

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 573 981**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/712 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.04.2010** **E 10713338 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.03.2016** **EP 2417257**

54 Título: **Oligonucleótidos antisentido de triciclo-ADN, composiciones, y métodos para el tratamiento de enfermedades**

30 Prioridad:

10.04.2009 US 212384 P

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

13.06.2016

73 Titular/es:

**ASSOCIATION INSTITUT DE MYOLOGIE (25.0%)
Bâtiment Babinski 47, Boulevard de l'Hôpital
75013 Paris;
UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE (25.0%);
UNIVERSITÄT BERN (25.0%) y
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (25.0%)**

72 Inventor/es:

**SCHÜMPERLI, DANIEL;
LEUMANN, CHRISTIAN;
FURLING, DENIS;
GARCIA, LUIS y
VOIT, THOMAS**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 573 981 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

Oligonucleótidos antisentido de triciclo-ADN, composiciones, y métodos para el tratamiento de enfermedades

Antecedentes de la descripción

Campo técnico

5 La presente descripción se refiere, en general, a oligonucleótidos antisentido sintéticos (ONA) y a los métodos que emplean los oligonucleótidos antisentido para modificar sucesos de corte y empalme que se dan durante el procesamiento del pre-mARN o para inhibir la expresión del mARN mutado que contiene secuencias repetidas tales como, por ejemplo, 3' o 5' CUG, CAG, y/o CCUG. De manera más específica, en la presente memoria se describen ONA de triciclo-ADN (tc-ADN) que son eficaces para facilitar la omisión de exones durante el procesamiento del pre-mARN, en el enmascaramiento de secuencias silenciadoras intrónicas y/o secuencias tallo-bucle en el pre-mARN, y en la selección como objetivo de la destrucción mediada por RNAsas del mARN. En la presente memoria se describen ONA de tc-ADN que se pueden usar en métodos para el tratamiento de la Distrofia Muscular de Duchenne omitiendo exones mutados, tales como un exón 23 o exón 51 mutados, en un gen de distrofina para restablecer la funcionalidad de una proteína distrofina. También se describen ONA de tc-ADN que se pueden usar en métodos para el tratamiento de la Atrofia Muscular Espinal enmascarando una secuencia silenciadora intrónica y/o una secuencia tallo-bucle terminal en un gen SMN2 para producir una proteína SMN2 funcional modificada, que incluye una secuencia de aminoácidos codificada por el exón 7, que es capaz de complementar al menos parcialmente a una proteína SMN1 no funcional. Además, se puede usar un ONA de tc-ADN adicional descrito en la presente memoria en métodos para el tratamiento de la Distrofia Miotónica de Steinert seleccionando como objetivo la destrucción de un mARN de DM1 mutada que comprende repeticiones CUG 3'-terminales. Así, se pueden usar los ONA de tc-ADN y una o más de las aproximaciones anteriores para restablecer la funcionalidad en una proteína implicada en una miopatía.

Descripción de la técnica relacionada

25 La Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) es la miopatía hereditaria más frecuente, y afecta a alrededor de uno de cada 3.500 varones, independientemente de la etnia. Aunque infrecuente, las niñas y mujeres pueden presentar síntomas similares al Duchenne en las portadoras que lo manifiestan. La consecuencia principal de la DMD es que las fibras musculares se hacen especialmente frágiles, y la actividad muscular natural provoca un daño general en el tejido muscular. El resultado observado en la DMD, así como en muchas distrofias musculares, es que la lenta degeneración conduce a una fibrosis casi completa con infiltración grasa. Debido a la deformación de la columna vertebral y a las dificultades respiratorias, la esperanza de vida en la década de 1960 era de alrededor de 15 años. En ausencia de complicaciones cardíacas, las mejoras actuales en los métodos de tratamiento (es decir, artrodesis y ventilación mediante traqueotomía) han incrementado la esperanza de vida hasta 30 años.

35 Los síntomas clínicos de DMD son evidentes a una edad de 18 meses a tres años, e incluyen una capacidad retrasada de caminar y trepar, dificultad para levantarse del suelo, y pantorrillas anormalmente agrandadas. A alrededor de los 5 a 6 años, se desarrollan contracciones musculares en las articulaciones del pie, la rodilla, y la cadera. La progresión de la enfermedad se caracteriza por un debilitamiento muscular continuo, que conduce a la pérdida de la capacidad de caminar a alrededor de los 9 a 12 años. Además, algunos niños con Duchenne presentan retraso mental, lo que sugiere que la proteína ausente también está implicada en el sistema nervioso central.

40 La distrofia muscular de Duchenne es un trastorno recesivo asociado a X. El locus de la DMD se identificó en el cromosoma X (Xp21.2 - id. de OMIM: 310200) en 1986, por medio de una aproximación de clonación posicional, en un gen que codifica una proteína denominada distrofina. Las mutaciones en el gen de distrofina dan como resultado la incapacidad de producir distrofina en los músculos estriados. Las madres de niños afectados tienen una probabilidad de dos tercios de portar una mutación de la distrofina, mientras aproximadamente un tercio de los pacientes tienen mutaciones *de novo*. Más de la mitad de los niños con DMD exhiben grandes deleciones genómicas que abarcan de uno a varios exones; pocos de ellos tienen grandes duplicaciones de secuencias. Otros tienen mutaciones puntuales o deleciones o duplicaciones muy pequeñas que son difíciles de identificar.

50 El grado de las mutaciones no se correlaciona directamente, sin embargo, con la gravedad del fenotipo. Las deleciones con marco de lectura incorrecto o las mutaciones sin sentido que producen codones de parada prematuros y la interrupción posterior de la traducción dan como resultado deficiencias de distrofina caracterizadas por fenotipos graves. Las deleciones con marco de lectura correcto son responsables de una miopatía más leve conocida como distrofia muscular de Becker (DMB).

55 Con prácticamente 2,5 millones de pares de bases, el locus de la DMD es el gen más largo jamás detectado, pero solamente alrededor de 14.000 pares de bases contienen secuencias codificantes, que se extienden a lo largo de 79 exones. La distrofina de longitud completa (DP 427) es una proteína citoesquelética de 427 kDa expresada en todos los músculos, pero se genera una diversidad de isoformas de la proteína (DP 260, DP 140, DP 116, DP 71) por el uso diferencial, específico de tejido, (en la retina, el sistema nervioso central, el sistema nervioso periférico, y los tejidos no musculares) de cuatro promotores internos localizados en los intrones 29, 43, 55, y 62, respectivamente.

La distrofina de longitud completa es un componente esencial de un complejo de glicoproteína sarcolémica (SGC) implicado en el mantenimiento de la integridad de las membranas de las fibras musculares uniendo el citoesqueleto de miofibras a la matriz extracelular. El análisis de la secuencia ha predicho que la proteína distrofina implica varios dominios y repeticiones. Esquemáticamente, existe un sitio que hibrida con actina en el extremo N-terminal (N-ABD); un dominio cilíndrico central (RD; que tiene 24 repeticiones similares a espectrina) que contiene cuatro segmentos de bisagra (H) que pueden conferir flexibilidad; y un dominio rico en cisteína (CRD), que se une a otros miembros de DPC, cerca del extremo C-terminal (CT).

El análisis de la estructura/función ha identificado dominios que son cruciales para la función de la proteína. Esto se ejemplificó mediante las deleciones internas que se dan en algunos pacientes con una enfermedad leve, en los que la deleción abarcó los exones 17 a 48 (46% de la secuencia codificante). England *et al.*, *Nature* 343(6254): 180-2 (1990). Esto condujo al concepto de "minidistrofina" funcional usado exhaustivamente en los últimos 10 años en los experimentos de transferencia génica. Actualmente se ha establecido que la eliminación de los dominios N-ABD y CT provoca una pérdida moderada de la función, mientras CRD es esencial. Las alteraciones de RD dan como resultado fenotipos diversos dependiendo del grado y la naturaleza del truncamiento. Como ejemplo, una distrofina delecionada en RD ($\Delta R1-R24$) no es funcional, mientras una distrofina truncada ($\Delta H2-R19$), que conserva ocho repeticiones similares a espectrina completas de 24, da como resultado una proteína con una actividad completa.

Existen dos modelos animales genéticos bien caracterizados para la Distrofia Muscular de Duchenne. El ratón *mdx* alberga una mutación sin sentido en el exón 23 del gen de distrofina, que impide la síntesis de la proteína distrofina de tipo natural, de longitud completa. El ratón *mdx* muestra un mecanismo compensatorio que contrarresta la degeneración, lo que podría mantener el proceso de regeneración para recuperar el daño mecánico. El ratón *mdx* no exhibe síntomas de DMD, y la duración de su vida es casi normal.

El perro GRMD (Distrofia Muscular de Golden Retriever) carece de distrofina funcional debido a una mutación del sitio de corte y empalme en el intrón 6, que altera el marco de lectura. En GRMD, como en DMD humana, la degradación progresiva de las fibras conduce inexorablemente al debilitamiento de la musculatura esquelética, con una notable fibrosis endomisial y perimisial. Debido a su fenotipo similar a DMD, GRMD sigue siendo el mejor modelo disponible para la determinación de terapias potenciales para DMD.

A pesar de la identificación y la caracterización de las mutaciones en el gen de distrofina que están asociadas al inicio de DMD, y la disponibilidad de sistemas de modelos animales adecuados para ensayar los agentes terapéuticos potenciales, sigue existiendo en la técnica la necesidad de composiciones y métodos para el tratamiento de esta enfermedad. Varios estudios a lo largo de los últimos 10 años apoyan el beneficio del tratamiento con esteroides (prednisona y deflazacort) en niños con Duchenne, aunque todavía no se ha completado totalmente una evaluación estadística amplia. La omisión inducida farmacológicamente de mutaciones de codones de parada prematuros por medio de medicación con gentamicina también podría ser potencialmente eficaz hasta en un 5% de los pacientes con DMD. Se están llevando a cabo ensayos clínicos en los Estados Unidos e Italia, aunque los resultados de los estudios preclínicos en el modelo de ratón *mdx* fueron controvertidos. Un fármaco nuevo (PTC124) desarrollado por PTC Therapeutics parece más prometedor. También hay estudios en curso para estimular el gen de utrofina mediante el uso de fármacos cuyo producto, la proteína similar a distrofina utrofina, puede compensar la función de la distrofina ausente.

Existen otras muchas vías de investigación; como ejemplo, recientemente se ha demostrado que antagonizar la mioestatina mediante el uso de anticuerpos bloqueantes podría mejorar la fuerza muscular en ratones *mdx*. Esta aproximación se basó inicialmente en múltiples inyecciones de mioblastos normales en los músculos enfermos. Partridge *et al.*, *Nature* 337(6203): 176-9 (1989). Los ensayos clínicos posteriores (1991-98) han fracasado, aunque la mejora de la fabricación de células y de los procedimientos de administración ha hecho posible un nuevo ensayo de fase I en Canadá (2002). Los progresos recientes también han proporcionado pruebas de que las células madre de médula ósea o de orígenes vasculares pueden seleccionar como objetivo el músculo esquelético por medio de la ruta sistémica, aunque el grado de corrección genética todavía es insuficiente.

La terapia génica para DMD se basa en la administración *in situ* de mini-genes de distrofina en las fibras esqueléticas mediante el uso de vectores de genes como vehículos. Se llevó a cabo un primer estudio exploratorio mediante el uso de cADN desnudo de longitud completa en un vector plasmídico en Francia (2000-03). Entre los diferentes tipos de vectores que se han ensayado para la terapia génica muscular, los vectores derivados de virus adenoasociados (VAA) parecen ser los más prometedores. Los vectores de VAA tienen varias ventajas: (i) son capaces de infectar una amplia diversidad de tipos celulares, que incluyen fibras musculares; (ii) parecen seguros, ya que carecen de todos los genes virales, y esos virus de tipo natural todavía no se han asociado a ninguna patología en seres humanos; (iii) contrariamente a los VAAs de tipo natural, que se integran en el genoma de las células hospedadoras, los vectores de VAA deficientes de replicación persisten en general como episomas, lo que limita el riesgo de mutagénesis por inserción o activación de oncogenes; y (iv) en contraste con otros sistemas de vectores, los vectores de VAA no desencadenan una respuesta inmunitaria significativa, lo que proporciona una expresión a largo plazo de los transgenes terapéuticos (siempre que sus productos génicos no sean rechazados). Los vectores de VAA se pueden producir también a un título elevado, y las inyecciones intraarteriales forzadas los hacen capaces de llevar a cabo la transferencia génica en zonas musculares significativas por medio de una única inyección, al menos en roedores. Aunque los vectores de VAA carecen de todos los genes virales, su transporte de

carga se limita a 4,5 kb. Por esa razón, la elección de VAA condujo al desarrollo de variantes de μ -distrofina de alrededor de 4 kb en vez de la distrofina de longitud completa (14 kb). Varias de estas variantes se han ensayado de manera beneficiosa en el modelo *mdx* mediante transgénesis o transferencia génica.

5 En muchos pacientes de DMD, así como en el ratón *mdx* y el perro GRMD, se ha informado de escasas fibras positivas para distrofina. Aunque la proporción de fibras revertientes se incrementa con el tiempo, desafortunadamente su número es demasiado bajo como para conferir un beneficio clínico significativo. El mecanismo que inicia estas fibras revertientes sigue sin conocerse, aunque los estudios sugieren que el marco de lectura se puede restablecer mediante omisión de exones. Dicho fenómeno natural ha motivado la investigación en el diseño de estrategias para la reparación/modulación génica basada en el uso de 2'-O-metil oligorribonucleótidos antisentido, así como morfolinós, para interferir con el corte y empalme, por lo que se induce la omisión de exones. De hecho, esta aproximación se ha usado con éxito *in vitro* en células musculares de *mdx*, GRMD y DMD, así como *in vivo* (ensayo clínico de fase 1 realizado con éxito para 2'-O-metiló en Holanda; un ensayo de fase 1 con morfolinós está en curso en el R.U.). Sin embargo, la debilidad de esta aproximación es que requiere la administración regular de los OAs sintéticos, y no se ha conseguido completamente la administración sistémica.

15 Una aproximación alternativa es sintetizar las secuencias de interés *in situ* a partir de vectores en forma de moléculas de ARN antisentido. Incluso así, la producción de moléculas de ARN antisentido "terapéuticas" *in vivo* plantea muchos problemas, tales como la estabilidad y la localización subcelular. Se pueden usar ARNs nucleares pequeños (snARNs), que se sabe que participan en la reacción de corte y empalme, como portadores para superar estas limitaciones. Los informes recientes han demostrado que el snARN U7 que porta secuencias antisentido contra las uniones de corte y empalme del exón 23 o del exón 51 del gen de distrofina inducen la síntesis de distrofina *in vitro* así como *in vivo* en células *mdx* y $\Delta 48-50$ de DMD, respectivamente.

25 Se ha llevado a cabo una búsqueda *in silico* de todos los pacientes de DMD con una delección con marco de lectura incorrecto que teóricamente se beneficiarían de la omisión de un único exón adyacente a la delección (a cada lado). De manera interesante, se predice que la omisión del exón 51 debería restablecer una mini-distrofina en un 22% de los casos (es decir, $\Delta 45-50$, $\Delta 47-50$, $\Delta 48-50$, $\Delta 49-50$, $\Delta 50$ y $\Delta 52$). Se espera que las proteínas truncadas resultantes sean al menos parcialmente funcionales debido a que corresponden a delecciones que se han hallado en algunos pacientes de DMB. Además, se han identificado unos cuantos varones sanos que portan delecciones con marco de lectura correcto $\Delta 51-52$ y $\Delta 48-51$. La omisión del exón 51, en pacientes seleccionados, debería provocar la producción de una distrofina más corta funcional, lo que mejoraría el fenotipo.

30 El retraso mental es un síntoma asociado con frecuencia a DMD, y puede ser el resultado de la ausencia de distrofina en las células neuronales. El rescate de una distrofina semifuncional en el cerebro podría corregir o mejorar, por lo tanto, el deterioro cognitivo.

35 La Atrofia Muscular Espinal (AME) se refiere, en general, a una diversidad de trastornos que derivan de un defecto genético frecuente en un gen de supervivencia de neuronas motoras (SMN), que, en 1990, se cartografió en el cromosoma 5q11.2-13.3. El cromosoma 5 humano contiene una gran duplicación, de forma que existen dos copias del gen SMN, SMN1 y SMN2.

40 La AME es la causa más frecuente de muerte neonatal determinada genéticamente. Todas las formas de AME asociada a SMN tienen una incidencia combinada de alrededor de 1 por cada 6.000. La frecuencia del gen es de alrededor de 1:80, y aproximadamente una de cada 40 personas es un portador. No hay consecuencias conocidas sobre la salud por ser un portador, y la única manera de que alguien considere esta posibilidad es si tiene un familiar afectado.

45 La AME se caracteriza por la pérdida de las neuronas motoras de la médula espinal y del tronco encefálico. En general, cuanto antes aparecen los síntomas, más corta es la esperanza de vida. Una vez que aparecen los síntomas, las células de las neuronas motoras se deterioran rápidamente. Todas las formas de AME tienen en común la debilidad provocada por la denervación, es decir, el músculo se atrofia porque ha perdido la señal para contraerse debido a la pérdida del nervio que lo inerva. La atrofia muscular espinal solamente afecta a los nervios motores. Los trastornos hereditarios que provocan debilidad debida a la denervación motora junto con deterioro sensorial debido a la denervación sensorial se conocen por las expresiones inclusivas Charcot-Marie-Tooth o Neuropatía Hereditaria Motora y Sensitiva.

50 El desarrollo de AME está relacionado directamente con la gravedad de la debilidad. Los lactantes con la forma grave de AME con frecuencia sucumben a la enfermedad respiratoria debido a la debilidad de los músculos que mantienen la respiración. Los niños con formas más suaves de AME viven de manera natural mucho más tiempo, aunque pueden necesitar un apoyo médico exhaustivo, especialmente los que se hallan en el extremo más grave del espectro.

55 La AME de tipo I, también conocida como AME infantil grave o enfermedad de Werdnig-Hoffmann, es la más grave, y se manifiesta en el primer año de vida. Este tipo en general se inicia rápidamente y de manera inesperada tras el nacimiento; Los lactantes diagnosticados con AME de Tipo I en general no viven hasta superar la edad de un año. La neumonía se considera la causa definitiva de muerte, debido al deterioro de la supervivencia de las neuronas

motoras; la muerte de las neuronas motoras provoca el funcionamiento insuficiente de los principales aparatos del organismo, en particular el aparato respiratorio (p.ej., respiración y desecho de secreciones mezcladas de los pulmones). La AME de tipo II, o AME intermedia, describe a los niños que nunca pueden levantarse y andar, pero que son capaces de mantener una posición sentada al menos durante cierto tiempo en su vida. El inicio de la debilidad se reconoce normalmente en algún momento entre los 6 y 18 meses. La debilidad se incrementa de manera lenta y gradual a lo largo de la vida del individuo. Los pacientes con AME de Tipo III son capaces de andar en algún momento.

La AME se diagnostica en general con un ensayo del gen de supervivencia de neuronas motoras (SMN), que determina si existe al menos una copia de un gen SMN1 funcional, que se distingue del gen SMN2, muy similar, por la presencia de los exones 7 y 8 en el mRNA completamente procesado. El gen SMN2 también contiene una mutación que lo hace menos eficaz en la producción de la proteína, aunque lo hace a un nivel bajo. La AME está provocada por la pérdida del gen SMN1 de ambos cromosomas y la incapacidad de la proteína SMN2 de compensar la pérdida de la proteína SMN1 funcional.

Las estrategias actuales para desarrollar productos terapéuticos para la AME incluyen la identificación de fármacos que incrementan los niveles de SMN2, aumentan la función de la SMN2 residual, o compensan de otra manera la pérdida de actividad de SMN1. Fármacos tales como butiratos, ácido valproico, hidroxiurea, y riluzol (Rilutek®, Sanofi Aventis) están o han estado en investigación clínica para el tratamiento de AME. Aunque se están ensayando estrategias de sustitución de genes en animales, el tratamiento actual para la AME consiste en la prevención y el tratamiento de los efectos secundarios de la pérdida crónica de unidades motoras. Actualmente no se conocen fármacos que alteren el desarrollo de AME, y es probable que la sustitución de genes para AME requiera muchos más años de investigación antes de que se pueda aplicar a seres humanos.

La distrofia Miotónica (DM) es una enfermedad multisistémica hereditaria crónica, que progresa lentamente, sumamente variable, que se puede manifestar a cualquier edad desde el nacimiento hasta la vejez. La distrofia miotónica es la forma más frecuente de distrofia muscular de inicio adulto, y la segunda forma más frecuente de cualquier enfermedad del músculo esquelético tras la distrofia muscular de Duchenne. La DM se caracteriza por el debilitamiento de los músculos (distrofia muscular), cataratas subcapsulares posteriores (opacidad de los cristalinios de los ojos), defectos de la conducción cardíaca, cambios endocrinos y miotonía (dificultad para relajar un músculo).

Actualmente hay dos tipos conocidos de DM de inicio adulto, ambos identificables mediante análisis del ADN: La distrofia miotónica de tipo 1 (DM1) se denomina habitualmente enfermedad de Steinert, y tiene una forma congénita que puede afectar gravemente a lactantes, y una forma de inicio infantil. La distrofia miotónica de tipo 2 (DM2) se conoce como PROMM o miopatía miotónica proximal. Se sospecha de formas adicionales de distrofia miotónica (p.ej., DM3, DM4, DMX), pero su existencia sigue sin demostrarse. Aunque se considera que DM1 y DM2 son afecciones lentamente degenerativas, se considera que DM2 en general es más leve que DM1.

La presentación de los síntomas varía considerablemente por la forma (DM1/DM2), la gravedad e incluso los fenotipos de DM2 poco habituales. Los pacientes de DM1 a menudo presentan miotonía, debilidad distal incapacitante y problemas cognitivos graves. Los pacientes de DM2 habitualmente presentan dolor muscular, rigidez, fatiga, o el desarrollo de debilidad proximal de extremidades inferiores. Day *et al.* *Neurology* 60(4): 657-64 (2003). El patrón característico de la debilidad es diferente para DM1 y DM2. En DM1, se observa en los músculos de la cara y de la mandíbula, la caída de los párpados (ptosis), la debilidad de los músculos del cuello, manos y parte inferior de las piernas. En DM2, la debilidad es más evidente en los músculos proximales, aquellos más cercanos al tronco del cuerpo, cuello, hombros, flexores de la cadera y parte superior de las piernas.

Los síntomas de DM1 incluyen hipersomnia (somnia diurna), debilitamiento muscular, disfagia, e insuficiencia respiratoria. Los pacientes de DM1 pueden experimentar una gama más diversa de problemas cognitivos que los pacientes de DM2. Dependiendo de qué forma tengan y del grado de gravedad, los problemas cognitivos de DM1 pueden incluir retrasos del desarrollo, problemas de aprendizaje, lenguaje, habla, comportamiento, apatía, o hipersomnia. Las manifestaciones cognitivas de DM2 incluyen problemas con la función ejecutiva (es decir, organización, concentración, búsqueda de palabras, etc.) e hipersomnia.

En DM1, el gen afectado se denomina DMPK (proteína quinasa de distrofia miotónica), y codifica una serina/treonina proteína quinasa expresada en el músculo esquelético. El gen está localizado en el brazo largo del cromosoma 19. En DM1, el gen DMPK se caracteriza por una repetición de tripletes de Citosina-Timina-Guanina (CTG). El número de repeticiones varía enormemente de persona a persona, pero el número medio en una persona sana es de entre 5 y 37. A veces, cuando se reparan o replican las secuencias repetitivas del ADN durante la división celular, la maquinaria celular comete un error y se añade una copia extra de la repetición del triplete a la secuencia. Cuando hay más de 37 repeticiones del triplete en el gen DMPK, la secuencia se hace inestable y el error se hace más frecuente.

Las personas afectadas de DM1 tienen más de 50, y pueden tener hasta 2000 repeticiones de CTG. El resultado es que el tamaño de las repeticiones de un individuo con DM1 normalmente se hará mayor durante la gametogénesis o el desarrollo embrionario temprano, de forma que los hijos de un adulto afectado exhiben en general expansiones mayores que su progenitor, debido al error durante la gametogénesis (este fenómeno se denomina anticipación). Los

individuos con expansiones mayores tienen un inicio más temprano del trastorno, y un fenotipo más grave.

La DM2 está provocada de forma similar por un defecto del gen ZNF9 del cromosoma 3q21. La expansión de repeticiones para DM2 es mucho mayor que para DM1, y oscila de 75 a 11.000 repeticiones, e implica una repetición de cuatro nucleótidos. A diferencia de DM1, sin embargo, el tamaño de la expansión del ADN repetido no parece provocar una diferencia en la edad de inicio o en la gravedad de la enfermedad en DM2. La anticipación parece ser menos significativa en DM2.

