

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 748 556**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/7068** (2006.01) **A61K 31/708** (2006.01)

**A61K 31/7064** (2006.01)

**A61K 31/7072** (2006.01)

**C07D 403/06** (2006.01)

**A61P 21/00** (2006.01)

**A61P 43/00** (2006.01)

**A61K 31/513** (2006.01)

**A61K 45/06** (2006.01)

**A61K 9/00** (2006.01)

**A61K 31/7076** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.06.2016 PCT/US2016/038110**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.12.2016 WO16205671**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.06.2016 E 16812537 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2019 EP 3310362**

54 Título: **Terapia de desoxinucleósidos para enfermedades causadas por grupos de nucleótidos desequilibrados incluyendo síndromes de agotamiento de ADN mitocondrial**

30 Prioridad:

**17.06.2015 US 201562180914 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**17.03.2020**

73 Titular/es:

**FUNDACIÓ HOSPITAL UNIVERSITARI VALL  
D'HEBRON - INSTITUT DE RECERCA (50.0%)  
Passeig Vall d'Hebrón, 119-129  
08035 Barcelona, ES y  
THE TRUSTEES OF COLUMBIA UNIVERSITY IN  
THE CITY OF NEW YORK (50.0%)**

72 Inventor/es:

**HIRANO, MICHIO;  
GARONE, CATERINA y  
MARTI, RAMON**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 748 556 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

Terapia de desoxinucleósidos para enfermedades causadas por grupos de nucleótidos desequilibrados incluyendo síndromes de agotamiento de ADN mitocondrial

## Campo de la invención

5 La invención se refiere en general a una terapia farmacológica para una enfermedad genética humana, específicamente enfermedades caracterizadas por grupos de nucleótidos desequilibrados, p. ej., síndromes de agotamiento de ADN mitocondrial, y más específicamente, deficiencia de timidina quinasa 2 (TK2). La terapia farmacológica implica la administración de dos desoxinucleósidos. Para el tratamiento de la deficiencia de TK2, la  
 10 terapia farmacológica implica la administración de desoxitimidina (dT) y desoxicidina (dC). Esta administración de desoxinucleósidos es aplicable a otros trastornos de grupos de nucleósidos desequilibrados, especialmente los que se encuentran en el síndrome de agotamiento del ADN mitocondrial.

## Antecedentes de la invención

15 Hirano, Michio, Universidad de Columbia (NY), Proyecto nº 3, 2014, "Pharmacological and gene therapy of TK2 deficiency in mice and human" afirma que la terapia de derivación molecular con dCMP y dTMP administrados por vía oral mejora el fenotipo anormal y prolonga la esperanza de vida de ratones Tk2<sup>-/-</sup> en 2-3 veces, pero no cura la enfermedad.

20 Garone et al, *Neurology* 80 (7), 2013, "Deoxyypyrimidine monophosphates treatment for thymidine kinase 2 deficiency (S05.005)" afirma que la falta de actividad de TK2 en ratones causa un desequilibrio del grupo de nucleótidos con reducción de trifosfatos de desoxipirimidina (dTTP y dCTP) en el cerebro y el hígado, lo que conduce a la reducción del número de copias de ADNmt.

25 Las enfermedades mitocondriales son enfermedades clínicamente heterogéneas debido a defectos de la cadena respiratoria mitocondrial (RC) y la fosforilación oxidativa, las vías bioquímicas que convierten la energía en los electrones en trifosfato de adenosina (ATP). La cadenas respiratoria está compuesta de cuatro enzimas de subunidades múltiples (complejos I-IV) que transfieren electrones para generar un gradiente de protones a través de la membrana interna de las mitocondrias y el flujo de protones a través del complejo V dirige la síntesis de ATP (DiMauro y Schon 2003; DiMauro y Hirano 2005). La coenzima Q<sub>10</sub> (CoQ<sub>10</sub>) es una molécula esencial que transporta  
 30 electrones desde los complejos I y II al complejo III. La cadena respiratoria es única en las células eucariotas, p. ej., de mamífero, en virtud de estar controlada por dos genomas, el ADN mitocondrial (ADNmt) y el ADN nuclear (ADNn). Como consecuencia, las mutaciones en cualquiera de los genomas pueden causar enfermedades mitocondriales. La mayoría de las enfermedades mitocondriales afectan a múltiples órganos del cuerpo y típicamente son mortales en la infancia o temprano en la vida adulta. No hay tratamientos efectivos probados para las enfermedades mitocondriales, solo terapias de apoyo, tales como la administración de CoQ<sub>10</sub> y sus análogos para mejorar la actividad de la cadena respiratoria y para la detoxificación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que son subproductos tóxicos de enzimas disfuncionales de la cadena respiratoria.

35 El síndrome de agotamiento del ADN mitocondrial (MDS), que es un subgrupo de la enfermedad mitocondrial, es una causa frecuente de encefalomiopatía infantil grave caracterizada molecularmente por la reducción del número de copias de ADN mitocondrial (ADNmt) en los tejidos y la síntesis insuficiente de complejos mitocondriales de la RC (Hirano, *et al.* 2001). Se han identificado mutaciones en varios genes nucleares como causas del MDS neonatal, que incluyen: *TK2*, *DGUOK*, *POLG*, *POLG2*, *SCLA25A4*, *MPV17*, *RRM2B*, *SUCLA2*, *SUCLG1*, *TYMP*, *OPA1* y *C10orf2*  
 40 (*PEO1*). (Bourdon, *et al.* 2007; Copeland 2008; Elpeleg, *et al.* 2005; Mandel, *et al.* 2001; Naviaux y Nguyen 2004; Ostergaard, *et al.* 2007; Saada, *et al.* 2003; Sarzi, *et al.* 2007; Spinazzola, *et al.* 2006). Además, las mutaciones en estos genes nucleares también pueden causar eliminaciones múltiples del ADNmt con o sin agotamiento del ADNmt (Béhin, *et al.* 2012; Garone, *et al.* 2012; Longley, *et al.* 2006; Nishino, *et al.* 1999; Paradas, *et al.* 2012; Ronchi, *et al.* 2012; Spelbrink, *et al.* 2001; Tyynismaa, *et al.* 2009; Tyynismaa, *et al.* 2012; Van Goethem, *et al.* 2001).

45 Uno de estos genes es *TK2*, que codifica la timidina quinasa (TK2), una enzima mitocondrial necesaria para la fosforilación de los nucleósidos de pirimidina (timidina y desoxicidina) para generar monofosfato de desoxitimidina (dTMP) y monofosfato de desoxicidina (dC) (Saada, *et al.* 2001). Las mutaciones en *TK2* deterioran las rutas de recuperación de nucleósidos/nucleótidos mitocondriales requeridas para la síntesis de trifosfato de desoxinucleótido (dNTP), los componentes básicos para la replicación y reparación de ADNn.

50 La deficiencia de TK2 se describió por primera vez en 2001 por Saada y colaboradores (Saada, *et al.* 2001), en cuatro niños afectados provenientes de cuatro familias diferentes, que sufrían de miopatía grave y devastadora. Después de un desarrollo temprano sin incidentes, a las edades de 6-36 meses, los pacientes desarrollaron hiperCKemia, hipotonía muscular grave con la consiguiente pérdida de actividad espontánea. La enfermedad fue rápidamente progresiva y dos pacientes recibieron ventilación mecánica a los 3 años, mientras que otros dos  
 55 pacientes ya estaban muertos en el momento del informe.

Después de la primera descripción, se ha informado de sesenta pacientes adicionales en la bibliografía y se han diagnosticado al menos veintiséis pacientes adicionales pero no se han comunicado (Alston, *et al.* 2013; Bartesaghi,

et al. 2010; Béhin, et al. 2012; Blakely, et al. 2008; Carrozzo, et al. 2003; Chanprasert, et al. 2013; Collins, et al. 2009; Galbiati, et al. 2006; Gotz, et al. 2008; Leshinsky-Silver, et al. 2008; Lesko, et al. 2010; Mancuso, et al. 2002; Mancuso, et al. 2003; Marti, et al. 2010; Oskoui, et al. 2006; Paradas, et al. 2012; Roos, et al. 2014; Tulinius, et al. 2005; Tyynismaa, et al. 2012; Vilà, et al. 2003; Wang, et al. 2005), dando como resultado noventa pacientes, 53 hombres y 37 mujeres.

