

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 651 216**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/113** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.10.2012 PCT/EP2012/070349**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.04.2013 WO13053928**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.10.2012 E 12770503 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.09.2017 EP 2766479**

54 Título: **Triciclo-ADN fosforotioato**

30 Prioridad:

**13.10.2011 EP 11185129**  
**13.10.2011 US 201161546942 P**  
**27.04.2012 CA 2776651**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**25.01.2018**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 651 216 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

Triciclo-ADN fosforotioato

**Campo de la invención**

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

**Antecedentes de la invención**

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

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

25 La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es la miopatía hereditaria más común, que afecta aproximadamente a uno de cada 3.500 varones, independientemente de la etnia. La consecuencia más importante de la DMD es que las fibras musculares se vuelven particularmente frágiles y la actividad muscular natural provoca daños generales en el tejido muscular. La carencia de distrofina hace que las fibras musculares sean particularmente vulnerables al estrés mecánico, y experimenten ciclos de necrosis recurrentes. Como resultado, los pacientes muestran una debilidad progresiva de los músculos esqueléticos, que con el tiempo son reemplazado por tejido adipofibrótico, lo que conduce a la pérdida de deambulación en torno a la edad de doce años, con lo cual la muerte prematura es causada por insuficiencia respiratoria o cardiomiopatía entre la segunda y la cuarta décadas. Además, aproximadamente un tercio de los pacientes con DMD también muestran deterioro cognitivo lo que sugiere una alteración notable de la función neuronal y cerebral. La DMD afecta a todos los músculos voluntarios e implica al corazón y a los músculos respiratorios en las fases más tardías de la enfermedad. El corazón y el SNC deberían por lo tanto preferiblemente ser el objetivo de cualquier terapia implementada para tratar o aliviar los síntomas de los pacientes con DMD.

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

**Compendio de la invención**

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

45 La invención se refiere por lo tanto a moléculas de ácido nucleico que comprenden triciclo-nucleósidos unidos por enlaces fosforotioato internucleosídicos (enlaces 3'-OPS-O-5'), en donde:

- la proporción de triciclo-nucleósidos representa al menos 50%, preferentemente al menos 60%, 70%, 80%, 90% o 95% de nucleósidos totales en la molécula de ácido nucleico; y/o
- la proporción de enlaces fosforotioato internucleosídicos representa al menos 50%, preferentemente al menos 60%, 70%, 80%, 90% o 95% de los enlaces internucleosídicos totales en la molécula de ácido nucleico.

Las moléculas de ácido nucleico de la invención también son referidas como " triciclo-ADN fosforotioato " o "tc-ADN-PS" en la presente descripción.

La invención también se refiere a una composición que comprende un tc-ADN-PS y un portador. La composición

puede ser en particular una composición farmacéutica, en donde el portador es un portador farmacéuticamente aceptable. La composición de la invención también puede comprender opcionalmente un agente activo adicional.

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

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

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

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

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

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

### Descripción de los dibujos

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

30 La **Figura 2** es una representación esquemática de la mutación *mdx* y el diseño racional del corte y empalme para el rescate de la distrofina. La mutación *mdx* consiste en un único cambio de base (transición de C a T) en el exón 23 del gen de la distrofina (A). Semejante transición genera un codón de parada prematuro (UAA) que anula la síntesis de la distrofina (B). De acuerdo con el ajuste de fase de exones en torno al exón 23, es posible omitir el exón que alberga el codón de parada prematuro durante el empalme del pre-ARNm utilizando los motivos clave de la reasociación de oligonucleótidos antisentido implicados en la definición del exón 23 (C). El ARNm resultante carente del exón 23 se puede traducir a una distrofina truncada pero todavía funcional.

La Figura 3 muestra el rescate de la distrofina diseminada en músculos *mdx* después del suministro de tc-ADN-PS (M23D+2-13).

45 (A) Detección de ARNm de distrofina con omisión del exón 23 en músculos *mdx* después del suministro sistémico de tc-ADN-PS (Dosis: 200 o 50 mg/kg de peso corporal/dos veces por semana; Ruta: intravenosa; Duración: 12 semanas). Las muestras de ARN se analizaron a las 2 semanas del final del tratamiento por medio de RT-PCR anidada como se ha descrito previamente. El fragmento de 688 pb que corresponde al ARNm con omisión del exón 23 se detectó en todos los músculos sometidos a ensayo incluyendo el corazón. También se representa un diagrama que muestra los diferentes exones presentes en el pre-ARNm de la distrofina (con o sin la omisión del exón 23) y la posición en los exones 20 y 26 de los cebadores utilizados para la PCR anidada.

50 (B) Transferencia Western de proteína total (50 µg) extraída de diferentes músculos de ratones tratados, teñida con NCL-DYS1. Las flechas indican la distrofina completa detectada en muestras de músculo normal utilizadas para la comparación. Obsérvese que la diferencia de 8 kD esperada entre las proteínas de tipo salvaje y rescatadas no se pudo resolver en este tipo de gel.

(C) Porcentaje de omisión del exón analizado por medio de qPCR Taqman (panel izquierdo) y porcentaje de distrofina rescatada evaluado por medio de transferencia Western (panel derecho). La omisión del exón 23 se expresa como el porcentaje de distrofina total, medido por medio del nivel de expresión del exón 4-5, después de la normalización con un control endógeno. Para la cuantificación de los niveles de proteína distrofina restaurados en diferentes músculos, las membranas se convirtieron en cuadros numéricos mediante barrido, y se analizaron las intensidades de las bandas utilizando el soporte lógico ImageJ 1.46r. Los niveles de distrofina se expresan como el porcentaje comparado con los niveles en tejido de tipo salvaje. El análisis implicó 3 animales por grupo.

La Figura 4 es una inmunotinción de distrofina de músculos *mdx* normales (A), no tratados (B), y músculos de ratón *mdx* 12 semanas después de inyecciones intravenosas de tc-oligonucleótido PS (+2-13) (C) gastrocnemio, (D) tibial anterior, (E) diafragma.

(F y G) muestran la tinción de distrofina en corazón de *mdx* de tipo salvaje y tratados, respectivamente. Los núcleos se contratiñeron con Dapi. Leyenda: **Detección de distrofina en músculos *mdx* después del tratamiento sistémico con el oligómero tc-ADN-PS M23D (+2-13).** Los ratones *mdx* fueron tratados semanalmente con inyecciones intravenosas de M23D (+2-13) durante 12 semanas, con una dosis de 200 mg/kg de peso corporal. Dos semanas después de la última inyección, los músculos se recogieron y se procesaron mediante análisis de inmunofluorescencia que implicaba la tinción con el anticuerpo monoclonal para distrofina NCL-DYS2. (A y B) muestran secciones transversales de los músculos normales y *mdx*. (C, D y E) muestran el inmunomarcado de distrofina de muestras de músculo de *mdx* tratado: gastrocnemio, tibial anterior y diafragma, respectivamente. (F y G) muestran la tinción de distrofina en *mdx* de corazón normal y tratado, respectivamente.

La Figura 5 presenta un experimento sobre la comparación del suministro de tc-oligonucleótido PS intravenoso versus subcutáneo.

Los animales *Mdx* se trataron durante 8 semanas con tc-ADN-PS (M23D+2-13) 100 mg/kg dos veces por semana suministrado mediante inyecciones intravenosas (A) o subcutáneas (B). Ambas rutas de administración dan lugar a resultados similares como se muestra mediante análisis de transferencia Western (cada calle se cargó con 100 µg de proteína total) de muestras de músculo teñidas con el anticuerpo monoclonal NCL-DYS1). El análisis se realizó 2 semanas después del final del tratamiento. Las flechas indican la distrofina completa, como se detectó en la calle cargada con músculo de tipo salvaje.

La Figura 6 presenta fotografías de transferencias Western que muestran la expresión de la proteína distrofina en músculo cardíaco en ratones *mdx* después del tratamiento sistémico con oligómero tc-ADN-PS M23D(+2-13). Los resultados del análisis de transferencia Western (utilizando el anticuerpo monoclonal NCL-DYS1 para distrofina) de los extractos de proteína total (100 µg cargados) aislada de los corazones de 3 ratones *mdx* tratados con el oligómero de tc-ADN M23D(+2-13) (asteriscos de color blanco) (inyecciones bisemanales - subcutáneas e intravenosas - a 100 mg/kg durante 8 semanas). (A); y 3 ratones *mdx* tratados en las mismas condiciones con oligómero de tc-ADN-fosforotioato (-PS) M23D(+2-13) (asteriscos de color negro) (B). La flecha indica la distrofina de 427 kD completa, detectada en las calles de los correspondientes controles de tipo salvaje para la comparación semi-cuantitativa de la detección de señal de distrofina. Los extractos de corazón de tipo salvaje se diluyeron de 30 a 5% para (A) y de 10 a 1,25% para (B) en extractos de corazón *mdx* con el fin de normalizar la cantidad de carga de proteína a 100 µg por calle.

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

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

La **Figura 8** presenta el rescate de ARNm de distrofina en el SNC de ratones mdx después del suministro sistémico de tc-ADN-PS (M23D+2-13) a dos dosis diferentes.

(A) Efectos de tc-ADN-PS M23D en el SNC después del suministro sistémico (Dosis: 200 y 50 mg/kg/semana; Ruta: intravenosa; Duración: 12 semanas). Se analizaron muestras de ARNm de cerebro completo o cerebelo mediante RT-PCR anidada utilizando cebadores específicos que amplifican específicamente el ARNm de distrofina con el exón 23 omitido (amplificación de 398 pb). Se utilizó una muestra del tibial anterior de un MDX tratado como control positivo. (B) Porcentaje de omisión del exón analizado mediante qPCR Taqman en el cerebro completo y el cerebelo de animales tratados (n = 3 por grupo).

La **Figura 9** presenta experimentos que demuestran que el suministro sistémico de tc-ADN-PS (M23D+2-13) mejoraba el fenotipo MDX. (A) Niveles de creatina quinasa en suero en animales tratados en comparación con el tipo salvaje y MDX no tratado (n = 3 por grupo).  $P < 0,001$  para 200 mg/kg/semana y  $p < 0,05$  para 50 mg/kg/semana. (B) Para ambos regímenes (200 o 50 mg/kg), los niveles de ALT y AST en suero apoyan que el tc-ADN-PS no provoca toxicidad hepática.  $P > 0,05$  en comparación con ratones MDX no tratados. (C) Mejora de la función muscular en ratones tratados con tc-ADN-PS. Se analizaron los músculos tibiales anteriores (TA) de ratones MDX tratados para determinar su fuerza específica (fuerza máxima normalizada para la zona transversal).  $p < 0,001$  para 200 mg/kg/semana y  $p < 0,05$  en comparación con ratones no tratados. (D) Se evaluó el porcentaje de caída de la fuerza midiendo el déficit de fuerza después de una serie de tres contracciones excéntricas. Los valores confirman que los músculos en los animales MDX tratados eran más resilientes que en los MDX no tratados. La caída de la fuerza en los ratones tratados (200 y 50 mg/kg/semana) no es significativamente diferente de la del tipo salvaje.

La **Figura 10** presenta experimentos que muestran el rescate de distrofina en el modelo de ratón dKO después del suministro intravenoso de tc-ADN-PS (M23+2-13).

(A) El tratamiento sistémico con tc-ADN-PS (M23D+2-13) (Dosis: 200 mg/kg/semana; Ruta: intravenosa y subcutánea alternantes) evita el comienzo de la patología distrófica en ratones dKO. Fotografía de un ratón dKO no tratado a las 12 semanas de edad (izquierda), que presenta una fuerte cifosis y contracturas de las articulaciones en comparación con una camada tratada (derecha), que parece sana. El tratamiento se inició a las 3 semanas de edad. (B) Detección de ARNm de distrofina con el exón 23 omitido en músculo dKO después del suministro sistémico de tc-ADN-PS (Dosis: 200 mg/kg/semana; Ruta: intravenosa y subcutánea alternantes; Duración: 20 semanas). Las muestras de ARN se analizaron a las 2 semanas del final del tratamiento mediante RT-PCR anidada como se ha descrito previamente. El fragmento de 688 pb que corresponde al ARNm con el exón 23 omitido se detectó en todos los músculos sometidos a ensayo incluyendo el corazón. (C - F). Inmunotinción de distrofina sobre secciones transversales de músculos de dKO tratados: (C) tibial anterior; (D) gastrocnemio; (E) diafragma; (F) corazón. Las secciones de animales no tratados estaban desprovistas de tinción de distrofina. Los núcleos se contratiñeron con Dapi (color azul). (G) Porcentaje de omisión de exón analizado por medio de qPCR Taqman en diferentes músculos y cerebro después de 5, 11, 18 o 20 inyecciones.

La **Figura 11** es un diagrama que muestra los resultados esperados después de un año de tratamiento. Conforme al efecto acumulativo de inyecciones sistémicas repetidas, se espera que el efecto máximo del tratamiento se logre a aproximadamente 20 semanas para el diafragma (observado durante el transcurso del experimento) y 40 semanas para los otros músculos esqueléticos. También se podría esperar que la omisión de exones alcanzara 60% en el músculo cardíaco y aproximadamente 15% en el SNC.

La **Figura 12** presenta experimentos que muestran que el suministro sistémico de tc-ADN-PS (M23D+2-13) mejoraba el fenotipo dKO.

(A) Niveles de creatinina quinasa en suero en animales tratados en comparación con el tipo salvaje y dKO no tratado (n=5 por cohorte) ( $p < 0,05$ ). (B y C) Los ratones fueron analizados a las 10 semanas de edad con jaulas de actividad de comportamiento de campo abierto. (B) tiempo activo acumulado y (C) distancia recorrida viajada a lo largo de una hora (n=5 por cohorte). (D - F) Mejora de la función del músculo en ratones tratados con tc-ADN-PS. (D) La evaluación de la función del músculo del miembro anterior muestra una mejora física en dKO tratados  $P < 0,05$ . (E) Se analizaron los músculos extensor digitorum longus (EDL) de ratones dKO tratados para determinar su fuerza específica (fuerza máxima normalizada para el área transversal). (F) Se evalúa el porcentaje de caída de la fuerza midiendo el déficit de fuerza después de una serie de 5 contracciones excéntricas.  $p < 0,05$  en comparación con ratones dKO no tratados. Los valores confirman que los músculos en los animales dKO no tratados eran más resilientes que en dKO no tratados. Se muestra la barra de error como las medias  $\pm$  ETM (N=5 por cohorte).

Las **Figuras 13 y 14** presentan experimentos que muestran el efecto duradero de tc-ADN-PS (M23D+2-13). La **Figura 13** muestra la farmacocinética de tc-ADN-PS (M23D+3-13) después de la inyección intravenosa (A). Los ratones recibieron una sola inyección de oligonucleótidos a la concentración de 200 mg/kg. Se recogieron muestras de suero en diferentes momentos puntuales y se analizaron mediante HPLC-MS/MS para apreciar los niveles de tc-ADN-PS en el compartimento sanguíneo. (B) La durabilidad del tratamiento se evaluó comparando el porcentaje de omisión en animales cargados con la misma cantidad de tc-ADN-PS (cantidad total de aproximadamente 15 mg) pero se analizó a las 2 semanas o a las 13 semanas del final del tratamiento. De manera importante, aproximadamente 3 meses después de la última inyección, los niveles de omisión todavía eran significativamente

muy altos, representando casi la mitad del resultado inicial medido 2 semanas después del tratamiento. Esto sugiere que los tc-ADN-PS son estables en células y se podrían volver a emplear a lo largo del tiempo limitando de ese modo la necesidad de reponer tejidos tan a menudo como se requeriría si estos oligos se destruyeran o titularan mediante si diana de ARNm. La Figura 14 muestra otro modo de someter a ensayo la persistencia del efecto del tratamiento. Se trataron tres conjuntos de animales con la misma cantidad de tc-ADN-PS M23D(+2-13). El conjunto 1 durante 12 semanas a 200 mg/kg/semana, el Conjunto 2 durante 12 semanas a 50 mg/kg/semana y el Conjunto 3 durante 4 semanas a 200 mg/kg/semana seguido de 8 semanas a 50 mg/kg/semana.

Los músculos se recogieron 2 semanas después del final del tratamiento y se analizaron mediante RT-PCR Taqman. (n=3 por cohorte).

- 10 La **Figura 15** muestra el efecto del suministro sistémico de tc-ADN-PS (ISS7) en el modelo de ratón SMA (FVB.Cg-Tg(SMN2)2Hung Smn<sup>1tm1Hung/J</sup>). Los ratones SMA de tipo III (FVB.Cg-Tg(SMN2)2Hung *Smn*<sup>1tm1Hung/J</sup>) tienen desactivado *Smn* (*Smn*<sup>1 -/-</sup>) y contienen un transgén SMN2 formado por dos copias en tándem del gen SMN2 humano. Estos animales presentan características típicas incluyendo necrosis de la cola que empieza a aproximadamente un mes de edad. Semejante necrosis se extiende progresivamente hacia las aurículas de las orejas y los pies y más adelante estos animales presentan debilidad muscular.