Actualmente no existe cura o tratamiento específico para la distrofia miotónica. Los problemas cardíacos, cataratas, y otras anomalías asociadas a la afección se pueden tratar pero no curar. Existen, sin embargo, intervenciones médicas y medicaciones que pueden mitigar algunos de los síntomas, tales como miotonía, dolor, y somnolencia excesiva. La investigación en áreas tales como el cribado de alto rendimiento y la terapia antisentido alberga la esperanza de tratamientos selectivos más eficaces para el futuro. El corte y empalme alterado del canal de cloruro 1 (CIC-1) específico de músculo provoca el fenotipo miotónico de DM1, y es reversible en modelos de ratón mediante el uso de oligonucleótidos antisentido de morfolino que modifican el corte y empalme del mRNA de CIC-1. Wheeler *et al.*, *J. Clin. Invest.* 117(12):3952-7 (2007).

Ittig *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 32:346-353 (2004) describe una comparación del efecto del LNA y tc-ADN *in vitro* en células HeLa.

Aartsma-Tus *et al.*, *Gene Therapy* 11: 1391-1398 (2004) describe un análisis comparativo de análogos de oligonucleótidos antisentido para la omisión selectiva del exón 46 de DMD en células musculares.

Vitiello *et al.*, *Neuromuscular Disorders* 18: 597-605 (2008) describe la administración *in vivo* de oligonucleótidos antisentido desnudos en ratones mdx envejecidos.

Graziewicz *et al.*, *Molecular Therapy* 16: 1316-1322 (2008) describe el uso de oligonucleótidos de conmutación del corte y empalme de LNA para modular el corte y empalme del pre-mRNA de TNFR2.

A pesar de la búsqueda en curso de modalidades terapéuticas para la Distrofia Muscular de Duchenne, la Atrofia Muscular Espinal, y la Distrofia Miotónica de Steinert, sigue existiendo una necesidad urgente de compuestos y métodos terapéuticos eficaces para el tratamiento de estas enfermedades.

Sumario de la descripción

La presente descripción satisface esta y otras necesidades relacionadas proporcionando oligonucleótidos antisentido (ONA) de triciclo-ADN (tc-ADN) y métodos que emplean ONA de tc-ADN para el tratamiento de enfermedades tales como la Distrofia Muscular de Duchenne, la Atrofia Muscular Espinal, y la Distrofia Miotónica de Steinert.

La invención también se refiere, en general, a un oligonucleótido antisentido de tc-ADN para el uso en un método para corregir la expresión anormal de un gen en una célula del sistema nervioso central de un sujeto, y el método comprende administrar al sujeto el oligonucleótido antisentido de tc-ADN, en el que dicho oligonucleótido antisentido de tc-ADN es complementario a una porción de un ARN codificado por dicho gen, y en el que dicho oligonucleótido antisentido de tc-ADN se administra de manera periférica al sujeto en una cantidad suficiente para corregir dicha expresión anormal.

La invención también se refiere a un oligonucleótido antisentido de tc-ADN para el uso en un método para tratar una enfermedad genética provocada por la expresión anormal de un gen en el sistema nervioso central de un sujeto, y el método comprende administrar al sujeto el oligonucleótido antisentido de tc-ADN, en el que dicho oligonucleótido antisentido de tc-ADN es complementario a una porción de un ARN codificado por dicho gen, y en el que dicho oligonucleótido antisentido de tc-ADN se administra de manera periférica al sujeto en una cantidad eficaz para corregir dicha expresión anormal.

La invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende un oligonucleótido antisentido de tc-ADN, en la que dicho oligonucleótido antisentido de tc-ADN es complementario a una porción de un ARN codificado por un gen humano, y en la que dicha composición comprende además un excipiente farmacéutico aceptable.

La invención también se refiere a un oligonucleótido antisentido de tc-ADN para el uso en el tratamiento de una enfermedad genética provocada por la expresión anormal de un gen en el sistema nervioso central de un sujeto, y dicho oligonucleótido antisentido de tc-ADN es complementario a una porción de un ARN codificado por dicho gen, y dicho oligonucleótido antisentido de tc-ADN se administra de manera periférica al sujeto en una cantidad eficaz para corregir dicha expresión anormal.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "administración periférica" incluye, sin limitación, cualquier vía de administración que no implique la inyección directa en el sistema nervioso central del sujeto que necesita el tratamiento. Más en particular, la administración periférica comprende inyecciones sistémicas, tales como inyecciones intramusculares (i.m.), intravenosas (i.v.), intraperitoneales (i.p.), intraarteriales, subcutáneas o transdérmicas.

La invención también se refiere a un oligonucleótido antisentido de tc-ADN para el uso en el tratamiento de una enfermedad neuromuscular o musculoesquelética. El oligonucleótido antisentido de tc-ADN implementado es como se describe en la presente memoria con más detalle más adelante. Más en particular, el oligonucleótido antisentido de tc-ADN puede ser uno de los tc-ADN específicos presentados en la presente memoria.

5 La enfermedad neuromuscular o musculoesquelética puede ser el resultado de una alteración de un gen, en la que dicha alteración es

una mutación con marco de lectura correcto de un exón, una mutación que altera el marco de lectura traduccional del gen,

10 una mutación perjudicial que se puede compensar mediante la inclusión de un exón atípico en el mRNA codificado por dicho gen, y el tc-ADN es complementario a una ISS o TSL presente en un pre-mRNA codificado por dicho gen y facilita la inclusión de un exón atípico, o

una mutación que da como resultado la presencia de amplificación(es) perjudicial(es) de CUG en 3' en un mRNA codificado por dicho gen.

15 En una realización particular, cuando la alteración es una mutación con marco de lectura correcto de un exón, dicho tc-ADN puede facilitar la omisión de dicho exón. En otra realización, cuando la alteración es una mutación que altera el marco de lectura traduccional del gen, dicho tc-ADN puede facilitar la omisión de un exón para restablecer el marco de lectura del gen. En otra realización, cuando la alteración es una mutación que da como resultado la presencia de amplificación(es) perjudicial(es) de CUG en 3' en un mRNA codificado por dicho gen, dicho ONA de tc-ADN puede destruir el mRNA que contiene dicha amplificación.

20 Los ONA de tc-ADN presentados en la presente memoria son ONA de ADN restringidos que muestran propiedades de hibridación mejoradas con los pre-mRNAs complementarios en comparación con ONA de ADN que emplean, por ejemplo, químicas más convencionales de 2'-O-metil-fosforotioato o morfolino. Mientras los ONA de ADN de 2'-O-metil-fosforotioato o morfolino requieren en general de 20 a 24 nucleótidos para llevar a cabo la hibridación selectiva con un pre-mRNA específico, los ONA de tc-ADN descritos ahora son capaces de producir una hibridación selectiva con un pre-mRNA específico con longitudes de entre 10 y 18 nucleótidos, y más en general entre alrededor de 6 y
25 alrededor de 22 nucleótidos, en particular entre 8 y 20 nucleótidos.

Como se describe con más detalle más adelante, la omisión de exones se consigue en el núcleo durante el proceso de maduración de los pre-mRNAs. Ello incluye el enmascaramiento de secuencias clave implicadas en el corte y empalme de exones seleccionados como objetivo mediante el uso de oligonucleótidos antisentido (ONA) que son
30 complementarios a las secuencias de definición de exones en un pre-mRNA. En la presente memoria se proporcionan ONAs de tc-ADN que se pueden emplear de manera adecuada para la omisión de exones por medio del enmascaramiento de sitios de corte y empalme en uniones intrón/exón, o más en general sitios usados para la definición de exones, en un pre-mRNA de distrofina, y de ese modo se facilita la delección de un exón perjudicial durante el procesamiento del pre-mRNA hasta un mRNA maduro. Tal ONA de tc-ADN tendrá utilidad en el
35 tratamiento de la Distrofia Muscular de Duchenne restableciendo un marco de lectura abierto en un gen de distrofina mutado que comprende un exón que contiene una mutación sin sentido, de parada, de desplazamiento del marco de lectura, o una secuencia intrónica que contiene un exón críptico perjudicial.

Por ejemplo, una mutación sin sentido o de desplazamiento del marco de lectura en el exón 23 o en el exón 51 de un gen de distrofina produce una proteína distrofina truncada de manera carboxi-terminal, no funcional. Mediante la
40 hibridación a nucleótidos que comprenden un sitio donante de corte y empalme del pre-mRNA de distrofina en el intrón 23 o en el intrón 51, respectivamente, y los nucleótidos adyacentes de 5' del exón 23 o del exón 51, los ONA de tc-ADN descritos en la presente memoria son capaces de impedir la inclusión del exón 23 o exón 51 mutados en el transcrito de mRNA maduro. La expresión de ese transcrito de mRNA maduro produce una proteína distrofina funcional que está delecionada en los aminoácidos codificados por el exón 23 o por el exón 51, pero que incluye los
45 aminoácidos de distrofina en posiciones N-terminal y C-terminal a los aminoácidos delecionados y, por lo tanto, constituye una "cuasi-distrofina" semi-funcional.

Los ONAs de tc-ADN descritos en la presente memoria para la omisión de un exón durante el procesamiento de un pre-mRNA de distrofina contienen entre alrededor de 6 y alrededor de 22 nucleótidos, en particular entre alrededor de 8 y 20 tricyclo nucleótidos, en particular entre 10 y 18 tricyclo nucleótidos, en los que 8-16 nucleótidos del ONA de
50 tc-ADN son complementarios a un sitio donante de corte y empalme intrónico del pre-mRNA de distrofina, en los que 2-8 nucleótidos del ONA de tc-ADN son complementarios a una región exónica del pre-mRNA de distrofina, y en los que el sitio donante de corte y empalme intrónico está contiguo con y en 5' de la región exónica. En ciertos aspectos, los ONAs de tc-ADN tienen entre 12 y 16 nucleótidos o entre 13 y 15 nucleótidos, y comprenden entre 6 y 14 nucleótidos que son complementarios al sitio donante de corte y empalme intrónico y entre 2 y 5 nucleótidos que son
55 complementarios a la región exónica. Se entenderá, sin embargo, que se pueden emplear ONA de tc-ADN más largos de manera adecuada para llevar a cabo la omisión de exones durante el procesamiento de un pre-mRNA de distrofina.

En la presente memoria se ejemplifican ONAs de tc-ADN diseñados para la omisión de un exón 23 mutado en un

pre-mARN de distrofina. El ONA de tc-ADN comprende la secuencia de nucleótidos 5'-AACCTCGGCTTACCT-3' (M23D (+02-13), SEQ ID N°: 1), e hibrida de manera específica con los nucleótidos del extremo 3' del intrón 23 del pre-mARN de distrofina y con los nucleótidos del extremo 5' contiguo del exón 23 del pre-mARN de distrofina. También se proporcionan ONA de tc-ADN diseñados para la omisión de un exón 51 mutado en un pre-mARN de distrofina. El ONA de tc-ADN comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en 5'-AGAAATGCCATCTTC-3' (H51 (+68+82), SEQ ID N°: 2), 5'-AAATGCCATCTTCCT-3' (H51 (+70+84), SEQ ID N°: 3), y 5'-TGCCATCTTCCTTGA-3' (H51 (+73+87), SEQ ID N°: 4), e hibrida de manera específica con los nucleótidos del extremo 3' del intrón 51 del pre-mARN de distrofina y con los nucleótidos del extremo 5' del exón 51 del pre-mARN de distrofina.

En la presente memoria se usa la siguiente nomenclatura: "M" se refiere a murino, "H" se refiere a humano, "23" y "51" se refieren a exones específicos, "D" se refiere al sitio donante, "A" se refiere al sitio aceptor, "+" seguido de un número indica el número de nucleótidos en la secuencia del exón, y "-" seguido de un número indica el número de nucleótidos en el exón flanqueante. Así, por ejemplo, M23D(+02-13) indica que el ONA de tc-ADN abarca los dos nucleótidos 3'-terminales del exón 23 y los 13 nucleótidos 5'-terminales del intrón 23, y dicho ONA es capaz de enmascarar el sitio de corte y empalme donante del exón 23 de la distrofina de ratón y H51(+68+82) indica que el ONA de tc-ADN abarca del nucleótido número 68 al nucleótido número 82 en el exón 51 de la distrofina humana.

Otros aspectos de la presente descripción proporcionan ONA de tc-ADN que se pueden emplear de manera adecuada para enmascarar secuencias silenciadoras intrónicas (ISS) o tallos-bucles terminales (TSL) en un pre-mARN de supervivencia de neuronas motoras 2 (SMN2). Tal ONA de tc-ADN facilita la inclusión de un exón atípico durante el procesamiento del pre-mARN de SMN2 hasta un mARN maduro. La proteína SMN2 funcional modificada resultante contiene la secuencia de aminoácidos codificada por el exón atípico incluido. Tal proteína SMN2 funcional modificada es capaz de complementar a una proteína SMN1 no funcional y, cuando se expresa *in vivo*, puede invertir al menos parcialmente la Atrofia Muscular Espinal que está provocada por mutaciones en el gen SMN1.

Por ejemplo, aunque el exón 7 de SMN2 en general se excluye del transcrito de mARN maduro por medio del procesamiento del pre-mARN correspondiente, la adición del exón 7 produce una proteína SMN2 funcional modificada que es capaz de compensar funcionalmente a la proteína SMN1 mutada. Mediante la hibridación a nucleótidos que comprenden una ISS o TSL de SMN2 en un pre-mARN de SMN2, un ONA de tc-ADN puede facilitar la inclusión del exón 7 en el transcrito de mARN maduro. La expresión de ese transcrito de mARN maduro produce una proteína SMN2 funcional modificada que incluye los aminoácidos codificados por el exón 7, así como todos los otros aminoácidos de SMN2 en posición N-terminal y C-terminal a los aminoácidos incluidos.

Así, la presente descripción proporciona ONA de tc-ADN para facilitar la inclusión del exón 7 durante el procesamiento del pre-mARN de SMN2, en el que el ONA de tc-ADN tiene una longitud de 6-22 tríciclo nucleótidos, en particular de 8-20 tríciclo nucleótidos, más en particular una longitud de 10-18 tríciclo nucleótidos, y en el que el ONA de tc-ADN es complementario a una secuencia silenciadora intrónica (ISS) o a un tallo-bucle terminal (TSL) de un pre-mARN de SMN2. Tal ONA de tc-ADN puede tener entre 13 y 17 nucleótidos, entre 12 y 16 nucleótidos, o entre 13 y 15 nucleótidos. En la presente memoria se ejemplifican ONA de tc-ADN que comprenden la secuencia de 15 nucleótidos 5'-CUUUCAUUAUGCUGG-3' (SMN2i7(10;25), SEQ ID N°: 5), cuyos ONA de tc-ADN son complementarios a una ISS de pre-mARN de SMN2 y que se pueden emplear para facilitar la inclusión del exón 7 en un mARN de SMN2 procesado. También se ejemplifican en la presente memoria ONA de tc-ADN que comprenden la secuencia de 13 nucleótidos 5'-JUAAUUUAAGGAA-3' (SMN2e7(39;51), SEQ ID N°: 6), cuyos ONA de tc-ADN son complementarios a una TSL2 de pre-mARN de SMN2 y que se pueden emplear también para facilitar la inclusión del exón 7 en un mARN de SMN2 procesado. Se entenderá que también se pueden emplear las combinaciones de los ONA de tc-ADN presentados en la presente memoria.

Otros aspectos adicionales de la presente descripción proporcionan ONA de tc-ADN que se pueden emplear de manera adecuada para facilitar la destrucción de un mARN de DM1 mutada. Tales ONA de tc-ADN comprenden 9-27 tríciclo nucleótidos, en los que el ONA de tc-ADN es complementario a un mARN de DM1 mutada que comprende amplificación(es) perjudicial(es) de CUG en 3' (n>50) y en los que el ONA de tc-ADN es capaz de facilitar la destrucción mediada por RNasa de dicho mARN de DM1. El ONA de tc-ADN 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 N°: 7). Un ONA de tc-ADN ejemplar para facilitar la destrucción de una DM1 mutada comprende la secuencia de 15 nucleótidos 5'-CAGCAGCAGCAGCAG-3' (DM1(CAG5), SEQ ID N°: 8). Otro ONA de tc-ADN ejemplar que facilita la destrucción de una DM1 mutada comprende la secuencia de 21 nucleótidos 5'-CAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG-3' (DM1(CAG7), SEQ ID N°: 9).

En otros aspectos, la presente descripción proporciona métodos para eliminar un exón mutado de un mARN de distrofina, métodos para incluir un exón atípico en un mARN de SMN2, y métodos para destruir un mARN de DM1 que comprenden un número patológico de amplificaciones de CUG en 3' en una célula. Cada uno de estos métodos incluye la etapa de poner en contacto una célula con un ONA de tc-ADN como se describe en la presente memoria.

En ciertas realizaciones se proporcionan métodos para eliminar un exón mutado de un mARN de distrofina, cuyos métodos comprenden la etapa de poner en contacto una célula que expresa un pre-mARN de distrofina con un ONA de tc-ADN que contiene 6-22 tríciclo nucleótidos de longitud, en particular 8-20 tríciclo nucleótidos, más en particular

entre 10 y 18 triciclo nucleótidos, en los que 8-16 nucleótidos del ONA de tc-ADN son complementarios a un sitio donante de corte y empalme intrónico del pre-mARN de distrofina, en los que 2-8 nucleótidos del ONA de tc-ADN son complementarios a una región exónica del pre-mARN de distrofina, y en los que la región exónica está contigua con y en 3' del sitio donante de corte y empalme intrónico. Los métodos ejemplares incluyen la etapa de poner en contacto la célula con un ONA de tc-ADN de entre 12 y 16 nucleótidos o entre 13 y 15 nucleótidos. Los ONA de tc-ADN adecuados para el uso en tales métodos comprenden la secuencia de nucleótidos 5'-AACCTCGGCTTACCT-3' (M23D (+02-13), SEQ ID N°: 1); 5'-AGAAATGCCATCTTC-3' (H51 (+68+82), SEQ ID N°: 2), 5'-AAATGCCATCTTCCT-3' (H51 (+70+84), SEQ ID N°: 3), y 5'-TGCCATCTTCCTTGA-3' (H51 (+73+87), SEQ ID N°: 4).

En otras realizaciones se proporcionan métodos para incluir un exón atípico en un mARN de SMN2, cuyos métodos comprenden la etapa de poner en contacto una célula que está expresando un pre-mARN de SMN2 con un ONA de tc-ADN que contiene 6-22 triciclo nucleótidos de longitud, en particular 8-20 triciclo nucleótidos, más en particular entre 10 y 18 o entre 11 y 18 triciclo nucleótidos, en los que el ONA de tc-ADN es complementario a una secuencia silenciadora intrónica (ISS) de un pre-mARN de SMN2, tal como ISS-N1 del intrón 7. Los métodos ejemplares incluyen la etapa de poner en contacto la célula con un ONA de tc-ADN de entre 12 y 16 nucleótidos o entre 13 y 15 nucleótidos. Los ONA de tc-ADN adecuados para el uso en tales métodos comprenden la secuencia de 15 nucleótidos 5'-CUUUCAUUAUGCUGG-3' (SMN2i7(10;25), SEQ ID N°: 5). En los métodos relacionados, el ONA de tc-ADN es complementario a un tallo-bucle terminal (TSL) del pre-mARN de SMN2, tal como TSL-2 del exón 7. Los ONA de tc-ADN adecuados para el uso en tales métodos comprenden la secuencia de 13 nucleótidos 5'-UUAUUUAAGGAA-3' (SMN2e7(39;51), SEQ ID N°: 6).

En realizaciones adicionales se proporcionan métodos para destruir un mARN de DM1 que comprende una o más amplificaciones de CUG en 3' en una célula, y dichos métodos comprenden la etapa de poner en contacto una célula con un ONA de tc-ADN que comprende 9-27 triciclo nucleótidos, en el que el ONA de tc-ADN es complementario a un mARN de DM1 mutada que comprende una o más amplificación(es) de CUG en 3' y en el que el ONA de tc-ADN es capaz de facilitar la destrucción mediada por RNasa del mARN de DM1. Los ONA de tc-ADN adecuados para el uso en tales métodos comprenden 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 N°: 7) y se ejemplifican mediante un ONA de tc-ADN que comprende la secuencia de 15 nucleótidos 5'-CAGCAGCAGCAGCAG-3' (DM1(CAG5), SEQ ID N°: 8). Otro ONA de tc-ADN ejemplar que facilita la destrucción de una DM1 mutada comprende la secuencia de 21 nucleótidos 5'-CAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG-3' (DM1(CAG7), SEQ ID N°: 9).

En otros aspectos, la presente descripción proporciona métodos para el tratamiento de la Distrofia Muscular de Duchenne (DMD), métodos para el tratamiento de la Atrofia Muscular Espinal (AME), y métodos para el tratamiento de la Distrofia Miotónica de Steinert (DS). Cada uno de estos métodos emplea la etapa de administrar a un paciente un ONA de tc-ADN, como se describe en la presente memoria, para eliminar un exón mutado de un mARN de distrofina, para incluir un exón atípico en un mARN de SMN2, o para destruir un mARN de DM1 que comprende una o más amplificaciones de CUG en 3', respectivamente.

Estas y otras realizaciones, características y ventajas de la descripción serán evidentes a partir de la descripción detallada y de las reivindicaciones adjuntas expuestas más adelante en la presente memoria.

Descripción breve de los dibujos

La Figura 1 es una tabla de diversos nucleótidos sintéticos usados para la producción de los oligonucleótidos antisentido.

La Figura 2 es una representación estructural de un triciclo-ADN (tc-ADN).

La Figura 3 es un diagrama que muestra que el ratón *mdx* porta una mutación sin sentido en el exón 23 del gen de distrofina, que impide la síntesis de distrofina funcional. El exón 23 codifica parcialmente las repeticiones R6 y R7 en las que una mutación de C a T crea un codón de parada (TAA). El ONA de tc-ADN de 15 nucleótidos para la omisión de exones en el sitio de corte y empalme donante de 3' del exón 23, denominado M23D (+02-13), tiene la secuencia de nucleótidos 5'-AACCTCGGCTTACCT-3' (SEQ ID N°: 1) e hibrida con la unión exón 23/intrón 23 del pre-mARN de distrofina objetivo, que se define mediante la secuencia 5'-exón 23...TCAGgtaagccgaggttgcc...intrón 23-3' (SEQ ID N°: 2), en el que las letras mayúsculas designan los nucleótidos exónicos y las letras minúsculas designan los nucleótidos intrónicos.

La Figura 4 es un gel de agarosa de reacciones de RT-PCR anidada que muestra la omisión del exón 23 del pre-mARN de distrofina en miotubos de *mdx* transfectados, con o sin oligofectamina, con 1, 2, y 10 µg del ONA de tc-ADN M23D (+02-13). Después de 48 horas, se recogieron los cultivos y se procesaron para la extracción del mARN.

La Figura 5 es un gel de agarosa de reacciones de RT-PCR anidada que muestra la omisión del exón 23 del pre-mARN de distrofina en miotubos de *mdx* transfectados con 0,5, 1, 2, 5 y 10 µg del ONA de tc-ADN M23D (+02-13) en presencia de oligofectamina. Después de 48 horas, se recogieron los cultivos y se procesaron para la extracción del mARN.

La Figura 6 es un gel de agarosa de reacciones de RT-PCR anidada que muestra la omisión del exón 23 del pre-mARN de distrofina en miotubos de *mdx* transfectados con 5 µg del ONA de tc-ADN M23D (+02-13) en presencia de oligofectamina. Los cultivos se recogieron y se procesaron para la extracción del mARN del día 0 al día 15 tras la transfección.

5 La Figura 7 es un gel de agarosa de reacciones de RT-PCR anidada que muestra la omisión del exón 23 del pre-mARN de distrofina en ratones *mdx* de ocho semanas de edad a los que se les inyectaron en el músculo tibial anterior 50 µl de PBS (solución salina tamponada con fosfato) que contenía 100, 80, 40, 20, 10 y 5 µg del ONA de tc-ADN M23D (+02-13). Los animales se sacrificaron 3 semanas más tarde, y se procesaron las muestras de músculo para el análisis del mARN.

10 La Figura 8 es un gel de agarosa de reacciones de RT-PCR que muestra la omisión del exón 23 del pre-mARN de distrofina en ratones *mdx* de ocho semanas de edad a los que se les inyectaron en el músculo tibial anterior 50 µl de PBS (solución salina tamponada con fosfato) que contenía 10 µg del ONA de tc-ADN M23D (+02-13). Los animales se sacrificaron 4, 10 y 20 semanas más tarde, y se procesaron las muestras de músculo para el análisis del mARN.

15 La Figura 9 es una fotomicrografía de la inmunotinción de distrofina en cortes transversales de tejido del músculo tibial anterior de ratones *mdx* a los que a las ocho semanas se les inyectaron 50 µl de PBS (solución salina tamponada con fosfato) que contenía 10 µg del ONA de tc-ADN M23D (+02-13). Los animales se sacrificaron 4, 10 y 20 semanas más tarde, y se procesaron las muestras de músculo para la inmunotinción.

