

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 654**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/113** (2010.01)

**A61K 31/712** (2006.01)

**A61K 31/7125** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.10.2011** **E 11185129 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.01.2015** **EP 2581448**

54 Título: **ADN triciclo-fosforotioato**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**13.05.2015**

73 Titular/es:

**ASSOCIATION INSTITUT DE MYOLOGIE (20.0%)**  
**Bâtiment Babinski, 47-83, Boulevard de l'Hôpital**  
**75013 Paris, FR;**  
**UNIVERSITÄT BERN (20.0%);**  
**UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE (PARIS 6)**  
**(20.0%);**  
**INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA**  
**RECHERCHE MÉDICALE (INSERM) (20.0%) y**  
**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE**  
**SCIENTIFIQUE (CNRS) (20.0%)**

72 Inventor/es:

**LEUMANN, CHRISTIAN;**  
**GARCIA, LUIS y**  
**VOIT, THOMAS**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 535 654 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

ADN triciclo-fosforotioato

### Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que contiene una secuencia de triclonucleósidos unidos por enlaces fosforotioato internucleosídicos. La invención también se refiere a oligonucleótidos antisentido sintéticos y a métodos en los que se emplean.

### Antecedentes de la invención

10 Los triciclo-ADN (tc-ADN) son una clase de análogos de ADN restringidos en los que cada nucleótido está modificado por la introducción de un anillo de ciclopropano para restringir la flexibilidad conformacional de la cadena principal y optimizar la geometría del ángulo de torsión y de la cadena principal. Los tc-ADN que contienen adenina y timina homobásicos forman pares de bases A-T extraordinariamente estables con los ARN complementarios.

15 Recientemente, los autores de la presente invención han propuesto el uso de las propiedades ventajosas de esta clase de ácidos nucleicos en oligonucleótidos antisentido para el tratamiento diversas enfermedades. La Solicitud Internacional Núm. PCT/EP2010/054735 describe oligonucleótidos antisentido sintéticos y métodos que emplean oligonucleótidos antisentido para modificar eventos de corte y empalme que se producen durante el procesamiento del pre-ARNm o para regular a la baja la expresión de ARNm mutado que contiene secuencias repetidas, tales como, por ejemplo, CUG, CAG, y/o CCUG 3' o 5'. Más específicamente, se ha demostrado que los oligonucleótidos antisentido de triciclo-ADN son eficaces para facilitar la omisión de exones durante el procesamiento del pre-ARNm, para enmascarar secuencias intrónicas silenciadoras y/o secuencias tallo-bucle en el pre-ARNm, y en el direccionamiento de la destrucción del ARNm mediada por ARNasa.

25 La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es la miopatía hereditaria más común, que afecta aproximadamente a uno de cada 3500 varones, independientemente de la etnia. La consecuencia más importante de la DMD es que las fibras musculares se vuelven particularmente frágiles y la actividad muscular natural provoca daños generales en el tejido muscular. La carencia de distrofina hace que las fibras musculares sean particularmente vulnerables al estrés mecánico, y experimenten ciclos de necrosis recurrentes. Como resultado, los pacientes muestran una debilidad progresiva de los músculos esqueléticos, que con el tiempo son reemplazado por tejido adipofibrótico, lo que conduce a la pérdida de deambulación a la edad de doce años, con lo cual la muerte prematura es causada por insuficiencia respiratoria o cardiomiopatía. Además, aproximadamente un tercio de los pacientes con DMD también muestran deterioro cognitivo lo que sugiere una alteración notable de la función neuronal y cerebral. La DMD afecta a todos los músculos voluntarios e implica al corazón y a los músculos respiratorios en las fases más tardías de la enfermedad. El corazón y el SNC deberían por lo tanto preferiblemente ser el objetivo de cualquier terapia implementada para tratar o aliviar los síntomas de los pacientes con DMD.

35 Se buscó un nueva clase de compuestos que tuvieran una eficacia mejorada en comparación con los oligonucleótidos de triciclo-ADN. La presente invención describe la síntesis, propiedades y usos de los triciclo-nucleótidos fosforotioato.

### Compendio de la invención

40 Los autores de la presente invención han demostrado sorprendentemente que las moléculas de ácido nucleico que comprende los triciclo-nucleótidos fosforotioato son, además de su capacidad compartida con las moléculas de tc-ADN de ser activos en una amplia gama de músculos, altamente eficaces para penetrar en el tejido cardíaco y son altamente activos en células cardíacas. También se ha demostrado que tales triciclo-nucleótidos fosforotioato son capaces de rescatar la expresión de una proteína, en particular, la distrofina, en el SNC después de la administración sistémica.

45 La invención se refiere por lo tanto a moléculas de ácido nucleico que comprenden triciclo-nucleósidos unidos por enlaces fosforotioato internucleosídicos (enlaces 3'-OPS-O-5'). Las moléculas de ácido nucleico de la invención también son referidas como " triciclo-ADN fosforotioato " o "tc-ADN-PS" en la presente descripción.

La invención también se refiere a una composición que comprende un tc-ADN-PS y un portador. La composición puede ser en particular una composición farmacéutica, en donde el portador es un portador farmacéuticamente aceptable. La composición de la invención también puede comprender opcionalmente un agente activo adicional.

La presente invención también se refiere a un método para sintetizar moléculas de tc-ADN-PS.

50 Las moléculas de ácido nucleico de la invención son particularmente útiles como oligonucleótidos antisentido (AON), en particular para la obtención de un efecto antisentido en los músculos y en las células cardíacas, o en el SNC, en particular, después de la liberación sistémica del AON. La presente invención por lo tanto también proporciona AON de tc-ADN-PS

Puesto que los autores de la presente invención han demostrado que después de la administración sistémica, un AON de tc-ADN-PS de acuerdo con la invención puede corregir la expresión de la distrofina en los músculos, en el tejido cardíaco y en el SNC, la invención se refiere adicionalmente a métodos que emplean los AON de tc-ADN-PS para el tratamiento de enfermedades. Las enfermedades representativas incluyen, por ejemplo, enfermedades del corazón, tales como la cardiomiopatía hipertrófica obstructiva causada por mutaciones cMYBP-C y enfermedades neuromusculares tales como la distrofia muscular de Duchenne, la atrofia muscular espinal, y la distrofia miotónica de Steinert. Más generalmente, la invención se refiere a un método de corrección de la expresión génica anormal en una célula de un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto un oligonucleótido antisentido de tc-ADN-PS, en donde dicho oligonucleótido antisentido de tc-ADN-PS es complementaria a una porción de un ARN codificado por dicho gen. En una realización preferida, dicho oligonucleótido antisentido de tc-ADN-PS se administra periféricamente al sujeto en una cantidad suficiente para corregir dicha expresión anormal. La administración periférica preferida incluye la inyección sistémica tal como la inyección intravenosa, intraperitoneal o intra-arterial.

La invención también se refiere a un método de tratamiento de una enfermedad genética causada por la expresión génica anormal en un tejido o una célula de un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto un oligonucleótido antisentido de tc-ADN-PS, en donde dicho oligonucleótido antisentido de tc-ADN-PS es complementario a una porción de un ARN codificado por dicho gen. El oligonucleótido antisentido de tc-ADN-PS se administra de manera preferente periféricamente al sujeto en una cantidad suficiente para corregir dicha expresión anormal. En particular, el tejido o la célula se pueden seleccionar entre tejidos o células musculares, cardíacos y del SNC.

Se ha demostrado que los tc-ADN-PS de la presente invención son transportados en el torrente sanguíneo después de la aplicación subcutánea o sistémica intravenosa/intraperitoneal a todos los músculos esqueléticos, al SNC y al músculo cardíaco y absorbidos por estos tejidos.

Otros objetos y aplicaciones se harán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de la invención.

#### Descripción de los dibujos

La **Figura 1** muestra las estructuras químicas y las secuencias de oligonucleótidos de PMO morfolino, 2'O-Me-PS-ARN, tc-ADN y Tc-ADN fosforotioato utilizadas para la omisión del exón 23 del pre-ARNm de distrofina en ratón *mdx*.

La **Figura 2** es un gel de agarosa de reacciones de PCR anidadas que muestran la omisión del pre-ARNm de la distrofina en diferentes músculos de ratones *mdx* de 8 semanas de edad a los que se ha inyectado alternativamente a través de las rutas intravenosa y subcutánea 100 mg/kg de tc-oligonucleótido PS (+2-13). También se representa un diagrama que muestra los diferentes exones presentes en el pre-ARNm de la distrofina (con o sin la omisión del exón 23) y la posición de los cebadores utilizados para la PCR anidada.

Leyenda: **Detección del ARNm de distrofina con omisión del exón 23 en músculos *mdx* después del tratamiento sistémico con el oligómero tc-ADN-PS M23D (+2-13)**. Los ratones *mdx* fueron tratados dos veces por semana con inyecciones subcutáneas e intravenosas de M23D (+2-13) durante 8 semanas, con una dosis de 100 mg/kg de peso corporal. Una semana después de la última inyección, los músculos se recogieron y las muestras de ARN se analizaron mediante RT-PCR anidada con cebadores en los exones 20 y 26 del gen de distrofina. La banda de 903 pb corresponde al ARNm de distrofina sin omisión que incluye la mutación sin sentido *mdx*. El fragmento de 688 pb corresponde al ARNm con el exón 23 omitido. Obsérvese que el tratamiento sistémico con el oligómero tc-ADN-PS M23D (+2-13) induce un rescate significativa del ARNm de la distrofina en varios músculos esqueléticos, así como en el músculo cardíaco

La **Figura 3** es una inmunotinción de distrofina de músculos normal (A), *mdx* (B), y músculos de ratón *mdx* 8 semanas después de las inyecciones intravenosas y subcutáneas alternas de tc-oligonucleótido PS (+2-13) (C) cuádriceps, (D) tibial, (E) diafragma.

Leyenda: **Detección de distrofina en músculos *mdx* después del tratamiento sistémico con el oligómero tc-ADN-PS M23D (+2-13)**. Los ratones *mdx* fueron tratados dos veces por semana con inyecciones subcutáneas e intravenosas de M23D (+2-13) durante 8 semanas, con una dosis de 100 mg/kg de peso corporal. Una semana después de la última inyección, los músculos se diseccionaron y se procesaron para el análisis de inmunofluorescencia que implicaba la tinción con el anticuerpo monoclonal para distrofina NCL-DYS2. (A y B) muestran secciones transversales de los músculos normales y *mdx*. (C, D y E) muestran el inmunomarcaje de distrofina de muestras de músculo de *mdx* tratado: cuádriceps, tibial anterior y diafragma, respectivamente.

La **Figura 4** (A) es un diagrama que representa distrofina normal, distrofina *mdx* y distrofina restaurada *mdx* después de la omisión del exón 23, y el sitio de reconocimiento del anticuerpo Dys1.

La **Figura 4**(B) es un análisis de transferencia Western de distrofina en diferentes músculos de un ratón *mdx* después de inyecciones intravenosas y subcutáneas alternas de oligonucleótidos de tc-ADN (+2-13) (transferencia izquierda) y oligonucleótidos de tc-ADN-PS (+2-13) (transferencia derecha).

**Leyenda: Expresión de la proteína distrofina en músculos mdx después del tratamiento sistémico con cualquiera de los oligómeros de tc-ADN o tc-ADN-PS M23D (+2-13).**

(A) Ilustración esquemática de distrofinas esperada en músculos normales, mdx, y mdx tratados con M23D (+2-13) (inyecciones dos veces por semana - subcutánea e intravenosa - durante 8 semanas, con una dosis de 100 mg/kg).

(B) Transferencia Western (teñida con anticuerpo monoclonal NCL-DYS1) de la proteína total extraída de diferentes músculos de mdx después del tratamiento sistémico, con el oligómero tc-ADN M23D (+2-18) (\*, calles 1 a 7 - panel izquierdo) o tc-ADN fosforotioato (-PS) M23D (+2-18) (\*, calles 10 a 19 - panel derecho). La flecha indica la distrofina de 427 kD completa, detectada en músculo normal (calles 8 y 9). Obsérvese que la diferencia de 8 kD esperada entre las proteínas de tipo salvaje y rescatada no se pudo resolver en este tipo de gel. Cada calle se cargó con 100 µg de proteína total.

**Figura 5 - Expresión de la proteína distrofina en tres ratones mdx después del tratamiento sistémico con el oligómero tc-ADN-PS M23D (+2-13).**

Análisis de transferencia Western (que implica el anticuerpo monoclonal contra distrofina NCL-DYS1) de los extractos de proteína total (100 µg cargados) de cuádriceps (A) y tibial anterior (B) en 3 ratones mdx (\*) tratados dos veces por semana con inyecciones subcutáneas e intravenosas de tc-ADN fosforotioato (-PS) M23D (+2-13) (100 mg/kg) durante 8 semanas. La flecha indica la distrofina de 427 kD completa, detectada en las calles de los correspondientes controles de tipo salvaje para la comparación cuantitativa de la detección de la señal de distrofina. Los correspondientes músculos tipo salvaje se diluyeron (10 a 1,75%) en los extractos musculares mdx con el fin de normalizar la cantidad total de proteína cargada por calle (100 µg).

**Figura 6 - Expresión de la proteína distrofina en el músculo cardíaco en ratones mdx después del tratamiento sistémico con el oligómero tc-ADN-PS M23D (+2-13).** Resultados del análisis de transferencia Western (utilizando el anticuerpo monoclonal contra distrofina NCL-DYS1) de extractos de proteína total (100 µg cargados) aislados de los corazones de 3 ratones mdx tratados con el oligómero tc-ADN M23D (+2-13) (\*) (inyecciones dos veces por semana - subcutánea e intravenosa - a 100 mg/kg durante 8 semanas) (A); y 3 ratones mdx tratados en las mismas condiciones con el oligómero tc-ADN-fosforotioato (-PS) M23D (+2-13) (\*) (B). La flecha indica la distrofina de 427 kD completa, detectada en las calles de los correspondientes controles de tipo salvaje para la comparación semicuantitativa de la detección de la señal de distrofina. Los extractos de corazón de tipo salvaje se diluyeron de 30 a 5% para (A) y de 10 al 1,25% para (B) en extractos de corazón mdx con el fin de normalizar la cantidad de carga de proteína a 100 µg por calle.