Los veintiséis pacientes recientemente diagnosticados se identificaron por la secuenciación de ADN de nueva generación. Este gran número de casos recientemente identificados sugiere que la deficiencia de TK2 es un trastorno poco diagnosticado.

La deficiencia de TK2 presenta un amplio espectro clínico y genético molecular presentándose en la mayoría de los pacientes en la infancia temprana con un curso clínico devastador, mientras que otros tienen debilidad lentamente progresiva durante décadas.

El tratamiento para la deficiencia de TK2, como la mayoría de los MDS y los trastornos mitocondriales, se ha limitado a terapias de apoyo. Si bien la administración de monofosfato de desoxitimidina (dTMP) y monofosfato de desoxicitidina (dCMP) mejoró las condiciones tanto de los ratones con mutaciones en TK2 como de los pacientes humanos con deficiencia de TK2 (Solicitud de EE.UU. N° de serie 15/082.207), todavía existe la necesidad de intervención terapéutica para la deficiencia de TK2.

Además, existe la necesidad de tratamiento para otras formas de MDS y otras enfermedades caracterizadas por grupos de nucleótidos desequilibrados. Por ejemplo, varios trastornos mendelianos con agotamiento de ADNmt o eliminaciones múltiples, o ambos, se caracterizan por grupos de trifosfatos de desoxinucleótidos desequilibrados que conducen a defectos de replicación del ADNmt. Uno de dichos trastornos, las mutaciones de DGUOK deterioran la enzima intramitocondrial desoxiguanosina quinasa, que normalmente fosforila los nucleósidos de desoxipurina desoxiguanosina y desoxicitidina para generar monofosfato de desoxiguanosina (dGMP) y monofosfato de desoxicitidina (dCMP). Otros genes nucleares que alteran los grupos mitocondriales de dNTP incluyen *TYMP*, *RRA12B*, *SUCLA2*, *SUCLG1* y *MPV17*. Las terapias que restablecen el equilibrio de los grupos de dNTP también serían útiles para tratar estos trastornos.

#### **Compendio de la invención**

La presente invención proporciona una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición que comprende una mezcla de desoxicitidina (dC) y desoxitimidina (dT) para usar en un método de tratamiento de deficiencia de timidina quinasa 2 (TK2) en un sujeto humano que lo necesite.

Las enfermedades o trastornos caracterizados por grupos de nucleótidos desequilibrados incluyen los caracterizados por mutaciones en los siguientes genes: *TK2*; *DGUOK*; *TYMP*; *RRM2B*; *SUCLA2*; *SUCLG1*; y *MPV17*.

Dicho trastorno puede ser un síndrome de agotamiento de ADN mitocondrial (MDS). Un MDS puede incluir trastornos de una forma miopática caracterizada por mutaciones en *TK2*, una forma encefalomiopática caracterizada por mutaciones en *SUCLA2*, una forma de encefalopatía neurogastrointestinal caracterizada por mutaciones en *TYMP* y una forma hepatopática caracterizada por mutaciones en *DGUOK*, *POLG* y *MPV17*.

En una realización preferida de la invención, la deficiencia de timidina quinasa 2 se caracteriza por mutación(mutaciones) en el gen *TK2*.

Todos los síndromes de agotamiento de ADN mitocondrial se pueden tratar con el método de la presente descripción, que comprende administrar desoxinucleósidos. Los ejemplos de MDS que se pueden tratar por el método de la presente descripción incluyen, pero no se limitan a, deficiencias en: el gen *DGUOK*, que codifica la desoxiguanosina quinasa, dGK; Gen *RRM2B*, que codifica p53R2, la subunidad pequeña inducible por p53 de ribonucleótido reductasa, RNR; y el gen *TYMP*, que codifica la timidina fosforilasa, TP.

En una parte de la descripción, el desoxinucleósido es desoxitimidina (dT) o desoxicitidina (dC) o mezclas de los mismos. También se pueden usar la desoxiadenosina (dA) y la desoxiguanosina (dG), solas o juntas. Se puede usar un desoxinucleósido (es decir, dT, dC, dA o dG) y mezclas de dos o más de cualquiera de los cuatro desoxinucleósidos en el método descrito.

Las dosis preferidas del o de los desoxinucleósidos son entre aproximadamente 100 y aproximadamente 1.000 mg/kg/día, más preferiblemente entre aproximadamente 300 y aproximadamente 800 mg/kg/día, y lo más preferiblemente entre aproximadamente 250 y aproximadamente 600 mg/kg/día. Si la composición descrita comprende un único desoxinucleósido, entonces las dosis son del único desoxinucleósido. Si, como en la invención, la composición comprende más de un desoxinucleósido, las dosis pueden ser de cada desoxinucleósido o de los desoxinucleósidos totales en la composición.

La administración del (de los) desoxinucleósido(s) puede ser una vez al día, dos veces al día, tres veces al día, cuatro veces al día, cinco veces al día, hasta seis veces al día, preferiblemente a intervalos regulares.

Los métodos de administración preferidos son oral, intratecal, intravenoso y enteral.

La administración del(de los) desoxinucleósido(s) debe comenzar tan pronto como se sospeche el trastorno caracterizado por grupos de nucleótidos desequilibrados, p. ej., MDS, y continuar durante toda la vida del paciente. Las pruebas para el diagnóstico de dichos trastornos, incluyendo la deficiencia de TK2, son conocidas en la técnica.

## 5 Breve descripción de los dibujos

Con el fin de ilustrar la invención, se representan en los dibujos ciertas realizaciones de la invención. Sin embargo, la invención no se limita a las disposiciones e instrumentos precisos de las realizaciones representadas en los dibujos.

La Figura 1 muestra una curva de crecimiento de ratones genéticamente intactos (Tk2<sup>+/+</sup> y Tk2<sup>+/-</sup>) y Tk2<sup>-/-</sup> tratados con 260 mg/kg/día o 520 mg/kg/día de desoxicitidina (dC) y desoxitimidina (dT) desde el día 4 posnatal. Cada símbolo representa la media de peso en cada tiempo de medición. N de cada grupo se indica en la figura.

La Figura 2 muestra la curva de supervivencia de ratones genéticamente intactos (Tk2<sup>+/+</sup>) y Tk2<sup>-/-</sup> con los siguientes tratamiento: Tk2<sup>-/-</sup>leche frente a Tk2<sup>-/-</sup>200 mg/kg día de dCMP+dTMP, p=0,0013; Tk2<sup>-/-</sup>leche frente a Tk2<sup>-/-</sup>260 mg/kg/día de dC+dT, p=0,0006; Tk2<sup>-/-</sup>leche frente a Tk2<sup>-/-</sup>520 mg/kg/día de dC+dT, p<0,0001; Tk2<sup>-/-</sup> 260 mg/kg/día de dC-dT frente a Tk2<sup>-/-</sup>520mg/kg/día de dCdT, p=0,0009, el día 4 posnatal. N de cada grupo indicado en la figura, valores p determinados por las pruebas de Mantel-Cox.

La Figura 3 son gráficos de las proporciones relativas de dNTP en mitocondrias aisladas de tejido cerebral y hepático de ratones genéticamente intactos (Tk2<sup>+/+</sup>), y Tk2<sup>-/-</sup>, no tratados o tratados con 200 mg/kg/día de dCMP y dAMP, o 260 mg/kg/día o 520 mg/kg/día de desoxicitidina (dC) y desoxitimidina (dT) a edades de 13 días posnatal (paneles superiores) y 29 días posnatal (paneles inferiores).