15 La fotografía muestra 3 individuos de tipo III (un mes de edad). El superior es un control no tratado que muestra la típica necrosis de la cola; los otros dos, tratados con tc-ADN-PS (ISS7) no muestran tal característica indicando que el gen SMN2 se ha rescatado por inclusión del exón 7, dando lugar de ese modo a SMN: Recibieron una única inyección ICV (intracerebrovascular) al nacer (5 µl que contenían 20 µg de tc-ADN-PS (ISS7) e inyecciones repetidas SC (subcutáneas) una vez a la semana a una dosis de 200 mg/kg.

20 La **Figura 16** presenta un experimento que muestra la eficacia *in vitro* de un oligonucleótido tc-ADN que se dirige a amplificaciones de CUG.

La **Figura 17** presenta un experimento que muestra la eficacia *in vitro* de un oligonucleótido tc-ADN-PS que se dirige a amplificaciones de CUG.

- 25 Las **Figuras 18 a 20** presentan experimentos que muestran la eficacia *in vitro* de un oligonucleótido tc-ADN-PS que se dirige a amplificaciones de CUG.

### Descripción detallada

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

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

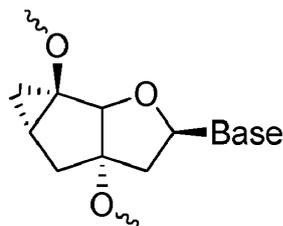
45 El presente descubrimiento encontrará una amplia aplicación en el tratamiento de enfermedades genéticas, en general, y más específicamente, en el tratamiento de enfermedades neuromusculares o musculoesqueléticas, tales como la distrofia muscular de Duchenne, la atrofia muscular espinal, y la distrofia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

### Definiciones

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

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

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



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

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

- 20 Según se utiliza en la presente memoria, "complementaria" se refiere a una molécula de ácido nucleico que puede formar uno o varios enlaces de hidrógeno con otra molécula de ácido nucleico, ya sea mediante emparejamiento tradicional de bases de Watson-Crick o mediante otros tipos de emparejamiento no tradicionales (p. ej., enlace de hidrógeno de Hoogsteen o Hoogsteen invertido) entre nucleósidos o nucleótidos complementarios. En referencia al AON de tc-ADN-PS de la presente descripción, la energía libre de unión para un AON de tc-ADN-PS con su secuencia complementaria es suficiente para permitir que la función correspondiente del AON de tc-ADN-PS prosiga y haya un grado suficiente de complementariedad para evitar la unión no específica del AON de tc-ADN-PS a secuencias no diana en condiciones en las que se desea la unión específica, es decir, en condiciones fisiológicas en el caso del tratamiento terapéutico *ex vivo* o *in vivo*. La determinación de las energías libres de unión para las moléculas de ácido nucleico es bien conocida en la técnica (véanse p. ej., Turner et al., *CSHSymp. Quant. Biol. LII*:123-133(1987); Freier et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **83**:9373-77 (1986); y Turner et al., *J. Am. Chem. Soc.* **109**:3783-3785 (1987)). Por lo tanto, "complementario" (o "hibridable específicamente") son términos que indican un grado suficiente de complementariedad o emparejamiento preciso de manera que se produce una unión estable y específica entre un AON de tc-ADN-PS y un pre-ARNm o ARNm diana.

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

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

proteína por los ribosomas en el citoplasma.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Un objeto de la invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que comprende triciclo-nucleósidos unidos por enlaces fosforotioato internucleosídicos (enlaces 3'-OPS-O-5'), en donde:

- la proporción de triciclo-nucleósidos representa al menos 50%, preferentemente al menos 60%, 70%, 80%, 90% o 95% de nucleósidos totales en la molécula de ácido nucleico; y/o
- la proporción de enlaces fosforotioato internucleosídicos representa al menos 50%, preferentemente al menos 60%, 70%, 80%, 90% o 95% de los enlaces internucleosídicos totales en la molécula de ácido nucleico,

también denominados "triciclo-ADN fosforotioato" o "tc-ADN-PS" en la presente descripción.

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

De acuerdo con la presente descripción, un ácido nucleico de la invención comprende al menos dos triciclo-nucleósidos adyacentes unidos por un enlace fosforotioato. Esta secuencia de radicales nunca ha sido descrita antes del presente estudio. Se entenderá que la molécula de ácido nucleico de la invención también puede comprender nucleósidos con diferente química tales como nucleósidos que contienen ribosa o desoxirribosa clásicos, nucleósidos de LNA y similares. La molécula de ácido nucleico de la invención también puede contener otros tipos de enlaces internucleosídico, además del enlace fosforotioato, p. ej. el enlace fosfodiéster clásico. Sin embargo, la invención se refiere a moléculas de ácido nucleico, en la que la proporción de triciclo-nucleósidos representan al menos 50%, preferentemente al menos 60%, 70%, 80%, 90% o 95% de los nucleósidos totales de la molécula de ácido nucleico. Además, la invención se refiere a moléculas de ácido nucleico, en las que la proporción de enlaces fosforotioato internucleosídicos representa al menos 50%, preferentemente al menos 60%, 70%, 80%, 90% o 95% de los enlaces internucleosídicos totales de la molécula de ácido nucleico. En una realización concreta, todos los nucleósidos de la molécula de ácido nucleico de la invención son triciclo-nucleósidos. En otra realización, todos los enlaces entre subunidades son enlaces fosforotioato.

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

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

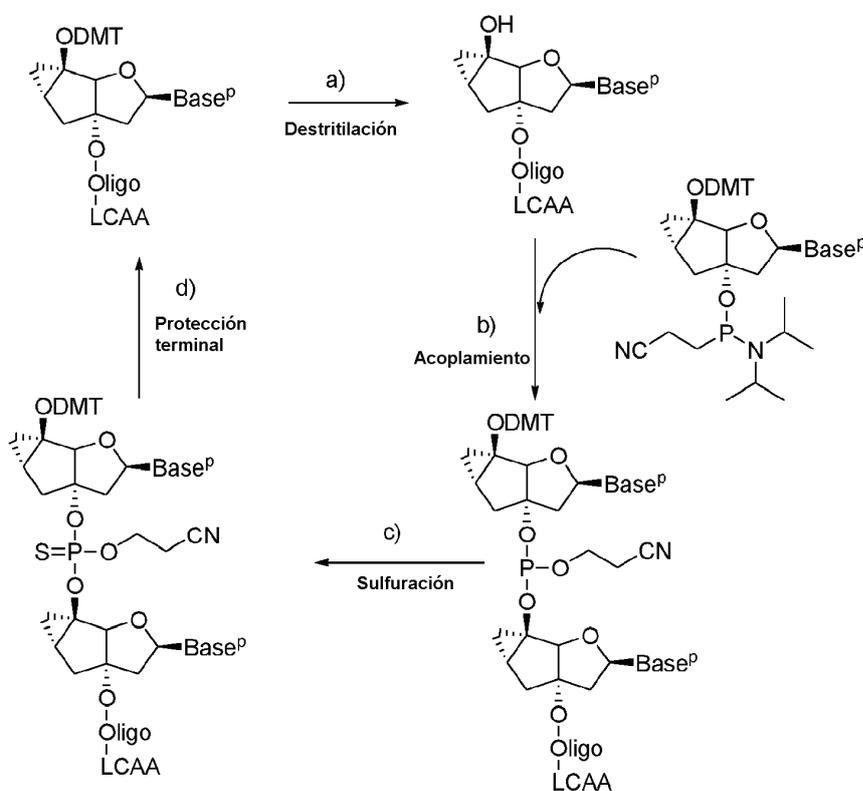
similares, para facilitar la detección del propio ácido nucleico y su presencia en, p. ej., en complejos de hibridación.

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

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

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

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



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

- El ciclo de síntesis en el que una unidad adicional se une a la cadena en crecimiento consiste en cuatro etapas sucesivas (a-d). Después del ensamblaje de la cadena el oligonucleótido se desprende del soporte sólido y se desprotege de la forma habitual ( $\text{NH}_3$  conc.,  $55^\circ\text{C}$ , 16 h). El vidrio de poro controlado de alquilamina de cadena larga (LCAA-CPG), al cual se une el primer triciclo-nucleósido a través de un conector de succinilo, se utiliza como soporte sólido. Las síntesis se realizaron generalmente en la escala de 1,3 o 10  $\mu\text{moles}$  en un ensamblador de genes más sintetizador de ADN de Pharmacia. Los triciclo-fosforotioato-oligonucleótidos se sintetizan con un grupo fosfato o tiofosfato 5' terminal para asegurar la estabilidad química del extremo 5' (R. Steffens y C. J. Leumann, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, **121**, 3249-3255). A continuación se proporcionan las condiciones de cada etapa a) - d) y se optimizan para una síntesis de 10  $\mu\text{moles}$ .
- 5
- 10 a) Destritilación:  
Se enjuaga con ácido dicloroacético al 3% en 1,2-dicloroetano (DCE) durante 1,5 min. A continuación se lavar con DCE y  $\text{CH}_3\text{CN}$ .
- b) Acoplamiento:  
Se aplica disolución de fosforamidita (0,1  $\mu\text{M}$  en  $\text{CH}_3\text{CN}^+$ , 400  $\mu\text{L}$ ) y activador 5-etiltetrazol (ETT, 0,25 M en  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 600 $\mu\text{L}$ ) al soporte sólido. Tiempo de acoplamiento: 9 min. A continuación lavar con  $\text{CH}_3\text{CN}$ .
- 15 \*Se utiliza  $\text{CH}_3\text{CN}$  para los elementos fundamentales tc-T, tc-G y tc-C. Por razones de solubilidad el elemento fundamental tc-A se utiliza en DCE seco como disolvente.
- c) Sulfuración:  
Se enjuaga bis(fenilacetil)disulfuro (PADS) en piridina seca/ $\text{CH}_3\text{CN}$  1/1 (0,2 M) se vacía sobre el soporte sólido durante 3 min. A continuación se lava con  $\text{CH}_3\text{CN}$
- 20 d) Protección terminal:  
Los grupos 5'-hidroxilo que no han reaccionado se protegen terminalmente utilizando disolución de CapA (4-dimetilaminopiridina (DMAP, 0,5 M) en  $\text{CH}_3\text{CN}$ ) y de CapB (anhídrido acético ( $\text{Ac}_2\text{O}$ ), colidina en  $\text{CH}_3\text{CN}$  (2:3:5)) durante 20 s cada uno. A continuación se lava con  $\text{CH}_3\text{CN}$ .
- 25 Los elementos fundamentales de tc-ADN fosforamidita utilizados para la síntesis de la molécula de ácido nucleico de la invención se pueden sintetizar como describe Steffens y Leumann, C. en *Helv. Chim. Acta* **80**:2426-2439 (1997). Los ciclos de prolongación de la cadena pueden ser esencialmente idénticos a los de la síntesis de oligodeoxinucleótidos naturales. Véase, Pharmacia LKB User's Manual (56-1111-56) (Gene assembler special/4 primers).
- 30 La molécula de tc-ADN-PS de la invención puede ser un oligonucleótido antisentido complementario a una porción de un ARN codificado por un gen, en particular un gen humano. La presente invención también se refiere por lo tanto a un oligonucleótido antisentido de triciclo-ADN fosforotioato.
- La molécula de tc-ADN-PS (u oligonucleótido antisentido) de la invención puede ser diseñada en particular:
- 35
- para efectuar la omisión del exón, en particular para la omisión de uno o más exones en un gen de distrofina;
  - para facilitar la inclusión de un exón durante el procesamiento de un pre-ARNm diana, en particular para facilitar la inclusión del exón 7 durante el procesamiento de un pre-ARNm de SMN2;
  - para el direccionamiento de un ARNm mutado que comprende amplificaciones de CUG en exceso para evitar el secuestro de proteínas nucleares a las repeticiones de CUG expandidas, por ejemplo para el direccionamiento de un ARNm de DM1 mutado que comprende amplificaciones de CUG en exceso;
  - para facilitar la destrucción de un ARNm mutado que comprende amplificaciones de CUG en exceso, por ejemplo facilitando la destrucción de un ARNm de DM1 mutado que comprende amplificaciones de CUG en exceso.
- 40
- 45 Las moléculas de tc-ADN-PS de la presente invención se pueden formular en una composición, con un portador. La composición puede ser una composición farmacéutica, siendo el portador un portador farmacéuticamente aceptable.
- De este modo, la invención se refiere también a una composición farmacéutica que comprende un ácido nucleico de la invención, que es, en particular, un oligonucleótido antisentido complementario a una porción de un ARN codificado por un gen, en particular un gen humano, y en donde dicha composición comprende adicionalmente un portador farmacéuticamente aceptable. Además, la invención también se refiere a una molécula de ácido nucleico de la invención, combinada con otro agente terapéutico. La molécula de ácido nucleico de la invención y el otro agente terapéutico se pueden formular en una composición farmacéutica, o son parte de una preparación combinada (kit de
- 50

partes), para uso simultáneo, separado o sucesivo. El experto en la técnica adaptará el otro agente terapéutico y la secuencia del ácido nucleico de la invención a la enfermedad concreta que se pretenda tratar.

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

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

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

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

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

50 Las composiciones farmacéuticas de esta descripción también pueden estar en forma de emulsiones de aceite en agua. La fase oleosa puede ser un aceite vegetal o un aceite mineral o mezclas de éstos. Los agentes

emulsionantes adecuados pueden ser gomas de origen natural, por ejemplo goma arábica o goma tragacanto, fosfátidos de origen natural, por ejemplo soja, lecitina, y ésteres o ésteres parciales derivados de ácidos grasos y hexitol, anhídridos, por ejemplo monooleato de sorbitán, y productos de condensación de dichos ésteres parciales con óxido de etileno, por ejemplo monooleato de polioxietilensorbitán.

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

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

- Una dosis farmacéuticamente eficaz es la dosis requerida para prevenir, inhibir la aparición o tratar (aliviar un síntoma en cierta medida, preferentemente todos los síntomas) de un estado de enfermedad. La dosis farmacéuticamente eficaz depende del tipo de enfermedad, la composición utilizada, la ruta de administración, el tipo de mamífero tratado, las características físicas del mamífero específico bajo consideración, la medicación concurrente y otros factores que reconocerán los expertos en las 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 la molécula de tc-ADN-PS de esta descripción.

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

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

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

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

Otros métodos para la administración de moléculas de ácido nucleico son descritos, por ejemplo, por Boado et al., *J.*

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

### Métodos de tratamiento

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

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

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

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

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

40 Según se utiliza en la presente memoria, el término "omisión de exón" se refiere a la modificación de corte y empalme del pre-ARNm mediante la localización de los sitios donadores y/o aceptores de empalme en un pre-ARNm con uno o más oligonucleótidos antisentido complementarios (AON). Al bloquear el acceso de un espliceosoma a uno o más sitios donadores o aceptores de empalme, o por supuesto cualquier otro sitio dentro de un exón o intrón implicado en la definición de corte y empalme, un AON puede evitar una reacción de corte y empalme causando de ese modo la delección de uno o más exones de un ARNm procesado completamente. La omisión de exones se consigue en el núcleo durante el proceso de maduración de los pre-ARNm. Incluye el enmascaramiento de las secuencias clave implicadas en el corte y empalme de exones localizados mediante el uso de oligonucleótidos antisentido (AON) que son, por ejemplo, complementarios a secuencias donadoras de empalme dentro de un pre-ARNm. Los AON de tc-ADN-PS proporcionados en la presente memoria se puede emplear adecuadamente para la omisión de exones a través de la enmascaramiento de los sitios de empalme en las uniones intrón/exón dentro de un pre-ARNm de distrofina facilitando de este modo la delección de un exón mutante durante el procesamiento del pre-ARNm a un ARNm maduro.

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

aminoácidos de distrofina tanto N-terminal como C-terminal para aquellos aminoácidos eliminados.

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

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

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

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

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

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

Se ilustran en la presente memoria AON de tc-ADN que comprenden la secuencia de 15 nucleótidos 5'-CTTTCATAATGCTGG-3' (SMN2i7 (10;25), SEQ ID NO: 7), cuyos AON de tc-ADN son complementarios a una ISS pre-ARNm de SMN2 y que se pueden emplear para facilitar la inclusión del exón 7 en un ARNm de SMN2 procesado. También se ilustran en la presente memoria AON de tc-ADN-PS que comprenden la secuencia de 13 nucleótidos 5'-TTAATTTAAGGAA-3' (SMN2e7 (39;51), SEQ ID NO: 8), cuyos AON de tc-ADN-PS son complementarios a un TSL2 de pre-ARNm de SMN2 y que también se pueden emplear para facilitar la inclusión del exón 7 en un ARNm de SMN2 procesado.