La **Figura 7** es un gel de agarosa de reacciones de PCR anidadas que muestran la omisión de pre-ARNm de distrofina en el SNC de ratones mdx tratados con el oligonucleótido de tc-ADN M23D (+2-13) o el oligonucleótido de tc-ADN-PS M23D (+2-13). Las inyecciones se han realizado por vía sistémica o por medio de inyección estereotáxica en la cisterna magna.

**Leyenda: Detección del ARNm de distrofina con el exón 23 omitido en el sistema nervioso central mdx después del tratamiento sistémico, con oligómeros de tc-ADN o tc-ADN-PS M23D (+2-13).**

Los ratones mdx fueron tratados dos veces por semana con inyecciones subcutáneas e intravenosas de M23D (+2-13) (cadenas principales de tc-ADN o tc-ADN-PS) durante 8 semanas, con una dosis de 100 mg/kg de peso corporal. Una semana después de la última inyección, los cerebros se diseccionaron y se procesaron para la detección del ARNm de distrofina con el exón 23 omitido. Las muestras de ARN se analizaron mediante RT-PCR anidada utilizando cebadores (Fo(out)/Fi(in) hibridación exón 20 y Ro/Ri hibridación exón 26 y la unión 22-24, respectivamente) que permiten el reconocimiento específico del mensajero omitido como un fragmento de 398 pb. (A) SM, marcadores de tamaño; calle 2 - cerebelo mdx no tratado; calles 3-5 - corteza, hipocampo y cerebelo en SNC mdx un mes después de una inyección estereotáxica de 400 µg de tc-ADN M23D (+2-13) en la Cisterna Magna; calles 6 a 8 - cerebelo en 3 ratones mdx después de tratamiento sistémico con tc-ADN M23D (+2-13) (\*); calles 9 a 11 - cerebelo en 3 ratones mdx después de tratamiento sistémico con tc-ADN fosforotioato (-PS) M23D (+2-13) (\*). (B) Detección de la omisión del exón 23 en corteza, hipocampo y cerebelo después de 5 semanas de tratamiento sistémico utilizando una dosis de solo 25 mg/kg/semana de tc-ADN-PS M23D (+2-13). Obsérvese que el tratamiento sistémico con el oligómero tc-ADN-PS M23D (+2-13) rescata el ARNm de la distrofina en el SNC después de la administración sistémica, mientras que la forma tc-ADN requiere la liberación intra-cerebral.

#### Descripción detallada

La presente invención se basa en el descubrimiento inesperado de que las moléculas de triciclo-ADN fosforotioato, ilustradas por el oligonucleótido antisentido de tc-ADN-PS (AON) denominado M23D (+02-13), pueden ser liberadas en las células cardíacas y en el sistema nervioso central (SNC) después de la administración intravenosa para restaurar un gen mutado, tal como un *gen de distrofina* mutado .

Este descubrimiento es bastante sorprendente ya que la versión triciclo-ADN del oligonucleótido (es decir, un

oligonucleótido que comprende enlaces fosfodiéster clásicos entre triciclo-nucleósidos) no es tan eficaz en la modificación de la expresión génica en las células cardíacas, o en el SNC después de la administración sistémica. Además, ni PMO ni 2'OMe-PS-ARN han demostrado eficacia en la modificación de la expresión génica en las células cardíacas a dosis aceptables para el uso en seres humanos (Yokota, T et al Ann Neurol 2009; Mol Ther. 2010 Jun; 18(6):1210-7. Preclinical PK and PD studies on 2'-O-methyl-phosphorothioate RNA antisense nucleotides in the mdx mouse model. Heemskerk H, de Winter C, van Kuik P, Heuvelmans N, Sabatelli P, Rimessi P, Braghetta P, van Ommen GJ, de Kimpe S, Ferlini A, Aartsma-Rus A, van Deutekom JC.). Para estas químicas, entrar en las células cardíacas requiere o bien dosis excepcionalmente altas tales como 3 g/kg - 300 veces la dosis utilizada en las pruebas clínicas hoy en día (Gene Ther. Enero 2010; 17(1):132-40. Dose-dependent restoration of dystrophin expression in cardiac muscle of dystrophic mice by systemically delivered morpholino. Wu B, Lu P, Benrashid E, Malik S, Ashar J, Doran TJ, Lu QL) o bien péptidos penetrantes conjugados o estrés mecánico tal como ultrasonidos (Mol Ther. Jul 2011; 19(7):1295-303. Pip5 transduction peptides direct high efficiency oligonucleotide-mediated dystrophin exon skipping in heart and phenotypic correction in mdx mice. Yin H, Saleh AF, Betts C, Camelliti P, Seow Y, Ashraf S, Arzumanov A, Hammond S, Merritt T, Gait MJ, Wood MJ; Ultrasound Med Biol. Jun 2009; 35(6):976-84. Microbubble stability is a major determinant of the efficiency of ultrasound and microbubble mediated in vivo gene transfer. Alter J, Sennoga CA, Lopes DM, Eckersley RJ, Wells DJ.)

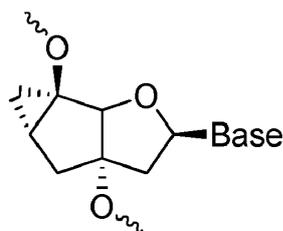
El presente descubrimiento encontrará una amplia aplicación en el tratamiento de enfermedades genéticas, en general, y más específicamente, en el tratamiento de enfermedades neuromusculares o musculoesqueléticas, tales como la distrofia muscular de Duchenne, la atrofia muscular espinal, y la distrofia miotónica de Steinert, y en el tratamiento de enfermedades del corazón o del SNC.

### Definiciones

Según se utiliza en la presente memoria, el término "enlace fosforotioato" se refiere a un radical 5' . . . -OP(S)-O- . . . 3' entre dos nucleósidos adyacentes en una molécula de ácido nucleico.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "triciclo-ADN (tc-ADN)" se refiere a una clase de análogos de ADN restringidos en los que cada nucleótido está modificado por la introducción de un anillo de ciclopropano para restringir la flexibilidad conformacional de la cadena principal y optimizar la geometría del ángulo de torsión y de la cadena principal (Ittig et al., *Nucleic Acids Res.* 32:346-353 (2004); Ittig et al., Prague, Academy of Sciences of the Czech Republic. 7:21-26 (Coll. Symp. Series, Hocec, M., 2005); Ivanova et al., *Oligonucleotides* 17:54-65 (2007); Renneberg et al., *Nucleic Acids Res.* 30:2751-2757 (2002); Renneberg et al., *Chembiochem.* 5:1114-1118 (2004); y Renneberg et al., *JACS.* 124:5993-6002 (2002)). Los tc-ADN que contienen adenina y timina homobásicos forman pares de bases A-T extraordinariamente estables con los ARN complementarios.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "triciclo-nucleósido" se refiere a una subunidad de una molécula de ácido nucleico que tiene la siguiente fórmula:



Según se utiliza en la presente memoria, el término "oligonucleótido antisentido (AON)" se refiere a un oligonucleótido que es capaz de interactuar con y/o hibridar con un pre-ARNm o un ARNm que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria modificando de este modo la expresión génica.

Según se utiliza en la presente memoria, una "base" se refiere a bases típicas de ADN y de ARN (uracilo, timina, adenina, guanina y citosina), y a bases modificadas o análogos de bases (p. ej., 5-metilcitosina, 5-bromouracilo o inosina). Un análogo de base es un producto químico cuya estructura molecular imita la de una base de ADN o ARN típica.

Según se utiliza en la presente memoria, "complementaria" se refiere a una molécula de ácido nucleico que puede formar uno o varios enlaces de hidrógeno con otra molécula de ácido nucleico, ya sea mediante emparejamiento tradicional de bases de Watson-Crick o mediante otros tipos de emparejamiento no tradicionales (p. ej., enlace de hidrógeno de Hoogsteen o Hoogsteen invertido) entre nucleósidos o nucleótidos complementarios. En referencia al AON de tc-ADN-PS de la presente descripción, la energía libre de unión para un AON de tc-ADN-PS con su secuencia complementaria es suficiente para permitir que la función correspondiente del AON de tc-ADN-PS prosiga y haya un grado suficiente de complementariedad para evitar la unión no específica del AON de tc-ADN-PS a secuencias no diana en condiciones en las que se desea la unión específica, es decir, en condiciones fisiológicas en el caso del tratamiento terapéutico *ex vivo* o *in vivo*. La determinación de las energías libres de unión para las

moléculas de ácido nucleico es bien conocida en la técnica (véanse p. ej., Turner et al., *CSH Symp. Quant. Biol. LII*:123-133(1987); Freier et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 83:9373-77 (1986); y Turner et al., *J. Am. Chem. Soc.* 109:3783-3785 (1987)). Por lo tanto, "complementario" (o "hibridable específicamente") son términos que indican un grado suficiente de complementariedad o emparejamiento preciso de manera que se produce una unión estable y específica entre un AON de tc-ADN-PS y un pre-ARNm o ARNm diana.

Se entiende en la técnica que una molécula de ácido nucleico no necesita ser 100% complementaria a una secuencia de ácido nucleico diana para ser específicamente hibridable. Es decir, dos o más moléculas de ácido nucleico pueden ser menos que totalmente complementarias. La complementariedad se indica mediante un porcentaje de residuos contiguos en una molécula de ácido nucleico que puede formar enlaces de hidrógeno con una segunda molécula de ácido nucleico. Por ejemplo, si una primera molécula de ácido nucleico tiene 10 nucleótidos y una segunda molécula de ácido nucleico tiene 10 nucleótidos, el emparejamiento de bases de 5, 6, 7, 8, 9, o 10 nucleótidos entre la primera y segunda moléculas de ácido nucleico representa una complementariedad de 50%, 60%, 70%, 80%, 90% y 100%, respectivamente. Moléculas de ácido nucleico "perfectamente" o "completamente" complementarias significan aquellas en las que todos los residuos contiguos de una primera molécula de ácido nucleico se unirán mediante puentes de hidrógeno con el mismo número de residuos contiguos de una segunda molécula de ácido nucleico, en donde las moléculas de ácido nucleico tienen el mismo número de nucleótidos (es decir, tienen la misma longitud) o las dos moléculas tienen diferentes longitudes.

Según se utilizan en la presente memoria, los términos "ARNm precursor" o "pre-ARNm" se refieren a una única cadena inmadura de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) que contiene una o más secuencias intermedias (intrones). El pre-ARNm es transcrito por una ARN polimerasa a partir de un molde de ADN en el núcleo celular y se compone de secuencias alternas de intrones y regiones codificantes (exones). Una vez que un pre-ARNm ha sido completamente procesado mediante corte y empalme de intrones y unión de exones, es referido como "ARN mensajero" o "ARNm", que es un ARN que está formado exclusivamente por exones. Los pre-ARNm eucarióticos existen solo transitoriamente antes de ser completamente procesados a ARNm. Cuando un pre-ARNm ha sido procesado correctamente a una secuencia de ARNm, es exportado fuera del núcleo y eventualmente traducido a proteína por los ribosomas en el citoplasma.

Según se utilizan en la presente memoria, los términos "corte y empalme" y "procesamiento" se refieren a la modificación de un pre-ARNm después de la transcripción, en la que se eliminan los intrones y se unen los exones. El corte y empalme se produce en una serie de reacciones que están catalizadas por un gran complejo de ARN-proteína compuesto de cinco ribonucleoproteínas nucleares pequeñas (snRNP) denominado espliceosoma. Dentro de un intrón, se requieren para el corte y empalme "sitio de empalme 3'", un sitio de empalme 5', y un sitio de ramificación. Los componentes de ARN de los snRNP interactúan con el intrón y pueden estar implicados en la catálisis.

El corte y empalme del pre-ARNm implica dos reacciones bioquímicas sucesivas. Ambas reacciones implican la transesterificación del espliceosoma entre los nucleótidos del ARN. En una primera reacción, el 2'-OH de un nucleótido del punto de ramificación específico dentro de un intrón, que se define durante el ensamblaje del espliceosoma, realiza un ataque nucleófilo sobre el primer nucleótido del intrón en el sitio de empalme 5' formando un intermedio de lazo. En una segunda reacción, el 3'-OH del exón 5' liberado realiza un ataque nucleofílico en el último nucleótido del intrón en el sitio de empalme 3' uniendo de ese modo los exones y soltando el lazo del intrón. El corte y empalme del pre-ARNm está regulado por numerosos factores tales como secuencias potenciadoras o inhibitoras del empalme exónico, y en particular también por secuencias silenciadoras intrónicas (ISS) y secuencias de tallo-bucle terminales (TSL).

Según se utilizan en la presente memoria, los términos "secuencias silenciadoras intrónicas (ISS)" y "tallo- bucle terminal (TSL)" se refieren a elementos de secuencia dentro de los intrones y exones, respectivamente, que controlan el corte y empalme alternativo mediante la unión de factores de proteínas que actúan en trans dentro de un pre-ARNm dando como resultado de ese modo el uso diferencial de los sitios de empalme. Típicamente, las secuencias silenciadoras intrónicas se encuentran entre los nucleótidos 8 y 16 y están menos conservadas que los sitios de empalme en las uniones exón-intrón. Las secuencias de tallo bucle terminales se encuentran típicamente entre los nucleótidos 12 y 24 y forman una estructura de bucle secundario debido a la complementariedad, y por lo tanto la unión, dentro de la secuencia de los nucleótidos 12-24.

Por "sujeto" se quiere significar un organismo, que es un donante o receptor de células explantadas o las propias células. "Sujeto" también se refiere a un organismo al que se pueden administrar las moléculas de ácido nucleico de esta descripción. En una realización, un sujeto es un mamífero o célula de mamífero. En otra realización, un sujeto es un ser humano o una célula humana.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad de molécula de tc-ADN-PS (p. ej., un AON) que es suficiente, en el sujeto (p. ej., ser humano) al cual se administra, para tratar o prevenir una enfermedad, trastorno, o afección indicados. La molécula de tc-ADN-PS de la presente invención, individualmente, o combinada o junto con otros fármacos, se puede utilizar para tratar enfermedades o afecciones, en particular las comentadas en la presente memoria. Por ejemplo, para tratar una enfermedad, trastorno o afección concretos, el tc-ADN-PS se puede administrar a un paciente o se puede administrar a otras

células apropiadas evidentes para los expertos en la técnica, individualmente o combinado con uno o más fármacos, en condiciones adecuadas para el tratamiento.