20 La Figura 10 es una inmunotinción de distrofina en el SNC de un ratón normal y un ratón *mdx* al que se le inyectó el ONA de tc-ADN M23D (+02-13) en el hipocampo o en el líquido cefalorraquídeo. Cortes A-B-C a nivel del hipocampo de ratones normales, *mdx* y *mdx* tratados con 20 µg del tc-ADN M23D (+02-13), un mes después de una única inyección intratecal. Cortes D-E-F a nivel del cerebelo de ratones normales, *mdx* y *mdx* tratados con 200 µg del tc-ADN M23D (+02-13), un mes tras la administración en el líquido cefalorraquídeo. Se hace una tinción de contraste de los núcleos con DAPI.

La Figura 11 es una representación esquemática del procesamiento total del pre-mARN en un mARN maduro.

25 La Figura 12 es un gel de agarosa de reacciones de RT-PCR anidada que muestra la omisión del exón 51 del pre-mARN de distrofina en ratones de hDMD de ocho a diez semanas de edad a los que se les inyectaron en el músculo tibial anterior 50 µl de PBS (solución salina tamponada con fosfato) que contenía diversos ONA de tc-ADN.

La Figura 13 es una representación esquemática de las estructuras intrón-exón y de la localización cromosómica de los genes SMN1 y SMN2.

30 La Figura 14 es una representación esquemática de la mutación puntual (C6T) en SMN2, que carece de manera predominante del exón 7, que afecta al corte y empalme del mARN.

La Figura 15 es una representación esquemática de la inclusión incrementada del exón 7 en SMN2 mediante la mejora del uso del aceptor de corte y empalme ("SA") 7 en el límite del intrón 6-exón 7, y el donante de corte y empalme (SD) 7 en el límite del exón 7-intrón 7.

35 La Figura 16 es una representación esquemática de la estructura del exón 7 en SMN1 y SMN2.

La Figura 17 es una representación esquemática de una secuencia objetivo y los efectos aparentes del ONA de tc-ADN SMN2e7(39;51) (SEQ ID N°: 6) sobre la estructura del exón 7 de SMN1 y SMN2. El ONA de tc-ADN SMN2e7(39;51), con la secuencia 5'-UUAAUUUAAGGAAUGUG-3', probablemente altera la estructura del tallo-bucle terminal 2 en SMN2, y de ese modo aumenta la inclusión del exón 7 en SMN1 y SMN2.

40 La Figura 18 es una representación esquemática de una secuencia objetivo y los efectos aparentes del ONA de tc-ADN SMN2i7(10;25) (SEQ ID N°: 5) sobre la inclusión del exón 7 de SMN1 y SMN2. El ONA de tc-ADN SMN2i7(10;25), con la secuencia 5'-CACUUUCAUUAUGCUGG-3', impide probablemente el reconocimiento de la secuencia silenciadora intrónica ("ISS")-N1, lo que permite el reconocimiento del sitio de corte y empalme de 5' en el límite del exón 7-intrón 7. EXINCT se refiere a contexto inhibitorio extendido. Basándose en un análisis de mutaciones exhaustivo, se ha mostrado que C6U crea un contexto inhibitorio extendido que afecta a la definición del exón 7.

45 La Figura 19 es un gel de agarosa de reacciones de RT-PCR (Panel B) y una representación normalizada (Panel A) que muestra la inclusión del exón 7 en SMN2 en fibroblastos de un paciente de AME (línea celular G03813). Después de 48 horas, se recogieron los cultivos y se procesaron para la extracción del mARN. La línea continua corresponde a células de control tratadas de manera simulada, la línea discontinua corresponde a células tratadas con el ONA de tc-ADN SMN2i7(10;25) (denominado tc-I7), y la línea de puntos corresponde a células tratadas con el ONA de tc-ADN SMN2e7(39;51) (denominado tc-TSL). Las representaciones se han normalizado según la cantidad total de SMN2+SMN1 (longitud completa) + SMN2 (Δ7) en cada carril. El panel C es una transferencia de Western que muestra los niveles de SMN en células G03813 transfectadas con los oligonucleótidos de tc-ADN indicados. La actina se muestra como control de carga. Es digno de mención el efecto aditivo del ONA de tc-ADN SMN2i7(10;25)

(denominado tc-ISS7) y el ONA de tc-ADN SMN2e7(39;51) (denominado tc-TSL) sobre la producción de SMN2. El panel D es una fotomicrografía que muestra la localización nuclear de SMN en las células tratadas con tc-TSL (puntos oscuros). Se hace una tinción de contraste de los núcleos con DAPI.

5 La Figura 20 (Panel A) es una transferencia de Northern que muestra niveles decrecientes de mARNs de DMPK humano mutante con cantidades crecientes del ONA de tc-ADN DM1(CAG7) (denominado tc-ADN (CAG)₇) transfectado en mioblastos de DM1 *in vitro*. Después de 3 días, se recogieron los cultivos y se procesaron para la extracción del mARN y el análisis mediante transferencia de Northern. El panel B es una representación de cuantificación que refleja la proporción de mARNs de DMPK mutante respecto del DMPK normal.

10 La Figura 21 (Panel A) es una transferencia de Northern que muestra niveles decrecientes de mARNs de DMPK humano mutante con cantidades crecientes del ONA de tc-ADN DM1(CAG7) (denominado tc-ADN (CAG)₇), con la secuencia 5'-CAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG-3' (SEQ ID N°: 9), inyectado en los músculos TA de ratones de DM1 que expresan el mARN de DMPK humano con 700 repeticiones de CUG. El Panel C es una transferencia de Northern que muestra niveles disminuidos de mARNs de DMPK humano mutante cuando se inyectaron 30 o 60 µg del ONA de tc-ADN DM1(CAG7) en los músculos TA de ratones de DM1 (n = 4). Los Paneles B y D son representaciones de cuantificación que reflejan la proporción de mARNs de DMPK humano mutante respecto de DMPK de ratón en transferencias de Northern de los Paneles A y C, respectivamente.

Descripción detallada

20 La presente descripción se basa en el descubrimiento inesperado de que los oligonucleótidos antisentido (ONA) de triciclo-ADN (tc-ADN) se pueden emplear de manera adecuada para enmascarar sitios de corte y empalme de pre-mARN en el gen de distrofina, para enmascarar secuencias de silenciamiento intrónico o secuencias tallo-bucle terminales en un gen de SMN2, o para destruir un mARN de DM1 que comprende una o más amplificaciones de CUG en 3'. Estos descubrimientos tendrán una amplia aplicación en el tratamiento de las enfermedades genéticas, en general, y, de manera más específica, en el tratamiento de la Distrofia Muscular de Duchenne, la Atrofia Muscular Espinal, y la Distrofia Miotónica de Steinert.

25 El triciclo-ADN (tc-ADN) pertenece a una clase nueva de análogos de ADN restringidos que muestran capacidades de hibridación mejoradas al ARN complementario. Ittig *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 32:346-353 (2004); Ittig *et al.*, Praga, Academia de Ciencias de la República Checa. 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); and Renneberg *et al.*, *JACS.* 124:5993-6002 (2002). Los heterodúplex de pre-mARN/ONA de tc-ADN descritos en la presente memoria son resistentes a la RNasa H y, como consecuencia, impiden la destrucción del pre-mARN seleccionado como objetivo. La ventaja de la química de triciclo-ADN es que las propiedades estructurales de su esqueleto permiten una reducción de la longitud de un ONA a la vez que se mantiene una afinidad elevada y una hibridación sumamente específica con una secuencia de nucleótidos complementaria. Inesperadamente, se pueden usar de manera ventajosa ONA de tc-ADN a dosis de microgramos *in vivo* mediante el uso de la aplicación intramuscular, que son al menos 10 veces menores que las dosis necesarias para las tecnologías de oligonucleótidos antisentido convencionales. Además, los tc-ADN conservan una actividad completa con longitudes antisentido reducidas. Así, por ejemplo, los ONA de tc-ADN de 13 a 15 nucleótidos son sumamente eficaces en las aplicaciones *ex vivo* e *in vivo* ejemplificadas mediante la presente descripción.

40 El ONA de tc-ADN descrito en la presente memoria también exhibe una estabilidad *in vivo* incrementada en comparación con las químicas de oligonucleótidos antisentido existentes tales como, por ejemplo, las químicas de 2'-O-metil-fosforotioato o morfolino. Así, por ejemplo, una única inyección intramuscular de un ONA de tc-ADN de la presente descripción conserva la eficacia *in vivo* durante más de 20 semanas tras la administración.

45 Además, y de manera bastante sorprendente, los ONA de tc-ADN de la presente descripción, tal como se ejemplifica mediante el ONA de tc-ADN denominado M23D(+02-13), se pueden administrar al sistema nervioso central (SNC), por medio de administración intra-parenquimatosa o intra-ventricular o mediante administración en el espacio subaracnoideo, para restablecer en las neuronas del hipocampo CA1 o en las neuronas de la corteza cerebral o cerebelosa, un gen mutado, tal como un gen de distrofina mutada. Así, se demuestra que los ONA de tc-ADN descritos en la presente memoria pueden atravesar de manera eficaz la barrera ependimaria.

La presente descripción se entenderá mejor mediante referencia a las siguientes definiciones:

50 Definiciones

Tal como se usa 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 mediante la introducción de un anillo de ciclopropano para restringir la flexibilidad conformacional del esqueleto y para optimizar la geometría del esqueleto del ángulo de torsión γ . Los tc-ADNs que contienen adenina y timina homobásicas forman pares de bases A-T extraordinariamente estables con los ARNs complementarios.

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "oligonucleótido antisentido (ONA)" se refiere a un oligonucleótido que es capaz de interactuar y/o hibridar con un pre-mARN o un mARN que tiene una secuencia de

nucleótidos complementaria, y de ese modo se modifica la expresión del gen. Los oligonucleótidos antisentido dependientes de enzimas incluyen formas que dependen de la actividad de RNasa H para degradar el mRNA objetivo, e incluyen ADN monocatenario, ARN, y oligonucleótidos antisentido de fosforotioato. Los oligonucleótidos antisentido de bloqueo estérico (antisentido independientes de RNasa-H) interfieren con la expresión del gen u otros procesos celulares dependientes del mRNA mediante la unión a una secuencia objetivo de mRNA. Los oligonucleótidos antisentido de bloqueo estérico incluyen oligonucleótidos antisentido de 2'-O alquilo, oligonucleótidos antisentido de morfolino, y oligonucleótidos antisentido de triciclo-ADN. Como se describe en la presente memoria, en ciertas aplicaciones se pueden emplear oligonucleótidos antisentido de tc-ADN en aplicaciones dependientes de enzimas tales como, por ejemplo, la destrucción mediada por RNasa del mRNA de DM1 que comprende una o más amplificaciones de CUG en 3'.

Tal como se usa en la presente memoria, "complementario" se refiere a una molécula de ácido nucleico que puede formar enlace(s) de hidrógeno con otra molécula de ácido nucleico mediante emparejamiento de bases de Watson-Crick tradicional u otros tipos no tradicionales de emparejamiento (p.ej., formación de enlaces de hidrógeno de Hoogsteen o de Hoogsteen invertido) entre nucleósidos o nucleótidos complementarios. Con respecto al ONA de tc-ADN de la presente descripción, la energía libre de unión para un ONA de tc-ADN con su secuencia complementaria es suficiente para permitir que se desarrolle la función relevante del ONA de tc-ADN, y existe un grado suficiente de complementariedad para evitar la unión inespecífica del ONA de tc-ADN a secuencias no objetivo en las 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 muy conocida en la técnica (véase p.ej., Turner *et al.*, *CSH Symp. Quant. Biol.* LII:123-133 (1987); Frier *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 83:9373-77 (1986); y Turner *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 109:3783-3785 (1987)). Así, "complementario" (o "hibridable de manera específica") son expresiones que indican un grado suficiente de complementariedad o emparejamiento preciso de forma que se da la unión estable y específica entre un ONA de tc-ADN y un pre-mRNA o mRNA objetivo.

Se entiende en la técnica que una molécula de ácido nucleico no necesita ser un 100% complementaria a una secuencia de ácido nucleico objetivo para que sea hibridable de manera específica. Es decir, dos o más moléculas de ácido nucleico pueden ser menos que completamente complementarias. La complementariedad se indica mediante un porcentaje de residuos contiguos en una molécula de ácido nucleico que pueden 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 la segunda molécula de ácido nucleico representa un 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, y 100% de complementariedad, respectivamente. Las moléculas de ácido nucleico "perfectamente" o "completamente" complementarias significan aquellas en las que todos los residuos contiguos de una primera molécula de ácido nucleico formarán enlaces de hidrógeno con el mismo número de residuos contiguos en una segunda molécula de ácido nucleico, en las que ambas moléculas de ácido nucleico tienen el mismo número de nucleótidos (es decir, tienen la misma longitud), o las dos moléculas tienen longitudes diferentes.

Tal como se usa en la presente memoria, las expresiones "mRNA precursor" o "pre-mRNA" se refieren a una única cadena inmadura de ácido ribonucleico mensajero (mRNA) que contiene una o más secuencia(s) intermedia(s) (intrones). El pre-mRNA es transcrito por una ARN polimerasa a partir de un molde de ADN en el núcleo de la célula, y está compuesto de secuencias alternantes de intrones y regiones codificantes (exones). Una vez que un pre-mRNA se ha procesado completamente eliminando mediante corte los intrones y uniendo los exones, se denomina "ARN mensajero" o "mRNA", que es un ARN que está compuesto exclusivamente de exones. Los pre-mRNAs eucarióticos existen solamente de manera transitoria antes de ser completamente procesados hasta mRNA. Cuando un pre-mRNA se ha procesado de manera adecuada hasta una secuencia de mRNA, se exporta fuera del núcleo y finalmente se traduce hasta una proteína mediante los ribosomas del citoplasma.

Tal como se usan en la presente memoria, las expresiones "corte y empalme" y "procesamiento" se refieren a la modificación de un pre-mRNA tras la transcripción, en la que se eliminan los intrones y se unen los exones. (Véase la Figura 11). El corte y empalme se da en una serie de reacciones que están catalizadas por un gran complejo de ARN-proteínas compuesto de cinco ribonucleoproteínas nucleares pequeñas (snRNPs) denominadas espliceosoma. En un intrón, es necesario un sitio de corte y empalme en 3', un sitio de corte y empalme en 5', y un sitio de ramificación para el corte y empalme. Los componentes del ARN de snRNPs interaccionan con el intrón y pueden estar implicados en la catálisis.

El corte y empalme del pre-mRNA implica dos reacciones bioquímicas secuenciales. Ambas reacciones implican la transesterificación espliceosómica entre nucleótidos del ARN. En una primera reacción, el 2'-OH de un nucleótido del punto de ramificación específico en un intrón, que se define durante el ensamblaje del espliceosoma, lleva a cabo un ataque nucleófilo sobre el primer nucleótido del intrón en el sitio de corte y empalme de 5' formando un intermedio con estructura de lazo. En una segunda reacción, el 3'-OH del exón de 5' liberado lleva a cabo un ataque nucleófilo en el último nucleótido del intrón en el sitio de corte y empalme de 3', por lo que se unen los exones y se libera el intrón con estructura de lazo. El corte y empalme del pre-mRNA está regulado por una secuencia silenciadora intrónica (ISS) y secuencias tallo-bucle terminales (TSL).

Tal como se usan en la presente memoria, las expresiones "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 proteicos que actúan en trans en un pre-mARN, lo que da como resultado el uso diferencial de los sitios de corte y empalme. En general, las secuencias silenciadoras intrónicas tienen entre 8 y 16 nucleótidos, y están menos conservadas que los sitios de corte y empalme en las uniones exón-intrón. Las secuencias tallo-bucle terminales tienen en general entre 12 y 24 nucleótidos, y forman una estructura secundaria en bucle debido a la complementariedad, y por lo tanto la unión, en la secuencia de 12-24 nucleótidos.

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "Atrofia Muscular Espinal (AME)" se refiere a los diferentes tipos clínicos de AME asociada al cromosoma 5, y cada uno tiene en común una causa genética y la manifestación de debilidad debida a la pérdida de las neuronas motoras de la médula espinal y del tronco encefálico. La Atrofia Muscular Espinal está provocada por mutaciones en el gen SMN1 de supervivencia de neuronas motoras. Es necesario al menos un alelo normal del gen SMN1 para la función normal.

La región del cromosoma 5 que contiene el gen SMN (supervivencia de neuronas motoras) tiene una gran duplicación. Una gran secuencia que contiene varios genes se da dos veces en segmentos adyacentes. Así, hay dos copias del gen, SMN1 y SMN2. El gen SMN2 tiene una mutación adicional que lo hace menos eficaz en la producción de la proteína, aunque lo hace a un nivel bajo. AME está provocada por la pérdida del gen SMN1 de ambos cromosomas. La gravedad de AME, que oscila de AME 1 a AME 3, está parcialmente relacionada con hasta qué punto los genes SMN2 restantes pueden compensar la pérdida de SMN1. A menudo existen copias adicionales de SMN2, y un número creciente de copias de SMN2 está relacionado con una enfermedad menos grave.

"Sujeto" significa 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 célula humana.

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad de ONA de tc-ADN que es suficiente, en el sujeto (p.ej., ser humano) al que se administra, para tratar o prevenir la enfermedad, trastorno, o afección indicada. El ONA de tc-ADN de la presente descripción, individualmente, o en combinación o junto con otros fármacos, se puede usar para tratar las enfermedades o afecciones discutidas en la presente memoria. Por ejemplo, para tratar una enfermedad, trastorno, o afección particular, el ONA de tc-ADN se puede administrar a un paciente o se puede administrar a otras células adecuadas evidentes para los expertos en la técnica, individualmente o en combinación con uno o más fármacos, en condiciones adecuadas para el tratamiento.

Tal como se usa en la presente memoria, la frase "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que son fisiológicamente tolerables y que no producen en general una reacción alérgica o reacción adversa similar, tal como malestar gástrico, mareo y similares, cuando se administran a un ser humano. Preferiblemente, tal como se usa en la presente memoria, la expresión "farmacéuticamente aceptable" significa aprobada por una autoridad reguladora del Gobierno Federal o de un Gobierno Estatal, o enumerada en la Farmacopea de los EE.UU. u otra farmacopea reconocida en general para el uso en animales, y más en particular en seres humanos.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "aislado" significa que el material mencionado se extrae de su medio nativo, p.ej., una célula. Así, 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 da de manera natural (p.ej., componentes citoplasmáticos o de la membrana).

El término "purificado", tal como se usa en la presente memoria, se refiere al material que se ha aislado en condiciones que reducen o eliminan la presencia de materiales no relacionados, es decir, contaminantes, que incluyen los materiales nativos de los que se obtiene el material. Por ejemplo, un ONA de tc-ADN purificado preferiblemente está sustancialmente libre de componentes de células o de cultivos, que incluyen los componentes de cultivos de tejidos, contaminantes, y similares. Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "sustancialmente libre" se usa de manera operativa, en el contexto del ensayo analítico del material. Preferiblemente, el material purificado sustancialmente libre de contaminantes está al menos un 50% puro; más preferiblemente, al menos un 90% puro, y todavía más preferiblemente al menos un 99% puro. La pureza se puede determinar mediante cromatografía, electroforesis en gel, inmunoensayo, análisis de la composición, ensayo biológico, y otros métodos conocidos en la técnica.

En la presente descripción, cualquier intervalo de concentraciones, intervalo de porcentajes, intervalo de proporciones, o intervalo de números enteros se debe entender que incluye el valor de cualquier número entero en el intervalo enumerado y, cuando sea adecuado, las fracciones del mismo (tal como una décima y una centésima de un número entero), a menos que se indique de otra manera. Además, cualquier intervalo de números mencionado en la presente memoria con respecto a cualquier característica física, tal como las subunidades de polímeros, el tamaño o el grosor, se debe entender que incluye cualquier número entero en el intervalo enumerado, a menos que se indique de otra manera. Tal como se usa en la presente memoria, "alrededor de" o "que consiste básicamente en" significan $\pm 20\%$ del intervalo indicado, valor, o estructura, a menos que se indique de otra manera.

Tal como se usa en la presente memoria, los términos "incluyen" y "comprenden" se usan de manera sinónima. Se debería entender que los términos "un" y "uno", tal como se usan en la presente memoria, se refieren a "uno o más" de los componentes enumerados. El uso de la alternativa (p.ej., "o") se debería entender que significa uno, ambos, o cualquier combinación de los mismos de las alternativas.

5 El término "alrededor de" o "aproximadamente" significa en un intervalo estadísticamente significativo de un valor. Tal intervalo puede estar dentro de un orden de magnitud, preferiblemente en un 50%, más preferiblemente en un 20%, todavía más preferiblemente en un 10%, y aún más preferiblemente en un 5% de un valor o intervalo dado. La variación permisible abarcada por la expresión "alrededor de" o "aproximadamente" depende del sistema particular en estudio, y alguien de experiencia habitual en la técnica lo puede apreciar fácilmente.

10 *Oligonucleótidos Antisentido de Triciclo-ADN para el Tratamiento de la Distrofia Muscular de Duchenne*

Tal como se indicó anteriormente, en ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona ONA de tc-ADN que se pueden emplear de manera adecuada para el tratamiento de la Distrofia Muscular de Duchenne (DMD), una forma asociada a X recesiva grave de distrofia muscular que se caracteriza por la progresión rápida de la degeneración muscular, que conduce finalmente a la pérdida de la capacidad de andar, parálisis, y muerte. La DMD está provocada por una mutación, tal como una mutación sin sentido o de desplazamiento del marco de lectura, en un gen de distrofina, que está localizado en el cromosoma X humano. El gen de distrofina codifica la proteína distrofina, un componente estructural importante en el tejido muscular que proporciona estabilidad estructural al sarcolema de la fibra muscular así como al complejo de distroglicano (DGC), localizado en la membrana celular. Una mutación sin sentido o de desplazamiento del marco de lectura da como resultado la terminación prematura de la traducción y, por lo tanto, una proteína distrofina truncada de manera C-terminal.

La DMD provocada por una o más mutación(es) de parada o mutación(es) de desplazamiento del marco de lectura se puede mitigar eliminando uno o varios exones para restablecer el marco de lectura traduccional, y de ese modo se restablece la secuencia de mRNA en dirección 3' de la mutación. Para conseguirlo, como parte de la presente descripción, se desarrollaron ONA de tc-ADN para las regiones seleccionadas como objetivo del pre-mRNA que pudieran enmascarar el reconocimiento del corte y empalme de uno o más exón(es). Seleccionando como objetivo estas regiones con ONA de tc-ADN, los exones se pueden eliminar por medio del corte y empalme alternativo para producir mRNA maduro de distrofina funcional.

Así, los ONA de tc-ADN descritos en la presente memoria son eficaces para facilitar la omisión de uno o más exones mutados en un gen de distrofina durante el procesamiento de un pre-mRNA de distrofina, y de ese modo se restablece el marco de lectura adecuado del mRNA de distrofina resultante, que, cuando se traduce, produce una proteína distrofina funcional. Así, el ONA de tc-ADN descrito en la presente memoria se puede usar terapéuticamente para pacientes afectados de DMD.

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "omisión de exones" se refiere a la modificación del corte y empalme del pre-mRNA mediante la selección como objetivo de los sitios donantes y/o aceptores de corte y empalme en un pre-mRNA con uno o más oligonucleótido(s) antisentido (ONAs) complementario(s). Mediante el bloqueo del acceso de un espliceosoma a uno o más sitios donantes o aceptores de corte y empalme, un ONA puede impedir una reacción de corte y empalme, y de ese modo se provoca la deleción de uno o más exones de un mRNA completamente procesado. La omisión de exones se lleva a cabo en el núcleo durante el proceso de maduración de pre-mRNAs. Ello incluye el enmascaramiento de secuencias clave implicadas en el corte y empalme de exones seleccionados como objetivo mediante el uso de oligonucleótidos antisentido (ONA) que son complementarios a las secuencias donantes de corte y empalme en un pre-mRNA. El ONA de tc-ADN proporcionado en la presente memoria se puede emplear de manera adecuada para la omisión de exones por medio del enmascaramiento de sitios de corte y empalme en uniones intrón/exón en un pre-mRNA de distrofina, y de ese modo se facilita la deleción de un exón mutante durante el procesamiento del pre-mRNA hasta un mRNA maduro.

Por ejemplo, una mutación sin sentido o de desplazamiento del marco de lectura en el exón 23 o en el exón 50 de un gen de distrofina produce una proteína distrofina truncada de manera carboxi-terminal, no funcional. Mediante la hibridación a nucleótidos que comprenden un sitio donante de corte y empalme del pre-mRNA de distrofina en el intrón 23 o en el intrón 51, respectivamente, y los nucleótidos adyacentes de 5' del exón 23 o del exón 51, los ONA de tc-ADN descritos en la presente memoria son capaces de impedir la inclusión del exón 23 o exón 51 mutados en el transcrito de mRNA maduro. La expresión de ese transcrito de mRNA maduro produce una proteína distrofina funcional que está delecionada en los aminoácidos codificados por el exón 23 o los exones 50 y 51, pero que incluye los aminoácidos de distrofina en posición N-terminal y C-terminal a esos aminoácidos delecionados.