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

En otras realizaciones adicionales, la presente descripción proporciona AON de tc-ADN-PS que se pueden emplear adecuadamente para el tratamiento de la Distrofia Miotónica de Steinert que es el resultado de amplificaciones CUG en el extremo 3' del ARNm que codifica DM1. Se cree que los ARNm de DM1 mutados que contienen amplificaciones CUG excesivas son secuestrados en el núcleo y acumulados para formar focos nucleares. Estos focos son estables y se cree que se unen a factores implicados en la maquinaria de corte y empalme afectando de

ese modo ampliamente al transcriptoma. Como parte de la presente descripción, se espera que los AON de tc-ADN-PS se puedan emplear para localizar las secuencias CUG y facilitar la destrucción del ARNm de DM1 mutado y/o prevenir el secuestro de proteínas nucleares a repeticiones de CUG expandidas conduciendo de ese modo a la liberación de los factores de empalme y a la eliminación de los focos nucleares. Sin desear vincularse a una teoría mecanicista particular, se cree adicionalmente que los AON de tc-ADN-PS descritos en la presente memoria son capaces de facilitar la destrucción del ARNm que contiene amplificaciones de CUG excesivas.

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

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

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

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

Inesperadamente, se ha demostrado que las moléculas de tc-ADN-PS de la invención atraviesan la barrera hematoencefálica. Por consiguiente, la presente invención se refiere a un método para proporcionar el direccionamiento de un oligonucleótido al SNC, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite un oligonucleótido de tc-ADN-PS. Adicionalmente, la invención también se refiere a un método para el tratamiento de una enfermedad que afecta al SNC de un sujeto que lo necesite que comprende administrar a dicho sujeto, en particular un sujeto humano, una molécula de tc-ADN-PS de la invención. El tc-ADN-PS es complementario a una secuencia diana definida de manera que la interacción entre el tc-ADN-PS administrado y la secuencia diana proporciona un tratamiento eficaz de dicha enfermedad. En una realización concreta, las moléculas de ácido nucleico de la invención se pueden utilizar para el tratamiento de enfermedades que afectan a los músculos y el SNC. Como se mencionó anteriormente, aunque la distrofia muscular de Duchenne se caracteriza principalmente por la disfunción muscular observada, aproximadamente un tercio de los pacientes con DMD también muestran deterioro cognitivo que sugiere una alteración notable de la función neuronal y cerebral. Las moléculas de ácido nucleico de la invención se pueden utilizar para la restauración de la función neuronal y cerebral alterada resultante de la distrofia anormal.

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

#### **Ejemplos**

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

La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es un trastorno recesivo ligado al cromosoma X que afecta a uno de cada 3.500 varones nacidos vivos (Emery. Neuromuscul. Disord. 1991). Está causada por mutaciones en el gen que codifica la distrofina, una proteína grande (427 kDa) encontrada en una variedad de tejidos, especialmente en fibras del músculo estriado y neuronas en determinadas regiones del sistema nervioso central (Kunkel et al., PNAS. 1985; Muntoni F et al., Lancet Neurol. 2003). La distrofina se localiza cerca de la superficie interna de la membrana plasmática, conectando el citoesqueleto de actina a la matriz extracelular a través de un complejo de glicoproteína asociada a distrofina de membrana (Culligan et al., 1988). La carencia de distrofina hace que las fibras musculares

sean particularmente vulnerables al estrés mecánico, y experimenten ciclos recurrentes de necrosis. Como resultado, los pacientes muestran una debilidad progresiva de los músculos esqueléticos, que con el tiempo son reemplazados por tejido adipofibrótico, lo que lleva a la pérdida de la deambulaci3n a la edad de aproximadamente doce a3os, con lo cual se ocasiona la muerte prematura por insuficiencia respiratoria o cardiomiopatía entre la segunda y la cuarta d3cadas. Adem3s, aproximadamente un tercio de los pacientes con DMD tambi3n muestran deterioro cognitivo lo que sugiere una alteraci3n notable de la funci3n neuronal y cerebral (Bresolin et al., Neuromuscul. Disord. 1994).

La distrofina completa, traducida a partir de un transcrito de ARNm principal de 14 kb formado por 79 exones, es una prote3na modular que puede apoyar por fortuna la deleci3n de m3ltiples exones siempre que se conserve el marco de lectura abierto (Koenig et al., Cell. 1987). Este fen3meno se produce en la enfermedad clínicamente m3s leve de distrofia muscular de Becker (BMD), donde las delecciones que mantienen el marco de lectura abierto conducen a la s3ntesis de formas semi-funcionales truncadas de distrofina (Monaco et al. Genomics. 1988). Por lo tanto, se propuso, hace quince a3os, que la interferencia del proceso de corte y empalme de exones elegidos mediante el uso de oligonucle3tidos antisentido (AON) podría ser un enfoque terap3utico adecuado para la DMD (Matsuo M. Brain Dev. 1996).

Se han sometido a ensayo exhaustivamente dos tipos de compuestos para determinar la omisi3n de exones inducida por antisentido, los olig3meros de ribosa modificados con 2'-O-metilo con una cadena principal de fosforotioato completa (2OMe-PS) y los olig3meros de morfolino fosforodiamidato (PMO). Se ha demostrado que ambos tipos de mol3culas antisentido rescatan la distrofina del m3sculo esquel3tico despu3s de la liberaci3n sist3mica en modelos animales de DMD y m3s recientemente en pruebas clínicas. Tal como est3n las cosas, las pruebas clínicas que utilizaban la administraci3n sist3mica de 2'OMe-PS y PMO dirigidos al ex3n 51 del pre-ARNm de distrofina fueron bien toleradas sin eventos adversos graves relacionados con el f3rmaco (van Deutekom et al., New. Engl. J. Med. 2007; Kinali et al., Lancet Neurol. 2009; Goemans et al., New. Engl. J. Med. 2011; Cirak et al., Lancet 2011). Sin embargo, estos compuestos tienen una limitaci3n importante y es que no se dirigen de manera eficaz al m3sculo cardíaco y no atraviesan la barrera hematoencef3lica.

Aqu3, los autores de la presente invenci3n demuestran que la administraci3n sist3mica de olig3meros antisentido preparados de an3logos de nucle3tidos de triciclo-ADN (tc-ADN) permite igualmente el rescate de distrofina en los m3sculos esquel3ticos en el modelo de rat3n mdx. Por otra parte, la sustituci3n de azufre por ox3geno en la cadena principal del 3ster fosfato confiri3 nuevas propiedades a los antisentido de tc-ADN que fueron cruciales para su biodistribuci3n despu3s de la administraci3n sist3mica. De hecho, los olig3meros de tc-ADN que contenían fosforotioato (PS) podrían dirigirse ahora de manera eficiente al m3sculo cardíaco y, adem3s, atravesar la barrera hematoencef3lica para rescatar la distrofina mutada en el coraz3n y el sistema nervioso central.

### **Materiales y m3todos:**

#### Triciclo-ADN.

La s3ntesis de tc-ADN f3sforotioato sigui3 los procedimientos cl3sicos de s3ntesis de oligonucle3tidos en fase s3lida de acuerdo con el enfoque de la fosforamidita. El ciclo de s3ntesis en el que una unidad adicional se une a la cadena en crecimiento consta de cuatro etapas sucesivas (a-d). Despu3s de ensamblaje de la cadena, el oligonucle3tido se separa del soporte s3lido y se desprotege de la forma habitual (NH<sub>3</sub> conc., 55°C, 16 h). Se utiliza vidrio de poro controlado con alquilamina de cadena larga (LCAA-CPG), al cual est3 unido el primer tc-nucle3sido a trav3s de un conector succinilo, como soporte s3lido. Las s3ntesis se realizaron generalmente a una escala de 1,3 o 10 μmoles en un ensamblador de genes m3s sintetizador de ADN de Pharmacia. Los Tc-oligonucle3tidos-PS se sintetizaron con un grupo fosfato o tiofosfato 5'-terminal para asegurar la estabilidad qu3mica del extremo 5'. Las condiciones de cada etapa a) - d) se proporcionan a continuaci3n y se optimizan para una s3ntesis de 10 μmoles.

a) Destritilaci3n: Se enjuaga con 3cido dicloroac3tico al 3% en 1,2-dicloroetano (DCE) durante 1,5 min. A continuaci3n se lava con DCE y CH<sub>3</sub>CN.

b) Acoplamiento: Se aplica disoluci3n de fosforamidita (0,1 mM en CH<sub>3</sub>CN, 400 ml) y activador de 5-3tiliotetrazol (ETT, 0,25 M en CH<sub>3</sub>CN, 600 ml) al soporte s3lido. Tiempo de acoplamiento: 9 min. A continuaci3n se lava con CH<sub>3</sub>CN.

c) Sulfuraci3n: Se enjuaga con bis(fenilacetil)disulfuro (PADS) en piridina seca/CH<sub>3</sub>CN 1/1 (0,2 M) el soporte s3lido durante 3 min. A continuaci3n se lava con CH<sub>3</sub>CN

d) Protecci3n terminal: Se protegen terminalmente los grupos 5'-hidroxilo que no han reaccionado utilizando disoluci3n de CapA (4-dimetilaminopiridina (DMAP, 0,5 M) en CH<sub>3</sub>CN) y de CapB (anh3drido ac3tico (AC<sub>2</sub>O), colidina en CH<sub>3</sub>CN (2:3:5)) durante 20 s cada uno. A continuaci3n se lava con CH<sub>3</sub>CN.

La secuencia antisentido para el rescate del pre-ARNm de distrofina mdx ten3a 15 unidades simples de longitud y se dirigi3a al sitio de empalme donador del ex3n 23 (M23D (+2-13)).

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

Las otras secuencias antisentido descritas en la presente memoria también han sido sintetizadas de acuerdo con este método.

#### Experimentos con animales

5 Se inyectaron intramuscularmente, intravenosamente o subcutáneamente tc-ADN o tc-ADN-PS a ratones mdx adultos (6 a 8 semanas de edad) como se indica en la sección resultados bajo anestesia general utilizando isoflurano.

10 Los ratones DKO se generan cruzando ratones (utr+/-, dys-/-), que se han obtenido cruzando los ratones utr-/- con ratones *mdx* (Deconinck, A.E., Rafae, J.A., Skinner, J.A., Brown, S.C., Potter, A.C., Metzinger, L., Watt, D.J., Dickson, J.G., Tinsley, J.M. y Davies, K.E. (1997) Utrrophin-dystrophin-deficient mice as a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell*, 90, 717-727). El tc-ADN se suministró semanalmente a ratones dKO a una dosis de 200 mg/kg/wk mediante inyecciones intravenosa (IV) en la vena de la cola y subcutánea (SC) alternativamente con ratones bajo anestesia general. Los ratones tratados se sacrificaron en diversos momentos puntuales indicados en la sección resultados mediante inhalación de CO<sub>2</sub>. Los músculos se congelaron instantáneamente en isopentano enfriado con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C antes de su análisis posterior. Todos los experimentos de 15 dKO se llevaron a cabo en Biomedical Science Building, University of Oxford, Oxford, R.U. y se realizaron de acuerdo con las pautas y protocolos aprobados por Home Office.

#### Análisis de la función muscular

20 Se realizó un análisis de la fuerza de agarre funcional en ratones tratados y de control a las 12 semanas de edad utilizando un control de la fuerza de agarre comercial (Chatillon, R.U.). Cada ratón se sujetó a 2 cm de la base de la cola, se permitió que se agarrara a una barra unida al aparato con sus patas delanteras, y se tiró suavemente hasta que soltó el agarre. La fuerza ejercida se registró a partir de 4 ensayos sucesivos, promediando a una separación de 1 min. Se midieron la fuerza específica y la caída de la fuerza de músculo extensor digitorum longus (EDL) diseccionado de la pata trasera de los ratones tratados y de control. Durante la disección y los experimentos, los 25 músculos se bañaron en solución de Krebs-Hensley oxigenada (O<sub>2</sub> al 95% - CO<sub>2</sub> al 5%) compuesta por (mM): NaCl, 118; NaHCO<sub>3</sub>, 24,8; KCl, 4,75; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,18; MgSO<sub>4</sub> 1,18; CaCl<sub>2</sub>, 2,54; glucosa, 10. Las propiedades contráctiles se midieron como se ha descrito previamente (Goyenvalle, A., Babbs, A., Powell, D., Kole, R., Fletcher, S., Wilton, S.D. y Davies, K.E. (2010) Prevention of dystrophic pathology in severity affected dystrophin/itrophin-deficient mice by morpholino-oligomer-mediated exon-skipping. *Mol. Ther.*, 18, 198-205).

#### Control de la actividad en campo abierto

30 Se utilizaron los Controles de Actividad Linton AM1053 X, Y, Z IR para controlar la actividad en campo abierto de los ratones dKO. Los ratones se aclimataron en jaulas vacías durante 90 minutos el día antes de la recogida de datos reales. Los datos se recogieron cada 10 minutos a lo largo de un periodo de 90 minutos durante 3 días consecutivos. Los primeros 3 de los 9 registros de cada día se desecharon tras el análisis. Se midieron 22 parámetros de actividad 35 diferentes para cada ratón, considerándose la distancia total recorrida, la actividad total, el tiempo de crianza y los recuentos móviles totales los mejores parámetros para controlar la actividad de comportamiento.

#### Inmunohistoquímica e histología

40 Se cortaron secciones de 8 µm de al menos dos terceras partes de los músculos tibial anterior, gastrocnemio, cuádriceps, glúteo, bíceps, tríceps, diafragma, y cardíaco a intervalos de 100 µm. Las secciones de músculo intermedias se recogieron para su posterior análisis mediante RT-PCR. Se utilizó la tinción convencional con eosina y hematoxilina para examinar la morfología general del músculo. A continuación se examinaron las criosecciones para determinar la expresión de distrofina utilizando el anticuerpo policlonal de conejo DYS (Novocastra, R.U.), que a continuación se detectó mediante IgG anti-conejo de cabra Alexa 488.

#### Aislamiento de ARN y análisis RT-PCR

45 El ARN total se aisló de secciones intermedias de músculo recogidas durante la criosección utilizando reactivo TRizol de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen, R.U.). Se utilizaron alícuotas de 200 ng de ARN total para el análisis de RT-PCR utilizando el Sistema Access RT-PCR (Promega) en una reacción de 50 µl utilizando los cebadores externos Ex 20Fo (5'-CAGAATTCTGCCAATTGCTGAG-3'; SEQ ID NO: 12) y Ex 26Ro (5'-TTCTTACAGCTTGTCATCC-3'; SEQ ID NO: 13). La síntesis de ADNc se llevó a cabo a 45°C durante 45 minutos, seguido directamente de la PCR primaria de 30 ciclos (94°C (30 s), 58°C (1 min) y 72°C (2 minutos). Se volvieron a 50 amplificar 2 microlitros de estas reacciones en PCR anidadas por medio de 22 ciclos de 94°C (30 s), 58°C (1 min) y 72°C (2 min) utilizando los cebadores internos Ex 20Fi (5'-CCCAGTCTACCACCCTATCAGAGC-3' ; SEQ ID NO: 14) y Ex 26Ri (5'- CCTGCCTTAAGGCTTCCTT-3' ;SEQ ID NO: 15)

Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa al 2%.

#### Detección de ARNm de distrofina con el exón 23 omitido en sistema nervioso central mdx

Se trataron ratones mdx bisemanalmente con inyecciones subcutáneas e intravenosas de M23D(+2-13) (cadenas principales de tc-ADN o tc-ADN-PS) durante 8 semanas, con una dosis de 100 mg/kg de peso corporal. Una semana después de la última inyección, se diseccionaron los cerebros y se procesaron para la detección del ARNm de distrofina con el exón 23 omitido. Las muestras de ARN se analizaron mediante RT-PCR anidada utilizando cebadores (exón 20 de reasociación Ex 20Fo (fuera)/Ex 20 Fi (dentro) y exón 26 de reasociación Ex 26Ro/Ri22-24 y la unión 22-24, respectivamente) permitiendo el reconocimiento específico del mensajero omitido como un fragmento de 398 pb (Ri22-24 5'-TTATGTGATTCTGTAAATTC-3' SEQ ID NO: 16). Obsérvese que puesto que el cebador RI reasocia específicamente el límite del exón 22-exón 24, el ARNm de distrofina no omitido no se amplifica y la banda de 398 pb solamente se puede detectar en muestras que contienen ARNm de distrofina que carecen del exón 23.