5 Según se utiliza en la presente memoria, la expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que son fisiológicamente tolerables y no producen típicamente una reacción alérgica o adversa similar, tal como molestias gástricas, mareos y similares, cuando se administran a un ser humano. Preferiblemente, según se utiliza en la presente memoria, el término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal, o enumerada en la Farmacopea Europea o de los Estados Unidos u otra Farmacopea reconocida generalmente para su uso en animales, y más concretamente en seres humanos.

10 Según se utiliza en la presente memoria, el término "aislado" significa que el material referenciado se ha retirado de su entorno nativo, p. ej., una célula. De este modo, un material biológico aislado puede estar libre de algunos o de todos los componentes celulares, es decir los componentes de las células en los que el material nativo se produce de forma natural (p. ej., componentes citoplásmicos o de membrana).

15 El término "purificado" según se utiliza en la presente memoria se refiere a un material que ha sido aislado en condiciones que reducen o eliminan la presencia de materiales no relacionados, es decir contaminantes, incluyendo materiales nativos a partir de los cuales se obtiene el material. Por ejemplo, una molécula de tc-ADN-PS purificada está preferiblemente sustancialmente libre de componentes celulares o de cultivo, incluyendo componentes de cultivo de tejidos, contaminantes, y similares. Según se utiliza en la presente memoria, el término "sustancialmente libre" se utiliza operacionalmente, en el contexto de las pruebas analíticas del material. Preferiblemente, el material  
20 purificado sustancialmente libre de contaminantes es puro en al menos 50%; más preferiblemente, puro en al menos 90%, y aún más preferiblemente puro en al menos 99%. La pureza se puede evaluar por medio de cromatografía, electroforesis en gel, inmunoanálisis, análisis de la composición, análisis biológico, y otros métodos conocidos en la técnica.

25 En la presente descripción, se entiende que cualquier intervalo de concentración, intervalo de porcentaje, intervalo de proporción, o intervalo de números enteros incluye el valor de cualquier número entero en el intervalo citado y, cuando sea apropiado, las fracciones del mismo (tal como una décima y una centésima de un número entero), a menos que se indique lo contrario. Además, se debe entender que cualquier intervalo numérico citado en la presente memoria referente a cualquier característica física, tal como subunidades de polímeros, tamaño o espesor, incluye cualquier número entero en el intervalo citado, a menos que se indique lo contrario. Según se utiliza en la presente  
30 memoria, "aproximadamente" o "que consiste esencialmente en" significa  $\pm 20\%$  del intervalo, el valor, o estructura, indicados a menos que se indique lo contrario.

35 Según se utiliza en la presente memoria, los términos "incluyen" y "comprenden" se utilizan indistintamente. Se debe entender que los términos "un", "una" y "uno" según se utiliza en la presente memoria se refieren a "uno o más" de los componentes enumerados. Se debe entender que el uso de la alternativa (p. ej., "o") significa uno cualquiera, ambos, o cualquier combinación de los mismos de las alternativas.

40 El término "alrededor de" o "aproximadamente" significa dentro de un intervalo estadísticamente significativo de un valor. Tal intervalo puede estar dentro de un orden de magnitud, preferiblemente dentro de 50%, más preferiblemente dentro de 20%, aún más preferiblemente dentro de 10%, e incluso más preferiblemente dentro de 5% de un valor o intervalo dados. La variación permisible abarcada por el término "alrededor de" o "aproximadamente" depende del sistema concreto bajo estudio, y puede ser fácilmente apreciada por un experto normal en la técnica.

45 En la nomenclatura utilizada en la presente memoria para designar los AON, tal como M23D (+02-13), M significa Ratón, 23 es el ID de exón, D significa el sitio Donador en el extremo 3' del exón, +2 indica que se inicia el antisentido dentro del exón, 2 nucleótido antes del sitio D, -13 indica que el antisentido termina en el 13<sup>o</sup> nucleótido del intrón aguas abajo.

Moléculas de triciclo-ADN fosforotioato de la invención y composiciones que las contienen

Un objeto de la invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que comprende triciclo-nucleósidos unidos por enlaces fosforotioato internucleosídicos (enlaces 3'-OPS-O-5'), también denominados "triciclo-ADN fosforotioato" o "tc-ADN-PS" en la presente descripción.

50 La molécula de ácido nucleico de la invención deriva de la mejora de la química de ADN que contiene triciclo-nucleósidos, en donde los enlaces fosfodiéster son remplazados por enlaces fosforotioato.

55 De acuerdo con la presente descripción, un ácido nucleico de la invención comprende al menos dos triciclo-nucleósidos adyacentes unidos por un enlace fosforotioato. Esta secuencia de radicales nunca ha sido descrita antes del presente estudio. Se entenderá que la molécula de ácido nucleico de la invención también puede comprender nucleósidos con diferente química tales como nucleósidos que contienen ribosa o desoxirribosa clásicos, nucleósidos de LNA y similares. La molécula de ácido nucleico de la invención también puede contener otros tipos de enlaces internucleosídico, además del enlace fosforotioato, p. ej. el enlace fosfodiéster clásico. Sin

embargo, la invención se refiere preferentemente a moléculas de ácido nucleico, en la que la proporción de triciclo-nucleósidos representan al menos 50%, preferentemente al menos 60%, 70%, 80%, 90% o 95% de los nucleósidos totales de la molécula de ácido nucleico. Además, la invención se refiere preferentemente a moléculas de ácido nucleico, en las que la proporción de enlaces fosforotioato internucleosídicos representa al menos 50%, preferentemente al menos 60%, 70%, 80%, 90% o 95% de los enlaces internucleosídicos totales de la molécula de ácido nucleico. En una realización concreta, todos los nucleósidos de la molécula de ácido nucleico de la invención son triciclo-nucleósidos. En otra realización, todos los enlaces entre subunidades son enlaces fosforotioato.

En una realización particularmente preferida, la molécula de ácido nucleico de la invención es una molécula de triciclo-ácido nucleico fosforotioato que comprende subunidades de nucleósidos unidas por enlaces entre subunidades, en donde todos los nucleósidos son triciclo-nucleósidos y todos los enlaces entre subunidades son enlaces fosforotioato.

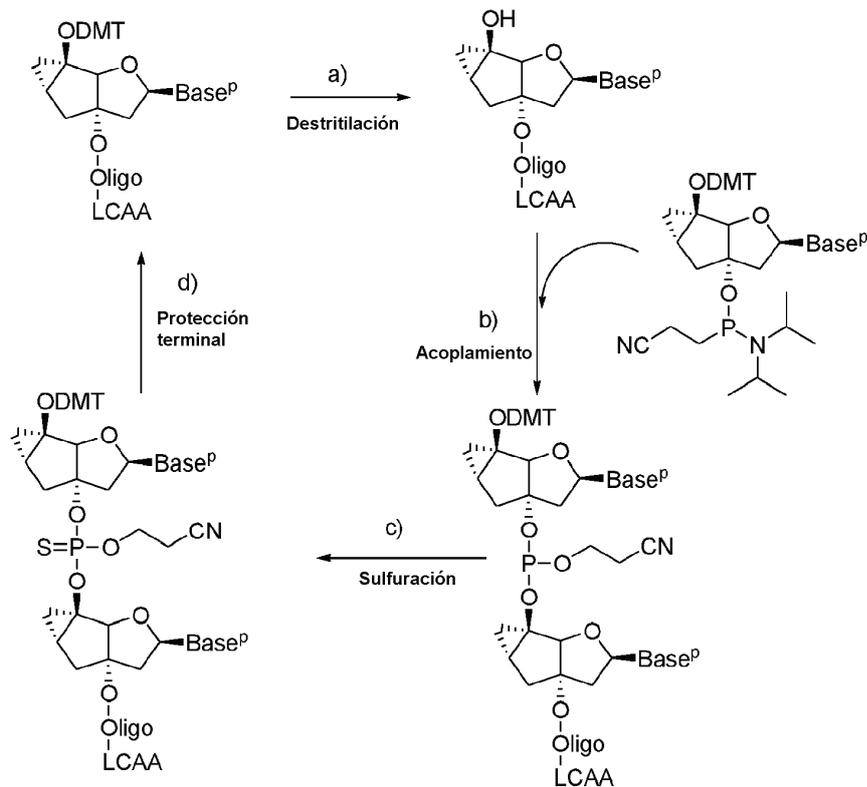
Las subunidades de nucleósidos comprendidas en el ácido nucleico de la invención pueden ser seleccionadas para que estén en una secuencia definida, tal como una secuencia de bases capaz de hibridarse específicamente con una secuencia diana de ácido nucleico de hebra sencilla o una secuencia que permita la formación de una estructura tríplex entre el ácido nucleico de la invención y un dúplex de ácido nucleico diana. Las secuencias de ácido nucleico diana pueden ser secuencias de ARN y ADN. Cuando sea deseable, los ácidos nucleicos de la presente invención se pueden marcar con un grupo informador, tal como marcas radiactivas, marcas de biotina, marcas fluorescentes y similares, para facilitar la detección del propio ácido nucleico y su presencia en, p. ej., en complejos de hibridación.

El tamaño de la molécula de ácido nucleico de la invención dependerá del uso concreto que para el que se prepare. Por ejemplo, el tc-ADN-PS de la invención puede tener al menos 3 nucleótidos de longitud, en particular al menos 5, 10, 20, 30, 40 o 50 nucleótidos de longitud. En una realización concreta, el tc-ADN-PS de la invención comprende entre 3 y 50 nucleótidos, en particular entre 5 y 21 nucleótidos, en particular entre 6 y 18 nucleótidos. Curiosamente, los oligonucleótidos de tc-ADN-PS pueden ser abreviados a 15 unidades simples, mientras que PMO morfolino y 2'-O-Me-PS-ARN están formados generalmente por 24 y 20 unidades simples, respectivamente. Por lo tanto, la invención se refiere en particular a tc-ADN-PS que comprenden o que consisten en, 15 nucleótidos.

La síntesis de triciclo-nucleósidos es conocida en la técnica, p. ej. como describen Steffens, R. y Leumann, C. (1997) Nucleic-acid analogs with constraint conformational flexibility in the sugar-phosphate backbone "Tricyclo-DNA". Parte 1. Preparation of [(5'R,6'R)-2-deoxy-3',5'-ethano-5',6'-methano-β-D-ribofuranosyl]thymine and -adenine, and the corresponding phosphoramidites for oligonucleotide synthesis. *Helv. Chim. Acta*, **80**, 2426-2439 y in Renneberg, D. y Leumann, C.J. (2002) Watson-Crick base-pairing properties of tricyclo-DNA. *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 5993-6002.

La síntesis de tc-ADN fósforotioato sigue los procedimientos clásicos de síntesis de oligonucleótidos en fase sólida de acuerdo con el enfoque de la fosforamidita (Oligonucleotide Synthesis - A Practical Approach, Oxford University Press, Oxford, 1984). En el método de síntesis de la presente invención, un primer triciclo-nucleósido se une a un soporte en fase sólida (p. ej. a un vidrio de poro controlado de alquilamina de cadena larga (LCAA-CPG) a través de un conector succinilo). El primer nucleótido tiene además un grupo 5'-OH protegido (p. ej. grupo dimetoxitritil - DMT -). El grupo 5' protegido se desprotege a continuación para formar un grupo 5'-OH libre al cual se añade un segundo nucleótido. El grupo 5'-OH libre del primer nucleótido se hace reaccionar con una triciclónucleosido-3'-O-cianoetil-N,N-diisopropilaminofosforamidita protegida en 5'. El grupo fosforamidita internucleosídico se sulfura después para formar un enlace internucleosídico fosforotioato entre el primer y segundo triciclo-nucleósidos. Los grupos 5'-OH que no han reaccionado del primer nucleótido se esterifican (se protegen terminalmente) para evitar la síntesis de secuencias incompletas. Esta secuencia se repite a continuación para añadir un tc-nucleótido PS más tantas veces como sea necesario para formar la secuencia de ácido nucleico completa deseada.

A continuación, se describe una realización concreta del método de síntesis de un ácido nucleico de acuerdo con la invención, con referencia al Esquema 1.



Esquema 1: Protocolo general para la síntesis de triciclo-ADN fosforotioato (tc-ADN-PS)

El ciclo de síntesis en el que una unidad adicional se une a la cadena en crecimiento consiste en cuatro etapas sucesivas (a-d). Después del ensamblaje de la cadena el oligonucleótido se desprende del soporte sólido y se desprotege de la forma habitual ( $\text{NH}_3$  conc.,  $55^\circ\text{C}$ , 16 h). El vidrio de poro controlado de alquilamina de cadena larga (LCAA-CPG), al cual se une el primer triciclo-nucleósido a través de un conector de succinilo, se utiliza como soporte sólido. Las síntesis se realizaron generalmente en la escala de 1,3 o 10  $\mu\text{moles}$  en un ensamblador de genes más sintetizador de ADN de Pharmacia. Los triciclo-fosforotioato-oligonucleótidos se sintetizan con un grupo fosfato o tiofosfato 5' terminal para asegurar la estabilidad química del extremo 5' (R. Steffens y C. J. Leumann, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, **121**, 3249-3255). A continuación se proporcionan las condiciones de cada etapa a) - d) y se optimizan para una síntesis de 10  $\mu\text{moles}$ .

a) Destrilación:

Se enjuaga con ácido dicloroacético al 3% en 1,2-dicloroetano (DCE) durante 1,5 min. A continuación se lava con DCE y  $\text{CH}_3\text{CN}$ .

15 b) Acoplamiento:

Se aplica disolución de fosforamidita ( $0,1 \mu\text{M}$  en  $\text{CH}_3\text{CN}^+$ ,  $400 \mu\text{L}$ ) y activador 5-etiltetrazol (ETT,  $0,25 \text{ M}$  en  $\text{CH}_3\text{CN}$ ,  $600 \mu\text{L}$ ) al soporte sólido. Tiempo de acoplamiento: 9 min. A continuación lavar con  $\text{CH}_3\text{CN}$ .

\*Se utiliza  $\text{CH}_3\text{CN}$  para los elementos fundamentales tc-T, tc-G y tc-C. Por razones de solubilidad el elemento fundamental tc-A se utiliza en DCE seco como disolvente.