Los ONA de tc-ADN descritos en la presente memoria para la omisión de un exón durante el procesamiento de un pre-mRNA de distrofina contienen en general 6-22 triciclo nucleótidos contiguos, en particular 8-20 triciclo nucleótidos, más en particular entre 10 y 18 triciclo nucleótidos contiguos, en los que 6-16 nucleótidos, en particular 8-16 nucleótidos del ONA de tc-ADN son complementarios a un sitio donante de corte y empalme intrónico del pre-mRNA de distrofina, en el que 2-8 nucleótidos del ONA de tc-ADN son complementarios a una región exónica del pre-mRNA de distrofina, y en el que el sitio donante de corte y empalme intrónico está contiguo con y en 5' de la región exónica. Dependiendo de la aplicación precisa considerada, el ONA de tc-ADN puede tener entre 12 y 16

nucleótidos o entre 13 y 15 nucleótidos, y puede comprender entre 6 y 14 nucleótidos que son complementarios al sitio donante de corte y empalme intrónico y entre 2 y 5 nucleótidos que son complementarios a la región exónica.

En la presente memoria se ejemplifican ONA de tc-ADN diseñados para la omisión de un exón 23 mutado en un pre-mARN de distrofina. El ONA de tc-ADN comprende la secuencia de nucleótidos 5'-AACCTCGGCTTACCT-3' (M23D (+02-13), SEQ ID N°: 1), e hibrida de manera específica con los nucleótidos del extremo 3' del intrón 23 del pre-mARN de distrofina y con los nucleótidos del extremo 5' contiguo del exón 23 del pre-mARN de distrofina. También se proporcionan ONA de tc-ADN diseñados para la omisión de un exón 51 mutado en un pre-mARN de distrofina. El ONA de tc-ADN comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en 5'-AGAAATGCCATCTTC-3' (H51 (+68+82), SEQ ID N°: 2), 5'-AAATGCCATCTTCCT-3' (H51 (+70+84), SEQ ID N°: 3), y 5'-TGCCATCTTCCTTGA-3' (H51 (+73+87), SEQ ID N°: 4), e hibrida de manera específica con los nucleótidos del extremo 3' del intrón 51 del pre-mARN de distrofina y con los nucleótidos del extremo 5' del exón 51 del pre-mARN de distrofina.

Oligonucleótidos Antisentido de Triciclo-ADN para el Tratamiento de la Atrofia Muscular Espinal

En otras realizaciones, la presente descripción proporciona ONA de tc-ADN que se pueden emplear de manera adecuada para el tratamiento de la Atrofia Muscular Espinal (AME). La AME está provocada por mutaciones en ambas copias del gen de SMN1, que en una célula normal se caracteriza por la presencia de los exones 7 y 8 en el mARN completamente procesado. Debido a que el mARN de SMN2 procesado normalmente no contiene los exones 7 o 8, la proteína SMN2 no puede compensar una pérdida de la proteína SMN1 funcional. Mediante el enmascaramiento de una secuencia de silenciamiento intrónico (ISS) y/o un tallo-bucle terminal (TSL) en un pre-mARN de SMN2, los ONA de tc-ADN descritos en la presente memoria son capaces de facilitar la inclusión del exón 7 o exón 8 atípicos en un pre-mARN de SMN2 procesado, que se traduce hasta una proteína SMN2 funcional modificada que es capaz de compensar la pérdida de la proteína SMN1 funcional y, cuando se expresa *in vivo*, la SMN2 funcional modificada puede invertir al menos parcialmente la Atrofia Muscular Espinal que está provocada por una mutación en el gen SMN1.

Así, la presente descripción proporciona ONA de tc-ADN para facilitar la inclusión de un exón atípico durante el procesamiento de un pre-mARN de SMN2, en el que el ONA de tc-ADN tiene una longitud de 6-22 triciclo nucleótidos, en particular 8-20 triciclo nucleótidos, más en particular una longitud de 10-18 triciclo nucleótidos, y en el que el ONA de tc-ADN es complementario a una secuencia silenciadora intrónica (ISS) o a un tallo-bucle terminal (TSL) de un pre-mARN de SMN2. Tal ONA de tc-ADN puede tener entre 13 y 17 nucleótidos, entre 12 y 16 nucleótidos, o entre 13 y 15 nucleótidos.

En la presente memoria se ejemplifican ONA de tc-ADN que comprenden la secuencia de 15 nucleótidos 5'-CUUUCUAUAAUGCUGG-3' (SMN2i7(10;25), SEQ ID N°: 5), cuyos ONA de tc-ADN son complementarios a una ISS de pre-mARN de SMN2 y que se pueden emplear para facilitar la inclusión del exón 7 atípico en un mARN de SMN2 procesado. También se ejemplifican en la presente memoria ONA de tc-ADN que comprenden la secuencia de 13 nucleótidos 5'-UUAUUUAAGGAA-3' (SMN2e7(39;51), SEQ ID N°: 6), cuyos ONA de tc-ADN son complementarios a una TSL2 de pre-mARN de SMN2 y que se pueden emplear también para facilitar la inclusión del exón 7 en un mARN de SMN2 procesado.

Oligonucleótidos Antisentido de Triciclo-ADN para el Tratamiento de la Distrofia Miotónica de Steinert

En realizaciones adicionales, la presente descripción proporciona ONA de tc-ADN que se pueden emplear de manera adecuada para el tratamiento de la Distrofia Miotónica de Steinert que resulta de amplificaciones de CUG en el extremo 3' del mARN que codifica DM1. Se cree que los mARNs de DM1 mutada que contienen excesivas amplificaciones de CUG se aíslan en el núcleo y se acumulan para formar focos nucleares. Estos focos son estables, y se cree que se unen a factores implicados en la maquinaria de corte y empalme, y de ese modo afectan de manera generalizada al transcriptoma. Como parte de la presente descripción, se demuestra, mediante el uso de un sistema de snARN U7, que los ONA de tc-ADN se pueden emplear para seleccionar como objetivo las secuencias de CUG, y facilitan la destrucción del mARN de DM1 mutada, y de ese modo conducen a la liberación de los factores de corte y empalme y a la eliminación de los focos nucleares. Sin limitarse a una teoría mecanicista particular, se cree además, de manera bastante sorprendente, que los ONA de tc-ADN descritos en la presente memoria son capaces de facilitar la destrucción del mARN que contiene excesivas amplificaciones de CUG.

Así, se describen ONA de tc-ADN que se pueden emplear de manera adecuada para facilitar la destrucción de un mARN de DM1 mutada que comprende un exceso de amplificaciones de CUG. Tales ONA de tc-ADN comprenden 9-27 triciclo nucleótidos, en los que el ONA de tc-ADN es complementario a un mARN de DM1 mutada que comprende una o más amplificación(es) de CUG en 3', y en los que el ONA de tc-ADN es capaz de facilitar la destrucción del mARN de DM1. Dependiendo de la aplicación precisa considerada, el ONA de tc-ADN 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 N°: 7). Un ONA de tc-ADN ejemplar para facilitar la destrucción de una DM1 mutada comprende la secuencia de 15 nucleótidos 5'-CAGCAGCAGCAGCAG-3' (DM1(CAG5), SEQ ID N°: 8). Otro ONA de tc-ADN ejemplar que facilita la destrucción de una DM1 mutada comprende la secuencia de 15 nucleótidos 5'-CAGCAGCAGCAGCAGCAG-3' (DM1(CAG7), SEQ ID N°: 9).

Síntesis y Aislamiento de Oligonucleótidos Antisentido de Triciclo-ADN

Se pueden sintetizar ONA de tc-ADN mediante el uso de protocolos conocidos en la técnica, por ejemplo como se describió en Caruthers *et al.*, *Methods in Enzymol.* 211:3-19 (1992); Thompson *et al.*, Publicación PCT N° WO 99/54459; Wincott *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 23:2677-2684 (1995); Wincott *et al.*, *Methods Mol. Bio.* 74:59 (1997); Brennan *et al.*, *Biotechnol Bioeng.* 61:33-45 (1998); y Brennan, Patente de EE.UU. N° 6.001.311.

Las metodologías para la síntesis de tc-ADN y ONA de tc-ADN se han descrito y se conocen bien en la técnica. Véase, por ejemplo, Steffens y Leumann, *J. Am. Chem. Soc.* 121(14):3249-3255 (1999); Steffens y Leumann, *J. Am. Chem. Soc.* 119:11548-11549 (1997); y Wengel, Patente de EE.UU. N° 7.034.133. El tc-ADN se puede sintetizar en un sintetizador de ADN comercial a partir de fosforamiditas generadas mediante química de cianoetil-fosforamiditas en fase sólida convencional. Los bloques de construcción de fosforamidita de tc-ADN se pueden sintetizar como se describió en Steffens y Leumann, *C. Helv. Chim. Acta* 80:2426-2439 (1997). Los ciclos de extensión de la cadena pueden ser básicamente idénticos a los de la síntesis de oligodesoxinucleótidos naturales. Véase el Manual del Usuario de Pharmacia LKB (56-1111-56) (Gene Assembler Special/4 Primers).

Por ejemplo, se puede llevar a cabo la síntesis de ONA de tc-ADN mediante la metodología de fosforamidita en fase sólida con el uso de un instrumento Gene Assembler Special de Pharmacia LKB o un Sintetizador de ADN PCR-MATE EP de Applied Biosystems (Modelo 391) conectado a un ordenador personal. Se pueden preparar las disoluciones de reactivo según los protocolos del fabricante. Véase el Manual del Usuario, Sintetizador de ADN PCR_MATE EP de Applied Biosystems (Modelo 391 (1989)) y el Manual del Usuario de Pharmacia LKB (56-1111-56) (Gene Assembler Special/4 Primers). Se puede obtener 1H-tetrazol (disolución 0,45 M en MeCN) de Fluka.

El ensamblaje de ONA de triciclo-ADN se puede llevar a cabo según los ciclos de síntesis habituales, con la excepción de que se puede emplear un tiempo de acoplamiento prolongado (p.ej., 6 minutos), un exceso de fosforamiditas de 11 veces, y el uso de una disolución 0,07 M en vez de 0,1 M del bloque de construcción de tricicloadenosina debido a su escasa solubilidad. Se pueden usar nucleósidos naturales de LCAA-CPG (Sigma) o poliestireno (Pharmacia) unidos como unidades iniciadoras.

La síntesis se puede llevar a cabo en el modo sin tritilo, finalizando con oligómeros 5'-destritilados. Las eficacias de acoplamiento se pueden monitorizar mediante ensayo de tritilo en tiempo real, y en general son de entre un 90 y 99%. Tras la síntesis, el soporte sólido se puede suspender en una disolución concentrada de NH₃ y dejarla durante 15 horas a 55 °C o 2 horas a temperatura ambiente.

El ONA de tc-ADN bruto se puede purificar mediante cualquiera de varias metodologías conocidas en la técnica tales como, por ejemplo, ultrafiltración, electroforesis en gel, o cromatografía. Se puede llevar a cabo una HPLC de intercambio iónico en una columna Nucleogen DEAE 60-7 (125 x 4 mm). Los oligonucleótidos aislados se pueden desalar en un cartucho SP-PAK C-18 (Waters) como se describe en Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" 11.29 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY, 1989). Los ONA de tc-ADN purificados se pueden disolver en NaCl 150 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 7,0 e incubar con fosfatasa alcalina (1 mg/ml) y fosfodiesterasa (2 mg/ml) a 37 °C. Después de 5 horas, la disolución se puede someter a purificación mediante HPLC.

La síntesis química de moléculas de ácido nucleico con sustituciones o modificaciones (base, carbohidrato o fosfato) puede impedir su degradación por las ribonucleasas del suero, lo que podría incrementar su potencia. Véase, p.ej., Eckstein *et al.*, Publicación PCT N° WO 92/07065; Perrault *et al.*, *Nature* 344:565 (1990); Pieken *et al.*, *Science* 253:314 (1991); Usman y Cedergren, *Trends in Biochem. Sci.* 17:334 (1992); Usman *et al.*, Publicación PCT N° WO 93/15187; y Rossi *et al.*, Publicación PCT N° WO 91/03162; Sproat, Patente de EE.UU. N° 5.334.711; Gold *et al.*, Patente de EE.UU. N° 6.300.074. Todas las referencias anteriores describen diversas modificaciones químicas que se pueden hacer a los restos de base, de fosfato, o de carbohidrato de los ONA de tc-ADN descritos en la presente memoria.

Formulación de Triciclo-ADN para la Administración In Vivo

Los ONA de tc-ADN descritos en la presente memoria pueden estar en una mezcla con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas. Tales excipientes son agentes de suspensión, por ejemplo carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, hidroxipropil-metilcelulosa, alginato sódico, polivinilpirrolidona, goma de tragacanto y goma arábiga; los agentes dispersantes o humectantes pueden ser un fosfolípido 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 de cadena alifática larga, por ejemplo heptadecaetilenoicetanol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y un hexitol tal como monooleato de polioxietileno sorbitol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo monooleato de polietileno sorbitán. Las suspensiones acuosas pueden contener también 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.

Las composiciones de ONA de tc-ADN pueden estar en forma de una suspensión acuosa u oleaginosa inyectable estéril. Las suspensiones se pueden formular según la técnica conocida mediante el uso de los agentes dispersantes o humectantes adecuados y agentes de suspensión que se han mencionado anteriormente. La preparación inyectable estéril puede ser también una disolución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable atóxico, por ejemplo en forma de una disolución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear están el agua, la disolución de Ringer y una disolución isotónica de cloruro sódico. Además, se emplean de manera convencional aceites fijos estériles como disolvente o medio de suspensión. Para este fin, se puede emplear cualquier aceite fijo suave, lo que incluye los mono- o diglicéridos sintéticos. Además, los ácidos grasos tales como ácido oleico tienen utilidad en la preparación de composiciones inyectables.

La presente descripción también incluye composiciones de ONA de tc-ADN preparadas para el almacenamiento o la administración, que incluyen una cantidad farmacéuticamente eficaz de los compuestos deseados en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Los vehículos o diluyentes aceptables para el uso terapéutico se conocen bien en la técnica farmacéutica, y se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., A.R. Gennaro edit., 1985). Por ejemplo, se pueden proporcionar conservantes y estabilizantes. Estos incluyen benzoato sódico, ácido sórbico y ésteres de ácido p-hidroxibenzoico. Además, se pueden usar antioxidantes y agentes de suspensión.

La presente descripción proporciona composiciones de ONA de tc-ADN y métodos para facilitar la omisión de exones o para enmascarar el silenciamiento intrónico o los tallos-bucles terminales en un pre-mARN o para seleccionar como objetivo la destrucción del mARN en una célula u organismo. En las realizaciones relacionadas, esta descripción proporciona métodos y composiciones de ONA de tc-ADN para tratar a un sujeto, que incluye una célula humana, tejido o individuo, que tiene una enfermedad o riesgo de desarrollar una enfermedad como se describió anteriormente en la presente memoria. En una realización, el método incluye administrar un ONA de tc-ADN de esta descripción o una composición farmacéutica que contiene el ONA de tc-ADN a una célula o a un organismo, tal como un mamífero, de forma que se modifique el procesamiento de un pre-mARN o se seleccione como objetivo la destrucción de un mARN. Los sujetos mamíferos susceptibles de tratamiento mediante el uso de las composiciones y métodos de la presente descripción incluyen los que padecen uno o más trastornos que son susceptibles de tal tratamiento tales como, por ejemplo, la Distrofia Muscular de Duchenne, la Atrofia Muscular espinal, o la Distrofia Miotónica de Steinert.

Las composiciones de ONA de tc-ADN de la presente descripción se pueden emplear de manera eficaz como formulaciones farmacéuticamente aceptables. Las formulaciones farmacéuticamente aceptables previenen, alteran la existencia o gravedad de, o tratan (mitigan uno o más síntoma(s) en un grado detectable o medible) de un estado patológico 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 de ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido acético, y ácido benceno sulfónico. Una composición o formulación farmacéutica se refiere a una composición o formulación en una forma adecuada para la administración, p.ej., administración sistémica, en una célula o paciente tal como un ser humano. Las formas adecuadas, en parte, dependen del uso o la vía de entrada, por ejemplo transdérmica o mediante inyección. Tales formas no deberían impedir que la composición o formulación alcance una célula objetivo (es decir, una célula en la que es deseable la administración del ONA de tc-ADN). Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas inyectadas en el torrente sanguíneo deberían ser solubles. En la técnica se conocen otros factores, e incluyen consideraciones tales como la toxicidad y las formas que impiden que la composición o formulación ejerza 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 estos. Los agentes emulsionantes adecuados pueden ser gomas naturales, por ejemplo goma arábica o goma de tragacanto, fosfolípidos naturales, por ejemplo soja, lecitina, y ésteres o ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo monooleato de sorbitán, y productos de condensación de dichos ésteres parciales con óxido de etileno, por ejemplo monooleato de polioxietileno sorbitán.

Los ONA de tc-ADN de esta descripción se pueden administrar a un paciente mediante cualquier medio habitual, con o sin estabilizantes, tampones, o similares, para formar una composición adecuada para el tratamiento. Cuando se desee usar un mecanismo de administración con liposomas, se pueden seguir los protocolos habituales para la formación de liposomas. Así, los ONA de tc-ADN de la presente descripción se pueden administrar en cualquier forma, por ejemplo de manera transdérmica o mediante inyección local, sistémica, o intratecal.

Esta descripción también incluye el uso de composiciones de ONA de tc-ADN que comprenden liposomas modificados superficialmente que contienen lípidos con poli(etileno glicol) (modificados con PEG, o liposomas de circulación prolongada o liposomas furtivos). Estas formulaciones ofrecen un método para incrementar la acumulación de ONA de tc-ADN en los tejidos objetivo. Esta clase de vehículos farmacológicos resiste a la opsonización y a la eliminación por el sistema fagocítico mononuclear (SFM o SRE), y de ese modo posibilita tiempos en la circulación sanguínea más prolongados y una exposición tisular incrementada para los ONA de tc-ADN encapsulados (Lasic *et al.*, *Chem. Rev.* 95:2601-2627 (1995) e Ishiwata *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.* 43:1005-1011 (1995)). Los liposomas de circulación prolongada aumentan la farmacocinética y farmacodinámica de los ONA

de tc-ADN, en particular en comparación con los liposomas catiónicos convencionales que se sabe que se acumulan en los tejidos del SFM (Liu *et al.*, *J. Biol. Chem.* 42:24864-24870 (1995); Choi *et al.*, Publicación PCT N° WO 96/10391; Ansell *et al.*, Publicación PCT N° WO 96/10390; Holland *et al.*, Publicación PCT N° WO 96/10392). También es probable que los liposomas de circulación prolongada protejan a los ONA de tc-ADN de la degradación por nucleasas en mayor grado en comparación con los liposomas catiónicos, basándose en su capacidad de evitar la acumulación en los tejidos del SFM metabólicamente agresivos, tales como el hígado y el bazo.

Una dosis farmacéuticamente eficaz es la dosis necesaria para prevenir, inhibir la existencia, o tratar (mitigar un síntoma hasta cierto punto, preferiblemente todos los síntomas) de un estado patológico. La dosis farmacéuticamente eficaz depende del tipo de enfermedad, la composición usada, la vía de administración, el tipo de mamífero a tratar, las características físicas del mamífero específico en consideración, la medicación concurrente, y otros factores que reconocerán los expertos en las técnicas 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 los ONA de tc-ADN de esta descripción.

Los niveles de dosis del orden de alrededor de 0,1 mg a alrededor de 140 mg por kilogramo de peso corporal por día son útiles en el tratamiento de las afecciones anteriormente indicadas (alrededor de 0,5 mg a alrededor de 7 g por paciente por día). La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con los vehículos para producir una forma farmacéutica individual varía dependiendo del hospedador tratado y del modo particular de administración. Las formas farmacéuticas unitarias contienen en general de alrededor de 1 mg a alrededor de 500 mg de un ingrediente activo.

Se entiende que el nivel de dosis específico para cualquier paciente particular depende de una diversidad de factores, que incluyen la actividad del compuesto específico empleado, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, el momento de la administración, la vía de administración, y la velocidad de excreción, la combinación de fármacos y la gravedad de la enfermedad particular que se somete a terapia. Tras la administración de las composiciones de ONA de tc-ADN según las formulaciones y métodos de esta descripción, los sujetos de ensayo exhibirán una reducción de alrededor del 10% a alrededor del 99% en uno o más síntomas asociados a la enfermedad o trastorno que se está tratando, en comparación con los tratados con placebo u otros sujetos de control adecuados.

Los ONA de tc-ADN se pueden administrar a las células mediante una diversidad de métodos conocidos para los expertos en la técnica, que incluyen la administración en formulaciones que comprenden los ONA de tc-ADN solos, o que comprenden además uno o más componentes adicionales, tales como un vehículo farmacéuticamente aceptable, diluyente, excipiente, adyuvante, emulsionante, tampón, estabilizante, conservante, o similares. En ciertas realizaciones, los ONA de tc-ADN se pueden encapsular en liposomas, administrados mediante iontoforesis, o se pueden incorporar en otros vehículos, tales como hidrogeles, ciclodextrinas, nanocápsulas biodegradables, microesferas bioadhesivas, o vectores proteicos (véase, p.ej., la Publicación PCT N° WO 00/53722).

La inyección directa de los ONA de tc-ADN de esta descripción, ya sea subcutánea, intramuscular, o intradérmica, puede tener lugar mediante el uso de las metodologías habituales de aguja y jeringa, o mediante tecnologías sin agujas, tales como las descritas en Conry *et al.*, *Clin. Cancer Res.* 5:2330-2337 (1999), y la Publicación PCT N° WO 99/31262.

Los métodos adicionales para la administración de las moléculas de ácido nucleico, tales como el ONA de tc-ADN de esta descripción, se describen, por ejemplo, en 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. Nat'l 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 para suplementar o complementar la administración de prácticamente cualquier ONA de tc-ADN considerado en esta descripción.

Ejemplos

La descripción anterior describe en general la presente descripción, que se ejemplifica adicionalmente mediante los siguientes ejemplos. Estos ejemplos específicos se describen únicamente con fines de ilustración, y no pretenden limitar el alcance de esta descripción. Aunque se han empleado objetivos, términos, y valores específicos en la presente memoria, tales objetivos, términos, y valores se entenderán de forma similar como ejemplares y no limitantes del alcance de esta descripción.

EJEMPLO 1

Uso de Oligonucleótidos Antisentido de Triciclo-ADN para Rescatar la Distrofina en las Fibras Musculares Distróficas

La Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) es un trastorno recesivo asociado a X que da como resultado mutaciones en el gen que codifica la distrofina. Las deleciones con marco de lectura incorrecto en el gen de distrofina que

codifican una proteína distrofina truncada deficiente conducen a fenotipos graves de DMD. Se desarrollaron estrategias de omisión de exones que usan oligonucleótidos antisentido (ONA) de triciclo-ADN (tc-ADN) para permitir la recuperación eficaz de mutaciones del gen de distrofina con marco de lectura incorrecto, y de ese modo restablecer el marco de lectura traduccional y por lo tanto la producción de proteína distrofina funcionalmente activa.

5 Se describen ONA de tc-ADN que, por ejemplo, hibridan con una unión exón 23/intrón 23 e interfieren con el procesamiento del pre-mARN de forma que el exón 23 se elimina mediante corte y empalme del mARN procesado resultante. De manera alternativa, los ONA de tc-ADN que hibridan a una unión exón 51/intrón 51 interfieren de forma similar con el procesamiento del pre-mARN de forma que el exón 51 se elimina mediante corte y empalme del mARN procesado. Las proteínas distrofina resultantes están delecionadas así en las secuencias de aminoácidos
10 codificadas por el exón 23 o el exón 51, respectivamente, y todavía conservan una funcionalidad suficiente de forma que se invierte el fenotipo de DMD grave.

EJEMPLO 2

El Modelo de Ratón mdx

15 El ratón *mdx* es un modelo murino de DMD que carece de la proteína distrofina de longitud completa, pero conserva todas las isoformas de distrofina más pequeñas. Bulfield *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:1189-1192 (1984). El ratón *mdx* porta una mutación sin sentido en el exón 23 del gen de distrofina, que impide la síntesis de distrofina funcional (véase la Figura 3). El exón 23 codifica parcialmente las repeticiones R6 y R7 en las que una mutación de C a T crea un codón de parada (TAA).

EJEMPLO 3

Estudios In Vitro

Este ejemplo demuestra que los miotubos de *mdx* transfectados con un ONA de tc-ADN de 15 nucleótidos denominado M23D (+02-13) que tiene la secuencia de nucleótidos 5'-AACCTCGGCTTACCT-3' experimentan la omisión de exones en el sitio de corte y empalme donante de 3' del exón 23, de forma que el pre-mARN de distrofina se procesa hasta un mARN que tiene delecionado el exón 23.

25 El ONA de tc-ADN denominado M23D (+02-13) se diseñó de forma que se hibrida a la secuencia objetivo intrón 22 - ttttgag[GCTC...EXÓN 23...TCAG]gtaagccgaggttgcc - intrón 23 en la unión de corte y empalme del exón 23/intrón 23.