La Figura 4 son gráficos que muestran la proporción de ADNmt/ADNn en cerebro, hígado, intestino y músculo en ratones genéticamente intactos en Tk2 (Tk2<sup>+/+</sup>) (barra izquierda) en comparación con ratones Tk2<sup>-/-</sup>, no tratados o tratados con 260 mg/kg/día o 520 mg/kg/día de desoxicitidina (dC) y desoxitimidina (dT), a edades 13 y 29 días posnatal. Los datos se representan como la media ± desviación estándar (DE) del porcentaje de copias de ADNmt con respecto a Tk2<sup>+</sup>. Los valores de p se evaluaron mediante pruebas de Mann-Whitney. (\*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001).

La Figura 5 son gráficos que representan los resultados de la HPLC que mide dT y uracilo en plasma de ratones genéticamente intactos (Tk2<sup>+/+</sup>) no tratados, ratones genéticamente intactos (Tk2<sup>+/+</sup>) tratados con 260 mg/kg/día de desoxicitidina (dC) y desoxitimidina (dT), ratones Tk2<sup>-/-</sup> tratados con 260 mg/kg/día de desoxicitidina (dC) y desoxitimidina (dT), y ratones Tk2<sup>-/-</sup> tratados con 200 mg/kg/día de dCMP y dTMP, 30 minutos después del tratamiento. Los datos se expresan como la media ± DE.

La Figura 6 son gráficos de los niveles de actividad enzimática de la cadena respiratoria en ratones Tk2<sup>-/-</sup> tratados con 400 mg/kg/día de dCMP y dTMP y THU a los 13 días posnatal, 260 mg/kg/día de desoxicitidina (dC) y desoxitimidina (dT) a los 13 y 29 días posnatal, o 520 mg/kg/día de desoxicitidina (dC) y desoxitimidina (dT) 29 días posnatal. Los datos se representan como el porcentaje de las actividades de RCE en tejidos de ratón Tk2<sup>-/-</sup> normalizados respecto a niveles de proteína y en relación a Tk2<sup>+</sup> para cada tratamiento, valores de p determinados por las pruebas de Mann-Whitney. \*p<0.05.

La Figura 7A es una inmunotransferencia de proteínas de la cadena respiratoria en ratones genéticamente intactos tratados con 260 mg/kg/día o 520 mg/kg/día de desoxicitidina (dC) y desoxitimidina (dT), y ratones Tk2<sup>-/-</sup> tratados con 260 mg/kg/día o 520 mg/kg/día de desoxicitidina (dC) y desoxitimidina (dT) a los 29 días posnatal. La Figura 7B son gráficos que muestran los niveles de RCE normalizados respecto al complejo II, representados como porcentaje de los niveles de RCE en ratones TK2<sup>+/+</sup>, los valores de p se evaluaron mediante pruebas de Mann-Whitney.

Abreviaturas: CS = citrato sintasa; CI = NADH-deshidrogenasa; CII = succinato deshidrogenasa; CIII = citocromo c reductasa; CIV = citocromo c oxidasa (COX); CI+III = NADH-citocromo c reductasa; CII+III = succinato deshidrogenasa-citocromo c reductasa.

## 45 Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa en el sorprendente descubrimiento de que los síndromes de agotamiento de ADN mitocondrial, incluyendo la deficiencia de TK2, se pueden tratar con desoxinucleósidos. Como se muestra por los resultados en el presente documento, la administración de desoxinucleósidos mejoraba enormemente la afección tanto en un modelo de ratón con deficiencia de TK2 como en pacientes humanos con deficiencia de TK2.

## 50 Definiciones

Los términos usados en esta memoria descriptiva en general tienen sus significados habituales en la técnica, dentro del contexto de esta invención y el contexto específico donde se usa cada término. Ciertos términos se discuten a continuación, o en otra parte de la memoria descriptiva, para proporcionar orientación adicional al profesional en la

- 5 descripción de los métodos de la invención y cómo usarlos. Además, se apreciará que se puede decir lo mismo de más de una manera. En consecuencia, se puede usar un lenguaje alternativo y sinónimos para uno cualquiera o más de los términos descritos en el presente documento, ni se le debe dar un significado especial a si un término se detalla o se discute en el presente documento. Se proporcionan sinónimos para ciertos términos. Una mención de uno o más sinónimos no excluye el uso de los otros sinónimos. El uso de ejemplos en cualquier parte de la memoria descriptiva, incluyendo ejemplos de cualquiera de los términos descritos en el presente documento, es solo ilustrativo, y de ninguna manera limita el alcance y el significado de la invención o cualquier término ilustrado. Asimismo, la invención no se limita a sus realizaciones preferidas.
- 10 El término "sujeto" como se usa en esta solicitud significa mamíferos. Los mamíferos incluyen mamíferos caninos, felinos, roedores, bovinos, equinos, porcinos, ovinos y primates. Por lo tanto, la invención se puede usar en medicina veterinaria, p. ej., para tratar animales de compañía, animales de granja, animales de laboratorio en parques zoológicos y animales en la naturaleza. La invención es particularmente deseable para aplicaciones médicas humanas.
- 15 El término "paciente" como se usa en esta solicitud significa un sujeto humano. En algunas realizaciones de la presente invención, se sabe o se sospecha que el "paciente" tiene una enfermedad o trastorno caracterizado por grupos de nucleótidos desequilibrados, enfermedad mitocondrial, síndrome de agotamiento de ADN mitocondrial o deficiencia de TK2.
- 20 La frase "cantidad terapéuticamente efectiva" se usa en el presente documento para significar una cantidad suficiente para causar una mejora en una afección clínicamente significativa en el sujeto, o retrasar o minimizar o mitigar uno o más síntomas asociados con la enfermedad o trastorno, o dar como resultado un cambio beneficioso deseado de fisiología en el sujeto.
- 25 Los términos "tratar", "tratamiento" y similares se refieren a un medio para disminuir, aliviar, mejorar o aliviar al menos uno de los síntomas de la enfermedad o trastorno, o invertir la enfermedad o trastorno después de su aparición.
- Los términos "prevenir", "prevención" y similares se refieren a actuar antes de la aparición sintomática de la enfermedad o trastorno, para prevenir que la enfermedad o trastorno se desarrolle o minimizar el alcance de la enfermedad o trastorno, o ralentizar su curso de desarrollo.
- 30 La expresión "que lo necesita" sería un sujeto que se sabe o que se sospecha que tiene o está en riesgo de tener una enfermedad o trastorno caracterizado por grupos de nucleótidos desequilibrados, enfermedad mitocondrial, síndrome de agotamiento de ADN mitocondrial o deficiencia de TK2.
- El término "agente" como se usa en el presente documento significa una sustancia que produce o es capaz de producir un efecto e incluiría, pero no se limita a, productos químicos, productos farmacéuticos, productos biológicos, moléculas orgánicas pequeñas, anticuerpos, ácidos nucleicos, péptidos y proteínas.
- 35 El término "desoxinucleósido", como se usa en el presente documento, significa desoxitimidina o dT, desoxicitidina o dC, desoxiadenosina o dA, y desoxiguanosina o dG. Se usarán indistintamente el nombre completo y la abreviatura común para cada uno. Dichos desoxinucleósidos también incluyen derivados fisiológicamente funcionales de los desoxinucleósidos.
- 40 Como se usa en el presente documento, la expresión "derivado fisiológicamente funcional" se refiere a un compuesto (p. ej., un precursor de fármaco) que se transforma *in vivo* para producir un desoxinucleósido. La transformación puede ocurrir por varios mecanismos (p. ej., por procesos metabólicos o químicos), como, por ejemplo, por hidrólisis en sangre. Los profármacos son dichos derivados, y proporcionan una descripción sobre el uso de profármacos T. Higuchi y W. Stella en "Pro-drugs as Novel Delivery Systems", vol. 14 de A.C.S. Symposium Series, y en Bioreversible Carriers in Drug Design, ed. Edward B. Roche, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987.
- 45 Como se usa en el presente documento, "un efecto adverso" es una reacción no deseada causada por la administración de un fármaco. En la mayoría de los casos, la administración de los desoxinucleósidos no causó efectos adversos. El efecto adverso más esperado sería una intolerancia gastrointestinal menor.
- 50 El término "aproximadamente" o "alrededor" significa dentro de un intervalo de error aceptable para el valor particular determinado por un experto en la técnica, que dependerá en parte de cómo se mide o determina el valor, es decir, las limitaciones de sistema de medición, es decir, el grado de precisión requerido para un propósito particular, tal como una formulación farmacéutica. Por ejemplo, "aproximadamente" puede significar dentro de 1 o más de 1 desviaciones estándar, según la práctica en la técnica. Alternativamente, "aproximadamente" puede significar un intervalo de hasta el 20%, preferiblemente hasta 10%, más preferiblemente hasta 5%, y aún más preferiblemente hasta 1% de un valor dado. Alternativamente, particularmente con respecto a los sistemas o procesos biológicos, el término puede significar dentro de un orden de magnitud, preferiblemente dentro de 5 veces, y más preferiblemente dentro de 2 veces, un valor. Cuando se describen valores particulares en la solicitud y en las reivindicaciones, a menos que se indique lo contrario, se debe suponer el término "aproximadamente" dentro de un intervalo de error
- 55