20 c) Sulfuración:

Se enjuaga bis(fenilacetil)disulfuro (PADS) en piridina seca/ $\text{CH}_3\text{CN}$  1/1 ( $0,2 \text{ M}$ ) se vacía sobre el soporte sólido durante 3 min. A continuación se lava con  $\text{CH}_3\text{CN}$

d) Protección terminal:

25 Los grupos 5'-hidroxilo que no han reaccionado se protegen terminalmente utilizando disolución de CapA (4-dimetilaminopiridina (DMAP,  $0,5 \text{ M}$ ) en  $\text{CH}_3\text{CN}$ ) y de CapB (anhídrido acético ( $\text{Ac}_2\text{O}$ ), colidina en  $\text{CH}_3\text{CN}$  (2:3:5)) durante 20 s cada uno. A continuación se lava con  $\text{CH}_3\text{CN}$ .

Los elementos fundamentales de tc-ADN fosforamidita utilizados para la síntesis de la molécula de ácido nucleico de la invención se pueden sintetizar como describe Steffens y Leumann, C. en *Helv. Chim. Acta* **80**:2426-2439 (1997).

Los ciclos de prolongación de la cadena pueden ser esencialmente idénticos a los de la síntesis de oligodeoxinucleótidos naturales. Véase, Pharmacia LKB User's Manual (56-1111-56) (Gene assembler special/4 primers).

5 El tc-ADN-PS de la invención puede ser un oligonucleótido antisentido complementario a una porción de un ARN codificado por un gen, en particular un gen humano. La presente invención también se refiere por lo tanto a un oligonucleótido antisentido de triciclo-ADN fosfortioato.

Las moléculas de tc-ADN-PS de la presente invención se pueden formular en una composición, con un portador. La composición puede ser una composición farmacéutica, siendo el portador un portador farmacéuticamente aceptable.

10 De este modo, la invención se refiere también a una composición farmacéutica que comprende un ácido nucleico de la invención, que es, en particular, un oligonucleótido antisentido complementario a una porción de un ARN codificado por un gen, en particular un gen humano, y en donde dicha composición comprende adicionalmente un portador farmacéuticamente aceptable. Además, la invención también se refiere a una molécula de ácido nucleico de la invención, combinada con otro agente terapéutico. La molécula de ácido nucleico de la invención y el otro agente terapéutico se pueden formular en una composición farmacéutica, o son parte de una preparación combinada (kit de partes), para uso simultáneo, separado o sucesivo. El experto en la técnica adaptará el otro agente terapéutico y la secuencia del ácido nucleico de la invención a la enfermedad concreta que se pretenda tratar.

15 Las moléculas de tc-ADN-PS descritas en la presente memoria pueden estar mezcladas con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas. Tales excipientes son agentes de suspensión, por ejemplo carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, hidropropil-metilcelulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma de tragacanto y goma arábiga; los agentes dispersantes o humectantes pueden ser un fosfátido de origen natural, por ejemplo, lecitina, o productos de condensación de un óxido de alquileo con ácidos grasos, por ejemplo estearato de polioxietileno, o productos de condensación de óxido de etileno con alcoholes alifáticos de cadena larga, por ejemplo heptadecaetilenoxicetanol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y un hexitol tal como monooleato de polioxietilenosorbitol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo monooleato de polietilensorbitán. Las suspensiones acuosas también pueden contener uno o más conservantes, por ejemplo p-hidroxibenzoato de etilo o n-propilo. Los polvos y gránulos dispersables adecuados para la preparación de una suspensión acuosa mediante la adición de agua proporcionan el ingrediente activo mezclado con un agente dispersante o humectante, agente de suspensión y uno o más conservantes.

20 30 Las composiciones de tc-ADN-PS pueden estar en la forma de una suspensión acuosa u oleaginoso inyectable estéril. Las suspensiones se pueden formular de acuerdo con la técnica conocida utilizando los agentes dispersantes o humectantes adecuados y agentes de suspensión que se han mencionado anteriormente. La preparación inyectable estéril también puede ser una disolución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable no tóxico, por ejemplo en forma de una disolución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear se encuentran agua, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro sódico. Además, se emplean convencionalmente aceites fijados estériles como disolvente o medio de suspensión. Para este propósito, se puede emplear cualquier aceite fijado blando incluyendo mono- o diglicéridos sintéticos. Además, los ácidos grasos tales como el ácido oleico encuentran uso en la preparación de inyectables.

35 40 La presente descripción también incluye composiciones preparadas para el almacenamiento o administración que incluyen una cantidad farmacéuticamente eficaz de la molécula de tc-ADN-PS deseada de la invención en un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable. Los portadores o diluyentes aceptables para uso terapéutico son bien conocidos en la técnica farmacéutica, y se describen, p. ej., en *Remington Pharmaceutical Sciences* (Mack Publishing Co., AR Gennaro edit., 1985). Por ejemplo, se pueden proporcionar conservantes y estabilizantes. Estos incluyen benzoato de sodio, ácido sórbico y ésteres de ácido p-hidroxibenzoico. Además, se pueden utilizar antioxidantes y agentes de suspensión.

45 La presente descripción también proporciona composiciones y métodos para facilitar la omisión de exones o enmascarar el silenciamiento intrónico o los tallo-bucles terminales en un pre-ARNm o para dirigir la destrucción de ARNm en una célula u organismo. En realizaciones relacionadas, esta descripción proporciona métodos y composiciones que comprenden una molécula de tc-ADN-PS de acuerdo con la invención para tratar a un sujeto, incluyendo una célula, tejido o individuo humano, que tiene una enfermedad o está en riesgo de desarrollar una enfermedad, en particular una de las enfermedades específicas descritas en la presente memoria. En una realización, el método incluye la administración de una molécula de tc-ADN-PS de la presente invención o una composición farmacéutica que contiene la molécula de tc-ADN-PS a una célula o un organismo, tal como un mamífero, de manera que se modifica el procesamiento de un pre-ARNm o se dirige la destrucción de un ARNm. 55 Los sujetos mamíferos susceptibles de tratamiento utilizando las composiciones y métodos de la presente invención incluyen aquellos que sufren de uno o más trastornos que son susceptibles de tal tratamiento, tales como, por ejemplo, Distrofia Muscular de Duchenne, Atrofia Muscular Espinal, o Distrofia Miotónica de Steinert.

Las composiciones de tc-ADN-PS de la presente descripción se pueden emplear eficazmente como formulaciones farmacéuticamente aceptables. Las formulaciones farmacéuticamente aceptables evitan, alteran la aparición o la

gravedad, o tratan (alivian uno o más síntomas en un grado detectable o medible) de un estado de enfermedad u otra afección adversa en un paciente. Una formulación farmacéuticamente aceptable incluye sales de los compuestos anteriores, p. ej., sales de adición de ácido tales como sales del ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido acético, y ácido bencenosulfónico. Una composición o formulación farmacéutica se refiere a una composición o formulación en una forma adecuada para la administración, p. ej., administración sistémica, a una célula o paciente tal como un ser humano. Las formas adecuadas, en parte, dependen del uso o la ruta de entrada, por ejemplo, transdérmica o mediante inyección. Tales formas no deberían impedir que la composición o formulación alcance una célula diana (es decir una célula en la cual es deseable la liberación de la molécula de tc-ADN-PS). Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas inyectadas en el torrente sanguíneo deben ser solubles. Otros factores son conocidos en la técnica, e incluyen consideraciones tales como la toxicidad y las formas que impiden que la composición o formulación ejerzan su efecto.

Las composiciones farmacéuticas de esta descripción también pueden estar en forma de emulsiones de aceite en agua. La fase oleosa puede ser un aceite vegetal o un aceite mineral o mezclas de éstos. Los agentes emulsionantes adecuados pueden ser gomas de origen natural, por ejemplo goma arábiga o goma tragacanto, fosfátidos de origen natural, por ejemplo soja, lecitina, y ésteres o ésteres parciales derivados de ácidos grasos y hexitol, anhídridos, por ejemplo monooleato de sorbitán, y productos de condensación de dichos ésteres parciales con óxido de etileno, por ejemplo monooleato de polioxietilensorbitán.

La molécula de tc-ADN-PS de esta descripción se puede administrar a un paciente mediante cualquier medio convencional, con o sin estabilizantes, tampones, o similares, para formar una composición adecuada para el tratamiento. Cuando se desea utilizar un mecanismo de liberación de liposomas, se pueden seguir los protocolos convencionales para la formación de liposomas. De este modo las moléculas de ácido nucleico de la presente descripción se pueden administrar en cualquier forma, por ejemplo por vía transdérmica o mediante administración local, oral, rectal, intramuscular, intracárdica, intraperitoneal, loco-regional, sistémica (por ejemplo por vía intravenosa o intraarterial), o inyección intratecal .

Esta descripción también incluye el uso de composiciones que comprenden liposomas modificados en la superficie que contienen lípidos con poli(etilenglicol) (PEG-modificado, o liposomas o liposomas ocultos de larga circulación). Estas formulaciones ofrecen un método para aumentar la acumulación de la molécula de tc-ADN-PS de la invención en los tejidos diana. Esta clase de portadores de fármacos resiste la opsonización y eliminación por el sistema fagocítico mononuclear (MPS o RES), permitiendo así los tiempos de circulación de la sangre más largos y una mayor exposición del tejido a la molécula de tc-ADN-PS encapsulada (Lasic et al., *Chem. Rev* 95:2601-2627 (1995) e Ishiwata et al., *Chem. Pharm. Bull.* 43:1005-1011 (1995). Los liposomas de larga circulación mejoran la farmacocinética y la farmacodinámica de las moléculas de ácido nucleico, en particular en comparación con los liposomas catiónicos convencionales que se sabe que se acumulan en los tejidos del MPS (Liu et al., *J. Biol. Chem.* 42:24864-24870 (1995); Choi et al., Publicación PCT Núm. WO 96/10391; Ansell et al., Publicación PCT Núm. WO 96/10390; Holland et al., Publicación PCT Núm. WO 96/10392). También es probable que los liposomas de larga circulación protejan las moléculas de tc-ADN-PS de la invención de la degradación por nucleasas en un mayor grado en comparación con los liposomas catiónicos, basándose en su capacidad para evitar la acumulación en los tejidos del MPS metabólicamente agresivos tales como el hígado y el bazo.

Una dosis farmacéuticamente eficaz es la dosis requerida para prevenir, inhibir la aparición o tratar (aliviar un síntoma cierta medida, preferentemente todos los síntomas) de un estado de enfermedad. La dosis farmacéuticamente eficaz depende del tipo de enfermedad, la composición utilizada, la ruta de administración, el tipo de mamífero tratado, las características físicas del mamífero específico bajo consideración, la medicación concurrente y otros factores que reconocerán los expertos en las técnica médicas. Por ejemplo, se administra una cantidad entre 0,1 mg/kg y 100 mg/kg de peso corporal/día de los ingredientes activos dependiendo de la potencia de la molécula de tc-ADN-PS de esta descripción.

Los niveles de dosificación del orden de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 140 mg por kilogramo de peso corporal por semana son útiles en el tratamiento de las afecciones indicadas en la presente memoria (de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 7 g por paciente por semana). La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con los materiales portadores para producir una sola forma de dosificación varía dependiendo del anfitrión tratado y del modo concreto de administración. Las formas unitarias de dosificación generalmente contienen entre aproximadamente 1 mg y aproximadamente 500 mg de ingrediente activo.

Se entiende que el nivel de dosificación específico para cualquier paciente concreto depende de una variedad de factores incluyendo la actividad del compuesto específico empleado, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, el tiempo de administración, la ruta de administración y la velocidad de excreción, la combinación de fármacos y la gravedad de la enfermedad concreta que experimenta terapia. Tras la administración de las composiciones de acuerdo con las formulaciones y métodos de esta descripción, los sujetos de ensayo exhibirán una reducción de aproximadamente 10% a aproximadamente 99% en uno o más síntomas asociados con la enfermedad o trastorno que estén siendo tratados, en comparación con los sujetos tratados con placebo u otro control adecuado.

La molécula de tc-ADN-PS de la invención se puede administrar a las células mediante una variedad de métodos

conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo la administración en las formulaciones que comprenden la molécula de tc-ADN-PS sola, o que comprenden además uno o más componentes adicionales, tales como un portador, diluyente, excipiente, coadyuvante, emulsionante, tampón, estabilizante, conservante, o similar farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones, la molécula de tc-ADN-PS de la invención puede ser encapsulada en liposomas, administrada mediante iontoforesis, o incorporada a otros vehículos, tales como hidrogeles, ciclodextrinas, nanocápsulas biodegradables, microesferas bioadhesivas, o vectores proteínicos (véase, p. ej., la Publicación PCT Núm. WO 00/53722).

La inyección directa de la molécula de tc-ADN-PS de esta descripción, ya sea intravenosa, subcutánea, intramuscular, o intradérmica, puede tener lugar utilizando metodologías de agujas y jeringas convencionales, o mediante tecnologías sin aguja, tales como las descritas por Conry et al., en *Clin. Cancer Res.* 5:2330-2337 (1999), y la Publicación PCT Núm. WO 99/31262.

Otros métodos para la administración de moléculas de ácido nucleico son descritos, por ejemplo, por Boado et al., *J. Pharm. Sci.* 87:1308-1315 (1998); Tyler et al., *FEBS Lett.* 421:280-284 (1999); Pardridge et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 92:5592-5596 (1995); Boado, *Adv. Drug Delivery Rev.* 15:73-107 (1995); Aldrian-Herrada et al., *Nucleic Acids Res.* 26: 4910-4916 (1998); Tyler et al., *Proc. Acad. Sci. USA* 96:7053-7058 (1999); Akhtar et al., *Trends Cell Bio.* 2:139 (1992); "Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics," (ed. Akhtar, 1995); Maurer et al., *Mol. Membr. Biol.* 16:129-140 (1999); Hofland y Huang, *Handb. Exp. Pharmacol* 137:165-192 (1999); y Lee et al., *ACS Symp. Ser.* 752:184-192 (2000). Estos protocolos se pueden utilizar como suplemento o complemento de la liberación de prácticamente cualquier molécula de tc-ADN-PS contemplada dentro de esta descripción.

## Métodos de tratamiento

Como se mencionó anteriormente, la molécula de ácido nucleico de la presente invención puede ser un oligonucleótido antisentido (AON) diseñado con el fin de que sea complementario a un ARNm o pre-ARNm específicos. Los oligonucleótidos antisentido de la invención se pueden utilizar para el tratamiento de numerosas enfermedades, algunas de las cuales se describen a continuación. Por supuesto, las enfermedades ilustrativas proporcionadas más abajo no limitan la invención, y la nueva química proporcionada en la presente memoria se puede utilizar para el tratamiento de cualquier enfermedad que el experto imagine pueda ser tratable mediante la administración de un AON.