Los miotubos de *mdx* se transfectaron con el ONA de tc-ADN M23D (+02-13) (1, 2 y 10 µg) con o sin oligofectamina. Una muestra se dejó sin tratar, como control negativo. Después de 48 horas, se recogieron los cultivos y se extrajo el mARN mediante el uso del kit RNeasy Mini (Qiagen). Después se transcribió inversamente el mARN, como sigue. Se mezclaron ocho microlitros del ARN extraído (500 ng a 1 µg) con 1 µL de dNTP y 1 µL de hexámeros aleatorios, y la mezcla se incubó durante 5 minutos a 65 °C. La mezcla se enfrió después sobre hielo. Se añadió MgCl₂ 25 mM (4 µL), DTT 0,1 M (2 µL), 1 µL de inhibidor de ribonucleasas RNase Out (40 U/µL), tampón 1X (2 µL de reserva 10X) y 50 U de transcriptasa inversa SuperScript a la mezcla para llevar la reacción hasta un volumen final de 20 µL. La reacción se incubó después durante 10 minutos a 25 °C, seguido de 50 minutos a 42 °C. A continuación, la reacción se inactivó mediante calentamiento durante 15 minutos a 70 °C. La reacción se colocó después sobre hielo y se agitó en vórtex. Después se añadió un µL de RNasa H a la reacción, y se incubó a 37 °C durante 20 minutos.

A continuación, se ensayó la omisión del exón 23 mediante PCR anidada, mediante el uso de las siguientes condiciones. Se combinaron veinticinco µL de PCR Master Mix (50 U/µL de Taq polimerasa, dNTPs 400 µM, MgCl₂ 3 mM) con 3 µL de cADN, 22 µL de H₂O y 1 µL de cada uno de los dos cebadores siguientes (concentración de reserva 100 µM):

Ex 20 Fo 5' - CAGAATTCTGCCAATTGCTGAG -3'

Ex 26 Ro 5' - TTCTTCAGCTTGTGTCATCC - 3'

La reacción se sometió después a los siguientes parámetros de termociclado. Cinco min a 94 °C, seguido de treinta ciclos de 30 seg 94 °C, 1 min 55 °C y 2 min a 72 °C. Finalmente, la reacción se somete a una incubación de cinco minutos a 72 °C.

Se añadieron dos microlitros del producto de PCR a otra reacción de PCR como molde, mediante el uso de 1 µL de los cebadores siguientes (concentración de reserva 100 µM). La reacción también incluyó 25 µL de PCR Master Mix y 23 µL de H₂O.

50 Ex 20 Fi 5' - CCCAGTCTACCACCCTATCAGAGC -3'

Ex 26 Ri 5' - CCTGCCTTAAGGCTTCCTT -3'

La reacción se sometió a los siguientes parámetros de termociclado - Cinco min a 94 °C, seguido de veinticinco ciclos de 30 seg a 94 °C, 1 min a 55 °C y 2 min a 72 °C. Finalmente, la reacción se sometió a una incubación de

cinco minutos a 72 °C.

Los datos presentados en la Figura 4 demuestran que: (1) el ONA de tc-ADN de 15 nucleótidos M23D (+02-13) puede conseguir la omisión del exón 23 mutado en el mRNA de distrofina de *mdx ex vivo* y (2) la oligofectamina mejora la absorción del ONA de tc-ADN *ex vivo*.

- 5 Se transfectaron miotubos de *mdx* con el ONA de tc-ADN M23D (+02-13) (0,5, 1, 2, 5 y 10 µg) en presencia de oligofectamina. Los cultivos se procesaron como se describió anteriormente. Los datos presentados en la Figura 5 demuestran que la omisión es perceptible en presencia de 2 µg del ONA de tc-ADN M23D (+02-13).

- 10 Los miotubos de *mdx* se transfectaron con 5 µg de ONA de tc-ADN M23D (+02-13) en presencia de oligofectamina. Los cultivos se procesaron como se describió anteriormente en momentos diferentes tras la transfección (del día 0 al día 15). Los datos presentados en la Figura 6 demuestran que: (1) se observó la omisión en el día 3 (D3) y (2) la omisión todavía fue detectable en el día 15 (D15), pero disminuyó a partir del día 7 (D7).

EJEMPLO 4

Estudios In Vivo

- 15 Este ejemplo demuestra que los ratones *mdx* a los que se inyectó un ONA de tc-ADN de 15 nucleótidos denominado M23D (+02-13) que tiene la secuencia de nucleótidos 5'-AACCTCGGCTTACCT-3' experimentan la omisión de exones en el sitio de corte y empalme donante de 3' del exón 23, de forma que el pre-mARN de distrofina se procesa hasta un mRNA que tiene delecionado el exón 23.

- 20 Se inyectó a ratones *mdx* de dieciocho semanas de edad en el músculo tibial anterior 50 µl de PBS (solución salina tamponada con fosfato) que contenía 100, 80, 40, 20, 10 y 5 µg del ONA de tc-ADN M23D (+02-13). Los animales se sacrificaron 3 semanas después. Las muestras musculares se procesaron para el análisis del mRNA mediante el uso de los mismos parámetros proporcionados anteriormente para el Ejemplo 3, y los resultados se dan en la Figura 7.

- 25 Los datos presentados en la Figura 7 demuestran que se dio la omisión de exones en todas las condiciones ensayadas. Además, se detectaron niveles significativos de la proteína distrofina en cortes transversales (no mostrados). La inyección de 2 µg del ONA de tc-ADN M23D (+02-13) fue equivalente a 5 µg del ONA de tc-ADN M23D (+02-13) (no mostrado).

- 30 Se inyectó a ratones *mdx* de ocho semanas de edad de manera intramuscular 50 µl de PBS que contenía 10 µg del ONA de tc-ADN M23D (+02-13). Los animales se sacrificaron a las 4, 10, y 20 semanas tras la inyección. Se ensayó el mRNA de distrofina en las muestras musculares y los cortes transversales, como se describió anteriormente. Los resultados se presentan en la Figura 8.

- 35 Se ensayó la expresión de la proteína distrofina en los cortes musculares transversales mediante el uso de inmunotinción, como sigue. Se añadió anticuerpo monoclonal primario NCL-Dys 2 (dilución 1:100) a las muestras, mediante el uso del kit M.O.M. (kit Mouse on Mouse). Las muestras se lavaron después 3 veces en PBS. Las muestras se incubaron después con anticuerpo secundario anti-IgG de ratón de cabra, marcado con Alexa Fluor 488 (Molecular Probes) durante dos horas, seguido de un lavado con PBS, un lavado con TritonX al 0,01% y un lavado final con PBS. Los resultados de este experimento se proporcionan en la Figura 9.

- Los datos presentados en las Figuras 8 y 9 demuestran que (1) la omisión de exones fue evidente a las 4 y 10 semanas, pero no se observó a las 20 semanas; (2) la distrofina es claramente detectable de las 4 semanas a las 20 semanas; y (3) el ONA de tc-ADN M23D (+02-13) parece más eficaz *in vivo* que *ex vivo*.

40 EJEMPLO 5

Inmunotinción cerebral

- 45 A ratones *mdx* de ocho semanas de edad se les inyectaron en el hipocampo o el líquido cefalorraquídeo (inyección intratecal) 50 µl de PBS que contenía 20 µg (hipocampo) o 200 µg (intratecal) del ONA de tc-ADN M23D (+02-13). Los animales se sacrificaron un mes tras la inyección. Se analizó la proteína distrofina en cortes cerebrales (paneles A, B, C) y cortes cerebelosos (paneles D, E, F), como se describió anteriormente en el Ejemplo 4. Los resultados se presentan en la Figura 10. Los paneles A y D corresponden a los controles negativos, en los que no se trató a los ratones. Los paneles B y E corresponden a un corte sin tratar de un ratón *mdx*. El panel C corresponde a un ratón *mdx* tratado en el hipocampo (C), y el panel (F) muestra los resultados de un cerebelo de ratón *mdx* tratado de manera intratecal. Se hizo una tinción de contraste de los núcleos con DAPI.

50 EJEMPLO 6

Administración (predictiva)

El ONA de tc-ADN M23D (+01-13) se puede administrar por medio de inyecciones intraperitoneales y subcutáneas

(de 1 g/kg e inferior).

EJEMPLO 7

Oligonucleótidos Antisentido de Triciclo-ADN para la recuperación de distrofina en ratones de DMD

5 Este ejemplo demuestra que los ONA de tc-ADN diseñados para la unión exón 51/intrón 51 de distrofina que tienen las secuencias 5'-AGAAATGCCATCTTC-3' ("ONA de tc-ADN H51 (+68+82)"; SEQ ID N°: 2), 5'-AAATGCCATCTTCCT-3' ("ONA de tc-ADN H51 (+70+84)"; SEQ ID N°: 3), y 5'-TGCCATCTTCCTTGA-3' ("ONA de tc-ADN H51 (+73+87)"; SEQ ID N°: 4), mediaron de manera eficaz en la omisión del exón 51 en células musculares de ratones que expresaban el gen de distrofina humana completa ("ratones de hDMD").

10 Se inyectó a ratones de hDMD de ocho a diez semanas de edad en el músculo tibial anterior 50 µl de PBS que contenía 10 µg de ONA de tc-ADN H51 (+68+82), también denominado tc-ADN ex51 ESEa, ONA de tc-ADN H51 (+70+84), también denominado tc-ADN ex51 ESEb, u ONA de tc-ADN H51 (+73+87), también denominado tc-ADN ex51 ESEc. Los animales se sacrificaron 4 semanas después. Las muestras musculares se procesaron para el análisis del mRNA mediante el uso de los mismos parámetros proporcionados anteriormente para el Ejemplo 3, y los resultados se dan en la Figura 12.

15 Se ensayó la omisión del exón 51 mediante PCR anidada en las siguientes condiciones. Se usaron quinientos nanogramos de ARN total para la RT-PCR mediante el uso del sistema Access RT-PCR (Promega) en una reacción de 50 µL con los cebadores externos siguientes:

Hex 49F2 (5'-AACTGAAATAGCAGTTCAAGC-3')

Hex 53R2 (5'-TTGCCTCCGGTTCTGAAGG-3')

20 La síntesis de cADN se llevó a cabo a 45 °C durante 45 min, directamente seguida de PCR primaria durante 20 ciclos con los parámetros siguientes: veinte ciclos de 40 seg a 94 °C, 40 seg a 60 °C, y 40 seg a 72 °C.

Se añadieron dos microlitros del producto de PCR a otra reacción de PCR como molde, mediante el uso de los cebadores siguientes (concentración de reserva 100 µM).

Hex 50F 5'-AGGAAGTTAGAAGATCTGAGC-3'

25 Hex 52R2 5'-TTCTTCCAACCTGGGGACGC-3'

La reacción se sometió a los siguientes parámetros de termociclado: Cinco min a 94 °C, seguido de treinta ciclos de 40 seg a 94 °C, 40 seg a 60 °C, y 40 seg a 72 °C. Finalmente, la reacción se sometió a una incubación de cinco minutos a 72 °C.

30 Los datos presentados en la Figura 12 demuestran que cada construcción de ONA de tc-ADN H51 ensayada (ONA de tc-ADN H51 (+68+82), ONA de tc-ADN H51 (+70+84), y ONA de tc-ADN H51 (+73+87)) dio como resultado la omisión incrementada del exón 51.

EJEMPLO 8

Los oligonucleótidos Antisentido de Triciclo-ADN dirigidos a la unión exón 7/intrón 7 de SMN y a la ISS del intrón 7 estimulan la inclusión del exón 7 en SMN2

35 Este ejemplo demuestra que un ONA de tc-ADN diseñado para la unión exón 7/intrón 7 de SMN y la ISS del intrón 7 ("ONA de tc-ADN SMN2e7(39;51)" y "ONA de tc-ADN SMN2i7(10;25)", respectivamente) media de manera eficaz en la inclusión del exón 7 en SMN2 en fibroblastos (línea celular G03813) aislados de un paciente de AME.

ONA de tc-ADN SMN2i7(10;25): 5'-CUUJCAUUAUGCUGG-3' (SEQ ID N°: 5)

ONA de tc-ADN SMN2e7(39;51): 5'-UUAUUUAAGGAA-3' (SEQ ID N°: 6)

40 La línea celular G03813 procede de un paciente de AME de tipo I de 3 años de edad con dos copias de SMN2. Las células GM03813 se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con un 20% de suero bovino fetal y un 1% de penicilina-estreptomina (100 U/ml). Las transfecciones de ONA de tc-ADN (ONA de tc-ADN SMN2i7(10;25) y ONA de tc-ADN SMN2e7(39;51)) se llevaron a cabo con Oligofectamina (Invitrogen) en medio sin suero y antibióticos durante 48 horas. El ARN total se extrajo 48 horas tras la transfección mediante el uso del reactivo TRIzol (Invitrogen), y la síntesis de la primera cadena de cADN se llevó a cabo mediante el uso de SuperScript II (Invitrogen) y hexámeros aleatorios. La PCR se llevó a cabo mediante el uso de Master Mix 2X Phusion GC (Finnzymes) en un volumen total de 50 µL con 11 µL de cADN y 10 µM de cada uno de los cebadores SMN-Ex6-FW y SMN-Ex8-Re. Los productos de PCR se separaron después mediante electroforesis en un gel de agarosa del 3%.

50 SMN-Ex6-Fw 5'-GCTGATGCTTTGGGAAGTATGTA-3'

SMN-Ex8-Re 5'-ATTCCAGATCTGTCTGATCG-3'

Los datos presentados en la Figura 19 muestran que tanto el ONA de tc-ADN SMN2e7(39;51) como el ONA de tc-ADN SMN2i7(10;25) estimulan la inclusión del exón 7 en el mRNA de SMN2. El panel A muestra el análisis mediante RT-PCR del ARN de células GM03813 tratadas con los oligonucleótidos de tc-ADN indicados. La intensidad de la banda que corresponde a SMN2 sin el exón 7 ("SMN2 ($\Delta 7$ ") es inferior con ambos oligonucleótidos de tc-ADN (carriles 3 y 4) en comparación con la banda del carril sin tratar (carril 2). El panel B es una representación de la cuantificación normalizada del gel que muestra que tras la transfección con el ONA de tc-ADN, la banda superior que corresponde a SMN1 + SMN2 de longitud completa se incrementó, mientras la banda inferior que corresponde a SMN2 ($\Delta 7$) disminuyó significativamente.

El panel C muestra una transferencia de Western de lisados de fibroblastos de tipo natural y células GM03813 transfectadas con los oligonucleótidos de tc-ADN indicados. Los extractos de proteínas se obtuvieron en tampón de lisis (10 mmol/l de HEPES de pH 7,9, 100 mmol/l de KCl, 1 mmol/l de EDTA, 1 mmol/l de 1,4-ditiotreitol, cóctel de inhibidor de proteasas completo 1 \times (Roche), 0,5% de NP-40). Se mezclaron cantidades iguales de proteína (determinadas mediante el Ensayo de Proteínas de Bradford (Pierce)) con tampón de carga 2 \times (125 mmol/l de Tris de pH 6,8, 2% de dodecil sulfato sódico, 10% de glicerol, 0,01% de azul de bromofenol, 10% de β -mercaptoetanol), y se determinó la concentración de proteína mediante el uso del Ensayo de Proteínas de Bradford (Pierce). Se resolvieron diez microgramos de cada muestra de proteína mediante SDS-PAGE en Geles Bis-Tris del 4-12% (Invitrogen) y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se bloqueó con un 10% de leche en tampón PBS-Tween, y se añadió una sonda con un anticuerpo policlonal de conejo anti-SMN (dilución 1:500; h-195, Santa Cruz) que reconocía SMN1, SMN2, y la forma truncada de SMN2, y después se incubó con un anticuerpo secundario anti-conejo de cabra conjugado con peroxidasa de rábano (1:50.000). Se detectaron las señales con el kit quimioluminiscente SuperSignal West Pico (ThermoScientific). Para confirmar la carga equivalente de proteínas, la membrana se lavó, se volvió a bloquear, y se añadió una sonda con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-actina, seguido de incubación con un anticuerpo secundario anti-ratón de oveja conjugado con peroxidasa de rábano (1:15.000). Las señales se detectaron como se describió anteriormente. Carril 1: Células GM03813 transfectadas con el ONA de tc-ADN SMN2i7 (10;25); Carril 2: Células GM03813 transfectadas con el ONA de tc-ADN SMN2e7(39;51); Carril 3: Células GM03813 transfectadas con el ONA de tc-ADN SMN2i7(10;25) y con el ONA de tc-ADN SMN2e7(39;51); Carril 4: fibroblastos de tipo natural; Carril 5: Células GM03813 sin transfectar.

Los datos del panel C indican que la transfección con oligonucleótidos de tc-ADN recuperó los niveles de SMN en las células GM03813 debido a la inclusión del exón 7 en el mRNA de SMN2. Las células GM03813 de control muestran cierta proteína SMN debido a la inclusión natural esporádica del exón 7 en SMN2.

El panel D muestra una fotomicrografía de células GM03813 transfectadas con 30 μ g de tc-TSL y posteriormente teñidas con anticuerpo hacia SMN. Las células GM03813 transfectadas sobre portaobjetos se fijaron con acetona/metanol (volumen/volumen). Las células fijadas se bloquearon en PBS + 5% de BSA durante 1 hora, seguido de incubación con un anticuerpo policlonal de conejo hacia SMN (1:100 en PBS + 1% de BSA; h-195, Santa Cruz) durante 1 hora. Las células se lavaron en PBS y se incubaron con un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a Alexa 594 durante 1 hora. Las células se lavaron después en PBS y se incubaron con DAPI (1:50.000) durante 5 minutos. Los portaobjetos se ajustaron con cubreobjetos mediante el uso de Fluoromount-G (SouthernBiotech) y se incubaron durante la noche a 4 $^{\circ}$ C. La fotomicrografía muestra que los niveles de SMN (rojo) se incrementan en los núcleos (azul) de las células GM03813 transfectadas con TSL de tc-ADN.

EJEMPLO 9

Los Oligonucleótidos Antisentido de Triciclo-ADN dirigidos hacia las repeticiones de CUG reducen la expresión del mRNA de DMPK mutante en mioblastos de DM1

Este ejemplo demuestra que el ONA de tc-ADN diseñado para las repeticiones de CUG en el mRNA de DMPK mutante que tiene la secuencia 5'-CAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG3' ("ONA de tc-ADN DM1(CAG7)"; SEQ ID N $^{\circ}$: 9) reduce de manera eficaz la expresión del mRNA de DMPK mutante con 800 repeticiones de CUG en mioblastos de DM1 humana aislados de una biopsia muscular obtenida del Banco de Tejidos para Investigación "Myobank".

Los mioblastos de DM1 se transfectaron con cantidades crecientes del ONA de tc-ADN DM1(CAG7) (0, 3,5 μ g, 10 μ g, y 20 μ g) mediante el uso de Lipofectamina (Invitrogen). Tres días tras la transfección, se detectó la expresión de los mARNs de DMPK de tipo natural y mutante mediante transferencia de Northern. Brevemente, se separaron 5-10 μ g de ARN total en geles de agarosa del 1,3% con MOPS que contenían formaldehído 0,66 M, y se transfirieron a membranas Hybond-N+ (Amersham Pharmacia Biotech) mediante transferencia capilar con SSC 10X. Las transferencias se hibridaron con una sonda marcada con 32 P cebada aleatoriamente (fragmento Bgl II-Sac I del cADN de DMPK) en tampón de hibridación (2% de SDS, 10% de sulfato de dextrano, SSPE 1X, 100 μ g/ml de ADN de esperma de salmón, 2% de Denhart) a 68 $^{\circ}$ C durante la noche. Las señales se analizaron en un aparato de formación de imágenes mediante fosforescencia (Molecular Imager FX, Bio-Rad) y se cuantificaron mediante el uso del programa Quantity One (Bio-Rad).

El panel A de la Figura 20 muestra que los niveles de DMPK mutante disminuyeron con las cantidades crecientes del

ONA de tc-ADN transfectado DM1(CAG7). De manera importante, los niveles de DMPK de tipo natural quedaron inalterados. Se usó ARN 18S como control de carga. El panel B es una representación de la cuantificación de la transferencia de Northern del Panel A. La cuantificación se llevó a cabo midiendo la proporción de intensidad de bandas del DMPK mutante respecto del DMPK de tipo natural.

5 EJEMPLO 10

Los tc-ADNs dirigidos hacia las repeticiones de CUG reducen la expresión del mRNA de DMPK mutante en ratones de DM1

Este ejemplo demuestra que el ONA de tc-ADN DM1(CAG7) reduce de manera eficaz los niveles de mRNA de DMPK humano mutante con 700 repeticiones de CUG expresadas en los músculos TA de ratones de DM1.

- 10 En músculos TA de ratones de DM1 que expresaban el mRNA de DMPK humano con 700 repeticiones de CUG se inyectaron cantidades crecientes del ONA de tc-ADN DM1(CAG7). Una semana más tarde, se extrajo el ARN total mediante el uso del reactivo TRIzol (Invitrogen). Se detectaron los mARNs de DMPK humano y DMPK de ratón mediante transferencia de Northern. Brevemente, se separaron 8-10 µg de ARN total en geles de agarosa del 1,3% con MOPS que contenían formaldehído 0,66 M, y se transfirieron a membranas Hybond-N+ (Amersham Pharmacia Biotech) mediante transferencia capilar con SSC 10X. Las transferencias se hibridaron con una sonda marcada con ³²P cebada aleatoriamente (fragmento Bgl II-Sac I del cADN de *DMPK*) en tampón de hibridación (2% de SDS, 10% de sulfato de dextrano, SSPE 1X, 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón, 2% de Denhart) a 68 °C durante la noche. Las señales se analizaron en un aparato de formación de imágenes mediante fosforescencia (Molecular Imager FX, Bio-Rad) y se cuantificaron mediante el uso del programa Quantity One (Bio-Rad).
- 15
- 20 Los paneles A y C de la Figura 21 muestran que los niveles de DMPK humano mutante disminuyeron con las cantidades crecientes del ONA de tc-ADN transfectado DM1(CAG7). Los paneles B y D son representaciones de la cuantificación de las transferencias de Northern de los Paneles A y C, respectivamente. La cuantificación se llevó a cabo midiendo la proporción de intensidad de bandas del DMPK humano mutante respecto del DMPK de ratón de tipo natural.