#### 10 Cuantificación de la omisión del exón 23 mediante PCR cuantitativa

El ARN se aisló de tejido de ratón como se ha descrito anteriormente. El ADN contaminante se eliminó de las preparaciones de ARN utilizando el sistema Turbo DNA Free (Ambion). A continuación se sometieron alícuotas de 1 µg de ARN tratado con ADNasa a transcripción inversa utilizando el sistema de síntesis First Strand (Invitrogen) con hexámeros al azar de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se llevó a cabo la PCR cuantitativa utilizando análisis TaqMan que fueron diseñados contra los moldes de exón 4-5 o exón 22-24 utilizando Custom Assat Design Tool (Applied Biosystems) como describen Goyenvalle et al., Rescue of severely affected dystrophin/utrophin deficient mice through scAAV-U7snRNA-mediated exon skipping; Human Molecular Genetics, 2012, Vol. 21, Núm. 11 2559-2571. Se utilizó un análisis de 18S inventariado como control endógeno (Applied Biosystems, 4310893E). Se utilizaron 50 ng de ADNc como entrada por reacción y todos los análisis se llevaron a cabo singleplex. Los análisis se realizaron en condiciones de ciclos rápidos en un termociclador Applied Biosystems StepOne Plus, y todos los datos se analizaron utilizando el método de Ct comparativa empleando el soporte lógico analítico de StepOne asociado. Para una muestra dada se utilizaron los valores de delta-Ct del exón 4-5 y el exón 22-24 para calcular la abundancia relativa del ARNm de de distrofina y de distrofina con el exón 23 omitido, respectivamente. La omisión del exón 23 se expresó a continuación como el porcentaje frente a la distrofina total, como se indica mediante el nivel de expresión del exón 4-5.

#### Análisis de transferencia Western

Se extrajo la proteína total de muestras de músculo con tampón que contenía sacarosa 250 mM, tris-HCl 10 mM pH 6,7, dodecil sulfato de sodio 20%, glicerol al 20%, β-mercaptoetanol al 10%, tampón de migración al 12,5% (Life Technologies) y mezcla de inhibidores de proteasa (Roche). Las muestras se desnaturalizaron a 95°C durante 5 min y se centrifugaron. A continuación la alícuota se precipitó utilizando Compact-Able Protein Assay Preparation Reagent Set y se cuantificó con el kit BCA Protein Assay (Pierce) y se cargaron 50 µg o 100 µg de proteína en un gel de poliacrilamida (NuPage 4-12% Bis-Tris, Life Technologies). Los geles se sometieron a electroforesis durante 4-5 horas a 130 V y se transfirieron a membrana de nitrocelulosa durante la noche a 100 mM. Las transferencias se bloquearon durante 1 hora con leches desnatada al 10% en tampón PBS-Tween (PBST). Las proteínas distrofina y α-Actinina se detectaron sondeando la membrana con una dilución 1:50 de anticuerpo primario NCL-DYS1 (anticuerpo monoclonal para la repetición R8 de distrofina; NovoCastra) y una dilución 1:5.000 de anticuerpo primario anti- α-actinina (Santa Cruz Biotechnology), respectivamente, seguido de incubación con un anticuerpo secundario de ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante (1:15.000). Las transferencias Western se revelaron con quimioluminiscencia potenciada (Thermo Scientific) y ECL Analysys System (ECL-Plus; GE healthcare). Se utilizaron bandas de actina para verificar que la carga de proteína era correcta. Las membranas se convirtieron en cuadros numéricos mediante barrido y las bandas de intensidad se analizaron utilizando el soporte lógico ImageJ 1.46r (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

#### Cuantificación de los niveles de biomarcadores del suero

Se recogieron muestras de sangre de sangrados de la cola bajo anestesia general. El análisis de los niveles de creatina quinasa (CK), alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST) fue realizado por el laboratorio de patología (Mary Lyon Centre, medical Research Council, Harwell, Oxfordshire, R.U.).

#### Análisis estadístico

Todos los resultados se expresan como valores medios ± ETM a menos que se establezca lo contrario. Las diferencias entre las cohortes tratadas y de control se determinaron utilizando una prueba t de Student no pareada.

#### 50 Ejemplo 1 - Evaluación in vivo de oligonucleótidos antisentido de tc-ADN-PS para el tratamiento de una distrofia muscular mediada por distrofina

Se trataron sistémicamente ratones mdx adultos durante 12 semanas utilizando inyecciones subcutáneas y/o intravenosas de oligómero de tc-ADN-PS M23D (+2-13) a 200 o 50 mg/kg de peso corporal por semana. Dos semanas después de la última inyección, se recogieron los músculos y las muestras de ARN se analizaron mediante RT-PCR anidada con cebadores en los exones 20 y 26 del gen de la distrofina. La Figura 3A muestra la detección del ARNm de distrofina con el exón 23 omitido en numerosos músculos esqueléticos de los animales tratados. La banda de 903 pb corresponde al ARNm de distrofina sin omisión que incluye la mutación sin sentido mdx, mientras el fragmento de 688 pb más corto corresponde al ARNm con la omisión del exón 23. Es notable que el tratamiento

sistémico con el oligómero que contiene fosforotioato induce un rescate significativo del ARNm de la distrofina en diversos músculos esqueléticos (es decir, tibial anterior, gastrocnemio, cuádriceps, glúteo, tríceps, bíceps, diafragma), incluyendo los músculos respiratorios, así como en el músculo cardíaco. Acorde con la generación de transcritos con omisiones, la proteína distrofina fue fácilmente detectada tanto mediante análisis de transferencia Western (figura 3B) como mediante inmunofluorescencia en secciones de tejidos (figura 4). Los niveles de distrofina reflejaron los del ARNm rescatado y el procedimiento de omisión generó especies de proteínas inmunorreactivas con una movilidad alrededor de 427 kDa. La diferencia de 8 kD esperada entre las proteínas de tipo salvaje y rescatada no se pudo resolver sobre el tipo de gel utilizado en este estudio. De manera importante, los mejores modos de suministro, intravenoso y subcutáneo, dieron lugar a un rescate de distrofina diseminada similar en mdx como se muestra en la figura 5. Independientemente del modo de suministro sistémico, los oligonucleótidos elaborados utilizando la cadena principal de tc-ADN normal (es decir, con enlaces internucleosídicos fosfodiéster normales) fueron incapaces de dirigirse significativamente al músculo cardíaco. Esto solo se logró con la cadena principal de fosforotioato (-PS) como se ilustra en la figura 6. La modificación con fosforotioato confiere un beneficio farmacocinético sustancial, los autores de la presente invención investigaron si tal adaptación podría permitir que el oligonucleótido cruzara la barrera hematoencefálica. En efecto, se demostró que los oligonucleótidos que utilizan la cadena principal de tc-ADN normal rescataban el ARNm de distrofina cuando se liberaban en el fluido cerebroespinal después de la inyección estereotáxica en la cisterna magna, sugiriendo que podrían cruzar el epitelio ependimal. Sin embargo, tales compuestos fueron ineficaces cuando se administraron por vía intravenosa y/o subcutánea, demostrando que no podían cruzar la barrera hematoencefálica (Figura 7). De hecho, esto solamente se logró de manera satisfactoria cuando se utilizaron las formas fosforotioato (-PS) de los tc-ADN (Figura 8), demostrando de ese modo su capacidad para acceder a todos los tejidos principales en los que la distrofina tenía que ser idealmente restaurada: músculos esqueléticos, corazón y SNC.

El efecto terapéutico del suministro sistémico de tc-ADN-PS (M23D +2-13) se confirmó mediante el descenso significativo de los niveles de creatina quinasa en el suero de animales tratados, indicando que la cantidad de distrofina rescatada era apropiada para proteger las fibras del daño inducido por el ejercicio sin toxicidad obvia representada por los niveles de ALT y AST en sangre, que no se incrementaban a cualquier concentración de oligómeros (Figura 9A y B). La mejora del músculo también se evaluó sometiendo a ensayo la fuerza específica de los músculos tratados que aumentaba significativamente (Figura 9C). De manera más importante, el porcentaje de caída de la fuerza, un rasgo característico del músculo distrófico evaluado midiendo el déficit de fuerza después de una serie de contracciones excéntricas, se redujo en animales tratados, confirmando que las fibras musculares en los animales tratados eran mucho más resistentes (Figura 9D).

Se apreció una relevancia clínica en el ratón transgénico dKO, un modelo de DMD más grave, que carece de distrofina y utrofina, conduciendo al desgaste progresivo del músculo, movilidad alterada y muerte prematura. Como para mdx, el tratamiento sistémico de dKO con tc-ADN-PS permitió un rescate significativo de la distrofina en todos los compartimentos de los tejidos (Figura 10). El porcentaje de omisión de exones se evaluó mediante RT-PCR cuantitativa a diferentes momentos puntuales después del comienzo del tratamiento demostrando que había un efecto acumulativo a lo largo de la duración del tratamiento. El rescate del ARNm fue casi completo en el diafragma después de 20 semanas y cabría esperar que los otros músculos esqueléticos alcanzaran ese nivel de omisión en 40 semanas y más tarde para el corazón y el cerebro para los cuales la absorción del oligómero parece ser inferior (Figura 11). Sin embargo, los niveles de rescate de distrofina en dKO después de 12 semanas de tratamiento proporcionan un beneficio clínico significativo. Los ratones tratados no mostraron una cifosis característica, los niveles de CK disminuyeron mientras los ratones eran físicamente más activos y presentaban mejores parámetros fisiológicos (Figura 12). Aunque los estudios farmacocinéticos mostraron que los oligonucleótidos desaparecían del suero en minutos después de la inyección intravenosa (Figura 13A), parece que hay un efecto de larga duración una vez en el interior del tejido diana. Esto es sugerido por el hecho de que se encontraron niveles de omisión de aproximadamente la mitad de su valor máximo 13 semanas después del final del tratamiento (Figura 13B). Este efecto de larga duración se confirma en los resultados presentados en la Figura 14. Es probable que los tc-ADN-PS sean estables en las células y se puedan re-utilizar a lo largo del tiempo limitando de ese modo la necesidad de reponer tejidos tan a menudo como se requeriría si estos oligonucleótidos se destruyeran o fueran titulados por sus dianas de ARNm.

#### Ejemplo 2: Efecto del suministro de un tc-ADN-PS (ISS7) que se dirige al exón 7 de SMN2

Se utilizó el modelo de ratón SMA (FVB.Cg-Tg(SMN2)2Hung *Smn1<sup>tm1Hung</sup>/J*). Los ratones SMA de tipo III (FVB.Cg-Tg(SMN2)2Hung *Smn1<sup>tm1Hung</sup>/J*) tienen desactivado *Smn* (*Smn1<sup>-/-</sup>*) y contienen un transgén SMN2 formado por dos copias en tándem del gen SMN2 humano. Estos animales presentan rasgos típicos que incluyen necrosis de la cola que comienza a aproximadamente un mes de edad. Tal necrosis se extiende progresivamente hacia las aurículas de las orejas y los pies y más adelante en la vida estos animales presentan debilidad muscular. La fotografía de la figura 15 muestra 3 individuos de tipo III (de un mes de edad). El superior es el control no tratado; los otros dos se trataron con tc-ADN-PS (ISS7): recibieron una sola inyección ICV (intracerebroventricular) al nacer (5  $\mu$ l que contienen 20  $\mu$ g de tc-ADN-PS (ISS7) e inyecciones SC (subcutáneas) repetidas una vez a la semana a una dosis de 200 mg/kg.

Los autores de la presente invención concluyen que los oligómeros de tc-ADN-PS representan un posible fármaco candidato para la terapia de SMA. Además, puesto que este tipo de oligonucleótido puede cruzar de manera

espontánea la barrera hematoencefálica (véase la sección mdx), es probable que los tc-ADN-PS no requieran necesariamente la administración intracerebral para redirigir eficazmente el empalme de SMN2 en el SNC.

Ejemplo 3: Evaluación de tc-ADN y tc-ADN-PS para DM1

5 Los mioblastos DM1 con 800 repeticiones CTG se transfectaron con una concentración creciente de tc-ADN-CAG7 (SEQ ID NO: 11). Después de 3 días de cultivo, se analizó la expresión de ARNm tanto normales como CUGexp-DMPK (distrofia miotónica-proteína quinasa) mediante transferencia Northern. Se cuantificó la razón de ARNm CUGexp-DMPK mutante vs. DMPK normal. Un descenso dependiente de la dosis del ARNm de CUGexp-DMPK mutante sin suspensión del ARNm de DMPK normal mostró que el tratamiento con el oligonucleótido da como resultado la destrucción específica de CUGexp-DMPK mutante (véase la figura 16).

10 En otro experimento, se transfectaron mioblastos DM1 con CTG expandido (>800 CTG) con 10 µg de tc-ADN-PS-CAG7. Después de 3 días en cultivo, se analizó la expresión de los ARNm de CUGexp-DMPK normal y mutante mediante transferencia Northern. la razón de ARNm de CUGexp-DMPK vs. DMPK normal se cuantificó (figura 17 calle superior). Los agregados nucleares de ARN expandido con CUG (focos) se detectaron mediante FISH y se cuantificó el número de células sin agregados nucleares de CUGexp-ARN (figura 17 calle inferior). Los resultados muestran que los mioblastos DM1 transfectados con el oligonucleótido tienen i) un menor nivel de ARNm de CUGexp-mutante sin cambio alguno de los ARNm de DMPK normales; ii) mayor número de células sin agregados nucleares.

20 El efecto del oligonucleótido de tc-ADN-PS-CAG7 se evaluó a continuación *in vivo*. Puesto que el oligonucleótido se dirige al ARN expandido con CUG de los transcritos de DMPK sin afectar a los transcritos normales en células musculares DM1, los autores de la presente invención decidieron evaluar el efecto del oligonucleótido en un modelo de ratón DM1 que expresaba ARN expandido con CUG en la región no codificante 3' del gen de la actina esquelética humana (HSA). Este modelo de ratón DM1 ya se ha utilizado para evaluar tanto CAG8 morfolino como CAG8 2'-O-Me ASO debido a que muestra una desregulación de empalme alternativa de varios transcritos de ARN así como miotonía, que resulta del empalme erróneo de pre-ARNm de CIC-1.

25 En el músculo tibial anterior TA de ratones HSA-LR que expresaban 250CTG en la 3'UTR del gen de la actina esquelética humana (HSA) se inyectaron concentraciones crecientes de tc-ADN-PS-CAG7. Los músculos TA contralaterales se inyectaron con solución salina y se utilizaron como control. Después de 2 semanas, se analizó la expresión de los ARNm de HSA y MSA (actina esquelética de ratón) mediante transferencia Northern. Se cuantificó la razón de ARNm de HSA vs. MSA. La Figura 18 muestra que la inyección intamuscular del oligonucleótido da como resultado una disminución marcada de CUGexp-ARNs.

30 En el músculo TA de ratones HSA-LR que expresaban 250CTG en la 3'UTR del gen de la actina esquelética humana (HSA) se inyectaron también con 30µg de tc-ADN-PS-CAG7. Los músculos TA contralaterales se inyectaron con solución salina y se utilizaron como control. Después de 1 y 2 semanas, se analizó la razón de HSA y MSA (actina esquelética de ratón) mediante transferencia Northern. Se cuantificó la razón de ARNm de HSA vs. MSA. La figura 19 muestra que el menor nivel de ARN de CUGexp después de la inyección intramuscular del oligonucleótido ya se observaba después de 1 semana.

35 Finalmente, se inyectaron en los músculos gastrocnemios GA de ratones HSA-LR que expresaban 250 CTG en la 3'UTR del gen de la actina esquelética humana (HSA) 90 µg de tc-ADN-PS-CAG7. En los músculos GA contralaterales se inyectó solución salina y se utilizaron como control. Se analizó la expresión de los ARNm de HSA y MSA (actina esquelética de ratón) mediante transferencia Northern después de 2, 4 y 8 semanas. Se cuantificó la razón de ARNm de HSA vs. MSA. La figura 20 muestra que la administración intramuscular del oligonucleótido causa una destrucción eficaz de los ARN de CUGexp y el efecto se mantiene entre 4 y 8 meses después del tratamiento.