### Oligonucleótidos antisentido de triciclo-fosforotioato para el tratamiento de la Distrofia Muscular de Duchenne

En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona AON que se pueden ser empleados adecuadamente para el tratamiento de la Distrofia Muscular de Duchenne (DMD), una forma ligada a x recesiva grave de distrofia muscular que se caracteriza por la rápida progresión de la degeneración muscular, conduciendo eventualmente a pérdida de deambulación, parálisis y muerte. La DMD es causada por una mutación, tal como una mutación sin sentido o de desplazamiento del marco, en el gen de la distrofina, que está situado en el cromosoma X humano. El gen de la distrofina codifica la proteína distrofina, un componente estructural importante del tejido muscular que proporciona estabilidad estructural al sarcolema de las fibras musculares, así como al complejo de distroglicano (DGC), ubicado en la membrana celular. Una mutación sin sentido o de desplazamiento del marco da como resultado la terminación prematura de la traducción y, por lo tanto, una proteína distrofina truncada C-terminalmente, no funcional.

La DMD causada por una o más mutaciones de parada o mutaciones por desplazamiento del marco se puede aliviar mediante la escisión de uno o varios exones con el fin de restaurar el marco de lectura de la traducción y por lo tanto restaurar la secuencia de ARNm aguas abajo de la mutación. Para lograr esto, como parte de la presente descripción, las moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la invención se desarrollaron como AON antisentido para dirigirse a las regiones dentro del pre-ARNm que pueden enmascarar el reconocimiento del espliceosoma de uno o más exones. Localizando estas regiones con AON de tc-ADN-PS, los exones pueden ser retirados por medio de corte y empalme alternativo para producir ARNm de distrofina maduro, con una supresión parcial interna, pero funcional.

Por lo tanto, los AON de tc-ADN-PS descritos en la presente memoria son eficaces para facilitar la omisión de uno o más exones mutados en un gen de la distrofina durante el procesamiento de un pre-ARNm de distrofina restaurando de ese modo el marco de lectura apropiado del ARNm de distrofina resultante, que, cuando se traduce, produce una proteína distrofina semi-funcional. Por lo tanto, los AON de tc-ADN-PS descritos en la presente memoria se pueden utilizar terapéuticamente para los pacientes aquejados de DMD.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "omisión de exón" se refiere a la modificación de corte y empalme del pre-ARNm mediante la localización de los sitios donadores y/o aceptores de empalme en un pre-ARNm con uno o más oligonucleótidos antisentido complementarios (AON). Al bloquear el acceso de un espliceosoma a uno o más sitios donadores o aceptores de empalme, o por supuesto cualquier otro sitio dentro de un exón o intrón implicado en la definición de corte y empalme, un AON puede evitar una reacción de corte y empalme causando de ese modo la delección de uno o más exones de un ARNm procesado completamente. La omisión de exones se consigue en el núcleo durante el proceso de maduración de los pre-ARNm. Incluye el enmascaramiento de las

secuencias clave implicadas en el corte y empalme de exones localizados mediante el uso de oligonucleótidos antisentido (AON) que son, por ejemplo, complementarios a secuencias donadoras de empalme dentro de un pre-ARNm. Los AON de tc-ADN-PS proporcionados en la presente memoria se puede emplear adecuadamente para la omisión de exones a través de la enmascaramiento de los sitios de empalme en las uniones intrón/exón dentro de un pre-ARNm de distrofina facilitando de este modo la delección de un exón mutante durante el procesamiento del pre-ARNm a un ARNm maduro.

Por ejemplo, una mutación sin sentido o de desplazamiento del marco en el exón 23 o el exón 50 de un gen de la distrofina proporciona una proteína distrofina truncada carboxi-terminalmente, no funcional. Mediante la hibridación con nucleótidos que comprenden un sitio donador de empalme de pre-ARNm de distrofina en el intrón 23 o el intrón 51, respectivamente, y los nucleótidos 5' adyacentes del exón 23 o el exón 51, los AON de tc-ADN-PS descritos en la presente memoria son capaces de prevenir la inclusión del exón 23 o el exón 51 mutados en el transcrito de ARNm maduro. La expresión de ese transcrito de ARNm maduro proporciona una proteína distrofina semi-funcional que tiene una supresión en los aminoácidos codificados por el exón 23 o los exones 50 y 51 pero que incluye los aminoácidos de distrofina tanto N-terminal como C-terminal para aquellos aminoácidos eliminados.

Los AON de tc-ADN-PS descritos en la presente memoria para la omisión de un exón durante el procesamiento de un pre-ARNm de distrofina contienen típicamente entre 6-22 triciclo-nucleótidos PS contiguos, en particular entre 8-20 triciclo-nucleótidos PS, más concretamente entre 10 y 18 triciclo-nucleótidos PS contiguos, en donde 6-16 nucleótidos, en particular 8-16 nucleótidos del AON de tc-ADN-PS son complementarios a un sitio donador de empalme intrónico de pre-ARNm de distrofina, en donde 2-8 nucleótidos del AON de tc-ADN PS son complementarios a una región exónica de pre-ARNm de distrofina, y donde el sitio donador de empalme intrónico es contiguo y se encuentra en posición 5' con respecto a la región exónica. Dependiendo de la aplicación precisa contemplada, los AON de tc-ADN-PS puede tener de entre 12 y 16 nucleótidos, o entre 13 y 15 nucleótidos y pueden comprender entre 6 y 14 nucleótidos que son complementarios al sitio donador de empalme intrónico y entre 2 y 5 nucleótidos que son complementarios a la región exónica.

Se ilustran en la presente memoria AON de tc-ADN-PS diseñados para omitir un exón 23 mutado dentro de un pre-ARNm de distrofina. Los AON de tc-ADN comprenden la secuencia de nucleótidos 5'-AACCTCGGCTTACCT-3' (M23D (+02-13), SEQ ID NO: 1) e hibridan específicamente con los nucleótidos en el extremo 3' del intrón 23 del pre-ARNm de distrofina y con los nucleótidos en el extremo 5' contiguo del exón 23 del pre-ARNm de distrofina. Un AON alternativo que se puede utilizar es la secuencia 5'-GGCCAAACCTCGGCTTACCT-3' (M23D (+2-18), SEQ ID NO: 2).

También se proporcionan AON de tc-ADN-PS diseñados para omitir un exón 51 mutado dentro de un pre-ARNm de distrofina. Los AON de tc-ADN comprenden una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en 5'-AGAAATGCCATCTTC-3' (H51 (+68+82), SEQ ID NO: 3), 5'-AAATGCCATCTTCCT-3' (H51 (+70+84), SEQ ID NO: 4), 5'-TGCCATCTTCCTTGA-3' (H51 (+73+87), SEQ ID NO: 5) y 5'-GCAGTTTCCTTAGTAA-3' (H51 (+40+55), SEQ ID NO: 6), y hibridan específicamente con los nucleótidos en el extremo 3' del exón 51 del pre-ARNm de distrofina y con los nucleótidos en el extremo 5' del exón 51 de pre-ARNm de distrofina.

#### *Oligonucleótidos antisentido de triciclo-ADN fosforotioato para el tratamiento de la Atrofia Muscular Espinal*

En otras realizaciones, la presente descripción proporciona AON de tc-ADN-PS que se pueden emplear adecuadamente para el tratamiento de la Atrofia Muscular Espinal (SMA, por su sigla en inglés). La SMA es causada por mutaciones en ambas copias del gen SMN1, que en una célula normal se caracteriza por la presencia de los exones 7 y 8 en el ARNm procesado completamente. Un segundo gen presente en el ser humano en un número variable de copias, SMN2, porta una mutación silenciosa en el exón 7 que altera una secuencia potenciadora del empalme exónico. Como consecuencia, el empalme de SMN2 está alterado en comparación con SMN1 y solo 10% de una proteína SMN completa normal es transcrito a partir de este gen, mientras que otros transcritos de SMN2 no funcionales tienen suprimido el exón 7. La baja abundancia del transcrito completo normal de SMN2 no puede compensar plenamente la falta de transcrito SMN1, lo que provoca la enfermedad. Al enmascarar una secuencia de silenciamiento intrónico (ISS) y/o un tallo-bucle terminal (TSL) dentro de un pre-ARNm de SMN2, se espera que los AON de tc-ADN-PS descritos en la presente memoria sean capaces de facilitar la inclusión del exón 7 de SMN2 en un pre-ARNm de SMN2 procesado, que es traducido a una proteína SMN2 completamente funcional que es idéntica a la proteína SMN1 y por lo tanto capaz de compensar la pérdida de proteína SMN1 funcional. Cuando se expresan *en vivo*, las mayores cantidades de proteína SMN2 pueden revertir al menos parcialmente la Atrofia Muscular Espinal que es causada por mutaciones en el gen SMN1.

Por lo tanto, la presente descripción proporciona AON de tc-ADN-PS para facilitar la inclusión del exón 7 durante el procesamiento de un pre-ARNm de SMN2 en donde el AON de tc-ADN-PS tiene 6-22 triciclo nucleótidos de longitud, en particular entre 8-20 triciclo nucleótidos, más concretamente entre 10-18 triciclo nucleótidos de longitud y en donde el AON de tc-ADN-PS es complementario a una secuencia de silenciamiento intrónico (ISS) del pre-ARNm de SMN2 o un tallo-bucle terminal (TSL). Tal AON de tc-ADN-PS puede tener entre 13 y 17 nucleótidos, entre 12 y 16 nucleótidos, o entre 13 y 15 nucleótidos.

Se ilustran en la presente memoria AON de tc-ADN que comprenden la secuencia de 15 nucleótidos 5'-

CTTTCATAATGCTGG-3' (SMN2i7 (10;25), SEQ ID NO: 7), cuyos AON de tc-ADN son complementarios a una ISS pre-ARNm de SMN2 y que se pueden emplear para facilitar la inclusión del exón 7 atípico en un ARNm de SMN2 procesado. También se ilustran en la presente memoria AON de tc-ADN-PS que comprenden la secuencia de 13 nucleótidos 5'-TTAATTTAAGGAA-3' (SMN2e7 (39;51), SEQ ID NO: 8), cuyos AON de tc-ADN-PS son complementarios a un TSL2 de pre-ARNm de SMN2 y que también se pueden emplear para facilitar la inclusión del exón 7 en un ARNm de SMN2 procesado.

#### *Oligonucleótidos antisentido de triciclo-ADN fosforotioato para el tratamiento de la Distrofia Miotónica de Steinert*

En otras realizaciones adicionales, la presente descripción proporciona AON de tc-ADN-PS que se pueden emplear adecuadamente para el tratamiento de la Distrofia Miotónica de Steinert que es el resultado de amplificaciones CUG en el extremo 3' del ARNm que codifica DM1. Se cree que los ARNm de DM1 mutados que contienen amplificaciones CUG excesivas son secuestrados en el núcleo y acumulados para formar focos nucleares. Estos focos son estables y se cree que se unen a factores implicados en la maquinaria de corte y empalme afectando de ese modo ampliamente al transcriptoma. Como parte de la presente descripción, se espera que los AON de tc-ADN-PS se puedan emplear para localizar las secuencias CUG y facilitar la destrucción del ARNm de DM1 mutado conduciendo de ese modo a la liberación de los factores de empalme y a la eliminación de los focos nucleares. Sin desear vincularse a una teoría mecanicista particular, se cree adicionalmente que los AON de tc-ADN-PS descritos en la presente memoria son capaces de facilitar la destrucción del ARNm que contiene amplificaciones de CUG excesivas.

Por lo tanto, se describen AON de tc-ADN-PS que se pueden emplear adecuadamente para facilitar la destrucción de un ARNm de DM1 mutado que comprende un exceso de amplificaciones de CUG. Tales AON de tc-ADN-PS comprenden 9-27 triciclo nucleótidos, en donde el AON de tc-ADN es complementario a un ARNm de DM1 mutado que comprende una o más amplificaciones de CUG 3' y donde el AON de tc-ADN-PS es capaz de facilitar la destrucción del ARNm de DM1. Dependiendo de la aplicación precisa contemplada, el AON de tc-ADN-PS puede comprender entre 3 y 9; entre 4 y 8; o 5, 6, o 7 repeticiones contiguas de la secuencia de nucleótidos 5'-CAG-3' (SEQ ID NO: 9). Un AON de tc-ADN-PS ilustrativo que se espera que facilite la destrucción de una DM1 mutada comprende la secuencia de 15 nucleótidos 5'-CAGCAGCAGCAGCAG-3' (DM1 (CAG5), SEQ ID NO: 10). Otro AON de tc-ADN-PS ilustrativo que se espera que facilite la destrucción de una DM1 mutada comprende la secuencia de 15 nucleótidos 5'-CAGCAGCAGCAGCAGCAG-3' (DM1 (CAG7), SEQ ID NO: 11).

#### *Oligonucleótidos antisentido de triciclo-fosforotioato para el tratamiento de enfermedades del corazón*

La causa genética más común de la cardiomiopatía hipertrófica (HCM, en su sigla en inglés) son las mutaciones en la proteína C de unión a miosina cardíaca (para una revisión, véase: Schlossarek, S, et al. J Mol Cell Cardiol 50 (2011) 613-620). Muy recientemente, se ha aplicado la omisión de exones in vitro para modificar una molécula cMyBP-C mutada en miocitos ratón ki cMyBP-C (Gedicke, C, Behrens-Gawlik, V, Dreyfus, PA, Eschenhagen, T, Carrier, L. Specific skipping of exons using antisense oligoribonucleotides results in novel molecule in cMyBP-C knock-in mouse myocytes. Circ 201; 122 (Suppl): A 19079). Debido a su absorción en el tejido cardíaco después de la liberación sistémica, el tc-ADN-PS podría ser empleado adecuadamente para corregir la cMyBP mutada en el tejido cardíaco. Por supuesto, también se prevé que los presentes tc-ADN-PS sean útiles para la corrección de otras proteínas en el tejido cardíaco.