25

LISTADO DE SECUENCIAS

SEQ ID N°: 1
Secuencia Artificial
ADN
5 Longitud: 15
ONA de tc-ADN M23D (+02-13)
aacctcggcttacct
SEQ ID N°: 2
Secuencia Artificial
10 ADN
Longitud: 15
ONA de tc-ADN H51 (+68+82)
agaaatgccatcttc
SEQ ID N°: 3
15 Secuencia Artificial
ADN
Longitud: 15
ONA de tc-ADN H51 (+70+84)
aaatgccatctcct
20 SEQ ID N°: 4
Secuencia Artificial
ADN
Longitud: 15
ONA de tc-ADN H51 (+73+87)
25 tgccatctccttga
SEQ ID N°: 5
Secuencia Artificial
ADN
Longitud: 15
30 ONA de tc-ADN SMN2i7 (10;25)
cuuucuaaavgcugg
SEQ ID N°: 6
Secuencia Artificial
ADN
35 Longitud: 13
ONA de tc-ADN SMN2e7 (39;51)
uuaauuaaggaa

SEQ ID N°: 7

Secuencia Artificial

ADN

Longitud: 12-21

5 ONA de tc-ADN DM1(CAG_n)

(cag)_n n=4-7

SEQ ID N°: 8

Secuencia Artificial

ADN

10 Longitud: 15

ONA de tc-ADN DM1(CAG5)

cagcagcagcagcag

SEQ ID N°: 9

Secuencia Artificial

15 ADN

Longitud: 21

ONA de tc-ADN DM1(CAG7)

cagcagcagcagcagcagcag

REIVINDICACIONES

1. Un ONA de tc-ADN para el uso en un método para corregir la expresión génica anormal en una célula del sistema nervioso central de un sujeto o para tratar una enfermedad genética provocada por la expresión anormal de un gen en el sistema nervioso central de un sujeto, en el que dicho oligonucleótido antisentido de tc-ADN es complementario a una porción de un ARN codificado por dicho gen, y en el que dicho oligonucleótido antisentido de tc-ADN se administra de manera periférica al sujeto en una cantidad suficiente para corregir dicha expresión anormal.
2. Un ONA de tc-ADN para el uso en el tratamiento de una enfermedad neuromuscular.
3. El ONA de tc-ADN para el uso según la reivindicación 2, en el que la enfermedad neuromuscular resulta de una alteración de un gen, en el que dicha alteración es
 - una mutación con marco de lectura correcto de un exón, y dicho tc-ADN facilita la omisión de dicho exón;
 - una mutación que altera el marco de lectura traduccional del gen, y el tc-ADN facilita la omisión de un exón para restablecer el marco de lectura, y dicho tc-ADN facilita la omisión de un exón para restablecer el marco de lectura del gen;
 - una mutación perjudicial que se puede compensar mediante la inclusión de un exón atípico en el mRNA codificado por dicho gen, y el tc-ADN es complementario a una ISS o TSL presente en un pre-mRNA codificado por dicho gen y facilita la inclusión de un exón atípico, o
 - una mutación que da como resultado la presencia de amplificación(es) perjudicial(es) de CUG en 3' en un mRNA codificado por dicho gen, y dicho ONA de tc-ADN destruye el mRNA que contiene dicha amplificación.
4. El ONA de tc-ADN para el uso según la reivindicación 1 o 2, en el que dicho oligonucleótido antisentido de tc-ADN es un oligonucleótido antisentido de triciclo-ADN (ONA de tc-ADN) para facilitar la omisión de un exón durante el procesamiento de un pre-mRNA de distrofina, y dicho ONA de tc-ADN contiene entre 10 y 18 triciclo nucleótidos, en el que 8-16 o 6-14 nucleótidos de dicho ONA de tc-ADN son complementarios a un sitio donante de corte y empalme intrónico del pre-mRNA de distrofina, en el que 2-8 nucleótidos de dicho ONA de tc-ADN son complementarios a una región exónica del pre-mRNA de distrofina, y en el que dicho sitio donante de corte y empalme intrónico está contiguo con y en 5' de dicha región exónica, en el que dicho ONA de tc-ADN se administra a un sujeto que lo necesita.
5. El ONA de tc-ADN para el uso según la reivindicación 4, en el que el exón que se omite durante el procesamiento de dicho pre-mRNA de distrofina es el exón 23 o el exón 51, y en particular en el que, cuando el exón omitido es el exón 23, dicho ONA de tc-ADN comprende la secuencia de nucleótidos 5'-AACCTCGGCTTACCT-3' (SEQ ID N°: 1) o es M23D (+02-13) (SEQ ID N°: 1), y, cuando el exón omitido es el exón 51, dicho ONA de tc-ADN comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en 5'-AGAAATGCCATCTTC-3' (SEQ ID N°: 2), 5'-AAATGCCATCTTCCT-3' (SEQ ID N°: 3), y 5'-TGCCATCTTCCTTGA-3' (SEQ ID N°: 4) o es H51 (+68+82) (SEQ ID N°: 2) o es H51 (+70+84) (SEQ ID N°: 3) es H51 (+73+87) (SEQ ID N°: 4).
6. El ONA de tc-ADN para el uso según la reivindicación 1 o 2, en el que dicho oligonucleótido antisentido de tc-ADN es un oligonucleótido antisentido de triciclo-ADN (ONA de tc-ADN) para facilitar la inclusión de un exón atípico durante el procesamiento de un pre-mRNA de SMN2, y dicho ONA de tc-ADN contiene entre 10 y 18 triciclo nucleótidos, en el que dicho ONA de tc-ADN es complementario a una secuencia silenciadora intrónica (ISS) del pre-mRNA de SMN2 o es complementario a un tallo-bucle terminal (TSL) del pre-mRNA de SMN2.
7. El ONA de tc-ADN para el uso según la reivindicación 6, en el que dicho exón atípico en dicho pre-mRNA de SMN2 es el exón 7 y dicha secuencia silenciadora intrónica es ISS-N1 o dicho tallo-bucle terminal es TSL2,
 - y en particular, cuando dicho ONA de tc-ADN es complementario a una ISS, dicho ONA de tc-ADN comprende la secuencia de nucleótidos 5'-CUUUCAUAAUGCUGG-3' (SEQ ID N°: 5) o es SMN2i7(10;25) (SEQ ID N°: 5) y cuando dicho ONA de tc-ADN es complementario a un TSL, dicho ONA de tc-ADN comprende la secuencia de nucleótidos 5'-UUAUUUAAGGAA-3' (SEQ ID N°: 6) o es SMN2e7(39;51) (SEQ ID N°: 6).
8. Una composición para facilitar la omisión de un exón durante el procesamiento de un pre-mRNA de distrofina, para facilitar la inclusión de un exón atípico durante el procesamiento de un pre-mRNA de SMN2, o para facilitar la inclusión de un exón atípico durante el procesamiento de un pre-mRNA de SMN2, y dicha composición comprende:
 - (a)
 - cuando la composición es para facilitar la omisión de un exón durante el procesamiento de un pre-mRNA de distrofina, un oligonucleótido antisentido de triciclo-ADN (ONA de tc-ADN) que contiene entre 10 y 18 triciclo nucleótidos, en el que 8-16 nucleótidos de dicho ONA de tc-ADN son complementarios a un sitio donante de corte y empalme intrónico del pre-mRNA de distrofina, en el que 2-8 nucleótidos de dicho ONA de tc-ADN son complementarios a una región exónica del pre-mRNA de distrofina, y en el que dicha región exónica está

contigua con y en 3' de dicho sitio donante de corte y empalme intrónico; o

- cuando la composición es para facilitar la inclusión de un exón atípico durante el procesamiento de un pre-mARN de SMN2, un oligonucleótido antisentido de triciclo-ADN (ONA de tc-ADN) que contiene entre 10 y 18 triciclo nucleótidos, en el que dicho ONA de tc-ADN es complementario a una secuencia silenciadora intrónica (ISS) del pre-mARN de SMN2; o

- cuando la composición es para facilitar la inclusión de un exón atípico durante el procesamiento de un pre-mARN de SMN2, un oligonucleótido antisentido de triciclo-ADN (ONA de tc-ADN) que contiene entre 10 y 18 triciclo nucleótidos, en el que dicho ONA de tc-ADN es complementario a un tallo-bucle terminal (TSL) del pre-mRNA de SMN2; y

(b) un agente de administración celular.

9. Un ONA de tc-ADN para el uso en un método para el tratamiento de la Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) en un paciente,

en el que dicho ONA de tc-ADN comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una unión intrón-exón de un pre-mARN de distrofina;

en el que dicha unión intrón-exón comprende un sitio donante de corte y empalme intrónico que está en posición 5' respecto de un exón;

en el que dicho exón comprende una mutación sin sentido o una mutación de desplazamiento del marco de lectura en comparación con un exón que tiene una secuencia de nucleótidos de tipo natural;

en el que dicho ONA de tc-ADN facilita la omisión de dicho exón durante el procesamiento de dicho pre-mARN de distrofina hasta un mARN maduro.

10. El ONA de tc-ADN para el uso según la reivindicación 9, en el que

- dicho ONA de tc-ADN tiene una longitud seleccionada del grupo que consiste en: (i) entre 11 y 18 nucleótidos o (ii) 15 nucleótidos, o

- dicho oligonucleótido de triciclo-ADN comprende entre 6 y 10 nucleótidos que son complementarios a un sitio donante de corte y empalme en un intrón, o

- dicho oligonucleótido de triciclo-ADN comprende entre 6 y 10 nucleótidos que son complementarios a los nucleótidos de 5' de dicho exón, o

- dicha mutación en dicho exón es una mutación sin sentido o una mutación de desplazamiento del marco de lectura.

11. Un ONA de tc-ADN para el uso en un método para el tratamiento de la Distrofia Muscular de Duchenne en un paciente, y dicho método comprende la etapa de administrar a dicho paciente un oligonucleótido de triciclo-ADN;

en el que dicho oligonucleótido de triciclo-ADN comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una unión intrón-exón en un pre-mARN de distrofina,

en el que dicha unión intrón-exón comprende un sitio donante de corte y empalme en el intrón 51 y nucleótidos de 5' en el exón 51 adyacente de dicho pre-mARN de distrofina,

en el que dicho pre-mARN de distrofina comprende una mutación en dicho exón 51, y

en el que dicho oligonucleótido de triciclo-ADN es capaz de mediar en la omisión de dicho exón 51.

12. El ONA de tc-ADN para el uso según la reivindicación 11, en el que

- dicha unión intrón-exón comprende la secuencia de SEQ ID N°: 1,

- dicho oligonucleótido de triciclo-ADN comprende entre 12 y 20 nucleótidos,

- dicho oligonucleótido de triciclo-ADN es de 15 nucleótidos,

- dicha mutación en dicho exón 51 es una mutación sin sentido o una mutación de desplazamiento del marco de lectura, o

- dicho oligonucleótido de triciclo-ADN comprende la secuencia de SEQ ID N°: 2.

13. El ONA de tc-ADN para el uso según la reivindicación 1 o 2, en el que dicho oligonucleótido antisentido de tc-

ADN es un oligonucleótido antisentido de triciclo-ADN (ONA de tc-ADN) para facilitar la destrucción de un mRNA de DM1 mutada, y dicho ONA de tc-ADN comprende 12-21 triciclo nucleótidos, en el que dicho ONA de tc-ADN es complementario a un mRNA de DM1 mutada que comprende una o más amplificación(es) de CUG en 3' y en el que dicho ONA de tc-ADN es capaz de facilitar la destrucción mediada por RNasa H de dicho mRNA de DM1;

- 5 en el que en particular dicho ONA de tc-ADN comprende de cuatro a siete repeticiones contiguas de la secuencia de nucleótidos 5'-CAG-3' (SEQ ID N°: 7), dicho ONA de tc-ADN comprende más en particular la secuencia de nucleótidos 5'-CAGCAGCAGCAGCAG-3' (SEQ ID N°: 8) o 5'-CAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG-3' (SEQ ID N°: 9), o dicho ONA de tc-ADN es DM1(CAG5) (SEQ ID N°: 8) o DM1(CAG7) (SEQ ID N°: 9).
- 10 14. Un ONA de tc-ADN para el uso en un método para el tratamiento de la Distrofia Miotónica de Steinert en un paciente, y dicho ONA de tc-ADN comprende 12-21 triciclo nucleótidos, en el que dicho ONA de tc-ADN es complementario a un mRNA de DM1 mutada que comprende una o más amplificación(es) de CUG en 3' y en el que dicho ONA de tc-ADN es capaz de facilitar la destrucción mediada por RNasa H de dicho mRNA de DM1.
- 15 15. Una composición farmacéutica que comprende un oligonucleótido antisentido de tc-ADN para el uso en el tratamiento de una enfermedad genética provocada por la expresión anormal de un gen en el sistema nervioso central de un sujeto, y dicho oligonucleótido antisentido de tc-ADN es complementario a una porción de un ARN codificado por dicho gen, y dicho oligonucleótido antisentido de tc-ADN se administra de manera periférica al sujeto en una cantidad eficaz para corregir dicha expresión anormal.
16. La composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 15, en el que dicha expresión anormal de un gen conduce a un trastorno neuromuscular, o en el que dicha enfermedad es un trastorno neuromuscular.

FIG. 1

OLIGONUCLEÓTIDOS ANTISENTIDO SINTÉTICOS

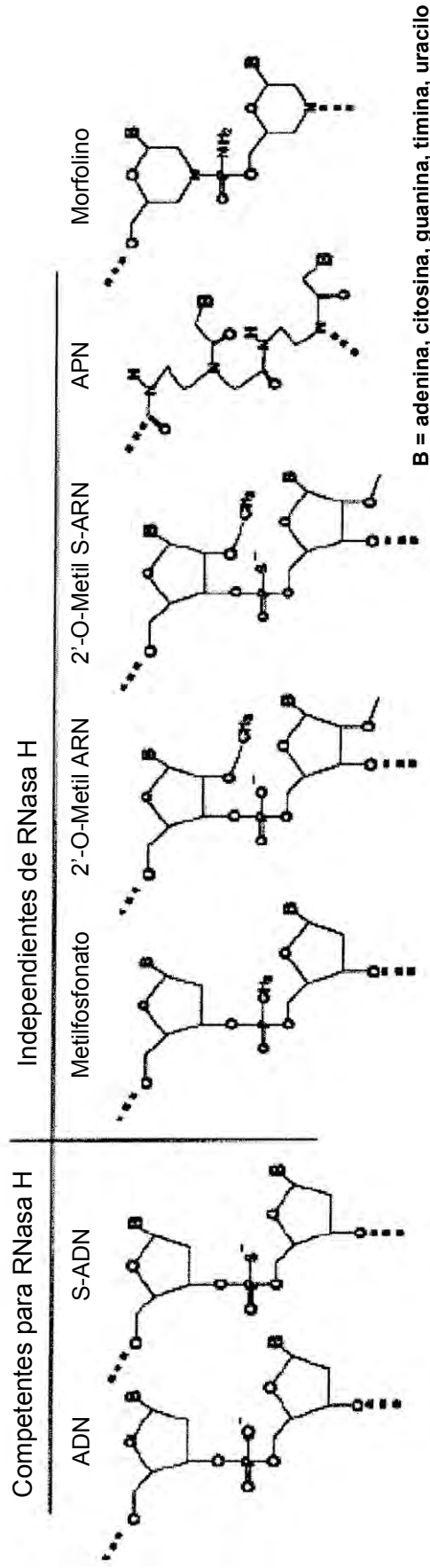


FIG. 2

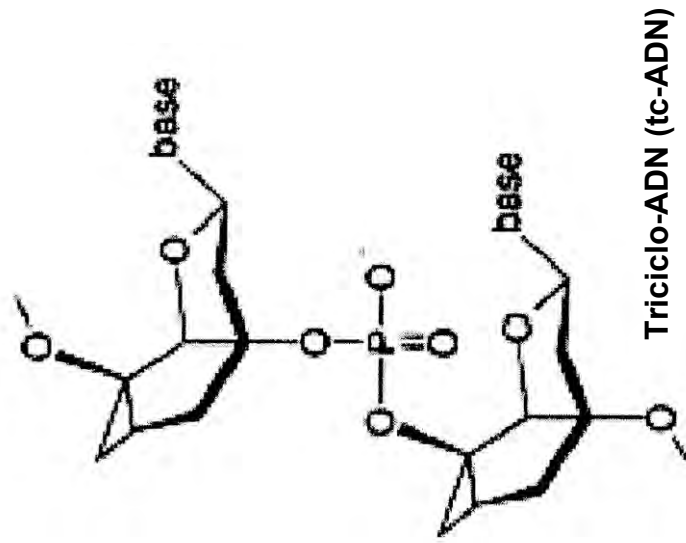


FIG. 3

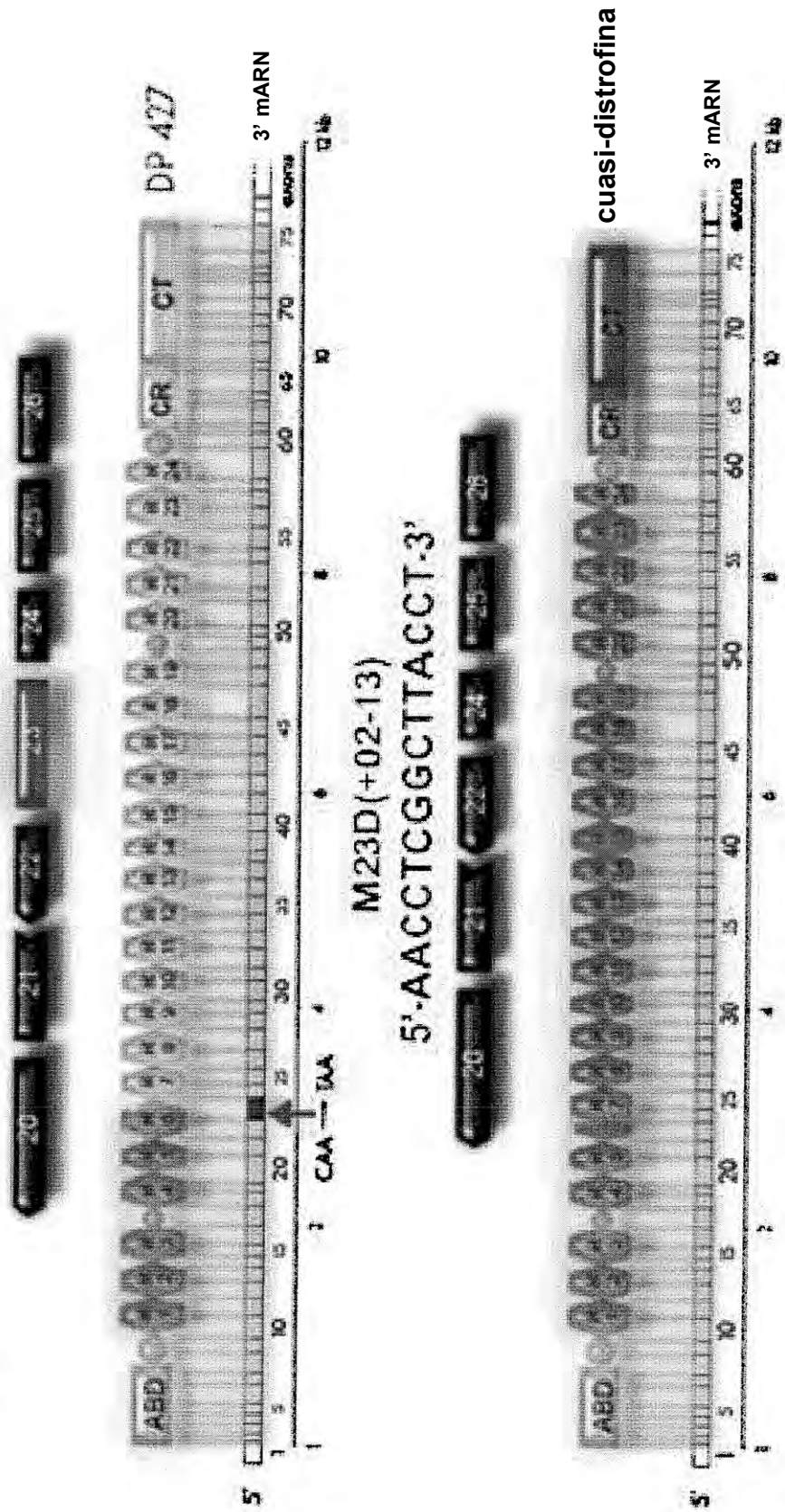
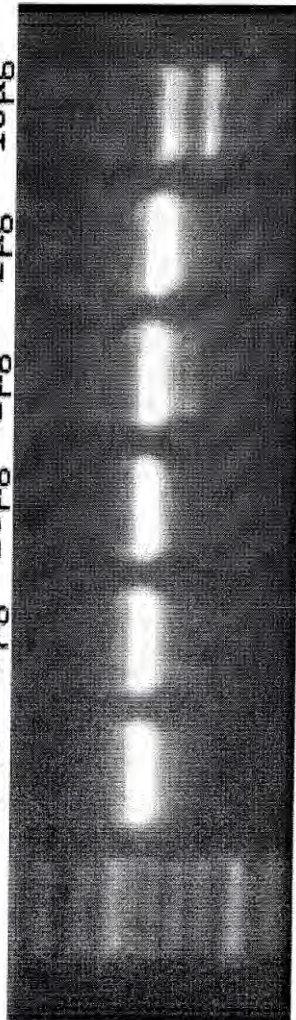


FIG. 4

RT-PCR anidada (Fe20/Re26 – Fi20/Re26)

Ctrl 2µg 10µg 1µg^o 2µg^o 10µg^a



° con oligofectamina

FIG. 5

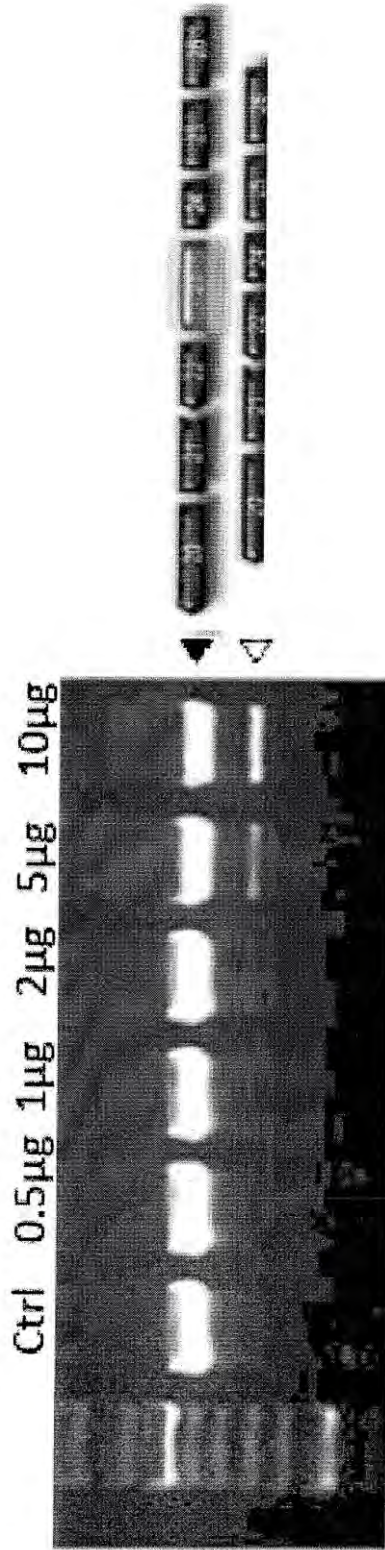


FIG. 6



FIG. 7

RT-PCR anidada (Fe20/Re26 – Fi20/Re26)

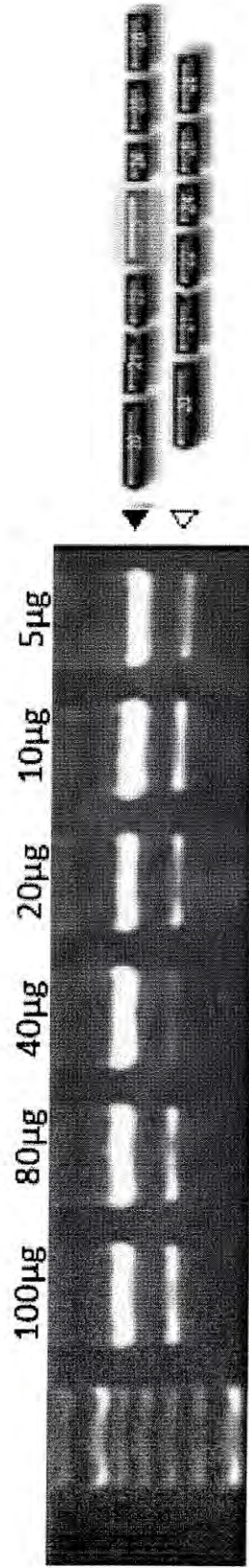
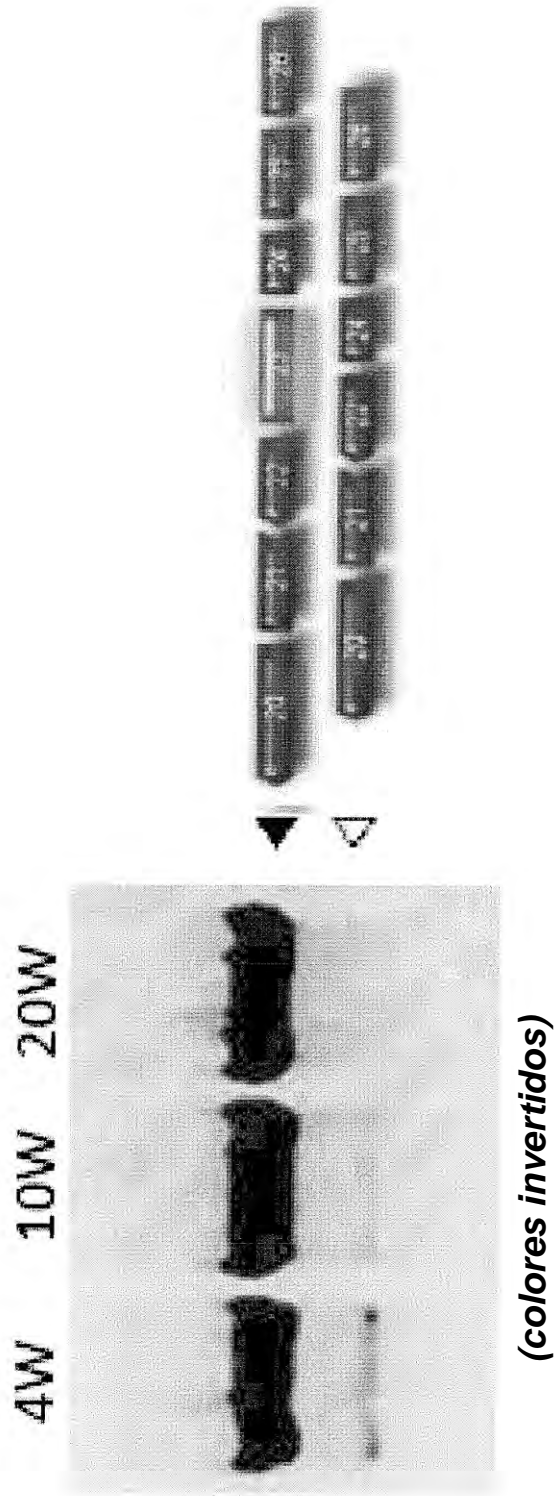