aceptable para el valor particular.

Administración de desoxinucleósidos para el tratamiento del síndrome de agotamiento de ADN mitocondrial

El síndrome de agotamiento de ADN mitocondrial (ADNmt) comprende varias enfermedades autosómicas graves caracterizadas por una reducción en el número de copias de ADNmt en los tejidos afectados. La mayoría de los genes nucleares causantes del MDS codifican proteínas que pertenecen a la maquinaria de replicación del ADNmt o están implicados en el metabolismo del trifosfato de desoxirribonucleósido (dNTP).

Una forma de MDS es la deficiencia de timidina quinasa o TK2. La TK2 codificada por el gen nuclear, *TK2*, es una proteína de la matriz mitocondrial que fosforila los nucleósidos de timidina y desoxicitidina para generar monofosfato de desoxitimidina (dTTP) y monofosfato de desoxicitidina (dCMP), que a su vez, se convierten en trifosfatos de desoxinucleótido de ADN (dNTP) requeridos para la síntesis de ADN mitocondrial. Como se ha descrito en la sección de antecedentes, las mutaciones autosómicas recesivas de *TK2* causan una debilidad neuromuscular devastadora con agotamiento grave del ADN mitocondrial (ADNmt) en bebés y niños, así como oftalmoplejía externa progresiva con eliminaciones múltiples de ADNmt en adultos. Muchos pacientes no pueden caminar y requieren algún tipo de ventilación mecánica y sonda de alimentación. El sistema nervioso central está implicado de manera variable en estos trastornos, con síntomas que incluyen convulsiones, encefalopatía, deterioro cognitivo y pérdida de audición. Menos del 7% de los pacientes viven más de 42 años.

Basándose en los hallazgos genéticos clínicos y moleculares de los pacientes así diagnosticados, se identificaron tres presentaciones de la enfermedad: i) miopatía de inicio en el lactante ( $\leq 1$  año) con inicio de debilidad en el primer año de vida con agotamiento grave de ADNmt y mortalidad temprana; ii) miopatía de inicio en la infancia ( $> 1-11$  años) con agotamiento grave de ADNmt; y iii) miopatía de inicio tardío ( $\geq 12$  años) con debilidad leve al inicio y progresión lenta hasta pérdida de locomoción, insuficiencia respiratoria, o ambas, a menudo con oftalmoparesia crónica progresiva externa en la adolescencia o la edad adulta en asociación con eliminaciones múltiples de ADNmt, número de copias de ADNmt reducido, o ambos. Véase en general Garone, et al., (2016) en preparación.

Los intentos de estudiar la patogénesis y las terapias de prueba para la deficiencia de TK2 usando fibroblastos cultivados de pacientes no han tenido éxito, porque las células que se replicaban no podían presentar el agotamiento del ADNmt. Por el contrario, un modelo de ratón mutante (*Tk2<sup>-/-</sup>*) homocigoto con mutación de *Tk2* H126N, presenta un fenotipo que es sorprendentemente similar a la encefalomiopatía del lactante humana causada por mutaciones de *TK2*, caracterizada por el inicio a los 10 días de edad con disminución de la locomoción, marcha inestable, temblor evidente, retraso del crecimiento y agotamiento del ADN mitocondrial (ADNmt) que progresa rápidamente hasta la muerte prematura de los 14 a 16 días, que es un período de tiempo análogo a la enfermedad humana de inicio en el lactante (Akman, et al. 2008; Dorado, et al. 2011).

Los estudios expuestos en el presente documento con ratones con mutación en *Tk2* han demostrado que la administración oral de dC/dT retrasaba el inicio de los síntomas clínicos de deficiencia de TK2 y prolongaba la vida de los ratones de dos a tres veces (Ejemplo 2).

Experimentos adicionales mostraron efectos específicos de tejido. La medición de los niveles de grupos de dNTP en extractos de mitocondrias mostró que se recuperaba el dCTP en el cerebro y se recuperaba el dTTP en el hígado (Ejemplo 3). La medición del agotamiento de ADNmt mostró que tanto las terapias de dCMP+dTMP como de dC+dT recuperaban el número de copias de ADNmt en hígado, músculo y tejido (Ejemplo 4). Anteriormente se especuló que la formación de la barrera hematoencefálica podría estar comprometiendo la biodisponibilidad del tratamiento en el cerebro. Sin embargo, las mediciones de HPLC mostraron que los productos catalíticos de estos compuestos se encontraron en concentraciones más altas después del tratamiento tanto con monofosfatos de nucleótidos como con desoxinucleósidos, lo que sugiere que son capaces de cruzar la barrera hematoencefálica. Las mediciones de agotamiento de ADNmt también mostraron una recuperación completa del número de copias de ADNmt en el intestino.

Por lo tanto, los experimentos expuestos en el presente documento usando el modelo de ratón de deficiencia de *Tk2* muestran que la administración de desoxinucleósidos es efectiva y segura para el tratamiento de la enfermedad. Además, como se muestra en el Ejemplo 5, la administración de dT y dC mejoró enormemente los síntomas de deficiencia de TK2 en pacientes.

Por lo tanto, la presente descripción incluye la administración de al menos un desoxinucleósido a un paciente que lo necesite. En una realización, la presente descripción incluye la administración de al menos una desoxipirimidina. En una realización adicional de la descripción, la desoxipirimidina se elige entre dC, dT y sus mezclas. En otra realización más, la presente descripción incluye la administración de al menos una desoxipurina. En una descripción adicional, la desoxipurina se elige de dA, dG y sus mezclas.

Los pacientes que se beneficiarían de la administración de desoxinucleósidos serían aquellos diagnosticados de deficiencia de TK2. En estos pacientes, se administraría al menos una desoxipirimidina, dC o dT, o sus mezclas.

Un defecto paralelo de la desoxiguanosina quinasa (dGK), debido a mutaciones autosómicas recesivas en *DGUOK* con deficiencias en dGMP y dAMP, produce agotamiento de ADNmt que se pone de manifiesto típicamente como

enfermedad hepatocerebral de inicio en la infancia temprana (Mandel, et al. 2001). Estos pacientes se beneficiarían de la administración de al menos una desoxipurina, dG o dA, o sus mezclas.

5 Otras formas de MDS, así como otros trastornos relacionados con grupos de nucleótidos desequilibrados, se pueden tratar mediante la administración de desoxinucleósidos específicos, es decir, dA, dG, dC o dT, o sus mezclas. Estos trastornos incluirían, pero no se limitan a deficiencias relacionadas con *RRM2B* (que codifica p53R2, la subunidad pequeña inducible por p53 de ribonucleótido reductasa, RNR) y mutaciones en *TYMP* (que codifica timidina fosforilasa, TP) que causan encefalomiopatía neurogastrointestinal mitocondrial (MNGIE). Los genes nucleares adicionales que alteran los grupos de dNTP mitocondriales incluyen, pero no se limitan a *SUCLA2*, *SUCLG1* y *MPV17*. Los trastornos relacionados con estos genes también se pueden tratar mediante la administración de uno o  
10 más desoxinucleósidos.