#### *Oligonucleótidos antisentido de triciclo-fosforotioato para el tratamiento de enfermedades del SNC*

En una realización concreta, las moléculas de ácido nucleico de la invención se pueden utilizar para el tratamiento de enfermedades que afectan a los músculos y el SNC. Como se mencionó anteriormente, aunque la distrofia muscular de Duchenne se caracteriza principalmente por la disfunción muscular observada, aproximadamente un tercio de los pacientes con DMD también muestran deterioro cognitivo que sugiere una alteración notable de la función neuronal y cerebral. Las moléculas de ácido nucleico de la invención se pueden utilizar para la restauración de la función neuronal y cerebral alterada resultante de la distrofina anormal.

Además, las moléculas de ácido nucleico de la invención se pueden utilizar para el tratamiento de enfermedades para las que los trastornos del SNC son las características principales, o una de las principales. Por ejemplo, los principios descritos anteriormente para la restauración de una proteína funcional (ya sea por omisión de exones o inclusión de exones) o para la destrucción de un pre-ARNm concreto, se puede trasladar al tratamiento de enfermedades tales como la amiotrofia muscular espinal, la distrofia miotónica o la enfermedad de Huntington.

#### **Ejemplos**

La descripción anterior describe generalmente la presente descripción, que se ilustra adicionalmente por medio de los siguientes ejemplos. Estos ejemplos específicos se describen únicamente para fines de ilustración, y no se pretende que limiten el alcance de esta descripción. Aunque en la presente memoria se han empleado objetivos, términos, y valores específicos, se entenderá que tales objetivos, términos, y valores son del mismo modo ilustrativos y no limitantes del alcance de esta descripción.

La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es un trastorno recesivo ligado al cromosoma X que afecta a uno de cada

3.500 varones nacidos vivos (Emery. *Neuromuscul. Disord.* 1991). Está causada por mutaciones en el gen que codifica la distrofina, una proteína grande (427 kDa) encontrada en una variedad de tejidos, especialmente en fibras del músculo estriado y neuronas en determinadas regiones del sistema nervioso central (Kunkel et al., *PNAS.* 1985; Muntoni F et al., *Lancet Neurol.* 2003). La distrofina se localiza cerca de la superficie interna de la membrana plasmática, conectando el citoesqueleto de actina a la matriz extracelular a través de un complejo de glicoproteína asociada a distrofina de membrana (Culligan et al., 1988). La carencia de distrofina hace que las fibras musculares sean particularmente vulnerables al estrés mecánico, y experimenten ciclos recurrentes de necrosis. Como resultado, los pacientes muestran una debilidad progresiva de los músculos esqueléticos, que con el tiempo son reemplazados por tejido adipofibrótico, lo que lleva a la pérdida de la deambulación a la edad de doce años, con lo cual se ocasiona la muerte prematura por insuficiencia respiratoria o cardiomiopatía. Además, aproximadamente un tercio de los pacientes con DMD también muestran deterioro cognitivo lo que sugiere una alteración notable de la función neuronal y cerebral (Bresolin et al., *Neuromuscul. Disord.* 1994).

La distrofina completa, traducida a partir de un transcrito de ARNm principal de 14 kb formado por 79 exones, es una proteína modular que puede apoyar por fortuna la delección de múltiples exones siempre que se conserve el marco de lectura abierto (Koenig et al., *Cell.* 1987). Este fenómeno se produce en la enfermedad clínicamente más leve de distrofia muscular de Becker (BMD), donde las delecciones que mantienen el marco de lectura abierto conducen a la síntesis de formas semi-funcionales truncadas de distrofina (Monaco et al. *Genomics.* 1988). Por lo tanto, se propuso, hace quince años, que la interferencia del proceso de corte y empalme de exones elegidos mediante el uso de oligonucleótidos antisentido (AON) podría ser un enfoque terapéutico adecuado para la DMD (Matsuo M. *Brain Dev.* 1996).

Se han sometido a ensayo exhaustivamente dos tipos de compuestos para determinar la omisión de exones inducida por antisentido, los oligómeros de ribosa modificados con 2'-O-metilo con una cadena principal de fosforotioato completa (20Me-PS) y los oligómeros de morfolino fosforodiamidato (PMO). Se ha demostrado que ambos tipos de moléculas antisentido rescatan la distrofina del músculo esquelético después de la liberación sistémica en modelos animales de DMD y más recientemente en pruebas clínicas. Tal como están las cosas, las pruebas clínicas que utilizaban la administración sistémica de 2'OMe-PS y PMO dirigidos al exón 51 del pre-ARNm de distrofina fueron bien toleradas sin eventos adversos graves relacionados con el fármaco (van Deutekom et al., *New. Engl. J. Med.* 2007; Kinali et al., *Lancet Neurol.* 2009; Goemans et al., *New. Engl. J. Med.* 2011; Cirak et al., *Lancet* 2011). Sin embargo, estos compuestos tienen una limitación importante y es que no se dirigen de manera eficaz al músculo cardíaco y no atraviesan la barrera hematoencefálica.

Aquí, los autores de la presente invención demuestran que la administración sistémica de oligómeros antisentido preparados de análogos de nucleótidos de triciclo-ADN (tc-ADN) permitió también el rescate de distrofina en los músculos esqueléticos en el modelo de ratón mdx. Por otra parte, la sustitución de azufre por oxígeno en la cadena principal del éster fosfato confirió nuevas propiedades a los antisentido de tc-ADN que fueron cruciales para su uso después de la administración sistémica. De hecho, los oligómeros de tc-ADN que contenían fosforotioato (PS) podrían dirigirse ahora de manera eficiente al músculo cardíaco, además de atravesar la barrera hematoencefálica para rescatar la distrofina mutada en el corazón y el sistema nervioso central.

### **Materiales y métodos:**

Modelo de ratón mdx.

El ratón mdx (Bulfield et al., 1984; Ryder-Cook et al., 1988) tiene una única sustitución de bases en el exón 23 del gen de la distrofina, que causa la terminación prematura de la cadena polipeptídica (Sicinski et al., 1989) de manera que no se produce la isoforma de músculo de 427 KDa completa de distrofina. Sin embargo, las otras isoformas producidas a partir de diferentes promotores (en 3' de la mutación puntual) no resultan afectadas (Fig. 5). Los mutantes son viables y fértiles. No tienen síntomas evidentes y resultan afectados mecánicamente durante toda su vida a menos que el daño muscular no esté provocado por una lesión mecánica o química (Reimann et al., 2000; Connolly et al., 2001). A nivel histológico, mdx muestra las características clásicas de músculo distrófico caracterizado por numerosas fibras necróticas, con la consiguiente infiltración de células fagocitarias (Coulton et al., 1988). Sin embargo, a diferencia de la DMD, un mecanismo compensatorio desconocido eficaz contrarresta la degeneración de este modo hasta el mantenimiento del proceso de regeneración para restaurar los daños mecánicos incesantes. El número de fibras revertientes es bajo, normalmente presente en alrededor de 1% de las fibras totales, aunque su número aumenta con la edad de los ratones (Lu et al., 2000). De acuerdo con la reducción gradual de exones, es posible la traducción de una distrofina acortada omitiendo el exón 23 en el curso del corte y empalme del ARNm.

Triciclo-ADN.

La síntesis de tc-ADN fósforotioato siguió los procedimientos clásicos de síntesis de oligonucleótidos en fase sólida de acuerdo con el enfoque de la fosforamidita. El ciclo de síntesis en el que una unidad adicional se une a la cadena en crecimiento consta de cuatro etapas sucesivas (a-d). Después de ensamblaje de la cadena, el oligonucleótido se separa del soporte sólido y se desprotege de la forma habitual (NH<sub>3</sub> conc., 55°C, 16 h). Se utiliza vidrio de poro controlado con alquilamina de cadena larga (LCAA-CPG), al cual está unido el primer tc-nucleósido a través de un

conector succinilo, como soporte sólido. Las síntesis se realizaron generalmente a una escala de 1,3 o 10  $\mu$ moles en un ensamblador de genes más sintetizador de ADN de Pharmacia. Los Tc-oligonucleótidos-PS se sintetizaron con un grupo fosfato o tiofosfato 5'-terminal para asegurar la estabilidad química del extremo 5'. Las condiciones de cada etapa a) - d) se proporcionan a continuación y se optimizan para una síntesis de 10  $\mu$ moles.

5 a) Destritilación: Se enjuaga con ácido dicloroacético al 3% en 1,2-dicloroetano (DCE) durante 1,5 min. A continuación se lava con DCE y CH<sub>3</sub>CN.

b) Acoplamiento: Se aplica disolución de fosforamidita (0,1 mM en CH<sub>3</sub>CN, 400 ml) y activador de 5-etiltiotetrazol (ETT, 0,25 M en CH<sub>3</sub>CN, 600 ml) al soporte sólido. Tiempo de acoplamiento: 9 min. A continuación se lava con CH<sub>3</sub>CN.

10 c) Sulfuración: Se enjuaga con bis(fenilacetil)disulfuro (PADS) en piridina seca/CH<sub>3</sub>CN 1/1 (0,2 M) el soporte sólido durante 3 min. A continuación se lava con CH<sub>3</sub>CN

d) Protección terminal: Se protegen terminalmente los grupos 5'-hidroxilo que no han reaccionado utilizando disolución de CapA (4-dimetilaminopiridina (DMAP, 0,5 M) en CH<sub>3</sub>CN) y de CapB (anhídrido acético (AC<sub>2</sub>O), colidina en CH<sub>3</sub>CN (2:3:5)) durante 20 s cada uno. A continuación se lava con CH<sub>3</sub>CN.

15 La secuencia antisentido para el rescate del pre-ARNm de distrofina mdx tenía 15 unidades simples de longitud y se dirigía al sitio de empalme donador del exón 23 (M23D (+2-13).

5' - AACCTCGGCTTACCT - 3' (SEQ ID NO: 1)

Administración sistémica de los tc-AND.

20 Los animales mdx fueron parte de una colonia de cría de ratones establecida en el laboratorio. Todos los procedimientos fueron realizados de conformidad con el acuerdo institucional y europeo para el tratamiento humanitario de animales. La mezcla de inyección contenía 2 mg de tc-ADN o tc-ADN-PS en 50  $\mu$ l de solución salina. La anestesia se mantuvo con isoflurano al 2%. Los animales recibieron 2 inyecciones por semana (100 mg de tc-ADN (-PS)/kg de peso corporal): intravenosas y subcutáneas durante 8 semanas. A continuación, los animales se sacrificaron y se diseccionaron los tejidos (músculos esqueléticos, corazón, cerebro), se congelaron instantáneamente en isopentano enfriado con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C.

25 Histología.

Se examinaron secciones seriadas transversales de 8  $\mu$ m, cortadas de las biopsias musculares, para determinar la distrofina utilizando el anticuerpo monoclonal NCL-DYS2 (Novocastra) para el dominio C-terminal. Los anticuerpos monoclonales se detectaron mediante un anticuerpo secundario anti-ratón de cabra Alexa488. Las secciones montadas se analizaron por medio de microscopía de fluorescencia (Zeiss). El tejido intermedio se recogió para el análisis de ARNm y proteínas.

30 Análisis de ARNm y proteínas.

El ARN total se aisló de secciones intermedias agrupadas utilizando reactivo TRIZOL (Life Technologies). Para detectar el ARNm de la distrofina, se realizó una RT-PCR anidada con 200 ng de ARN total utilizando el sistema de RT-PCR Access (Promega). La primera reacción se realizó con los siguientes cebadores durante 30 ciclos (94°C/30 s; 58°C/1 min; 72°C/2 min).

35 **Exon 20 Fo** CAGAATTCTGCCAATTGCTGAG (SEQ ID NO: 12)

**Exón 26 Ro** TTCTTCAGCTTGTGTCATCC (SEQ ID NO: 13)

**Oligo 22-24** GGAAATTACAGAATCACATAA (SEQ ID NO: 14)

40 A continuación, se amplificaron 2  $\mu$ l de la primera reacción durante 25 ciclos con:

**Exón 20 Fi** CCCAGTCTACCACCCTATCAGAGC (SEQ ID NO: 15)

**Exón 26 Ri** CCTGCCTTTAAGGCTTCCTT (SEQ ID NO: 16)

o

**Exón 20 Fi** CCCAGTCTACCACCCTATCAGAGC (SEQ ID NO: 17)

45 **Exon 22-24 Ri** GGAAATTACAGAATCACATAA (SEQ ID NO: 18)

Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa al 2%, y las bandas individuales se purificaron para el análisis de la secuencia.

Los extractos de proteína se obtuvieron a partir de secciones de tejidos agrupadas tratadas con SDS al 4%, Tris-HCl 125 mM, pH 6,4, urea 4 M,  $\beta$ -mercaptoetanol al 10%, glicerol al 10%, y azul de bromofenol al 0,001%. Se cargaron 100  $\mu$ g de proteína sobre geles de poliacrilamida al 3-8%, se sometieron a electroforesis, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se sondearon con NCL-DYS1 1:50, seguido de incubación con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (1:1000) y ECL Analysis System (Amersham).

### Resultados:

Los ratones mdx adultos se trataron dos veces por semana con inyecciones subcutáneas e intravenosas de oligómeros de tc-ADN o tc-ADN-PS M23D (+2-13) de 8 semanas, con una dosis de 100 mg/kg de peso corporal. Una semana después de la última inyección, los músculos se recogieron y las muestras de ARN se analizaron por medio de RT-PCR anidada con cebadores en los exones 20 y 26 del gen de la distrofina. La Figura 2 muestra la detección del ARNm de distrofina con el exón 23 omitido en músculos mdx después del tratamiento con tc-ADN-PS M23D (+2-13). La banda de 903 pb corresponde al ARNm de la distrofina sin omisión que incluía la mutación sin sentido mdx, mientras que el fragmento de 688 pb más corto corresponde al ARNm con el exón 23 omitido. Es significativo que el tratamiento sistémico con el oligómero que contiene fosforotioato induce un rescate significativo del ARNm de distrofina en varios músculos esqueléticos, incluyendo los músculos respiratorios, así como en el músculo cardíaco. De acuerdo con la generación de los transcritos omitidos, la proteína distrofina se detectó fácilmente tanto mediante inmunofluorescencia en las secciones de tejidos (figura 3) como mediante análisis de transferencia Western (figura 4 y figura 5). Los niveles de distrofina reflejaron los del ARNm rescatado y el procedimiento de omisión generó especies de proteínas inmunorreactivas con una movilidad alrededor de 427 kDa. La diferencia de 8 kD esperada entre las proteínas de tipo salvaje y rescatada no se pudo resolver sobre el tipo de gel utilizado en este estudio. El análisis de transferencia Western también confirmó la carencia de direccionamiento al corazón con la cadena principal de tc-ADN normal (es decir, con enlaces internucleosídicos fosfodiéster normales). Esto solo se logró con la cadena principal de fosforotioato como se ilustra en la figura 6. La modificación con fosforotioato confiere beneficio farmacocinético sustancial, los autores de la presente invención investigaron si tal oligonucleótido indicaba que los oligómeros de tc-ADN podían cruzar eficazmente el epitelio endotelial. Sin embargo, tales compuestos fueron ineficaces cuando se administraron por vía intravenosa y/o subcutánea, demostrando que no podían cruzar la barrera hematoencefálica. Es importante destacar que esto se logró con éxito por medio de las formas modificadas con fosforotioato de los tc-ADN, demostrando de ese modo su capacidad para acceder a todos los tejidos principales en los que la distrofina tenía que ser idealmente restaurada: músculos esqueléticos, corazón y SNC.