FIG. 8



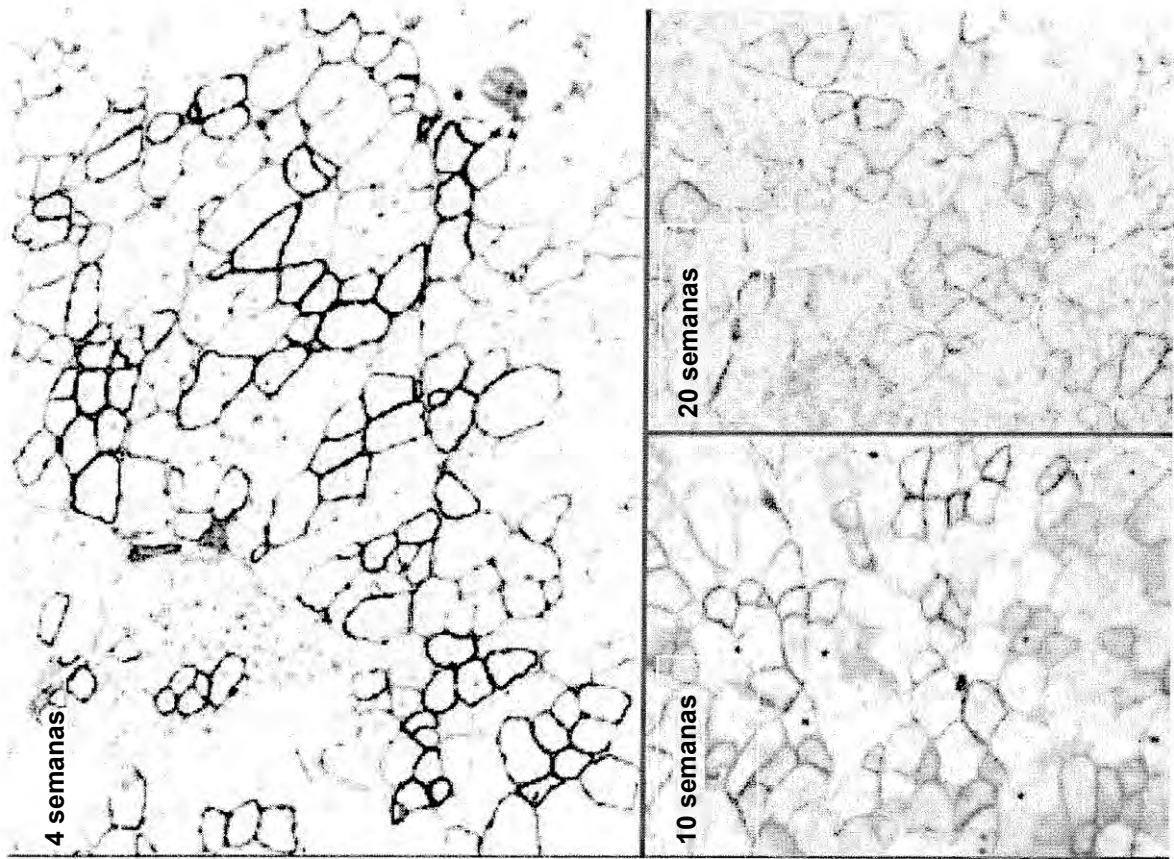


FIG. 9

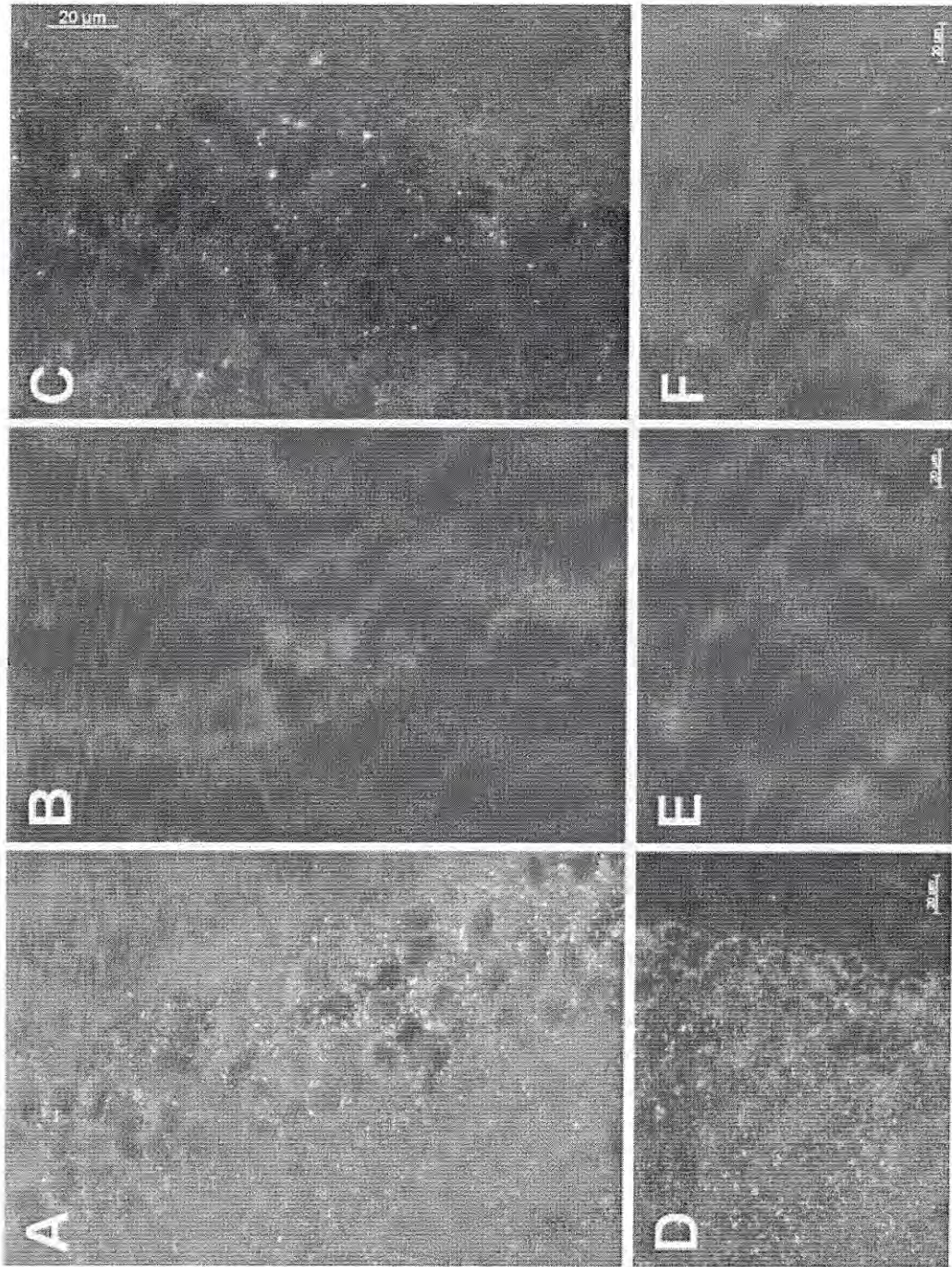


FIG. 10

FIG. 11

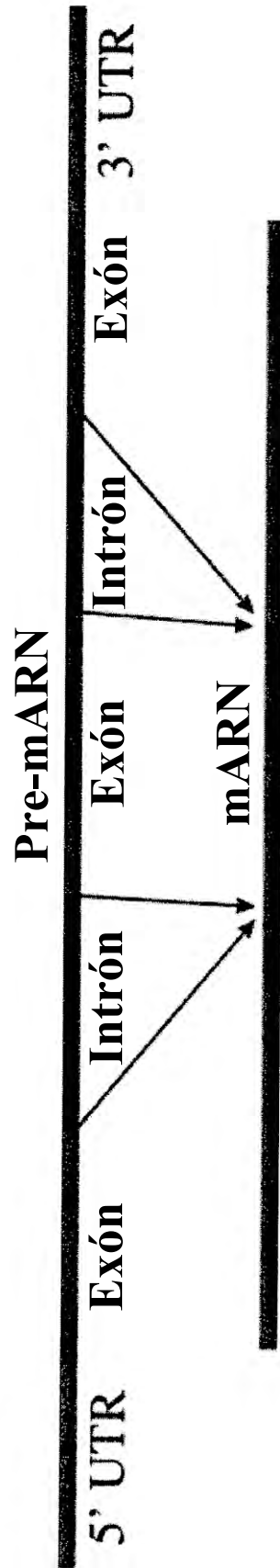


FIG. 12

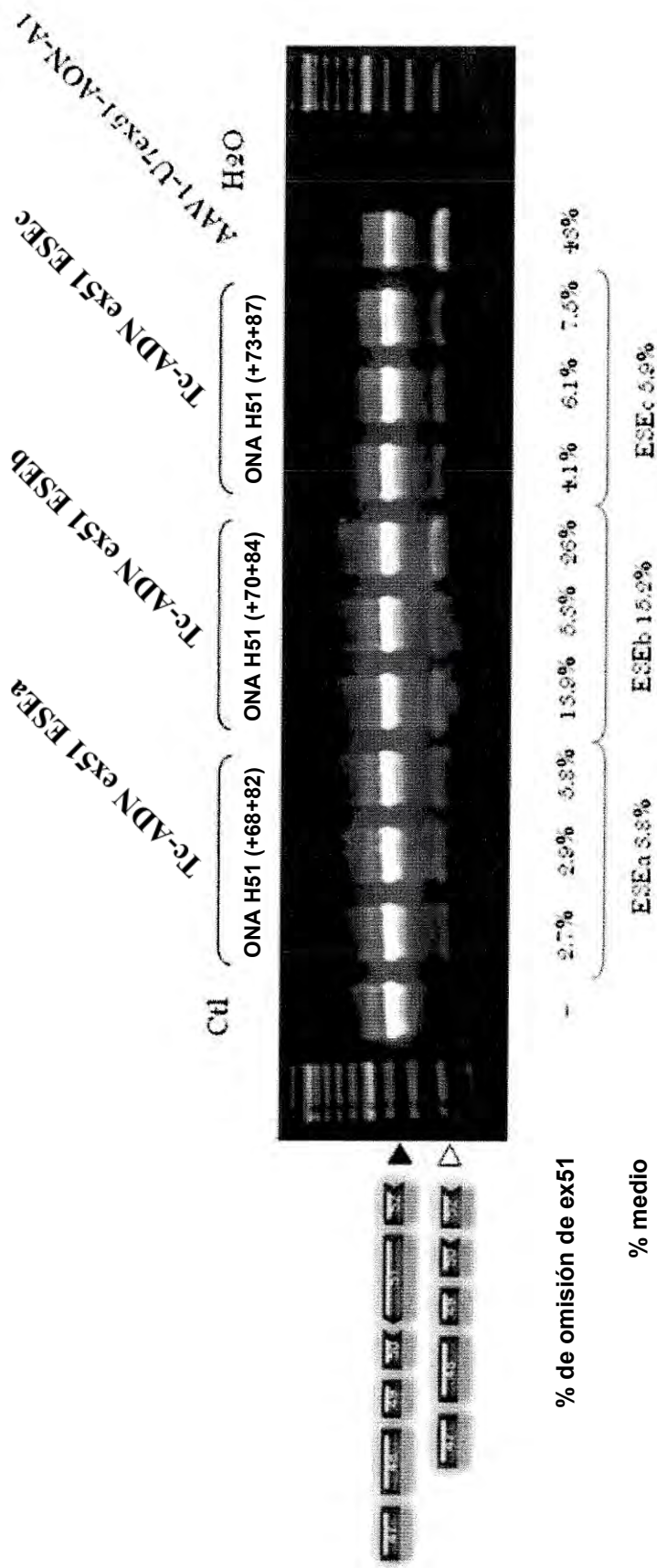
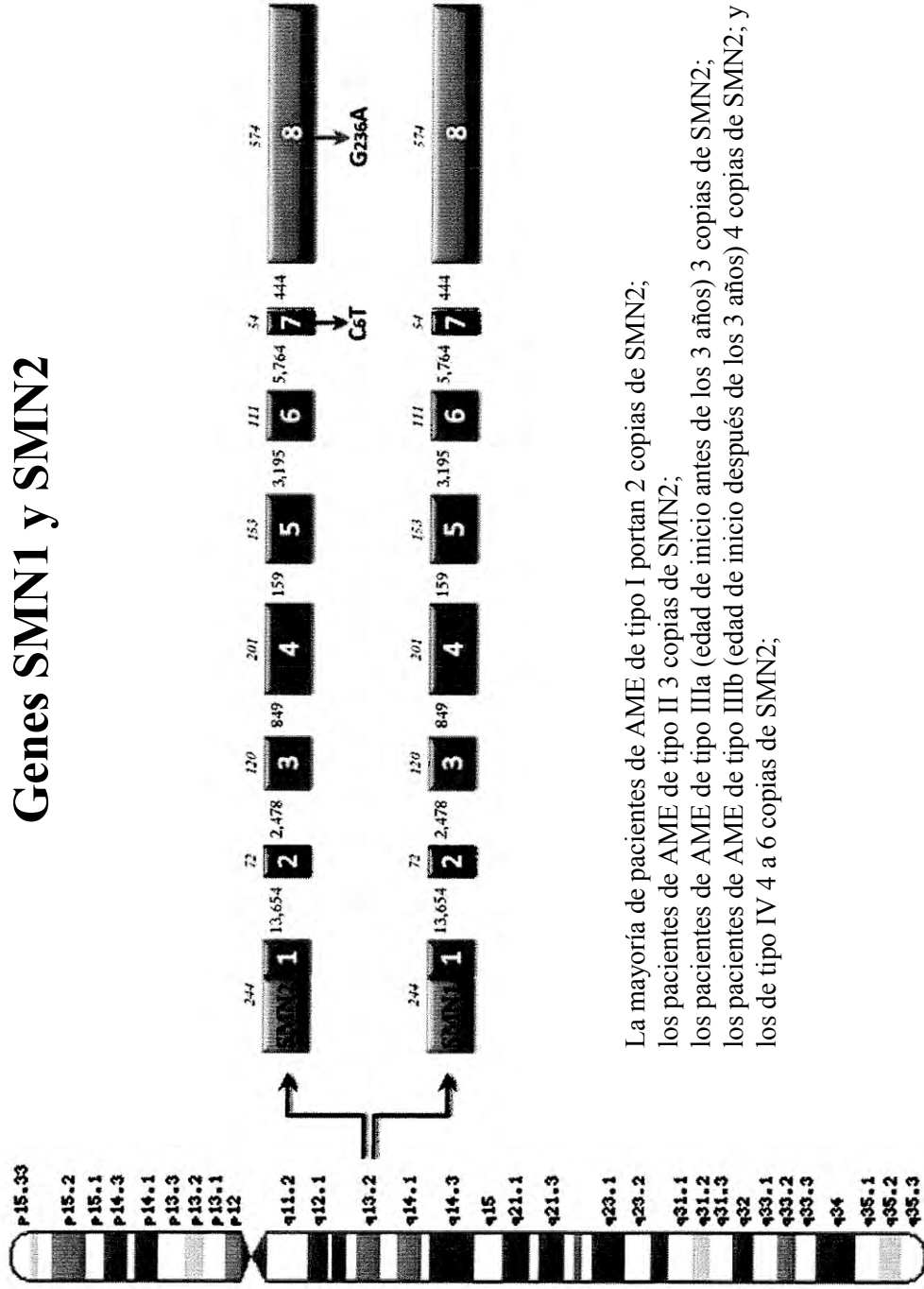


FIG. 13

Cromosoma 5

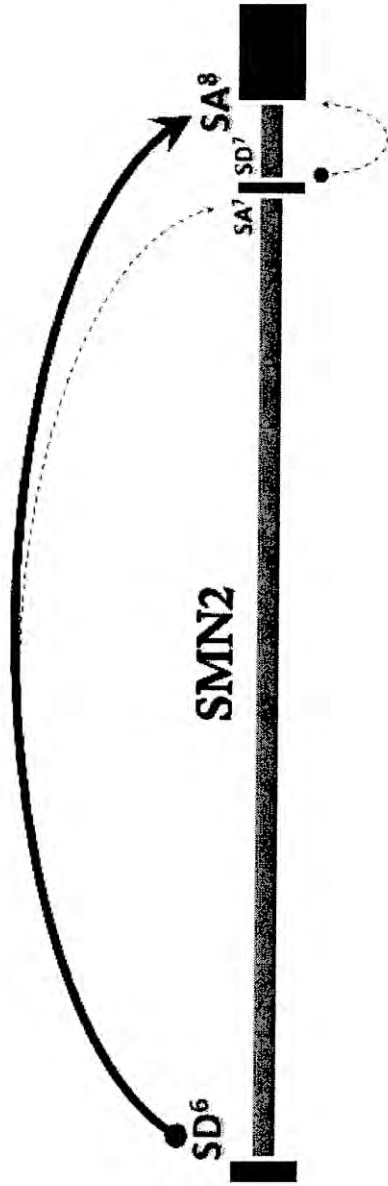


La mayoría de pacientes de AME de tipo I portan 2 copias de SMN2;
 los pacientes de AME de tipo II 3 copias de SMN2;
 los pacientes de AME de tipo IIIa (edad de inicio antes de los 3 años) 3 copias de SMN2;
 los pacientes de AME de tipo IIIb (edad de inicio después de los 3 años) 4 copias de SMN2; y
 los de tipo IV 4 a 6 copias de SMN2;

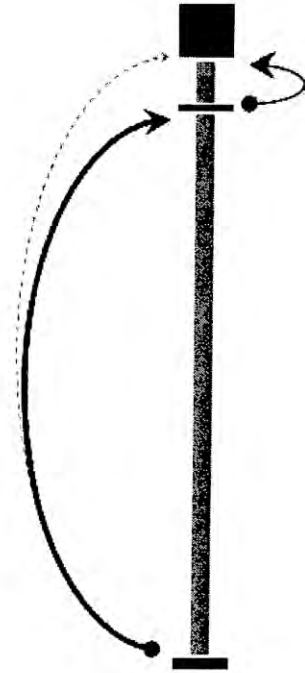
FIG. 14



FIG. 15



Mejora SA⁷ en el límite [exón 6 – intrón 7]



Mejora SD⁷ en el límite [exón 7 – intrón 7]