Además, a medida que se dilucidan los mecanismos de otras formas de MDS y otros trastornos, el profesional experto puede determinar los desoxinucleósidos adecuados para el tratamiento.

15 Los pacientes que presentan el fenotipo descrito antes para la deficiencia de TK2, incluyendo la presentación más típica de enfermedad muscular progresiva caracterizada por hipotonía generalizada, debilidad muscular proximal, pérdida de capacidades motoras previamente adquiridas, mala alimentación y dificultades respiratorias, se pueden evaluar para diagnosticar definitivamente la enfermedad.

Si el cuadro clínico es altamente sospechoso para el síndrome de agotamiento de ADNmt, se deben realizar pruebas genéticas moleculares usando un panel de genes que se sabe que causan el síndrome de agotamiento de ADNmt (Chanprasert, et al. 2012). El gen *TK2* es el único gen en el que se sabe que las mutaciones causan el síndrome de agotamiento del ADN mitocondrial relacionado con TK2. Esta prueba puede incluir un análisis de secuencia de toda las regiones codificantes y de unión exón/intrón de *TK2* para las variantes de secuencia y de eliminación/duplicación. Si se identifican mutaciones perjudiciales heterocigotas u homocigotas compuestas en el análisis de secuencia, se confirma el diagnóstico de deficiencia de TK2 y, por lo tanto, el sujeto se beneficiaría de la terapia con desoxinucleósidos. Si el análisis de secuencia no identifica dos mutaciones perjudiciales heterocigotas u homocigóticas compuestas, se debe considerar el análisis de eliminaciones/duplicación para determinar y/o  
20 confirmar un diagnóstico de deficiencia de TK2.

Otras pruebas para determinar y/o confirmar un diagnóstico de deficiencia de TK2 pueden incluir pruebas de concentración de creatina quinasa (CK) en el suero, electromiografía, histopatología en el músculo esquelético, contenido de ADN mitocondrial (ADNmt) (número de copias) y actividad de la cadena de transporte de electrones (ETC) en músculo esquelético. Si se encuentra uno o más de los siguientes en estas pruebas, se determina y/o confirma la deficiencia de TK2. La concentración elevada de CK en comparación con los controles sanos puede indicar una deficiencia de TK2. Se puede realizar una biopsia del músculo esquelético y después se realiza un análisis de contenido de ADNmt en el músculo esquelético. Si la biopsia del músculo esquelético muestra una variación notable en el tamaño de la fibra, vacuolas sarcoplásmicas variables, aumento del tejido conectivo y fibras rojas rasgadas, así como aumento de la actividad de la succinato deshidrogenasa (SDH) y actividad de citocromo c oxidasa (COX) de baja a ausente, y el número de copias de ADNmt se reduce de forma importante (típicamente menos de 20% de los controles sanos de edad y tejidos correspondientes), se puede determinar y/o confirmar un diagnóstico de deficiencia de TK2 (Chanprasert, et al. 2012).  
30

Además, la deficiencia de TK2 se hereda de manera autosómica recesiva. Por lo tanto, se puede evaluar a un hermano de un paciente afectado lo antes posible después del nacimiento para diagnosticar la enfermedad.  
40

En todos estos ejemplos, la terapia con desoxinucleósidos debe iniciarse lo antes posible después de un diagnóstico de deficiencia de TK2.

Composiciones farmacéuticas, métodos de administración y dosis.

45 La presente invención abarca desoxinucleósidos, más específicamente dos desoxinucleósidos, para usar en un método de tratamiento de la deficiencia de TK2, comprendiendo dicho método además administrar dichos desoxinucleósidos.

Los métodos de administración más preferidos son los orales, intratecales y parentales, incluyendo los intravenosos. Los desoxinucleósidos deben estar en la forma adecuada para la administración de elección.

50 Los desoxinucleósidos se disuelven fácilmente en líquido, se disuelven fácilmente en líquido (tal como agua, leche artificial o leche) mientras que la forma de ácido libre no se disuelve fácilmente en líquido.

Dichas composiciones farmacéuticas que comprenden uno de más desoxinucleósidos para administración pueden comprender una cantidad terapéuticamente eficaz de los desoxinucleósidos y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La frase "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que son fisiológicamente tolerables y que normalmente no producen una reacción alérgica o similar, como malestar gástrico, mareos y similares, cuando se administra a un ser humano y están aprobadas por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o que figuran en la farmacopea de EE.UU. u otra farmacopea generalmente reconocida  
55

para su uso en animales, y más particularmente en seres humanos. "Vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el agente terapéutico. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como disoluciones salinas en agua y aceites, que incluyen los de origen del petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Una disolución salina es un vehículo preferido cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. Las disoluciones salinas y las disoluciones acuosas de dextrosa y glicerol también se pueden usar como vehículos líquidos, particularmente para disoluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, yeso, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche descremada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol, y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes reguladores del pH.

La administración oral es un método preferido de administración. Los desoxinucleósidos se pueden añadir a cualquier forma de líquido que un paciente pueda consumir, incluyendo, pero no limitado a leche, leche materna y de vaca, leche de inicio y agua.

Además, las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración oral pueden ser cápsulas, comprimidos, polvos, gránulos, disoluciones, jarabes, suspensiones (en líquidos no acuosos o acuosos) o emulsiones. Los comprimidos o las cápsulas de gelatina dura pueden comprender lactosa, almidón o sus derivados, estearato de magnesio, sacarina de sodio, celulosa, carbonato de magnesio, ácido esteárico o sales de los mismos. Las cápsulas de gelatina blanda pueden comprender aceites vegetales, ceras, grasas, polioles semisólidos o líquidos. Las disoluciones y jarabes pueden comprender agua, polioles y azúcares. Un agente activo destinado a la administración oral se puede recubrir o mezclar con un material que retrase la disgregación y/o absorción del agente activo en el tracto gastrointestinal. Por lo tanto, se puede lograr la liberación sostenida a lo largo de muchas horas y, si es necesario, el agente activo se puede proteger de la degradación dentro del estómago. Las composiciones farmacéuticas para administración oral se pueden formular para facilitar la liberación de un agente activo en una ubicación gastrointestinal particular debido a condiciones específicas de pH o enzimáticas.

Con el fin de superar cualquier problema de los desoxinucleósidos que cruzan la barrera hematoencefálica, la administración intratecal es otra forma de administración preferida (Galbiati, et al. 2006; Gotz, et al. 2008). La administración intratecal implica la inyección del fármaco en el canal espinal, más específicamente en el espacio subaracnoideo, de modo que llegue al líquido cefalorraquídeo. Este método se usa comúnmente para anestesia espinal, quimioterapia y medicación para el dolor. La administración intratecal se puede realizar mediante punción lumbar (inyección en bolo) o mediante un sistema de catéter puerto (bolo o infusión). El catéter se inserta lo más habitualmente entre las láminas de las vértebras lumbares y la punta se enrosca en el espacio te cal hasta el nivel deseado (generalmente L3-L4). Las formulaciones intratecales usan lo más habitualmente agua y disolución salina como excipientes, pero también se han usado EDTA y lípidos.