**LISTA DE SECUENCIAS**

- <110> ASSOCIATION INSTITUT DE MYOLOGIE ET AL.
- <120> TRICICLO-ADN FOSFOROTIOATO
- 5 <130> B1243PC00
- <160> 16
- 10 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1  
 <211> 15  
 <212> ADN
- 15 <213> Artificial
- <220>  
 <223> tc-ADN PS AON M23D (+02-13)
- 20 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <223> triciclo-ADN fosforotiato
- <400> 1
- 25 aacctcgct tacct 15
- <210> 2  
 <211> 20  
 <212> ADN
- 30 <213> Artificial
- <220>  
 <223> tc-ADN PS AON M23D (+2 -18)
- 35 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <223> triciclo-ADN fosforotiato
- <400> 2
- 40 ggccaaacct cggcttacct 20
- <210> 3  
 <211> 15  
 <212> ADN
- 45 <213> Artificial
- <220>  
 <223> tc-ADN PS AON H51 (+68+82)
- 50 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <223> triciclo-ADN fosforotiato
- <400> 3
- 55 agaaatgcca tcttc 15
- <210> 4  
 <211> 15  
 <212> ADN
- 60 <213> Artificial
- <220>  
 <223> tc-ADN PS AON H51 (+70+84)

<220>  
 <221> característica miscelánea  
 <223> triciclo-ADN fosforotiato

5 <400> 4  
 aaatgccatc ttct 15

<210> 5  
 <211> 15  
 10 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> tc-ADN PS AON H51 (+73+87)

15 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <223> triciclo-ADN fosforotiato

20 <400> 5  
 tgccatcttc cttga 15

<210> 6  
 <211> 16  
 25 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> tc-ADN PS AON H51(+40+55)

30 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <223> triciclo-ADN fosforotiato

35 <400> 6  
 gcagtttct tagtaa 16

<210> 7  
 <211> 15  
 40 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> tc-ADN PS AON SMN2i7(10;25)

45 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <223> triciclo-ADN fosforotiato

50 <400> 7  
 cttcataat gctgg 15

<210> 8  
 <211> 13  
 55 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> tc-ADN PS AON SMN2e7(39;51)

60 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <223> triciclo-ADN fosforotiato

65 <400> 8  
 ttaatttaag gaa 13

<210> 9  
 <211> 3  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 5  
 <220>  
 <223> ADN repetición  
 <400> 9  
 10 cag 3  
 <210> 10  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 15 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> tc-ADN PS AON DM1(CAG5)  
 20 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <223> triciclo-ADN fosforotiato  
 <400> 10  
 25 cagcagcagc agcag 15  
 <210> 11  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 30 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> tc-ADN PS AON DM1(CAG7)  
 35 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <223> triciclo-ADN fosforotiato  
 <400> 11  
 40 cagcagcagc agcagcagca g 21  
 <210> 12  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 45 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> cebador Exon 20 Fo  
 50 <400> 12  
 cagaattctg ccaattgctg ag 22  
 <210> 13  
 <211> 20  
 55 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> cebador Exon 26 Ro  
 60 <400> 13  
 ttcttcagct tgtgtcatcc 20  
 <210> 14  
 65 <211> 24  
 <212> ADN

# ES 2 651 216 T3

<213> Artificial  
<220>  
<223> cebador Exon 20 Fi  
5  
<400> 14  
cccagcttac caccctatca gagc 24  
<210> 15  
10 <211> 20  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
15 <223> cebador Exon 26 Ri  
<400> 15  
cctgcctta aggctcctt 20  
20 <210> 16  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Artificial  
25 <220>  
<223> cebador Ri22-24  
<400> 16  
30 ttatgtgatt ctgtaaattc 20

**REIVINDICACIONES**

1. Una molécula de ácido nucleico que comprende triciclo-nucleósidos unidos por enlaces fosforotioato internucleosídicos (enlaces 3'-OPS-0-5'), en donde
  - 5           - la proporción de triciclo-nucleósidos representa al menos 50%, preferentemente al menos 60%, 70%, 80%, 90% o 95% de nucleósidos totales en la molécula de ácido nucleico, y/o
  - la proporción de enlaces fosforotioato internucleosídicos representa al menos 50%, preferentemente al menos 60%, 70%, 80%, 90% o 95% de enlaces internucleosídicos totales en la molécula de ácido nucleico.
2. La molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1, en donde todos los nucleósidos son triciclo-nucleósidos y todos los enlaces entre subunidades son enlaces fosforotioato.
3. La molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que comprende entre 3 y 50 nucleótidos.
4. La molécula de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que es complementaria a una secuencia diana.
5. La molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 4, siendo la molécula de ácido nucleico un oligonucleótido antisentido complementario a una porción de un ARN codificado por un gen.
6. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1, que comprende o consiste en la secuencia seleccionada del grupo que consiste en los SEQ ID NO: 1-11.
7. Una composición farmacéutica que comprende una molécula de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en un portador farmacéuticamente aceptable.
8. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 7, siendo dicha composición una composición inyectable, en particular una composición para inyección intravenosa.
9. La molécula de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para su uso como medicamento.
10. La molécula de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para su uso en el tratamiento de una enfermedad del corazón.
11. La molécula de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para su uso en el tratamiento de una enfermedad neuromuscular o musculoesquelética.
12. La molécula de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para uso en el tratamiento de una enfermedad del sistema nervioso central.
13. La molécula de ácido nucleico para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en donde la enfermedad del corazón, del SNC, neuromuscular o musculoesquelética resulta de una alteración de un gen, en donde dicha alteración es
  - una mutación en marco de un exón,
  - una mutación que interrumpe el marco de lectura traduccional del gen, y el tc-ADN facilita la omisión de un exón con el fin de restablecer el marco de lectura;
  - una mutación deletérea que puede ser compensada mediante la inclusión de un exón atípico en el ARNm codificado por dicho gen, y el tc-ADN es complementario a una ISS o un TSL presentes en un pre-ARNm codificado por dicho gen y facilita la inclusión de un exón atípico, o
  - una mutación que da como resultado la presencia de una o varias amplificaciones CUG 3' deletéreas en un ARNm codificado por dicho gen.
14. La molécula de ácido nucleico para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, para el tratamiento de la Distrofia Muscular de Duchenne, la Atrofia Muscular Espinal, o la Distrofia Miotónica de Steinert.