**Lista de Secuencias**

|    |   |    |
|----|---|----|
|    | <110> Association Institut de Myologie et al. |    |
|    | <120> ADN triciclo-fosforotioato              |    |
|    | <130> B1243EP00                               |    |
| 5  | <160> 18                                      |    |
|    | <170> PatentIn versión 3.5                    |    |
|    | <210> 1                                       |    |
|    | <211> 15                                      |    |
|    | <212> ADN                                     |    |
| 10 | <213> Artificial                              |    |
|    | <220>   |    |
|    | <223> tc-ADN PS AON M23D (+02-13)             |    |
|    | <220>   |    |
|    | <221> característica miscelánea               |    |
| 15 | <223> ADN triciclo-fosforotioato              |    |
|    | <400> 1                                       |    |
|    | aacctcggt tacct                               | 15 |
|    | <210> 2                                       |    |
|    | <211> 20                                      |    |
| 20 | <212> ADN                                     |    |
|    | <213> Artificial                              |    |
|    | <220>   |    |
|    | <223> tc-ADN PS AON M23D (+02 -18)            |    |
|    | <220>   |    |
| 25 | <221> característica miscelánea               |    |
|    | <223> ADN triciclo-fosforotioato              |    |
|    | <400> 2                                       |    |
|    | ggccaacct cggcttacct                          | 20 |
|    | <210> 3                                       |    |
| 30 | <211> 15                                      |    |
|    | <212> ADN                                     |    |
|    | <213> Artificial                              |    |
|    | <220>   |    |
|    | <223> tc-ADN PS AON H51 (+62+82)              |    |
| 35 | <220>   |    |
|    | <221> característica miscelánea               |    |
|    | <223> ADN triciclo-fosforotioato              |    |
|    | <400> 3                                       |    |
|    | agaaatgcca tcttc                              | 15 |
| 40 | <210> 4                                       |    |
|    | <211> 15                                      |    |
|    | <212> ADN                                     |    |
|    | <213> Artificial                              |    |
|    | <220>   |    |
| 45 | <223> tc-ADN PS AON H51 (+70+84)              |    |
|    | <220>   |    |
|    | <221> característica miscelánea               |    |
|    | <223> ADN triciclo-fosforotioato              |    |
|    | <400> 4                                       |    |

|    |                                    |    |
|----|------------------------------------|----|
|    | aaatgccatc ttct                    | 15 |
|    | <210> 5                            |    |
|    | <211> 15                           |    |
|    | <212> ADN                          |    |
| 5  | <213> Artificial                   |    |
|    | <220>                              |    |
|    | <223> tc-ADN PS AON H51 (+73+87)   |    |
|    | <220>                              |    |
|    | <221> característica miscelánea    |    |
| 10 | <223> ADN triciclo-fosforotioato   |    |
|    | <400> 5                            |    |
|    | tgccatcttc cttga                   | 15 |
|    | <210> 6                            |    |
|    | <211> 16                           |    |
| 15 | <212> ADN                          |    |
|    | <213> Artificial                   |    |
|    | <220>                              |    |
|    | <223> tc-ADN PS AON H51 (+40+55)   |    |
|    | <220>                              |    |
|    | <221> característica miscelánea    |    |
| 20 | <223> ADN triciclo-fosforotioato   |    |
|    | <400> 6                            |    |
|    | gcagttcct tagtaa                   | 16 |
|    | <210> 7                            |    |
| 25 | <211> 15                           |    |
|    | <212> ADN                          |    |
|    | <213> Artificial                   |    |
|    | <220>                              |    |
|    | <223> tc-ADN PS AON SMN2i7 (10;25) |    |
| 30 | <220>                              |    |
|    | <221> característica miscelánea    |    |
|    | <223> ADN triciclo-fosforotioato   |    |
|    | <400> 7                            |    |
| 35 | ctttcataat gctgg                   | 15 |
|    | <210> 8                            |    |
|    | <211> 13                           |    |
|    | <212> ADN                          |    |
|    | <213> Artificial                   |    |
| 40 | <220>                              |    |
|    | <223> tc-ADN PS AON SMN2e7 (39;51) |    |
|    | <220>                              |    |
|    | <221> característica miscelánea    |    |
|    | <223> ADN triciclo-fosforotioato   |    |
| 45 | <400> 8                            |    |
|    | ttaatttaag gaa                     | 13 |
|    | <210> 9                            |    |
|    | <211> 3                            |    |
|    | <212> ADN                          |    |
| 50 | <213> Artificial                   |    |
|    | <220>                              |    |
|    | <223> repetición de ADN            |    |

ES 2 535 654 T3

|    |  |    |
|----|--|----|
|    | <400> 9<br>cag   | 3  |
| 5  | <210> 10<br><211> 15<br><212> ADN<br><213> Artificial<br><br><220><br><223> tc-ADN PS AON DM1 (CAG5) |    |
| 10 | <220><br><221> característica miscelánea<br><223> ADN triciclo-fosforotioato                         |    |
|    | <400> 10<br>cagcagcagc agcag   | 15 |
| 15 | <210> 11<br><211> 21<br><212> ADN<br><213> Artificial<br><br><220><br><223> tc-ADN PS AON DM1 (CAG7) |    |
| 20 | <220><br><221> característica miscelánea<br><223> ADN triciclo-fosforotioato                         |    |
|    | <400> 11<br>cagcagcagc agcagcagca g  | 21 |
| 25 | <210> 12<br><211> 22<br><212> ADN<br><213> Artificial<br><br><220><br><223> Cebador Fo Exón 20       |    |
| 30 | <400> 12<br>cagaattctg ccaattgctg ag   | 22 |
| 35 | <210> 13<br><211> 20<br><212> ADN<br><213> Artificial<br><br><220><br><223> Cebador Ro Exón 26       |    |
| 40 | <400> 13<br>ttcttcagct tgtgtcatcc  | 20 |
|    | <210> 14<br><211> 21<br><212> ADN<br><213> Artificial  |    |
| 45 | <220><br><223> Oligo 22-24<br><br><400> 14<br>ggaaattaca gaatcacata a                                | 21 |
| 50 | <210> 15<br><211> 24<br><212> ADN  |    |

|    |                             |    |
|----|-----------------------------|----|
|    | <213> Artificial            |    |
|    | <220>                       |    |
|    | <223> Cebador Fi Exón 20    |    |
|    | <400> 15                    |    |
| 5  | cccagtctac caccctatca gagc  | 24 |
|    | <210> 16                    |    |
|    | <211> 20                    |    |
|    | <212> ADN                   |    |
|    | <213> Artificial            |    |
| 10 | <220>                       |    |
|    | <223> Cebador Ri Exón 26    |    |
|    | <400> 16                    |    |
|    | cctgccttta aggcttcct        | 20 |
|    | <210> 17                    |    |
| 15 | <211> 24                    |    |
|    | <212> ADN                   |    |
|    | <213> Artificial            |    |
|    | <220>                       |    |
|    | <223> Cebador Fi Exón 20    |    |
| 20 | <400> 17                    |    |
|    | cccagtctac caccctatca gagc  | 24 |
|    | <210> 18                    |    |
|    | <211> 21                    |    |
|    | <212> ADN                   |    |
| 25 | <213> Artificial            |    |
|    | <220>                       |    |
|    | <223> Cebador Ri Exón 22-24 |    |
|    | <400> 18                    |    |
|    | ggaaattaca gaatcacata a     | 21 |
| 30 |                             |    |
| 35 |                             |    |

**REIVINDICACIONES**

1. Una molécula de ácido nucleico que comprende triciclo-nucleósidos unidos por enlaces fosforotioato internucleosídicos (enlaces 3'-OPS-O-5').
- 5 2. La molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende entre 3 y 50 nucleótidos.
3. La molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que es complementaria a una secuencia diana.
4. la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 3, siendo la molécula de ácido nucleico un oligonucleótido antisentido complementario a una porción de un ARN codificado por un gen.
- 10 5. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1, que comprende o consiste en la secuencia 5'-AACCTCGGCTTACCT-3' (SEQ ID NO: 1).
6. Un método para sintetizar una molécula de triciclo-ADN fosforotioato, comprendiendo el método:
  - a) proporcionar un primer triciclo-nucleósido unido a un soporte en fase sólida, teniendo dicho primer nucleótido un grupo 5'-OH protegido;
  - 15 b) desproteger el grupo 5' para formar un grupo 5'-OH libre;
  - c) hacer reaccionar el grupo 5'-OH libre con un monómero de triciclonucleosido-3'-O-cianoetil-N,N-diisopropilaminofosforamidita protegido en 5' para formar un enlace fosforamidita internucleosídico entre el primer y una segundo triciclo-nucleósidos; y
  - d) sulfurar el grupo fosforamidita internucleosídico para formar un enlace internucleosídico fosforotioato entre el primer y segundo triciclo-nucleósidos.
- 20 7. Una composición farmacéutica que comprende una molécula de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en un portador farmacéuticamente aceptable.
8. La molécula de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para su uso como medicamento.
- 25 9. La molécula de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para su uso en el tratamiento de una enfermedad del corazón.
10. La molécula de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para su uso en el tratamiento de una enfermedad neuromuscular o musculoesquelética.
- 30 11. La molécula de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para uso en el tratamiento de una enfermedad del sistema nervioso central.
12. La molécula de ácido nucleico para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en donde la enfermedad del corazón, del SNC, neuromuscular o musculoesquelética resulta de una alteración de un gen, en donde dicha alteración es
  - una mutación en marco de un exón,
  - 35 una mutación que interrumpe el marco de lectura traduccional del gen, y el tc-ADN facilita la omisión de un exón con el fin de restablecer el marco de lectura;
  - una mutación deletérea que puede ser compensada mediante la inclusión de un exón atípico en el ARNm codificado por dicho gen, y el tc-ADN es complementario a una ISS o un TSL presentes en un pre-ARNm codificado por dicho gen y facilita la inclusión de un exón atípico, o
  - 40 una mutación que da como resultado la presencia de una o varias amplificaciones CUG 3' deletéreas en un ARNm codificado por dicho gen.
13. La molécula de ácido nucleico para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, para el tratamiento de la Distrofia Muscular de Duchenne, la Atrofia Muscular Espinal, o la Distrofia Miotónica de Steinert.