Una forma preferida adicional de administración es parenteral, incluyendo la administración intravenosa. Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración parenteral, incluyendo la administración intravenosa, incluyen disoluciones o suspensiones inyectables estériles acuosas y no acuosas, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostatos y solutos que hacen que las composiciones sean sustancialmente isotónicas con la sangre del sujeto. Otros componentes que pueden estar presentes en dichas composiciones incluyen agua, alcoholes, polioles, glicerina y aceites vegetales. Las composiciones adaptadas para la administración parental se pueden presentar en envases de dosis unitarias o multidosis, tales como ampollas y viales sellados, y se pueden almacenar en un estado congelado-secado (liofilizado) que requiere solo la adición de un vehículo estéril, inmediatamente antes de usar. Las disoluciones y suspensiones para inyección extemporánea se pueden preparar a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles. Los vehículos adecuados que se pueden usar para proporcionar formas farmacéuticas parenterales de la invención son bien conocidos por los expertos en la técnica. Los ejemplos incluyen: agua para inyección USP; vehículos acuosos tales como inyección de cloruro de sodio, inyección de Ringer, inyección de dextrosa, inyección de cloruro de sodio y dextrosa, e inyección de Ringer lactato; vehículos miscibles con agua tales como alcohol etílico, polietilenglicol y polipropilenglicol; y vehículos no acuosos tales como aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de cacahuete, aceite de sésamo, oleato de etilo, miristato de isopropilo y benzoato de bencilo.

Además, dado que algunos pacientes pueden estar recibiendo nutrición enteral en el momento en que comienza el tratamiento con desoxinucleósidos, los dN se pueden administrar a través de una sonda de alimentación de gastrostomía u otro medio de nutrición enteral.

Otros métodos de administración incluyen vía mucosa, tal como nasal, sublingual, vaginal, bucal o rectal; o administración transdérmica a un sujeto.

Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración nasal y pulmonar pueden comprender vehículos sólidos tales como polvos, que se pueden administrar por inhalación rápida a través de la nariz. Las composiciones para administración nasal pueden comprender vehículos líquidos, tales como aerosoles o gotas. Alternativamente, la inhalación directamente a los pulmones se puede lograr inhalando profundamente o instilando a través de una boquilla. Estas composiciones pueden comprender disoluciones acuosas o aceitosas del principio activo. Las

composiciones para inhalación se pueden suministrar en dispositivos especialmente adaptados que incluyen, pero no se limitan a, aerosoles presurizados, nebulizadores o insufladores, que pueden estar contruidos para proporcionar dosis predeterminadas del principio activo.

5 Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración rectal se pueden proporcionar como supositorios o enemas. Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración vaginal se pueden proporcionar como pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones en aerosol.

Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración transdérmica se pueden proporcionar como parches discretos destinados a permanecer en contacto íntimo con la epidermis del receptor durante un período de tiempo prolongado.

10 La terapia de desoxinucleósidos comprende la administración de uno o más desoxinucleósidos elegidos del grupo que consiste en desoxitimidina (dT), desoxicidina (dC), desoxiadenosina (dA) y desoxiguanosina (dG).

15 Un profesional experto puede determinar qué desoxinucleósidos son beneficiosos en función de la deficiencia. También está dentro de la experiencia en la técnica que el profesional determine si se deben administrar mezclas de los desoxinucleósidos y en qué proporción. Si se van a administrar dos desoxinucleósidos, pueden estar en una proporción de 50/50 de cada desoxinucleósido, p. ej., dC y dT, o en proporciones de aproximadamente 5/95, 10/90, 15/85, 20/80, 25/75, 30/70, 35/65, 40/60, 45/55, 55/45, 60/40, 65/35, 70/30, 75/25, 80/20, 85/15, 90/10 y 95/5.

A modo de ejemplo, dT y dC se administran en una mezcla de cantidades iguales para la deficiencia de TK2.

20 La selección de una dosis terapéuticamente efectiva será determinada por el experto en la técnica considerando varios factores, que serán conocidos por un experto en la técnica. Dichos factores incluyen la forma particular del desoxinucleósido y sus parámetros farmacocinéticos, tales como la biodisponibilidad, metabolismo y semivida, que se habrán establecido durante los procedimientos de desarrollo habituales usados típicamente para obtener la aprobación reguladora de un compuesto farmacéutico. Otros factores al considerar la dosis incluyen la afección o enfermedad a tratar o el beneficio a alcanzar en un individuo normal, la masa corporal del paciente, la vía de administración, si la administración es aguda o crónica, medicamentos concomitantes y otros factores que es bien conocido que afectan a la eficacia de los agentes farmacéuticos administrados. Por lo tanto, la dosis precisa debe decidirse de acuerdo con el criterio del experto en la técnica, y las circunstancias de cada paciente, y de acuerdo con las técnicas clínicas estándar.

30 Una dosis preferida está en el intervalo de aproximadamente 100 mg/kg/día a aproximadamente 1.000 mg/kg/día. Una dosis preferida adicional está en el intervalo de aproximadamente 200 mg/kg/día a aproximadamente 800 mg/kg/día. Una dosis preferida adicional está en el intervalo de aproximadamente 250 mg/kg/día a aproximadamente 400 mg/kg/día. Estas cantidades de dosificación son de desoxinucleósidos individuales o de una composición con una mezcla de más de un desoxinucleósido, p. ej., dT y dC. Por ejemplo, una dosis puede comprender 400 mg/kg/día de dT solo. En otro ejemplo, una dosis puede comprender una mezcla de 200 mg/kg/día de dT y 200 mg/kg/día de dC. En otro ejemplo, una dosis puede comprender 400 mg/kg/día de una mezcla de dT y dC.

35 La administración de los desoxinucleósidos puede ser una vez al día, dos veces al día, tres veces al día, cuatro veces al día, cinco veces al día, hasta seis veces al día, preferiblemente a intervalos regulares. Por ejemplo, cuando los desoxinucleósidos se administran cuatro veces al día, las dosis serían a las 8:00 a.m., 12:00 p.m., 4:00 p.m. y 8:00 p.m.

40 Las dosis también se pueden reducir si se administran por vía intravenosa o intratecal. Los intervalos de dosis preferidos para dicha administración son de aproximadamente 50 mg/kg/día a aproximadamente 500 mg/kg/día.

Como se muestra en el Ejemplo 5, las dosis se pueden ajustar para optimizar los efectos en el sujeto. Por ejemplo, los desoxinucleósidos pueden administrarse en 100 mg/kg/día para comenzar, y después aumentar a lo largo del tiempo a 200 mg/kg/día, a 400 mg/kg/día, a 800 mg/kg/día, hasta 1.000 mg/kg/día, dependiendo de la respuesta del sujeto y la tolerabilidad.

45 Se puede vigilar en un sujeto la mejora de su afección antes de aumentar la dosis. La respuesta de un sujeto a la administración terapéutica de los desoxinucleósidos se puede vigilar observando la fuerza y el control muscular y la movilidad del sujeto, así como los cambios en la altura y el peso. Si uno o más de estos parámetros aumentan después de la administración, el tratamiento se puede continuar. Si uno o más de estos parámetros permanecen iguales o disminuyen, se puede aumentar la dosis de desoxinucleósidos.

50 Como se muestra en los Ejemplos, los desoxinucleósidos son bien tolerados. Cualquier efecto adverso observado fue menor y fueron principalmente diarrea, distensión abdominal y otras manifestaciones gastrointestinales. Se puede vigilar en un sujeto también cualquier efecto adverso, tal como intolerancia gastrointestinal, p. ej., diarrea. Si se observan uno o más efectos adversos después de la administración, la dosis se puede disminuir. Si no se observan dichos efectos adversos, la dosis se puede aumentar. Además, una vez que se disminuye una dosis debido a la observación de un efecto adverso, y el efecto adverso ya no se observa, se puede aumentar la dosis.

Los desoxinucleósidos también se pueden administrar conjuntamente con otros agentes. Dichos agentes incluirían agentes terapéuticos para tratar los síntomas de la forma particular de MDS. En particular, para la deficiencia de TK2, la dT y dC se pueden coadministrar con un inhibidor de enzimas catabólicas de nucleósidos ubicuas, que incluyen, pero no se limitan a inhibidores enzimáticos tales como tetrahidroruridina (inhibidor de citidina desaminasa) e immucilina H (inhibidor de la nucleósido fosforilasa purina) y tipiracilo (inhibidor de la timidina fosforilasa). Dichos inhibidores son conocidos y se usan en el tratamiento de algunos tipos de cáncer.