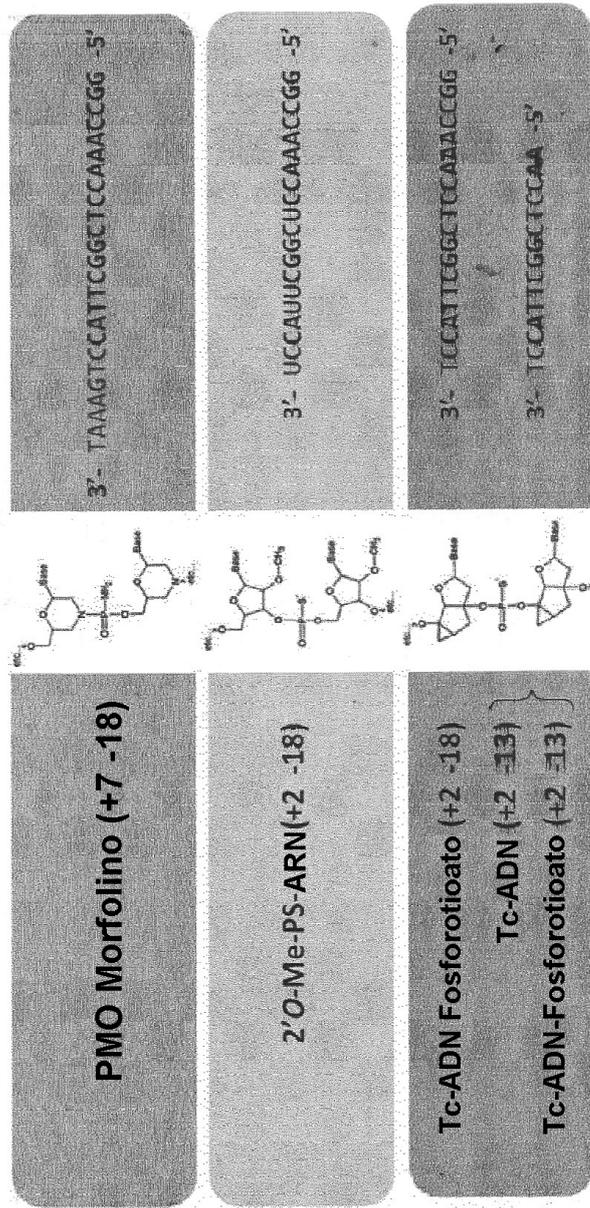


Figura 1

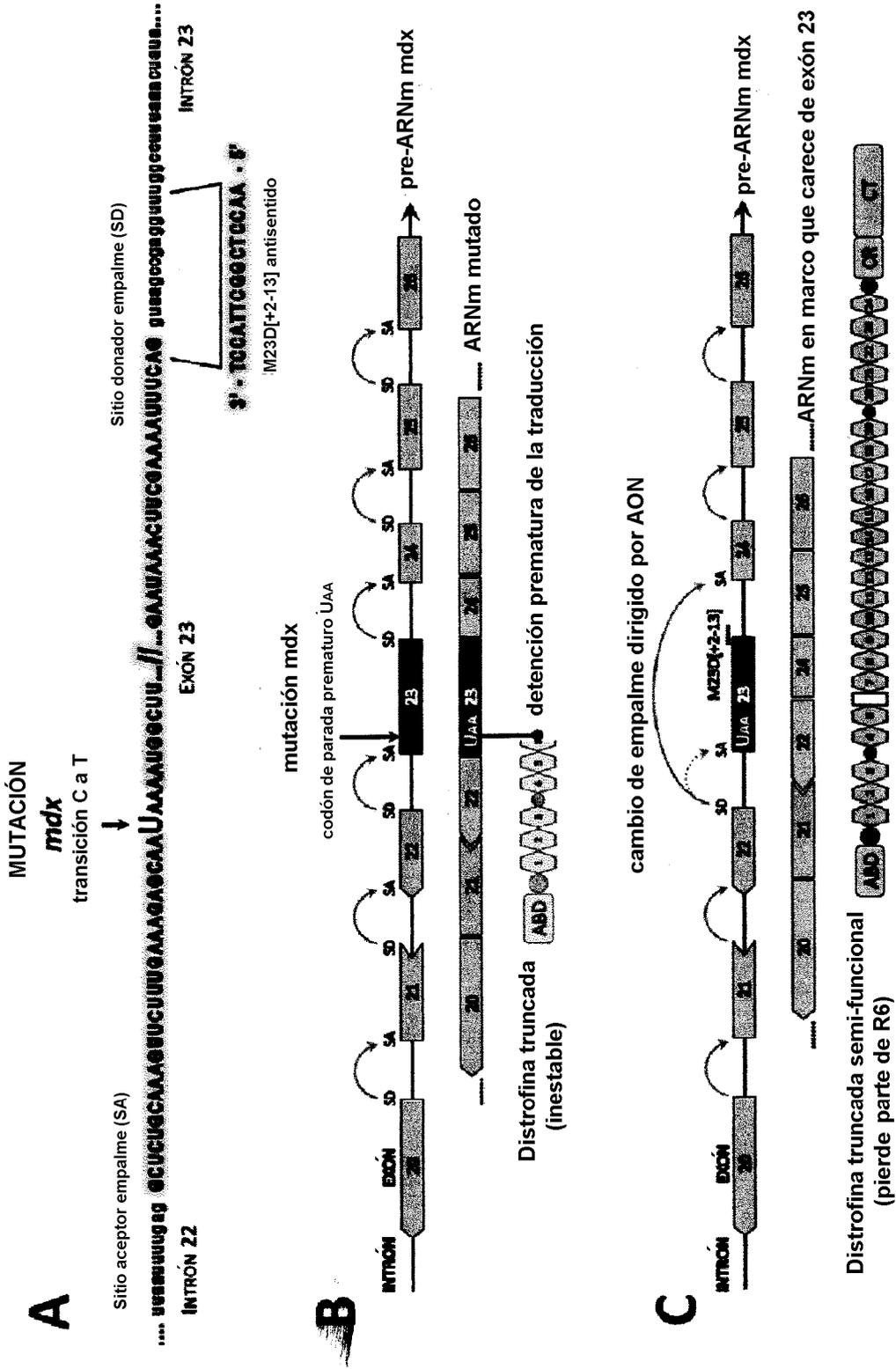


Figura 2

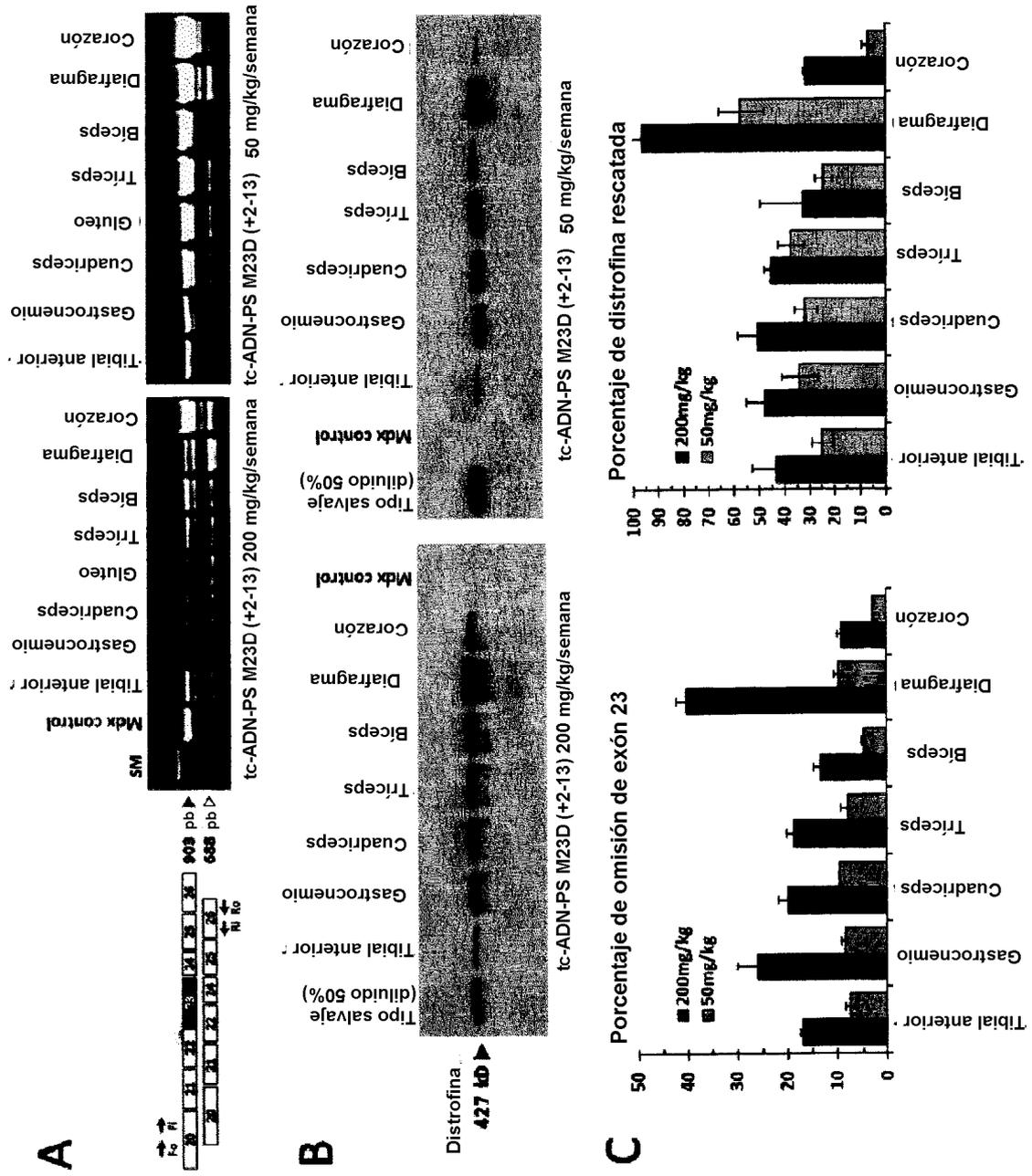


Figura 3

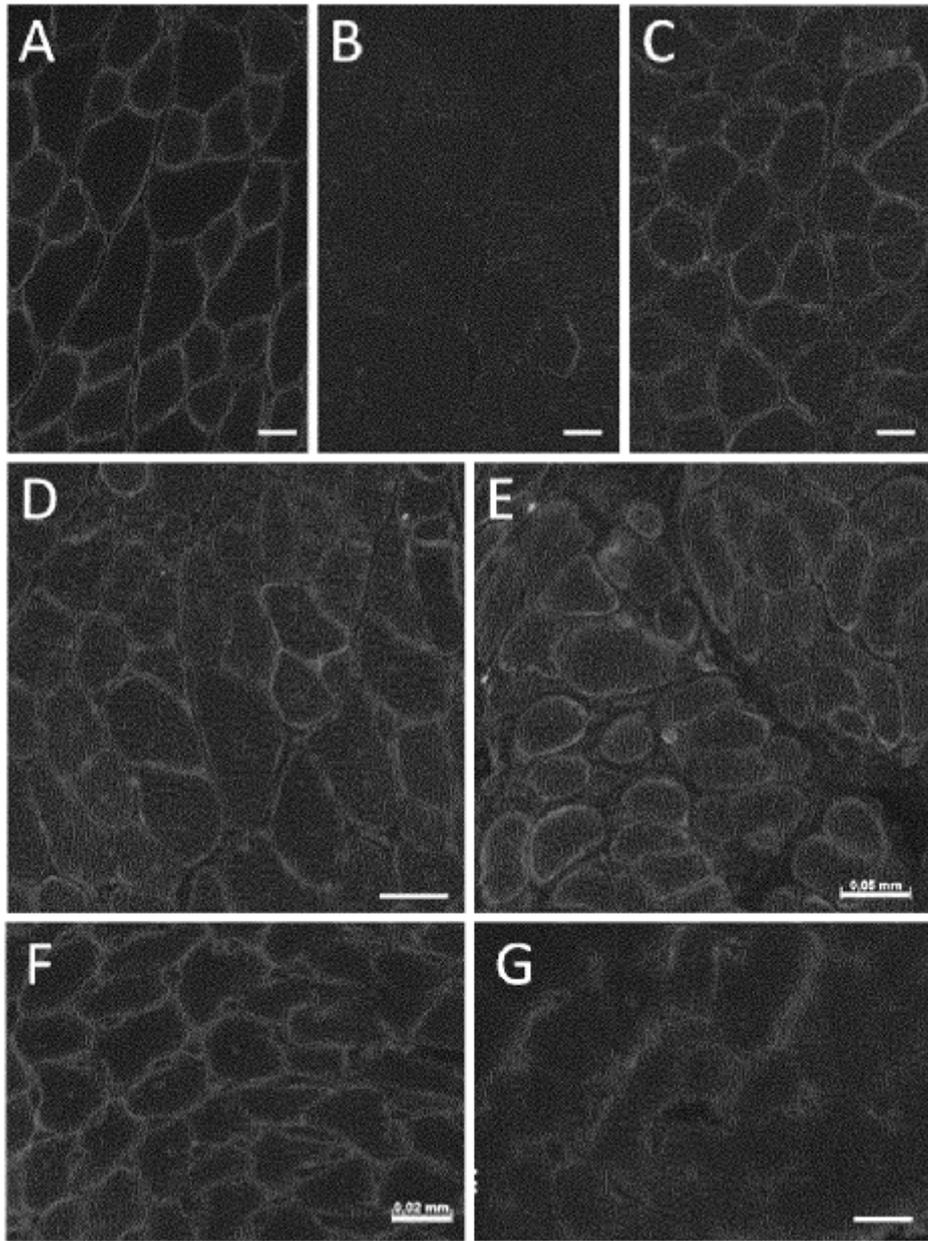


Figura 4

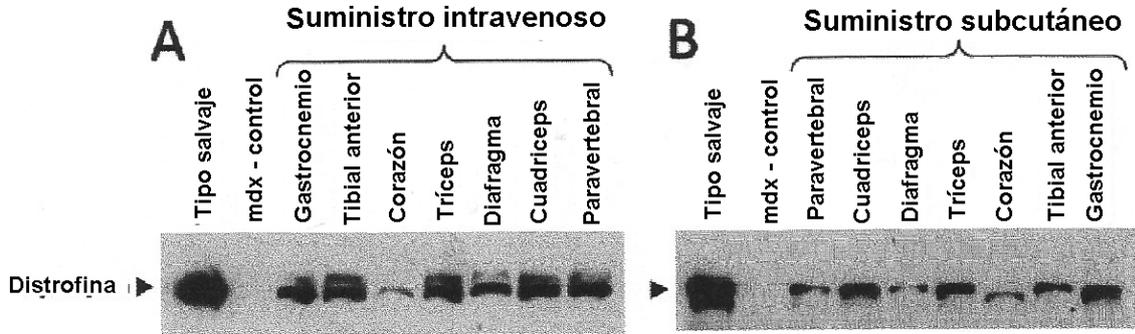


Figura 5

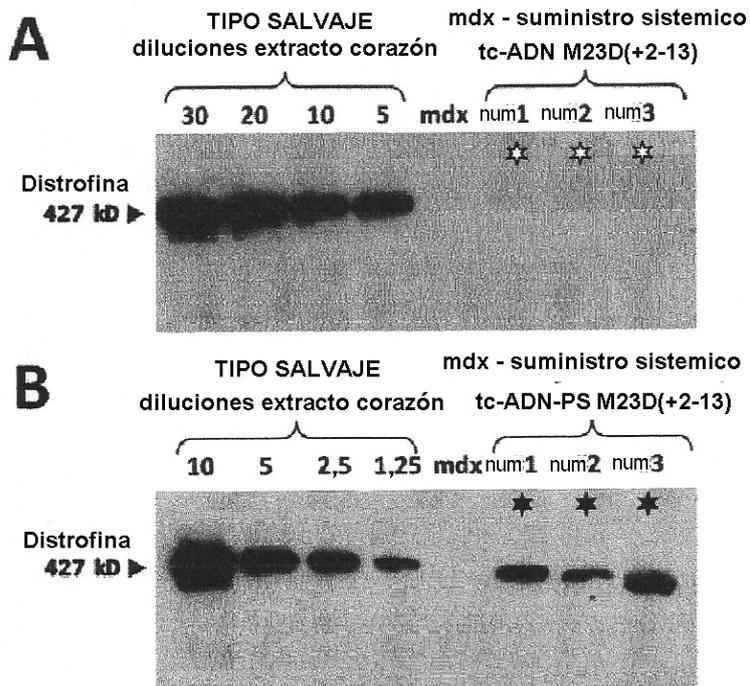


Figura 6

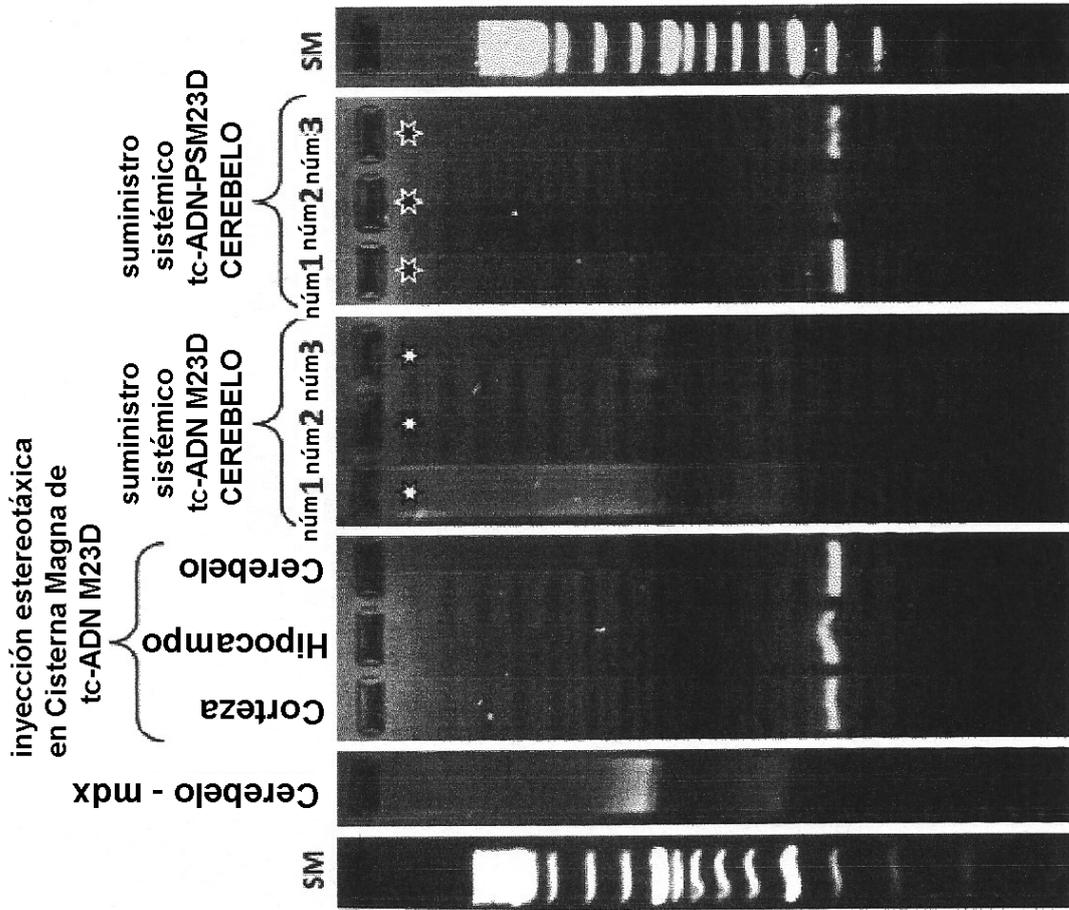
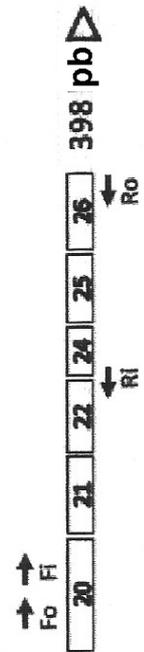
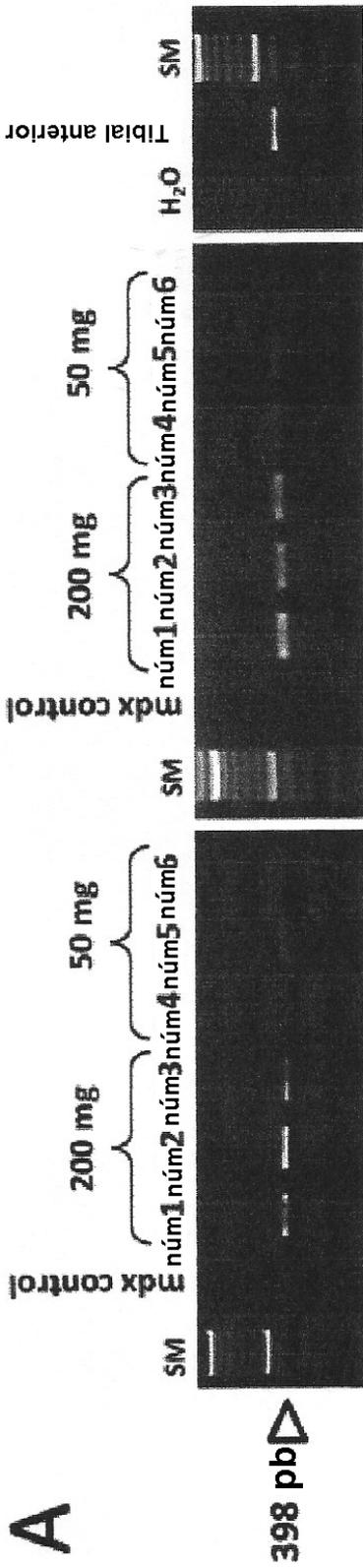