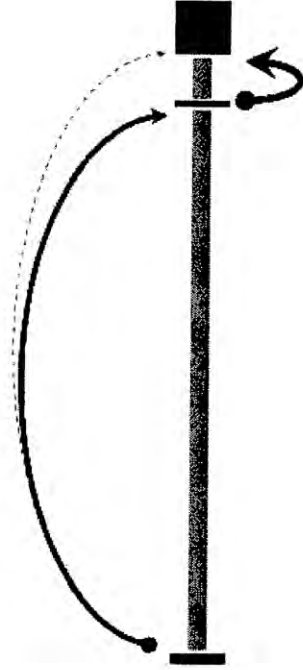


FIG. 16

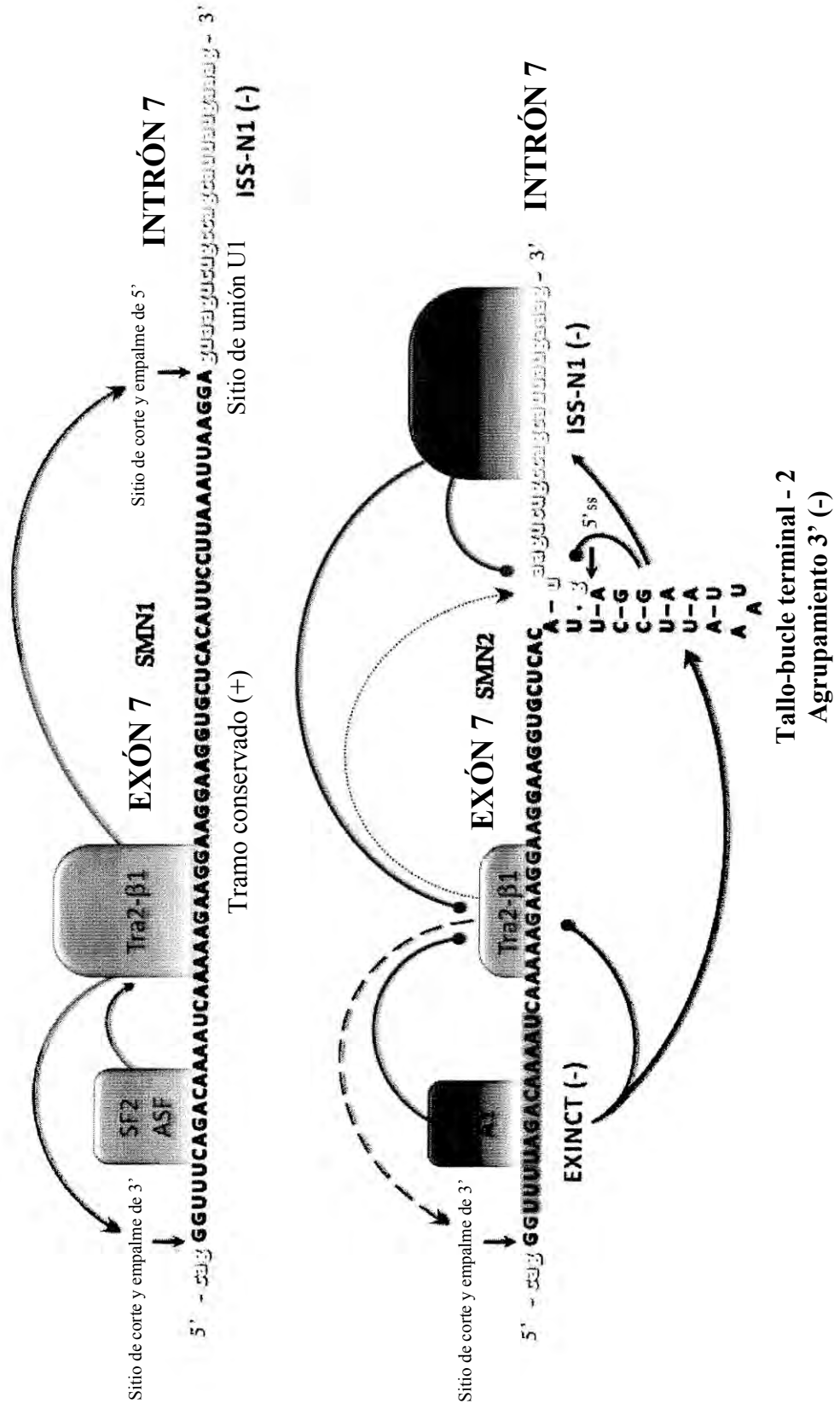


FIG. 17

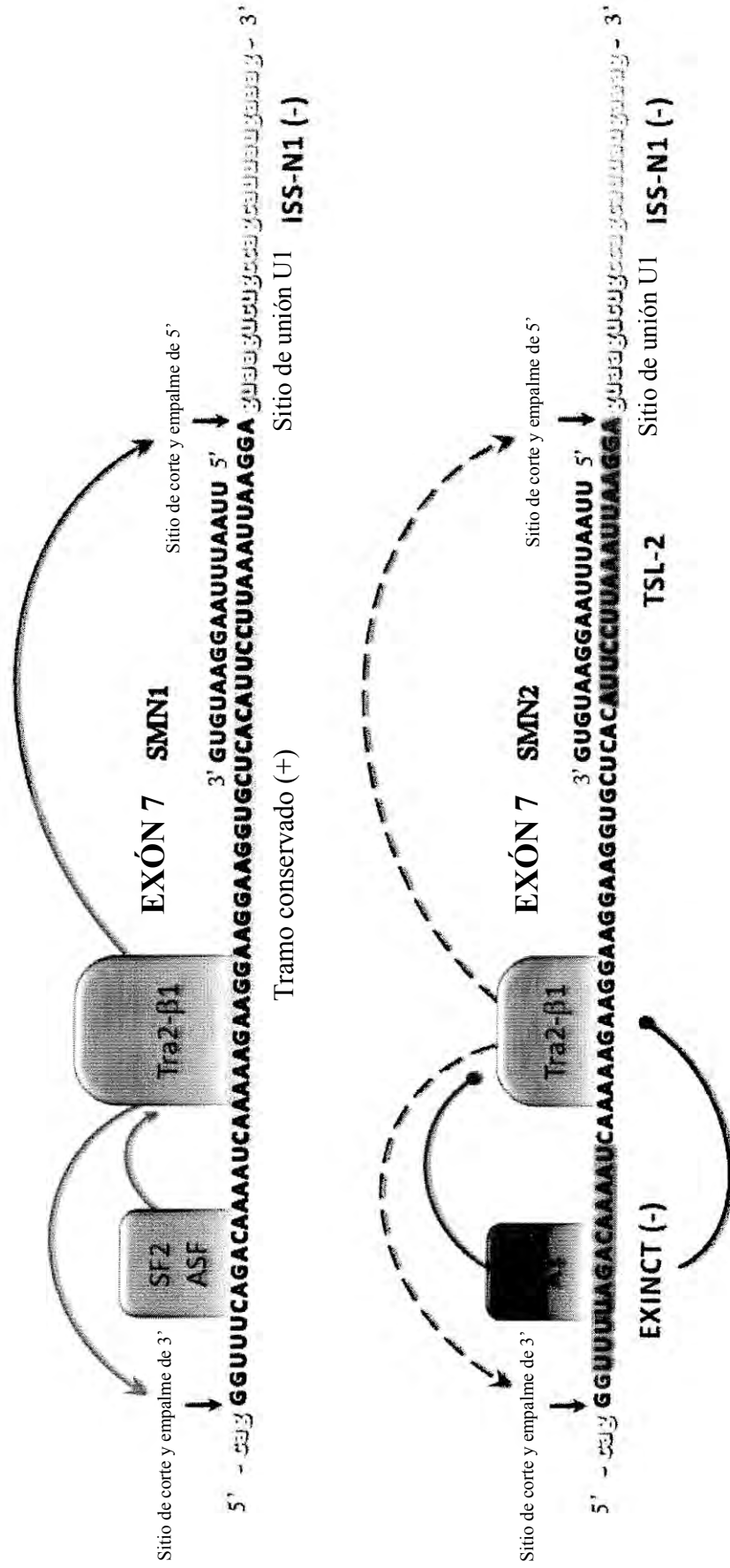


FIG. 19A

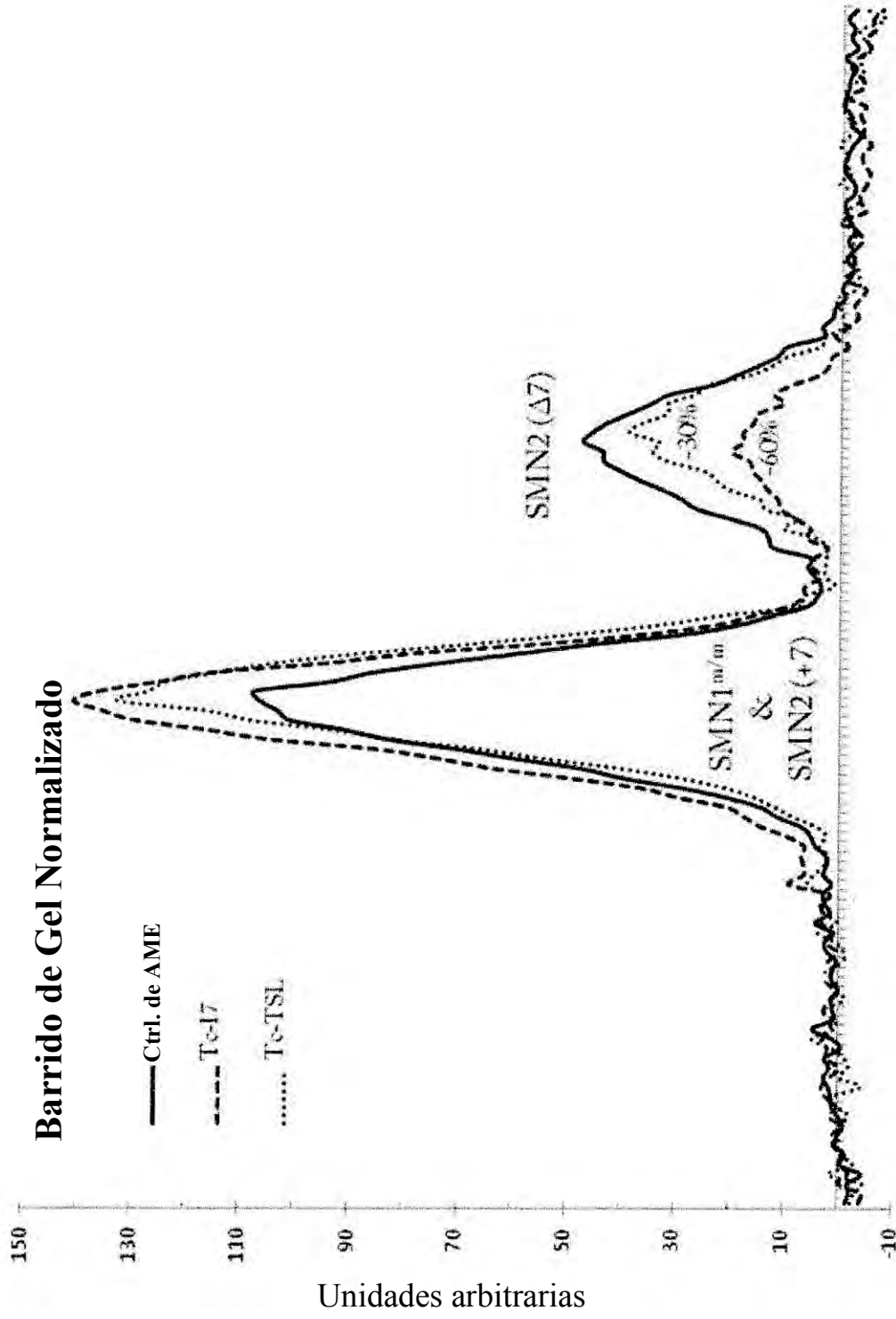
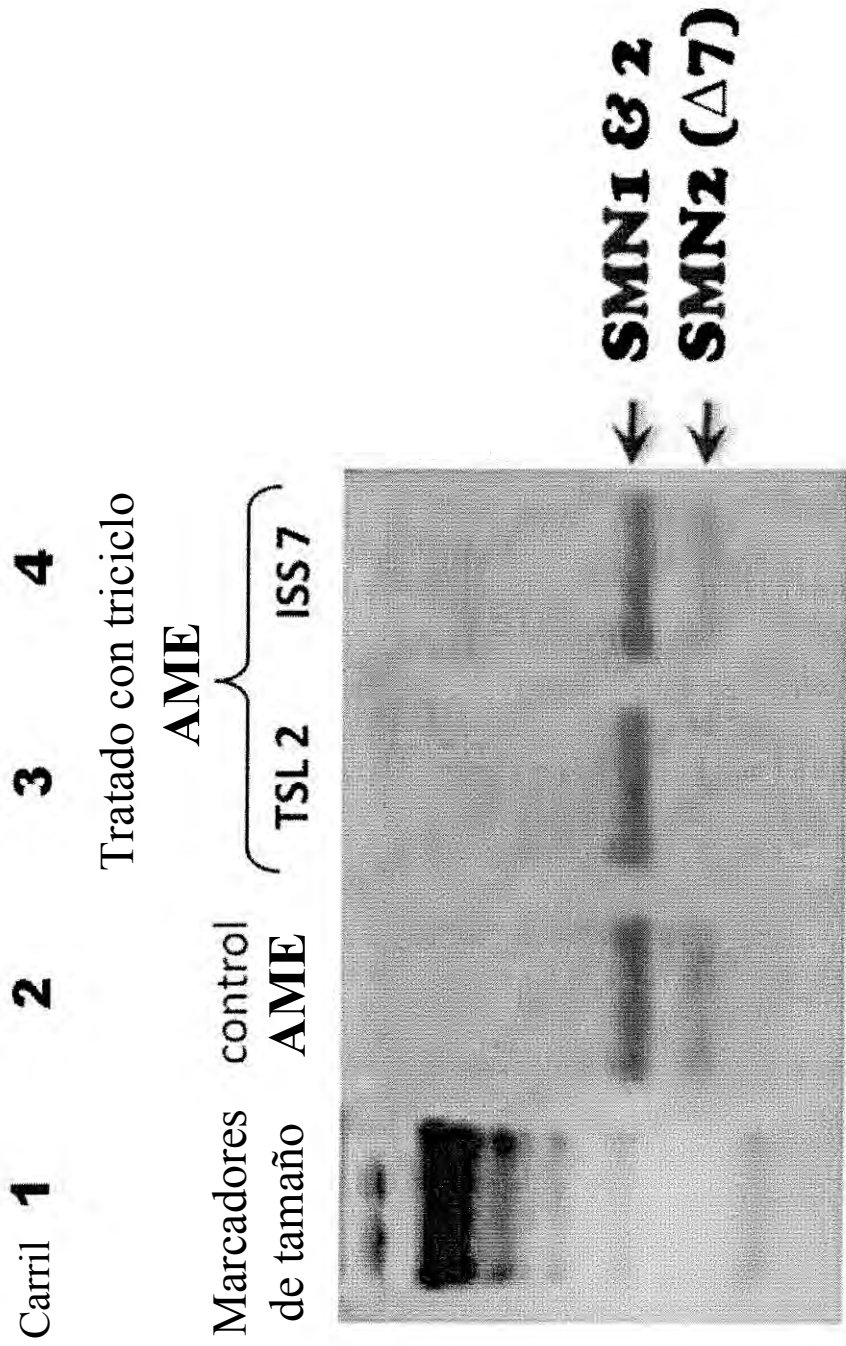


FIG. 19B



RT-PCR (exones 6 a 8) – agarosa del 3%
(imagen invertida)

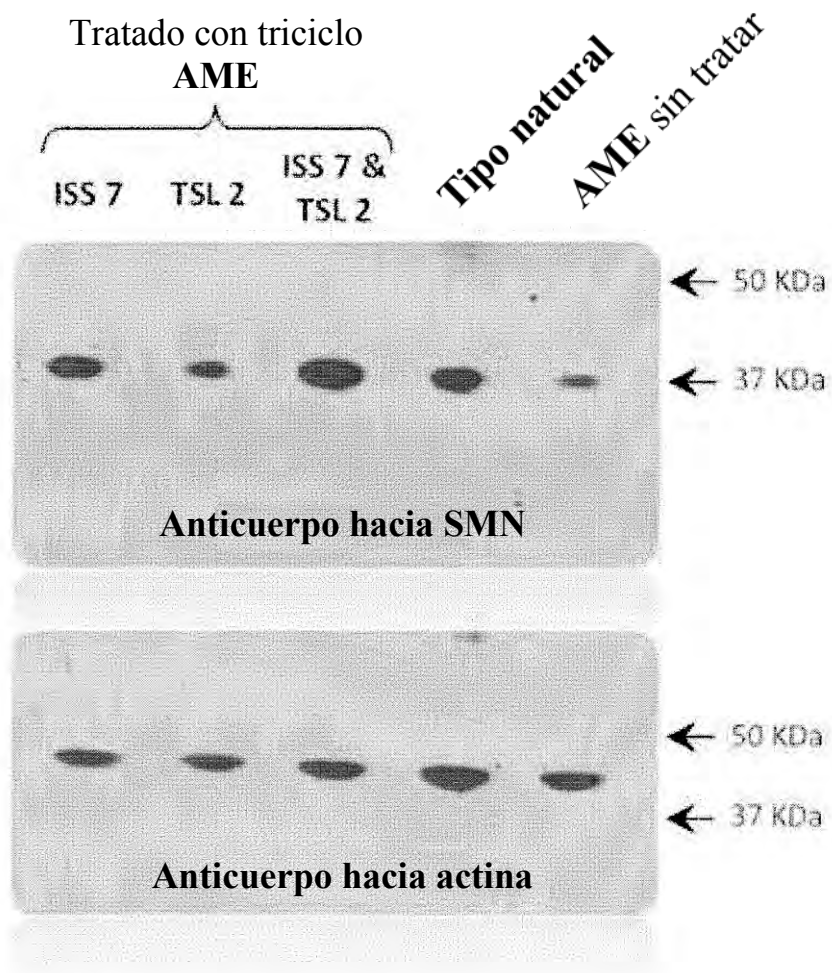


FIG 19C

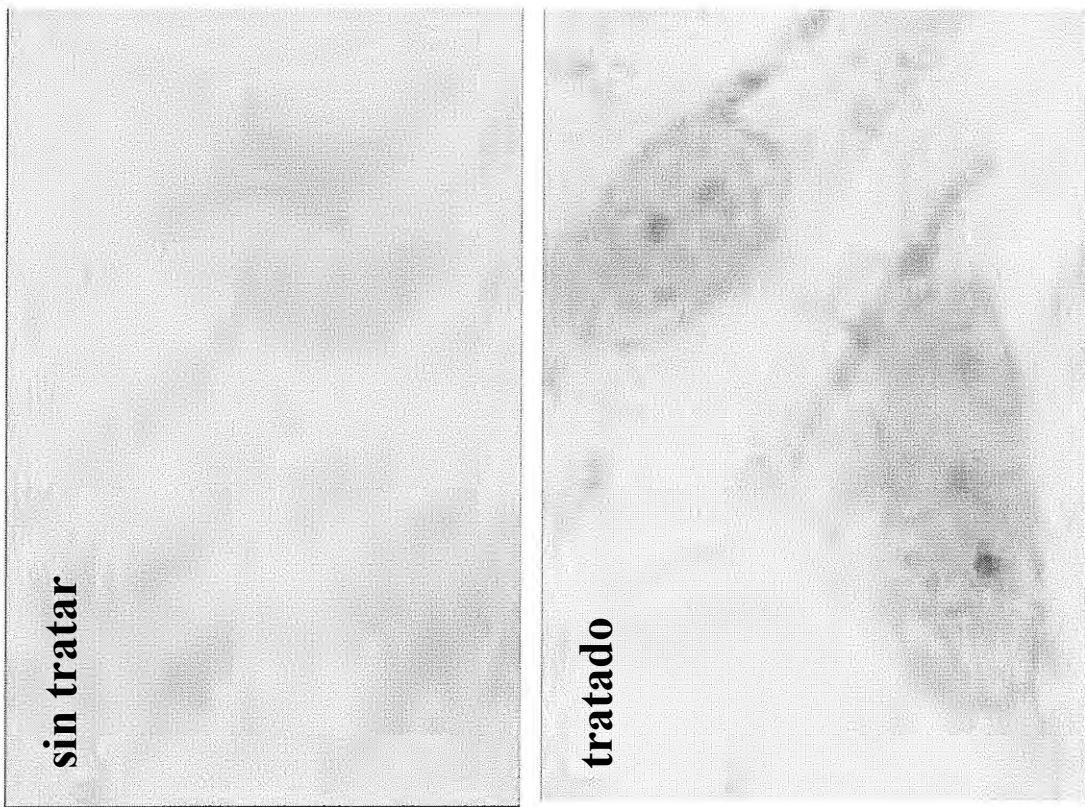


FIG. 19D

FIG. 20A

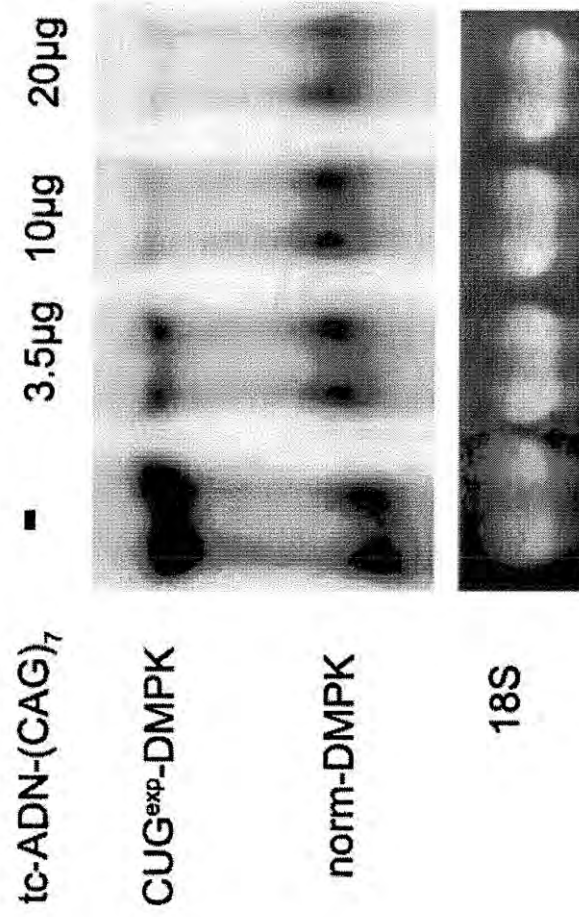


FIG. 20B

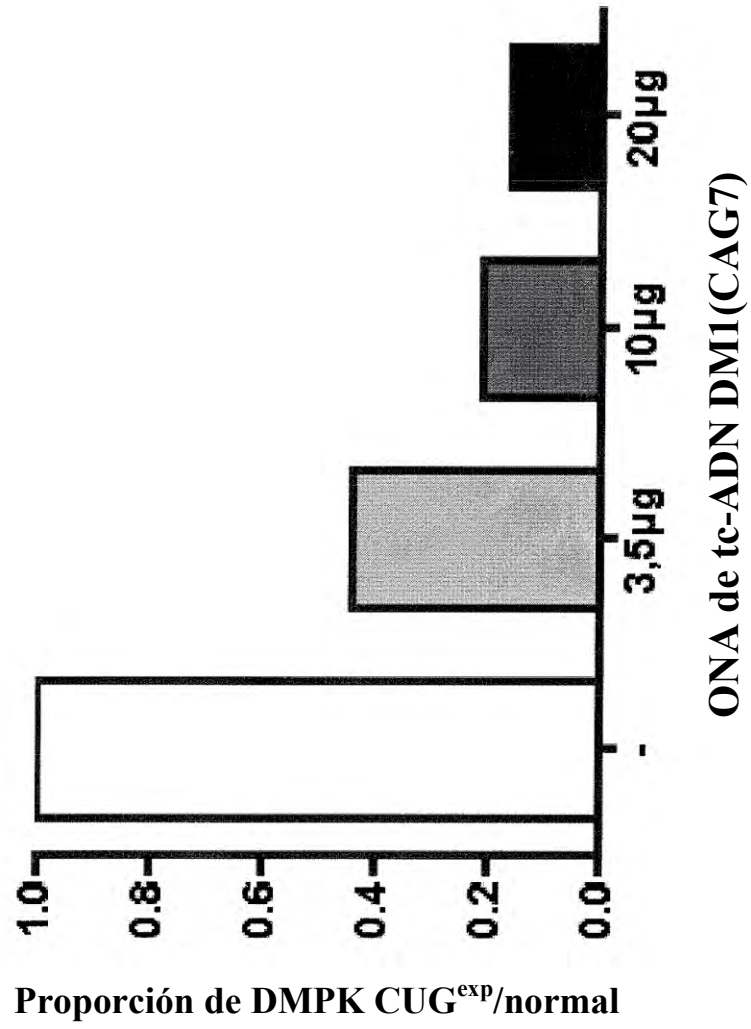
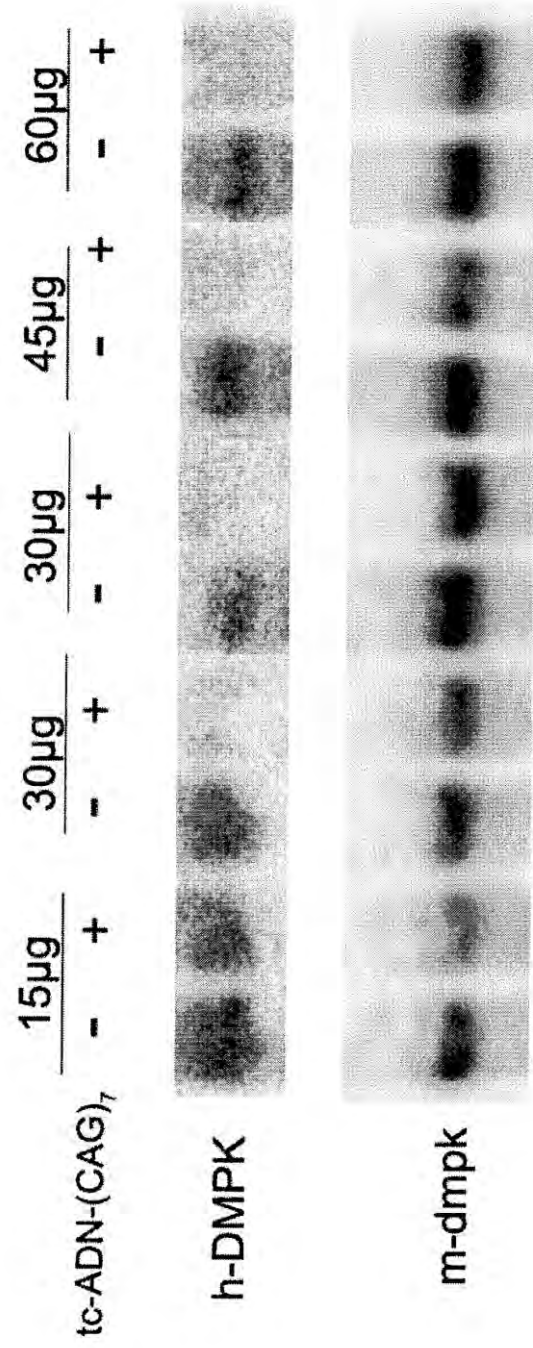


FIG. 21A



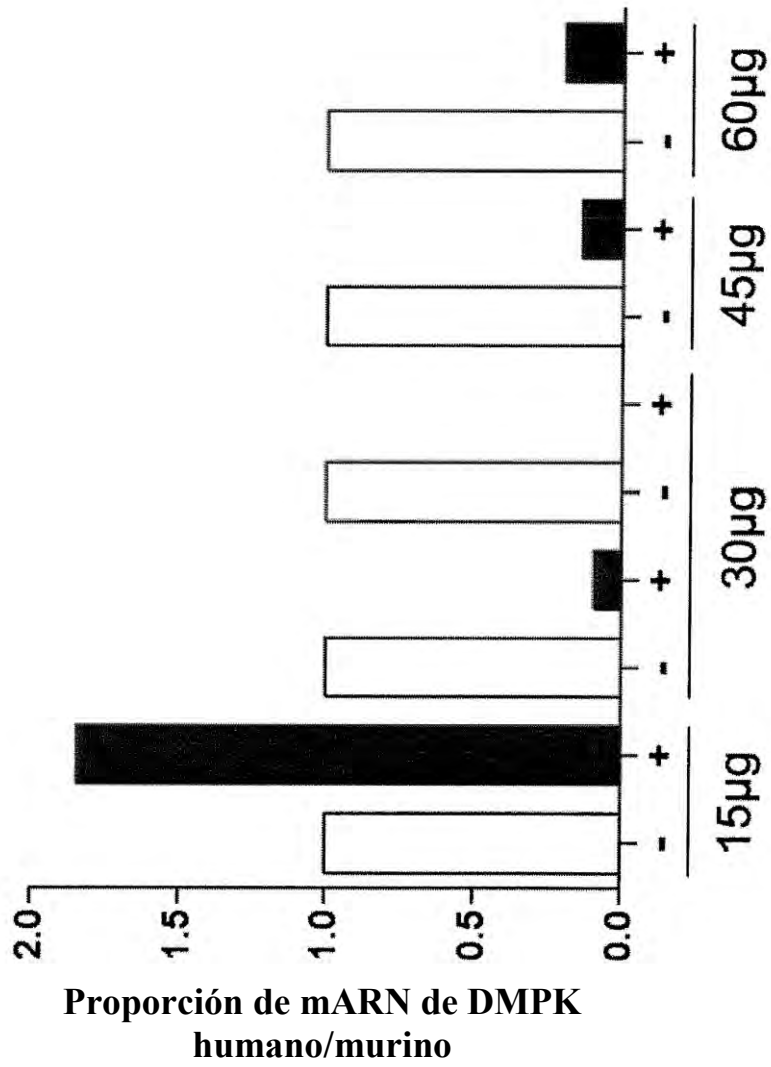


FIG. 21B

FIG. 21C

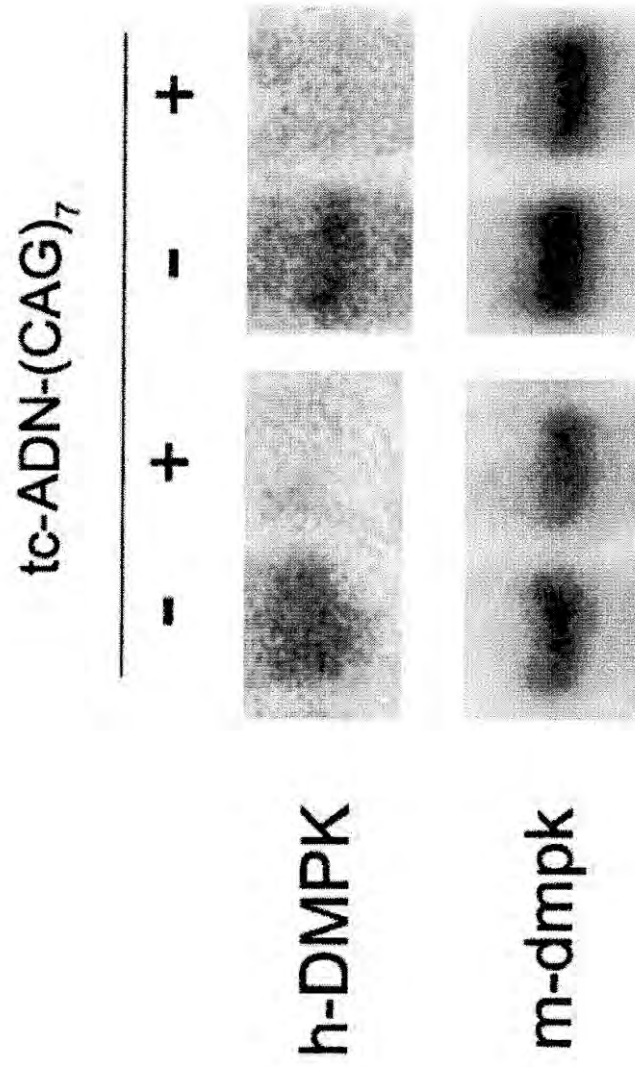


FIG. 21D