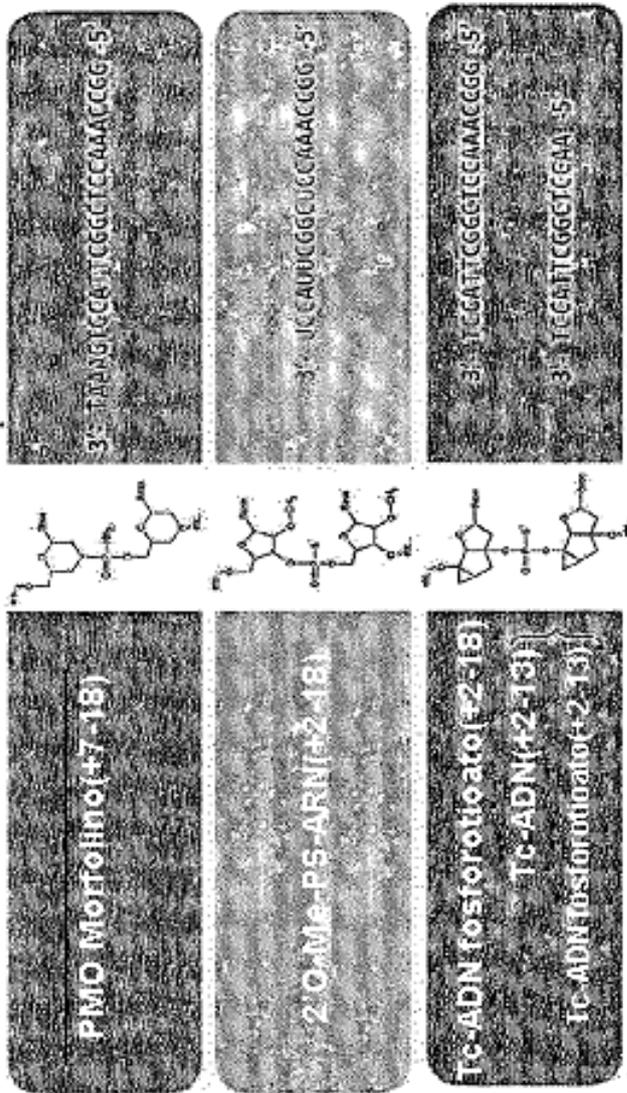


Figura 1

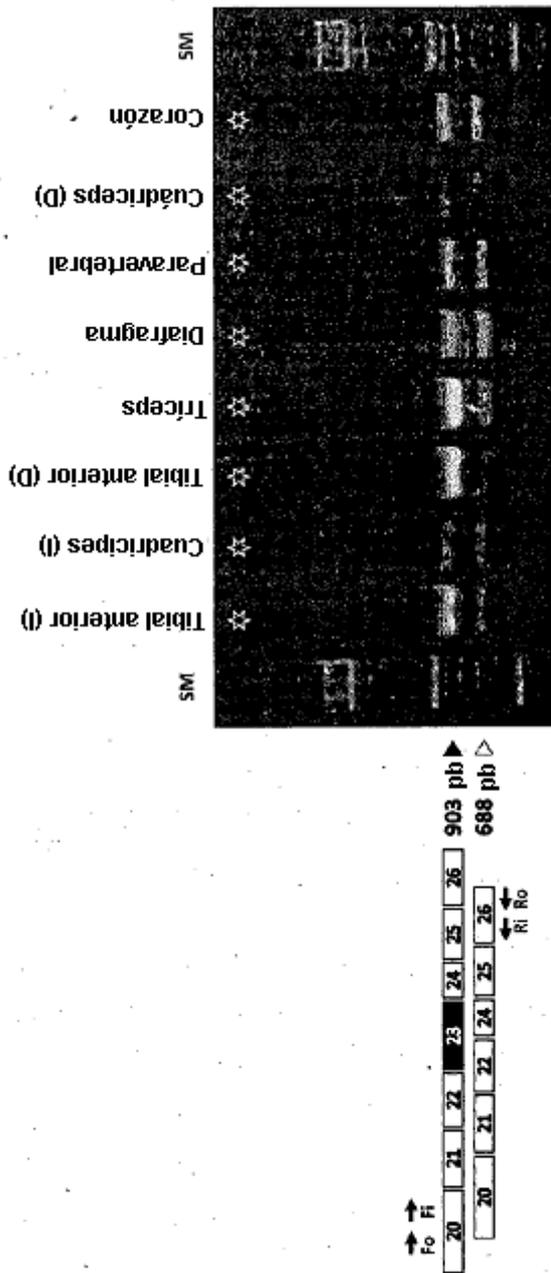
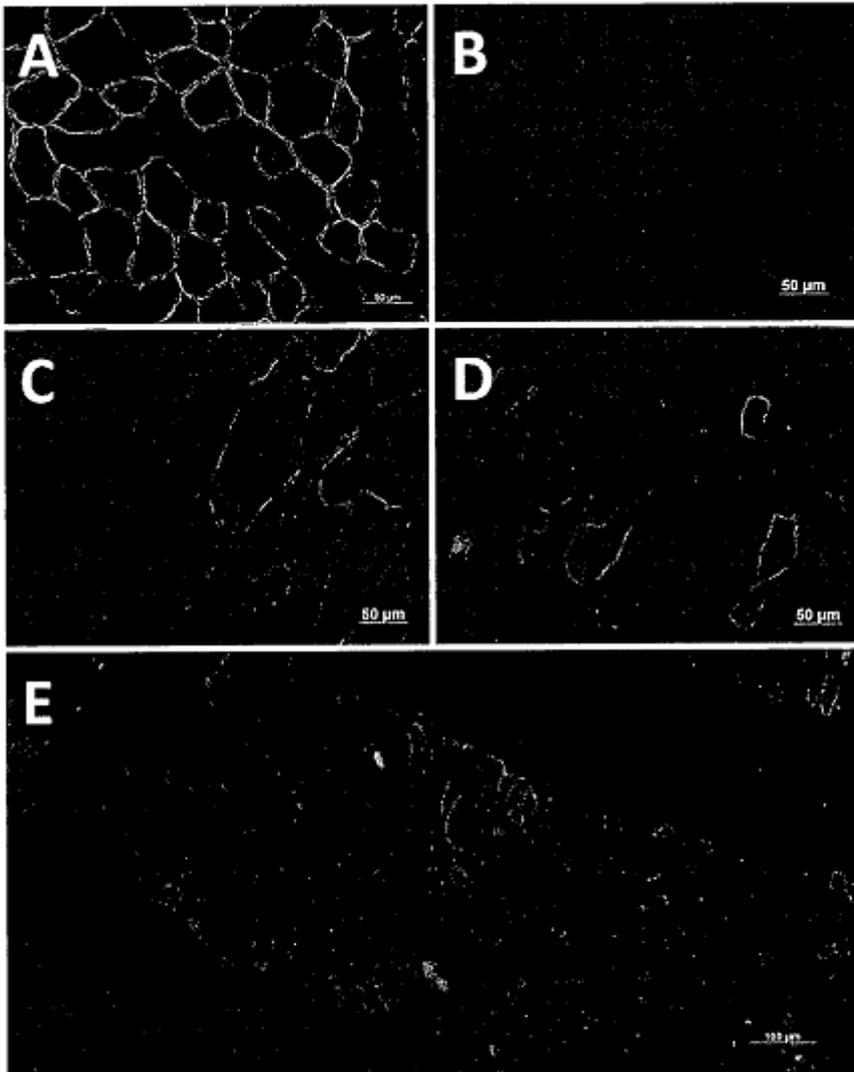


Figura 2



**Figura 3**

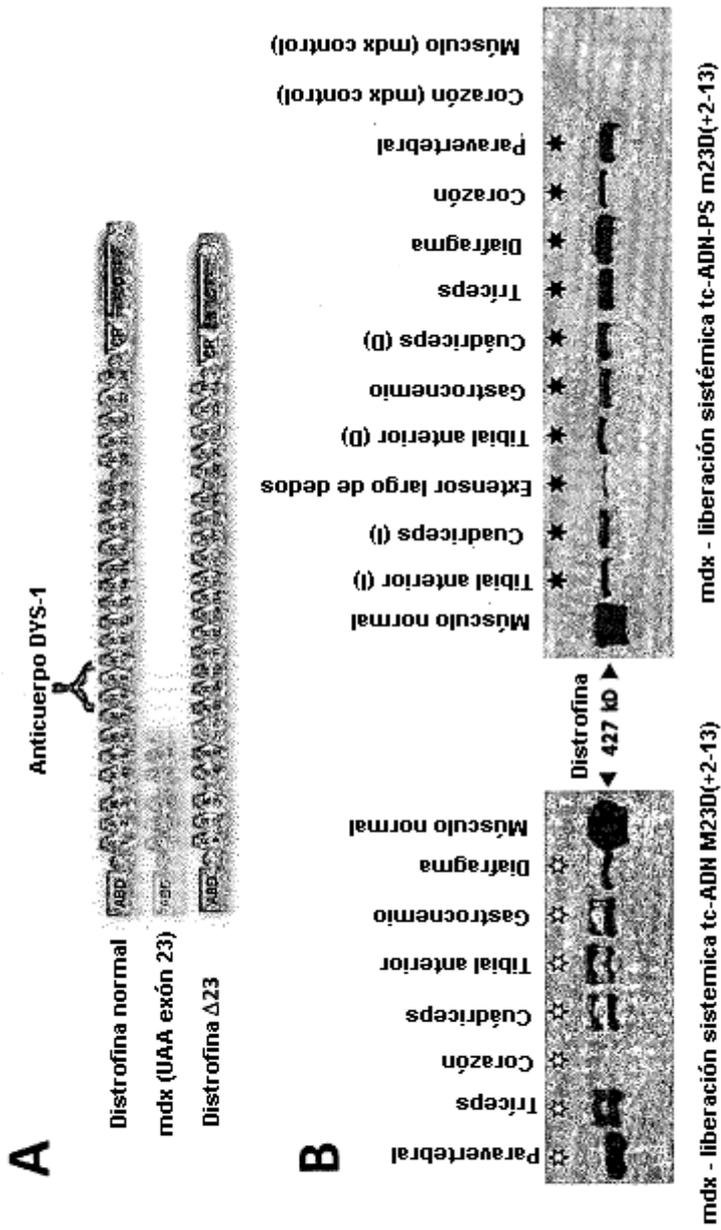


Figura 4

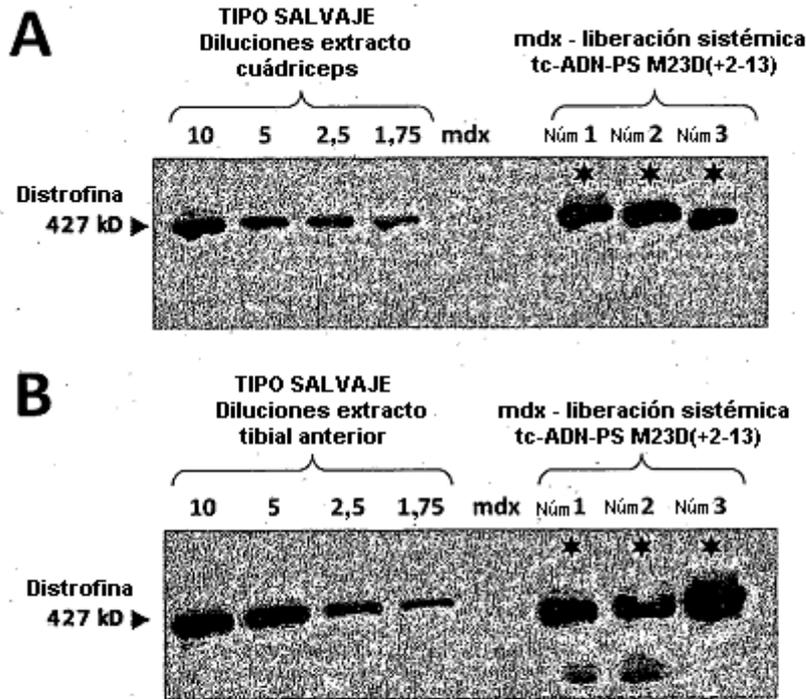


Figura 5

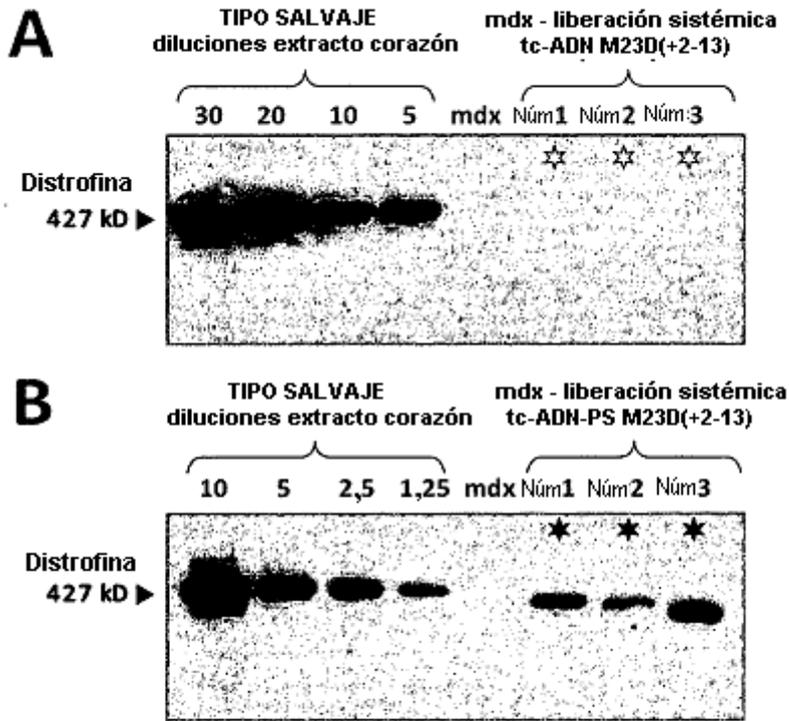
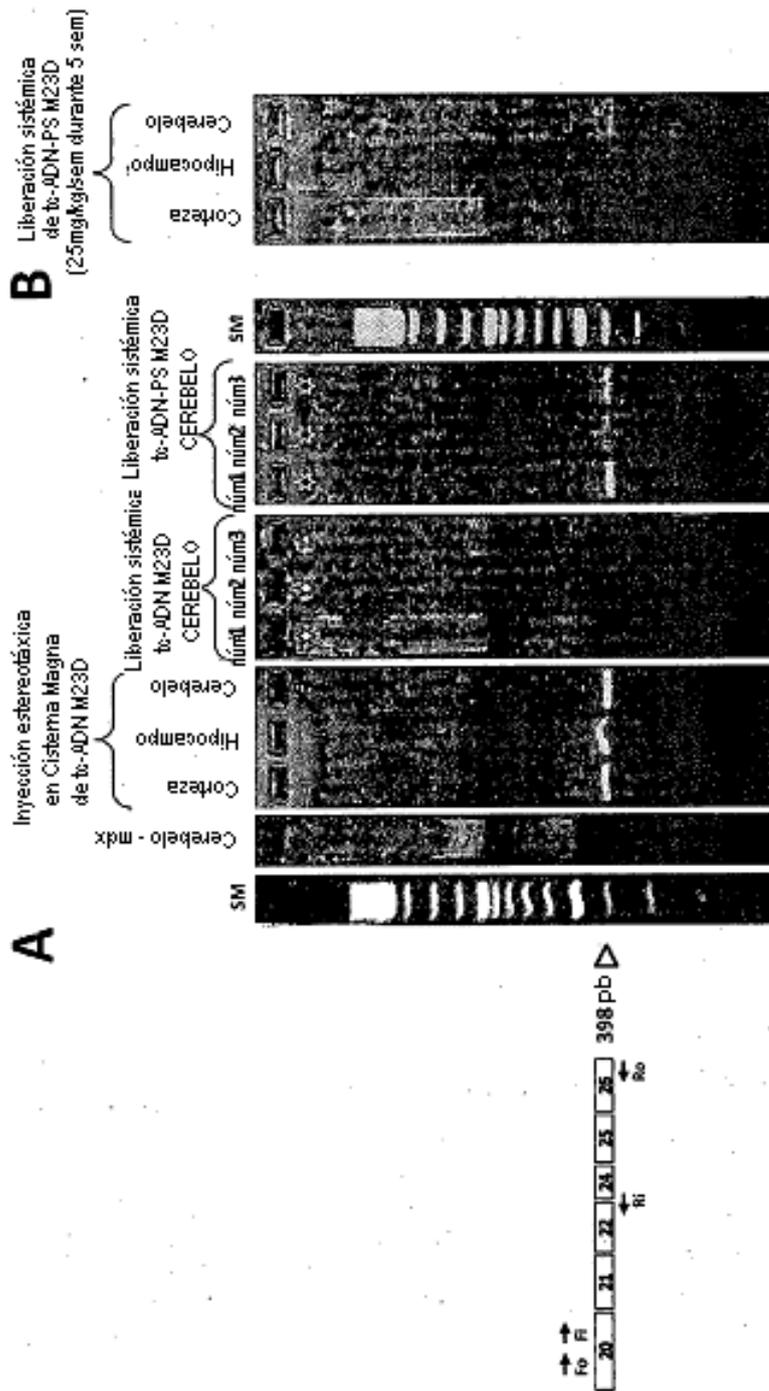


Figura 6



**Figura 7**