Figura 7

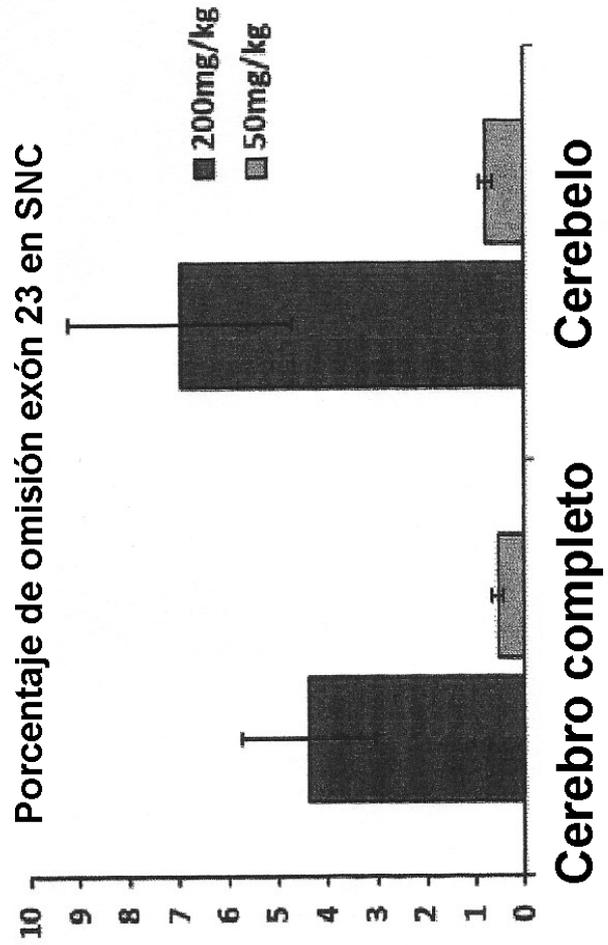




Cerebelo

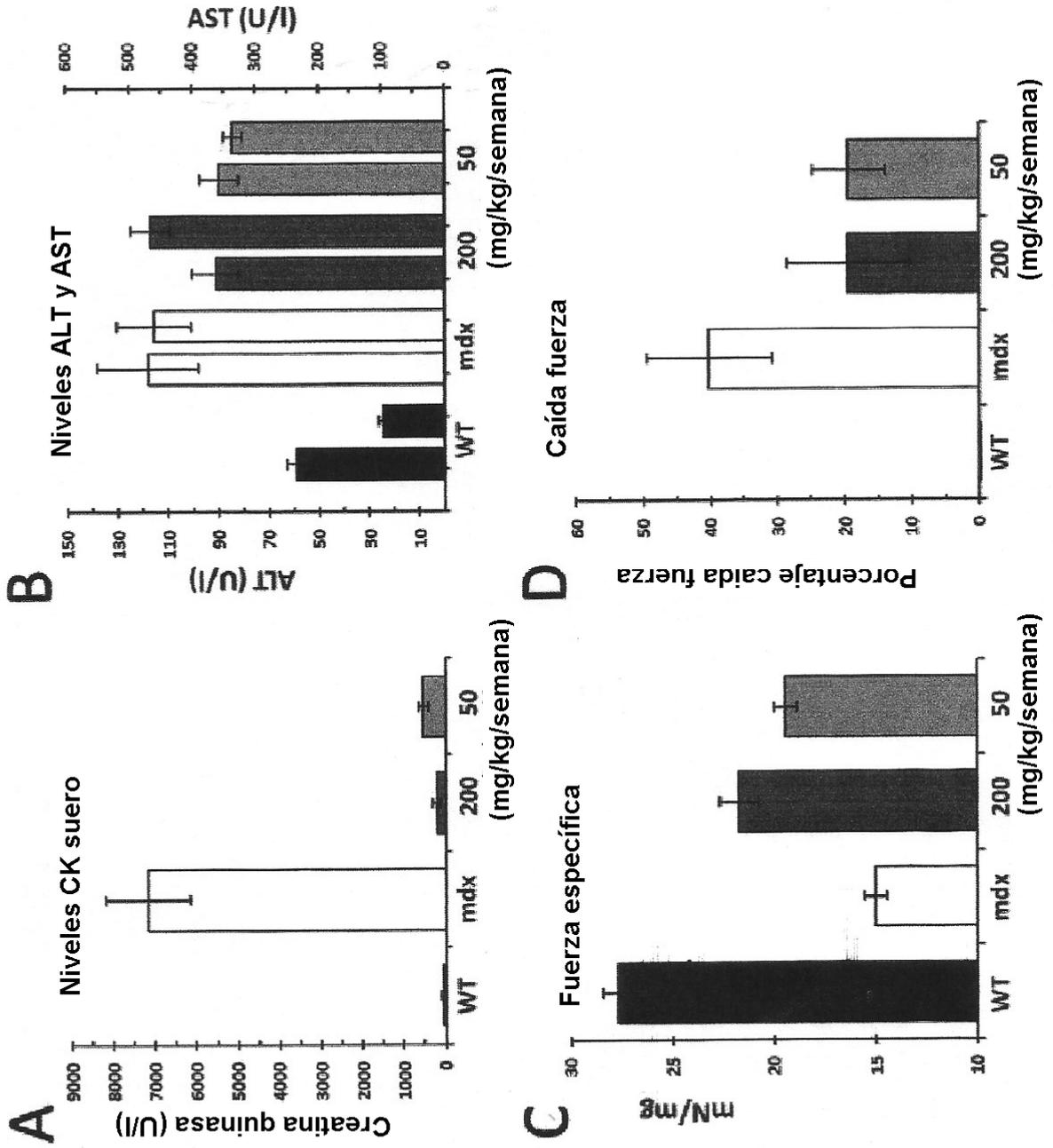
Cerebro completo

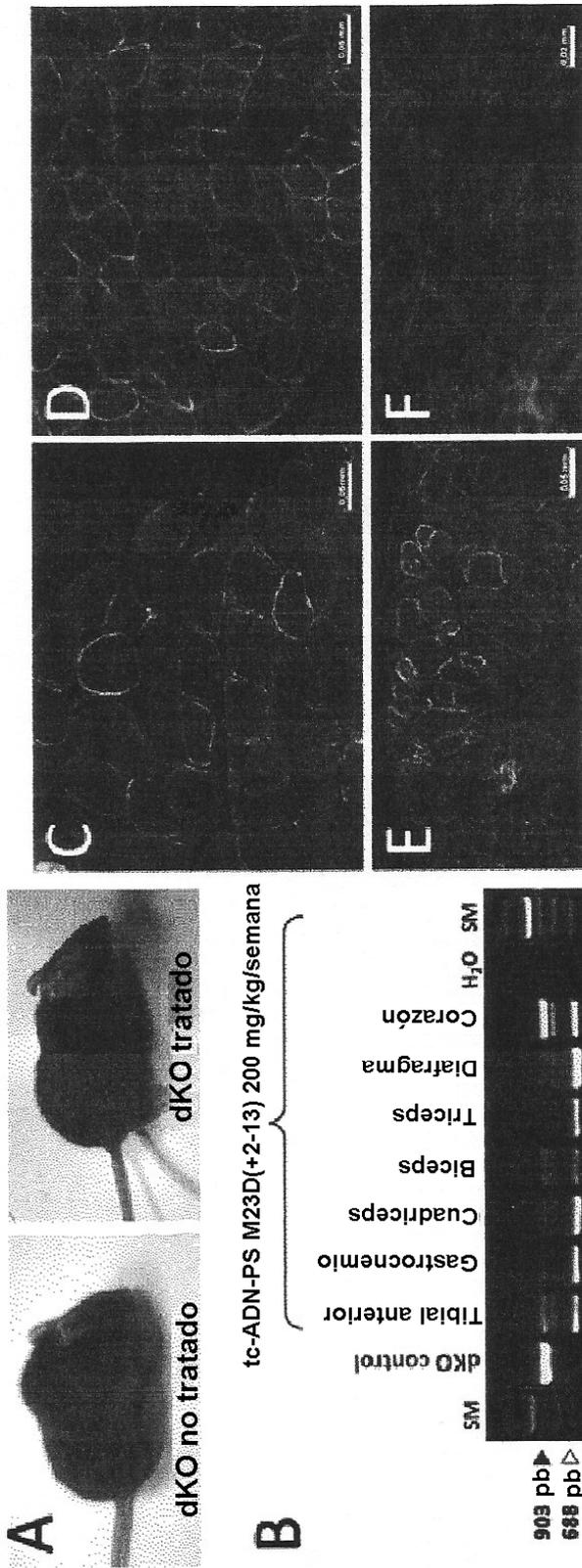
**B**



**Figura 8**

Figura 9





**Figura 10**

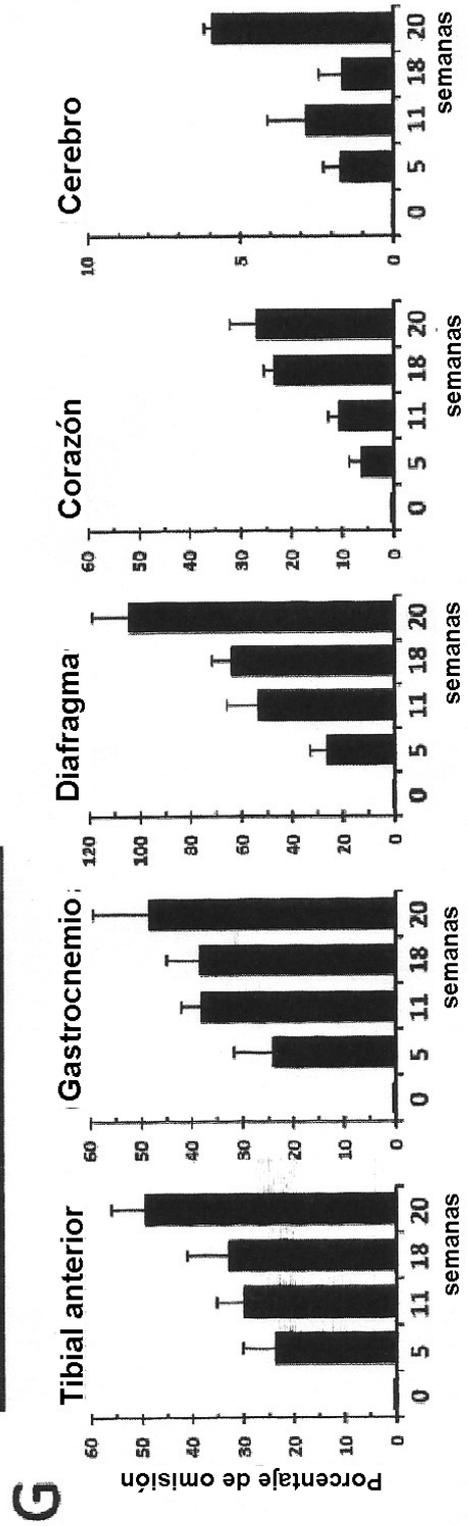


Figura 11

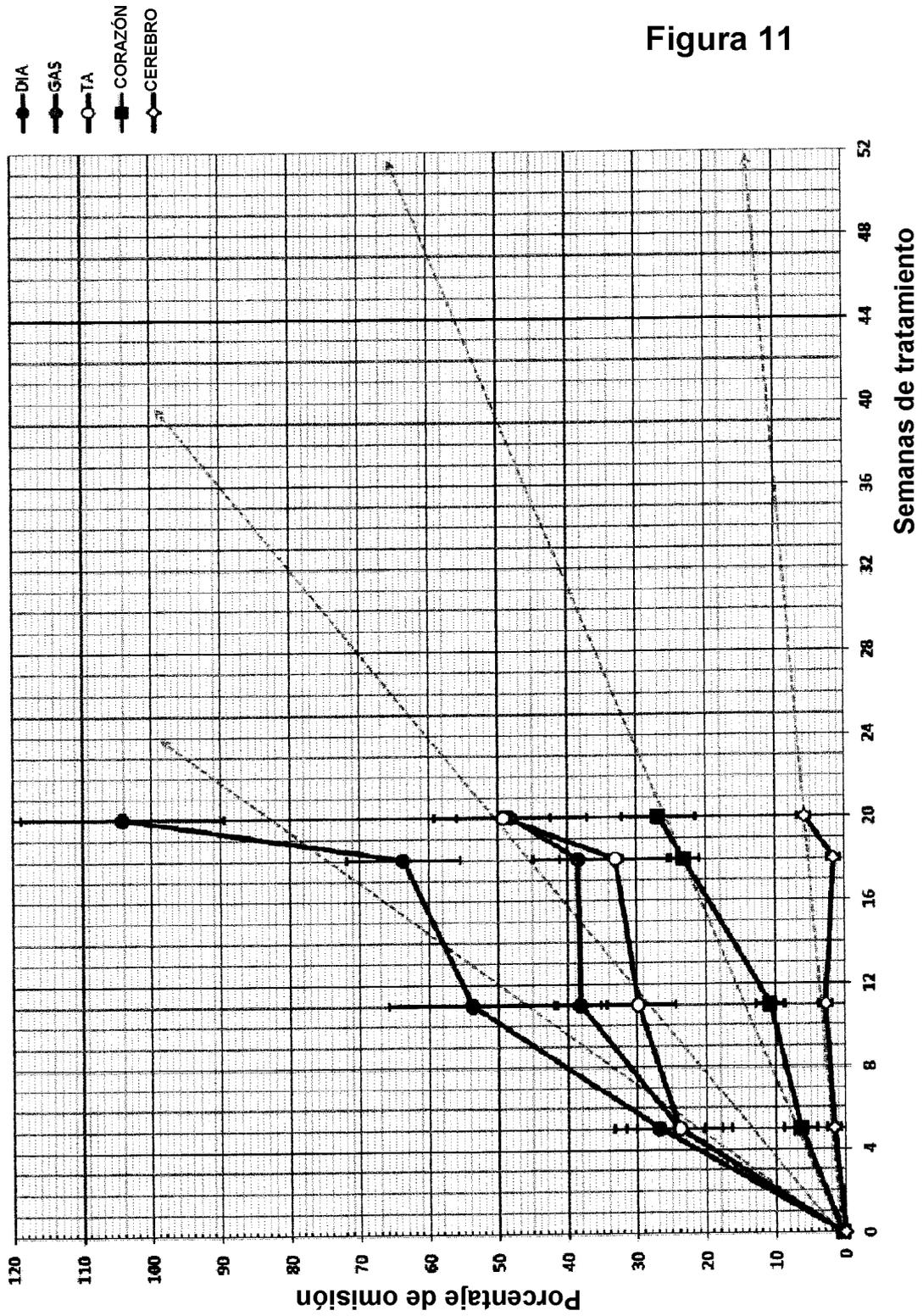
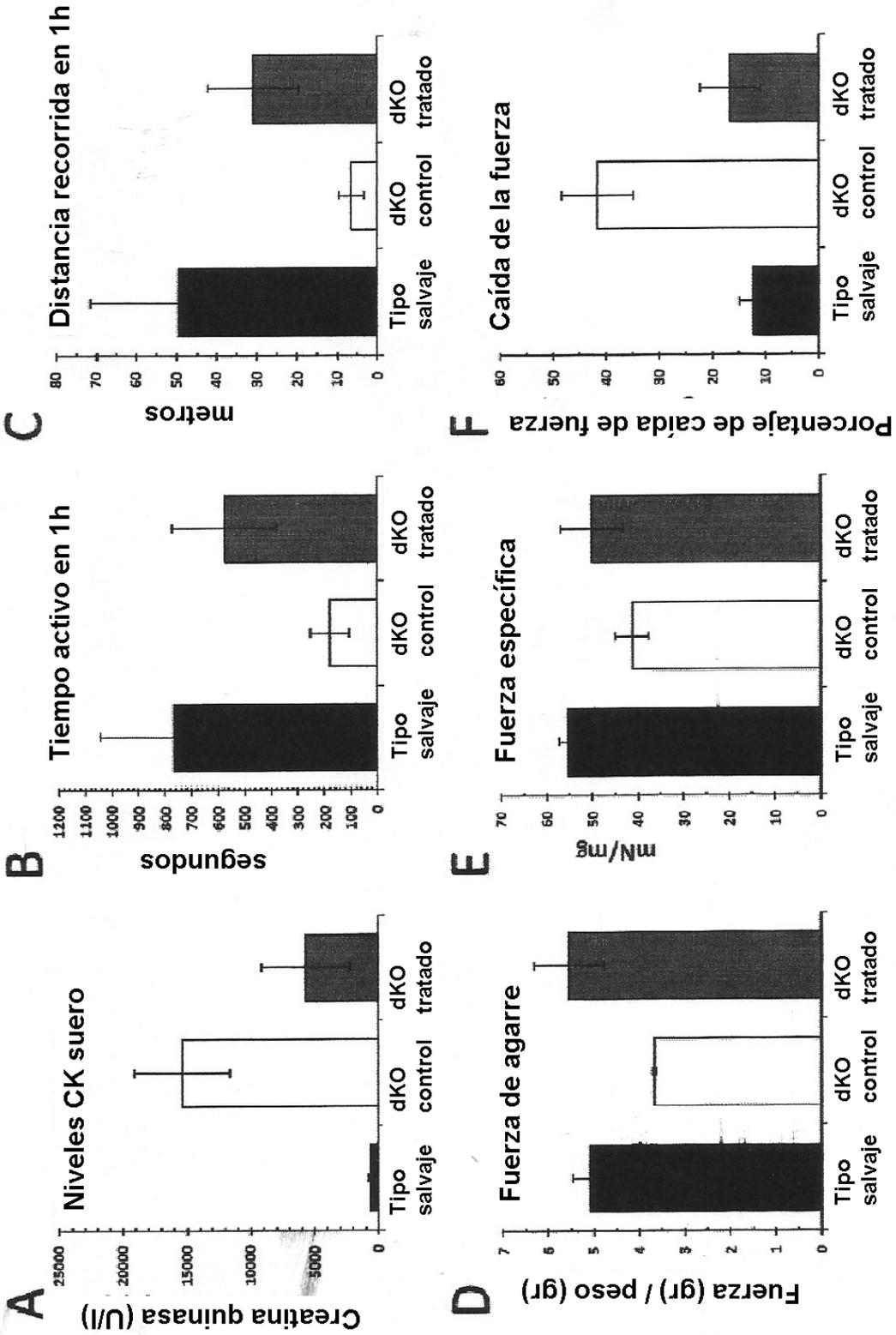
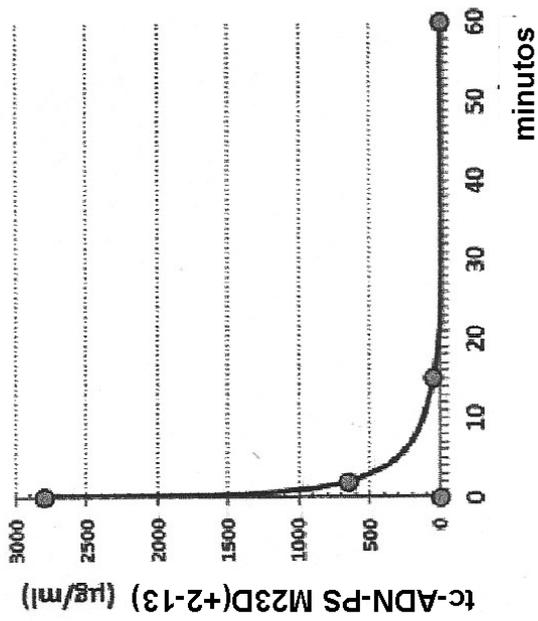