### Ejemplos

La presente invención se puede entender mejor por referencia a los siguientes ejemplos no limitantes, que se presentan con el fin de ilustrar más completamente las realizaciones preferidas de la invención. De ninguna manera deben interpretarse como limitantes del amplio alcance de la invención.

#### Ejemplo 1 - Materiales y métodos

##### Modelo de ratón con deficiencia de TK2

Se ha descrito previamente un ratón mutante (*Tk2*<sup>-/-</sup>) con mutación de *Tk2* H126N que presenta un fenotipo sorprendentemente similar a la encefalomiopatía infantil humana (Akman, et al. 2008). Entre los días 10 y 13 posnatales, los ratones *Tk2*<sup>-/-</sup> desarrollan rápidamente encefalomiopatía mortal caracterizada por disminución de la locomoción, marcha inestable, temblor evidente, retraso del crecimiento y evolución rápida a muerte prematura a los 14 a 16 días de edad. Los análisis moleculares y bioquímicos del modelo de ratón demostraron que la patogénesis de la enfermedad se debe a la pérdida de actividad enzimática y a los consiguientes desequilibrios de grupos de dNTP con menores niveles de dTTP en el cerebro y niveles tanto de dTTP como de dCTP en el hígado, lo que, a su vez, produce el agotamiento del ADNmt y defectos de las enzimas de la cadena respiratoria que contienen subunidades codificadas por ADNmt, principalmente en el cerebro y la médula espinal.

Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con un protocolo aprobado por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales del Centro Médico de la Universidad de Columbia, y eran consistentes con la Guía de los Institutos Nacionales de Salud para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio. Los ratones se alojaron y criaron de acuerdo con las condiciones estándar internacionales, con un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, y se sacrificaron a los 4, 13 y 29 días de edad.

Se extrajeron los órganos (cerebro, médula espinal, hígado, corazón, riñón, músculo cuádriceps, pulmón y tracto gastrointestinal) y se congelaron en la fase líquida del isopentano, se preenfriaron cerca de su punto de congelación (-160°C) con hielo seco o se fijaron en formalina tamponada neutra al 10% y se insertaron en parafina usando procedimientos estándar. Después, el tejido insertado en parafina se tiñó con hematoxilina y eosina (HyE) para el estudio morfológico o se procesó para estudios de inmunotinción con GFAP, COX I o subunidad de complejo I como se describe con detalle en los procedimientos complementarios. Tanto los ratones heterocigotos como los homocigotos genéticamente intactos se consideraron como grupo de control (*Tk2*<sup>+</sup>) ya que no se describieron previamente diferencias clínicas y bioquímicas (Akman, et al. 2008; Dorado, et al. 2011).

#### Administración del tratamiento y plan experimental.

La desoxicitidina (dC) y la desoxitimidina (dT) se administraron en 50 µl de leche artificial Esbilac para mascotas pequeñas (Pet-Ag) mediante sonda oral diariamente a ratones con mutación de *Tk2* H126N (*Tk2*<sup>-/-</sup>) y genéticamente intactos de control de edad correspondiente (*Tk2*<sup>+</sup>) usando 2 dosis, 260 mg/kg/día y 520 mg/kg/día, desde el día 4 a 29 días posnatales. A los 21 días de edad, los ratones se separaron de la madre y el tratamiento continuó con la administración de dC y dT en agua potable usando dosis equimolares respectivamente de 1,6 mM y 3,2 mM. Se pesó un grupo de control negativo de ratones mutantes de *Tk2* y genéticamente intactos de control no tratados y se observó con atención para la comparación.

#### Evaluación de fenotipo

El peso corporal se evaluó diariamente, ya que se ha observado previamente que la incapacidad para aumentar de peso es el primer signo de enfermedad (Akman, et al. 2008).

Para definir el grado de seguridad y eficacia de dT/dC, se compararon el tiempo de supervivencia, edad de aparición de la enfermedad, tipo y gravedad de los síntomas, aparición de efectos secundarios y proporción de finalización del tratamiento debido a sucesos adversos en ratones *Tk2* tratados y no tratados. El comportamiento general, el tiempo de supervivencia y los pesos corporales de los ratones se evaluaron diariamente a partir del día 4 posnatal.

#### Grupo de dNTP por ensayo de extensión de polimerasa

Los tejidos se homogeneizaron sobre hielo en 10 volúmenes (p/v) de tampón MTSE frío (manitol 210 mM, sacarosa 70 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EGTA 0,2 mM, BSA al 0,5%) y se centrifugaron a 1.000 g durante 5 minutos a 4°C, seguido de tres centrifugaciones a 13.000 g durante 2 minutos a 4°C. El líquido sobrenadante se hizo precipitar con metanol al 60%, se mantuvo 2 horas a -80°C, se hirvió 3 minutos, se almacenó a -80°C (de 1 hora a toda la noche) y

se centrifugó a 20.800 g durante 10 minutos a 4°C. Los líquidos sobrenadantes se evaporaron hasta que se secaron y el sedimento se volvió a suspender en 65 µl de agua y se almacenó a -80°C hasta su análisis. Para minimizar la interferencia de ribonucleótidos, se determinaron los grupos de dNTP totales como se ha descrito (Ferraro, et al. 2010; Martí, et al. 2012a). En resumen, se generaron reacciones de 20 µl de volumen mezclando 5 µl de muestra o dNTP de referencia con 15 µl de tampón de reacción [0,025 U/ml de ADN polimerasa ThermoSequenase (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EE.UU.) o polimerasa Taq (Life Technologies, NY, EE.UU.), 0,75 µM de 3H-dTTP o 3H-dATP (Moravek Biochemicals), oligonucleótido específico 0,25 µM, Tris-HCl 40 mM, pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, DTT 5 mM]. Después de 60 minutos a 48°C, se aplicaron como manchas puntuales 18 ml de reacción sobre filtros Whatman DE81, se secaron al aire y se lavaron tres veces durante 10 minutos con Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> al 5%, una vez en agua destilada y una vez en etanol absoluto. La radiactividad retenida se determinó por recuento de centelleo.

#### Mediciones de nucleósidos por HPLC

Los niveles de desoxitimidina (dT), desoxiuridina (dU), uracilo (U) y timina (T) se evaluaron por un método de HPLC con elución con gradiente como se ha descrito previamente (Lopez, et al. 2009; Martí, et al. 2012b), con modificaciones menores. Brevemente, se inyectaron muestras desproteinizadas en un sistema de HPLC Alliance (Waters Corporation) con una columna de fase inversa Alltima C18NUC (Alltech) con un caudal constante de 1,5 ml/min (excepto donde se indique) usando cuatro tampones: eluyente A (fosfato de potasio 20 mM, pH 5,6), eluyente B (agua) y eluyente C (metanol). Las muestras se eluyeron durante 60 minutos con un gradiente de la siguiente manera: 0-5 min, 100% de eluyente A; 5-25 min, 100-71% de eluyente A, 29% de eluyente B; 25-26 min, 0-100% de eluyente C; 26-30 min, 100% de eluyente C; 30-31 min, 0-100% de eluyente B; 31-35 min, 100% eluyente B (1,5-2 ml/min); 35-45 min, 100% de eluyente B (2 ml/min); 45-46 min, 100% de eluyente B (2-1.5 ml/min); 46-47 min, 0-100% de eluyente C; 47-50 min, 100% de eluyente C; 50-51 min, 0-100% de eluyente A; y 51-60 min, 100% de eluyente A.

La absorbancia de los eluatos se siguió a 267 nm y los picos de dThd y dUrd se cuantificaron comparando sus áreas de pico con una curva de calibración obtenida con patrones acuosos. Para la identificación definitiva de los picos de desoxitimidina, desoxiuridina, uracilo y timina para cada muestra, se trató una segunda parte alícuota con exceso de TP de *E. coli* purificada (Sigma) para eliminar específicamente la dT y dU. El límite de detección de este método es 0,05 mmol/l para todos los nucleósidos. Los resultados se expresaron como nmol/mg de proteína.