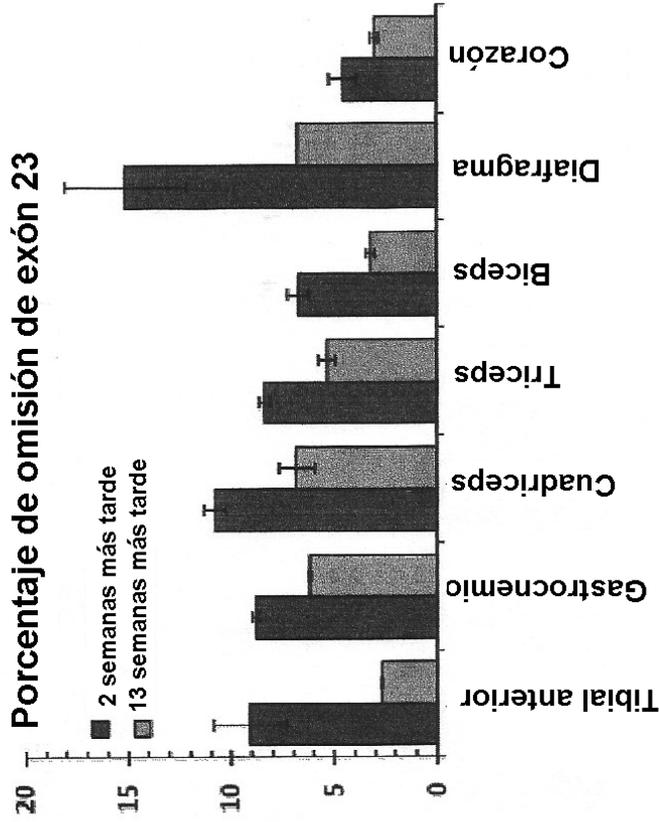
Figura 12



**A** Concentraciones de tc-ADN-PS en suero versus tiempo después de suministro intravenoso

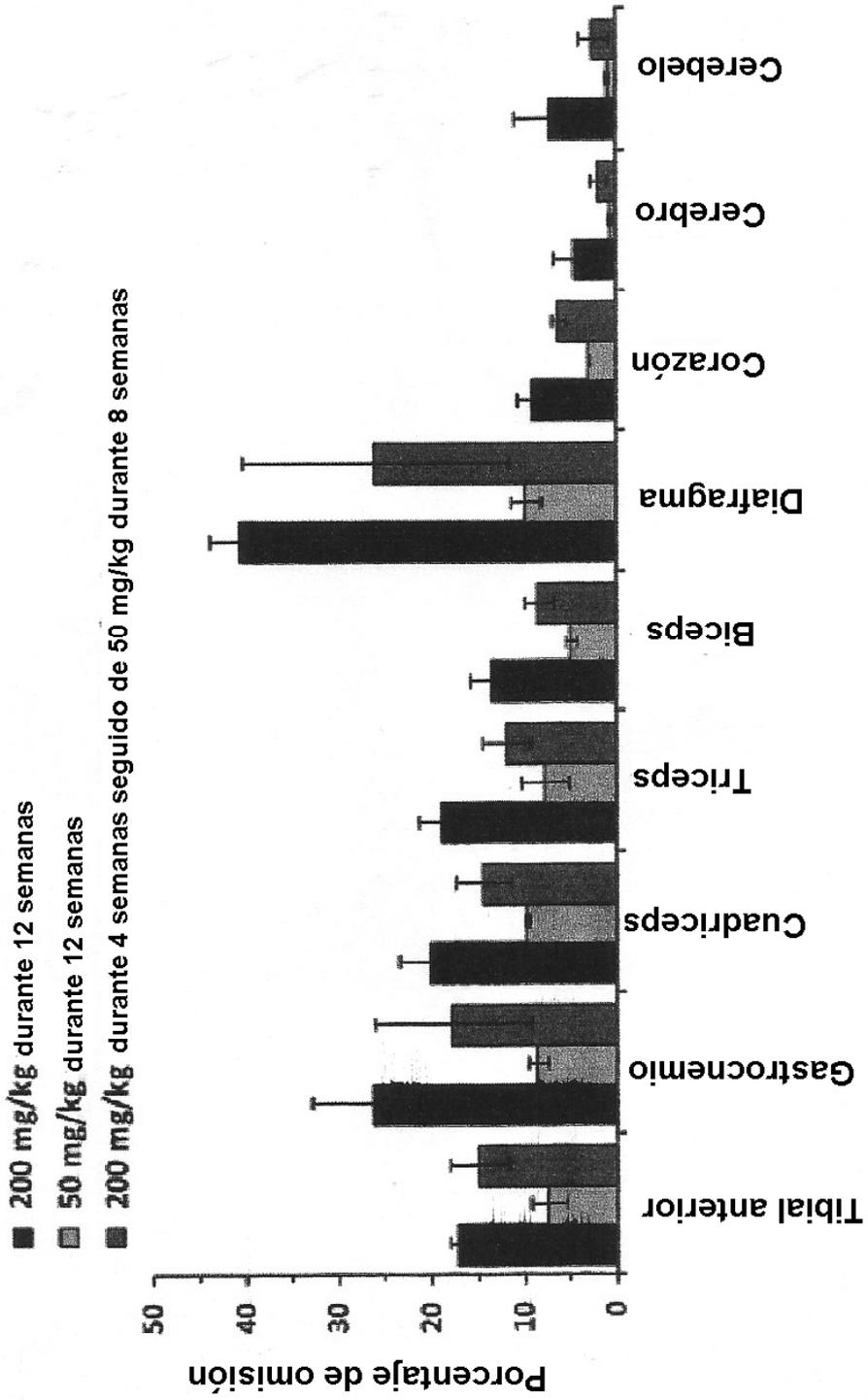


**B** Porcentaje de omisión de exón 23



**Figura 13**

Figura 14



ES 2 651 216 T3

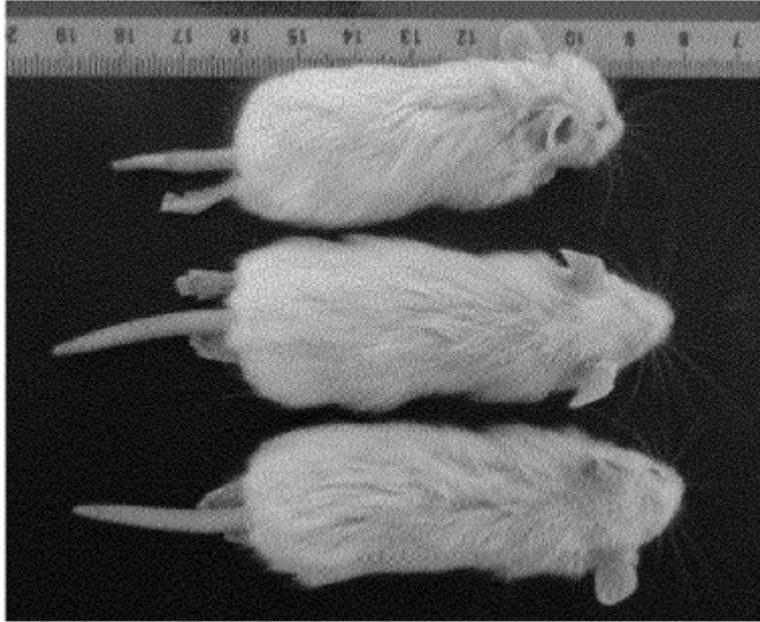


FIGURA 15

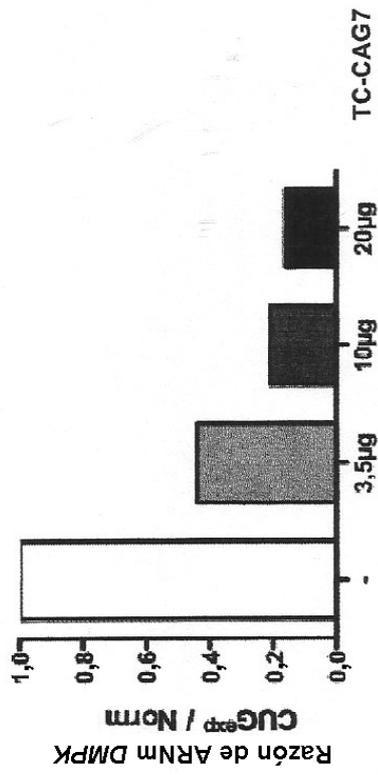
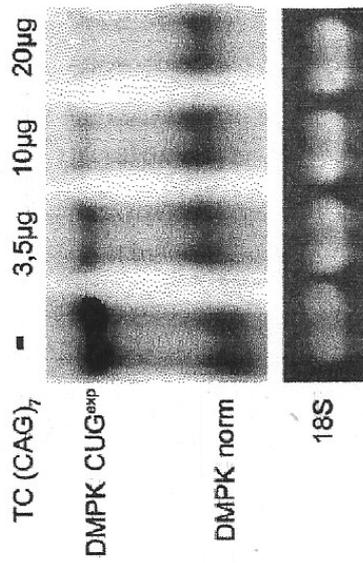


Figura 16



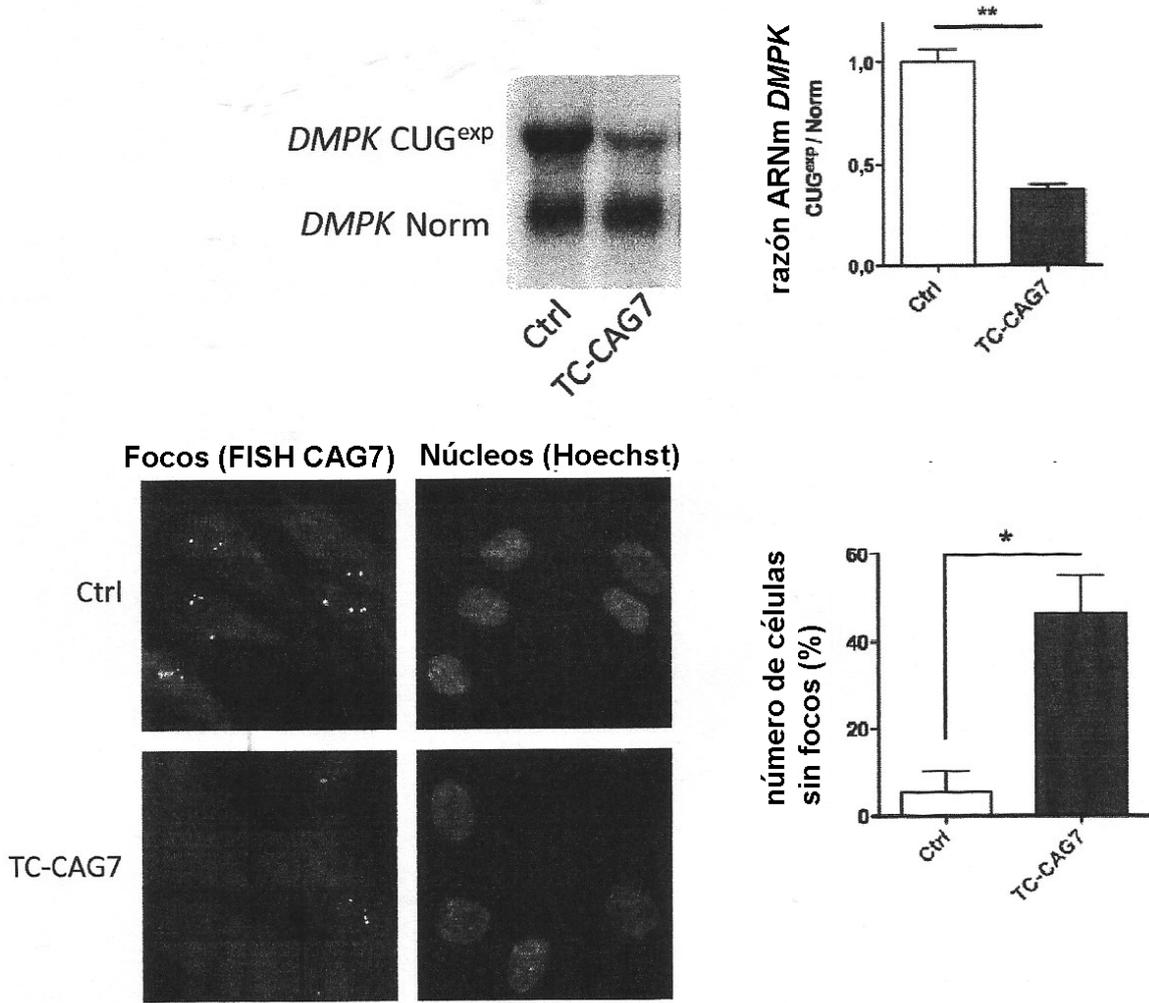


Figura 17

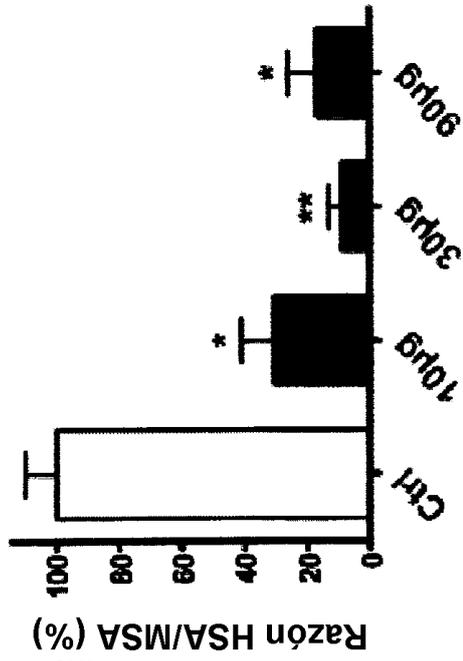
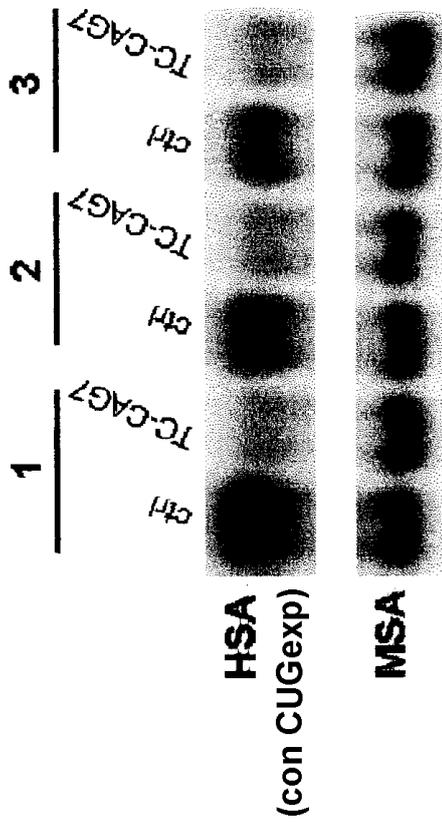


Figura 18



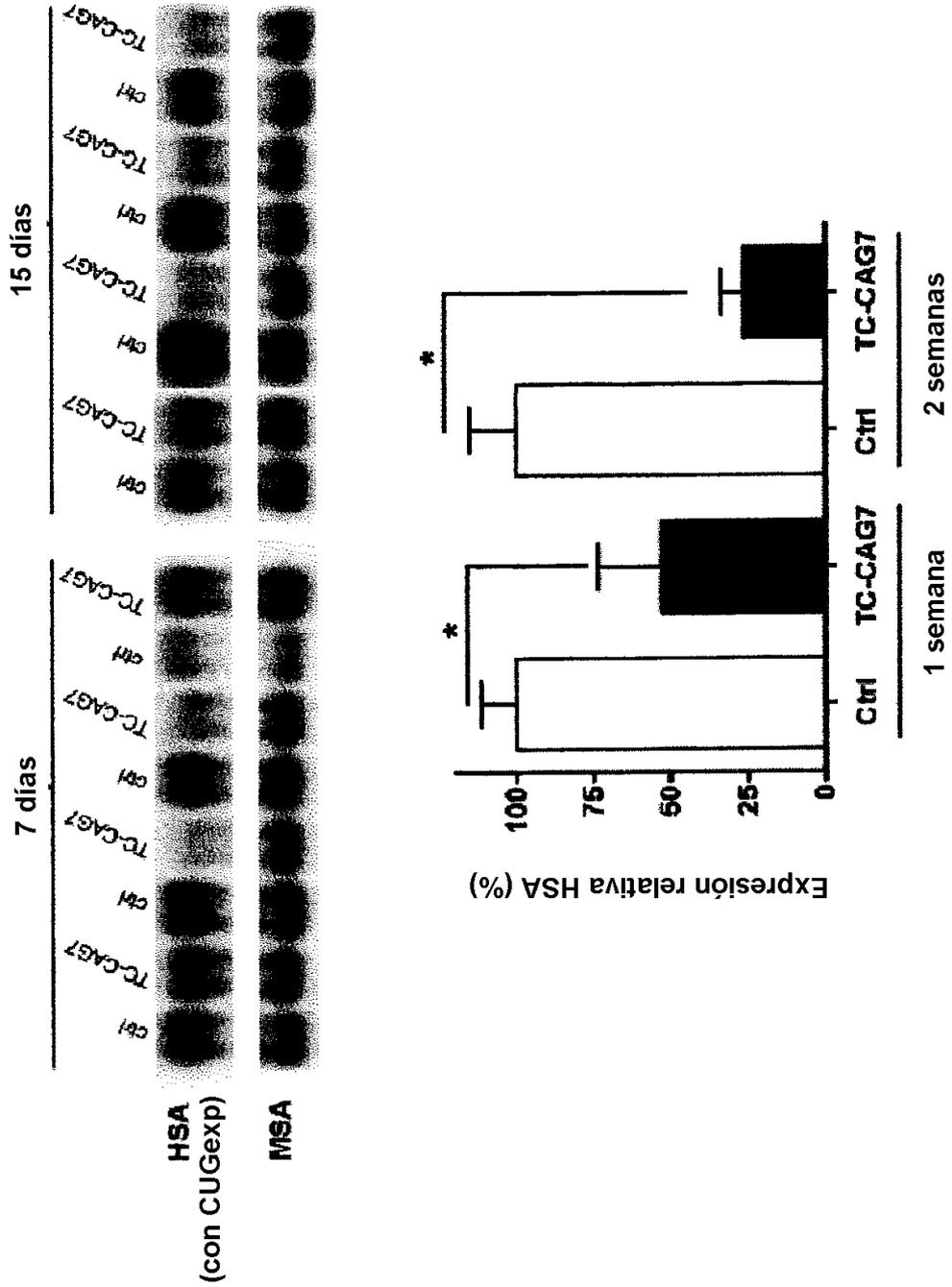


Figura 19

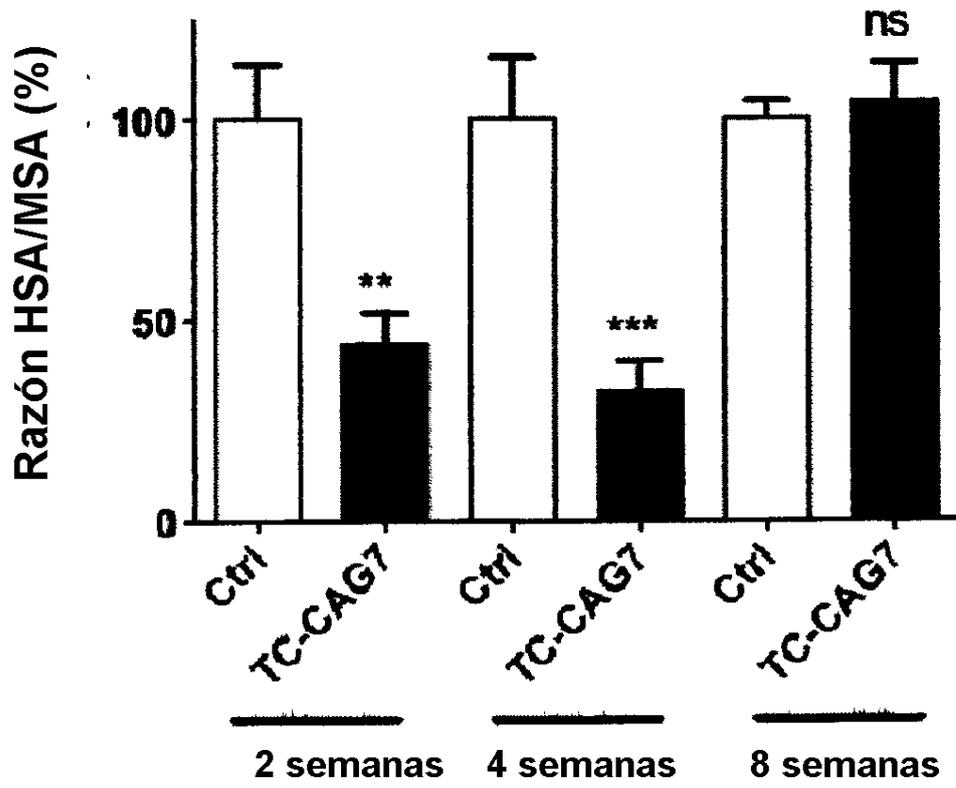


Figura 20