#### RT-qPCR: cuantificación de ADN mitocondrial

La PCR en tiempo real se llevó a cabo con los cebadores y las sondas para el gen murino COX I (ADNmt) y la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de ratón (GAPDH, ADNn) (Applied Biosystems, Invitrogen, Foster City, CA, EE.UU.) como se describe como se describe usando el método de ddCt en un sistema de PCR en tiempo real Step One Plus (Applied Biosystems) (Dorado, et al. 2011). Los valores de ADNmt se normalizaron respecto a los valores de ADNn y se expresaron como porcentaje relativo al tipo natural (100%).

#### Niveles de proteínas de la cadena respiratoria mitocondrial

Treinta microgramos de extractos de cerebro y cerebelo de cerebro completo se sometieron a electroforesis en un gel SDS al 12%-PAGE, se transfirieron a membranas de PVDF Immun-Blot™ (Biorad, Hercules, CA, EE.UU.) y se hibridaron con cóctel de anticuerpos MitoProfile® Total OXPHOS Rodent WB Antibody Cocktail (MitoSciences, Eugene, OR, EE.UU.). La interacción proteína-anticuerpo se detectó con el anticuerpo de ratón anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE.UU.), usando el sistema de detección de transferencia Western ECL Plus de Amersham™ (GE Healthcare Life Sciences, Reino Unido). La cuantificación de proteínas se llevó a cabo usando el software NIH ImageJ 1.37V. El valor de gris promedio se calculó dentro de las áreas seleccionadas como la suma de los valores de gris de todos los píxeles en la selección dividida entre el número de píxeles.

#### Actividades enzimáticas de la cadena respiratoria mitocondrial mediante análisis por espectrofotómetro

El análisis de las enzimas mitocondriales de la RC se realizó en tejido cerebral como se ha descrito previamente (DiMauro, et al. 1987).

#### Métodos estadísticos

Los datos se expresan como la media ± DE de al menos 3 experimentos por grupo. La prueba de Gehan-Breslow-Wilcoxon se usó para comparar la proporción de supervivencia de cada grupo de ratones. Un valor de p <0,05 se consideró estadísticamente significativo.

Ejemplo 2 - La administración de dC/dT a ratones Tk2<sup>-/-</sup> retrasó el inicio clínico de la deficiencia de TK2 y aumentó la supervivencia

Se administró una dosis de 260 y 520 mg/kg/día de cada uno de los desoxinucleósidos (dC/dT) a los ratones Tk2<sup>-/-</sup>. Estas dosis de desoxinucleósidos eran el equivalente molar de 400 y 800 mg/kg/día de dCMP+dTMP respectivamente.

Los ratones tratados con dC+dT oral (260 o 520 mg/kg/día desde los 4 días de edad) aparecían normales hasta el día 21 posnatal (Figura 1). Después de los 21 días de edad, los ratones mutantes tratados con una dosis de 260 mg/kg/día (Tk2<sup>-/-</sup> 260 mg/kg/día de dC/dT) dejaron de aumentar de peso y desarrollaron temblores leves en la cabeza y debilidad que llevaron a la muerte el día 31+4.3 posnatal (Figura 2).

- 5 Los ratones mutantes tratados con 520 mg/kg/día de dC+dT (Tk2<sup>-/-</sup> 520 mg/Kg/día de dC/dT) continuaron aumentando de peso durante una semana adicional, pero posteriormente manifestaron un deterioro similar a los de Tk2<sup>-/-</sup> 260 mg/Kg/día de dC/dT, y murieron el día 43+10 posnatal. Estos resultados son comparables a los mostrados por ratones Tk2<sup>-/-</sup> tratados con 200 o 400 mg/kg/día de tratamiento con dCMP/dTMP oral. Se hizo el seguimiento de Tk2<sup>+260</sup> mg/kg/día de dC/dT y Tk2<sup>+520</sup> mg/kg/día de dC/dT hasta el día 60 posnatal. No se observaron efectos secundarios.
- 10 Como se muestra, la duración de vida de los Tk2<sup>-/-</sup> tratados aumentó significativamente. Los ratones Tk2<sup>-/-</sup> no tratados mostraron una duración de vida media de 13 días, mientras que los ratones tratados sobrevivieron una media de 31 y 40 días con la dosis de 260 y 520 mg/kg/día, respectivamente (Figura 2). Es interesante que uno de los ratones sobrevivió hasta el día 56 posnatal, que ha sido la duración de vida más larga para el modelo de ratón con mutación de Tk2 hasta la fecha.
- 15 Ejemplo 3 - dC/dT oral mejora las anomalías moleculares en el cerebro y el hígado

La medición de dNTP en el extracto mitocondrial mostró que tanto los Tk2<sup>-/-</sup> 260 mg/Kg/día de dC/dT como los Tk2<sup>-/-</sup> 520 mg/Kg/día de dC/dT no corregían completamente los desequilibrios del grupo de dNTP mitocondriales el día 13 posnatal y manifestaron efectos variables en tejidos con una recuperación completa de deficiencias de dCTP en el cerebro, mientras que el dTTP se corrigió en el hígado. En cambio, las deficiencias de dTTP en el cerebro y dCTP en el hígado se mantuvieron graves a pesar de la suplementación con desoxinucleósidos (Figura 3).

20 En ratones Tk2<sup>-/-</sup> 260 mg/Kg/día de dC/dT y Tk2<sup>-/-</sup> 520 mg/Kg/día de dC/dT en el día 13 posnatal, el tratamiento evitó el agotamiento de ADNmt en el corazón, hígado, riñón, intestino y músculo (Figura 4). En cambio, el número de copias de ADNmt solo mejoró parcialmente en el cerebro el día 13 posnatal de una manera dependiente de la dosis con relaciones de ADNmt/ADNn con respecto al cerebro de control que alcanzaron 39% con 260 mg/kg/día de dC+dT y 52% con 520 mg/kg/día. Las mediciones de las bases dT y uracilo en el cerebro por HPLC mostraron niveles más altos en animales tratados con dC+dT o con dCMP+dTMP (Figura 5), lo que indica que tanto los desoxinucleósidos como los monofosfatos de desoxinucleósidos atraviesan la barrera hematoencefálica. En el día 29 posnatal, el agotamiento de ADNmt era parcialmente recuperado por 260 y 520 mg/kg/día de terapia de dC+dT en el corazón (40 y 35%), hígado (46 y 45%), riñón (38 y 42%) y músculo (24 y 35%), pero sorprendentemente se recuperó completamente en el

25

30 intestino (82 y 84%) (Figura 4).

Ejemplo 4 - dC/dT oral mejora las anomalías bioquímicas en el cerebro

Las actividades de las enzimas de la cadena respiratoria (RCE) y los niveles de proteínas se recuperaron por completo en el cerebro de los TK2<sup>-/-</sup> 260 mg/Kg/día de dC/dT el día 13 posnatal (Figura 6). Las actividades de las RCE también se estaban restablecidas el día 29 posnatal, y solo se pudo observar una ligera disminución de la actividad del complejo I en TK2<sup>-/-</sup> 520 mg/Kg/día de dC/dT (Figura 6). Los niveles de proteína de las RCE en el cerebro se restablecieron parcialmente el día 29 posnatal con niveles más altos en TK2<sup>-/-</sup> 520 mg/Kg/día de dC/dT que en TK2<sup>-/-</sup> 260 mg/Kg/día de dC/dT (Figura 7). Estas diferencias en los niveles de proteína eran consistentes con las diferencias en el agotamiento de ADNmt en cerebros de ratones mutantes tratados el día 29 posnatal, y probablemente explicaban la supervivencia prolongada observada con la dosis más alta.

40 Ejemplo 5- La administración de dC/dT en pacientes con deficiencia de TK2 era eficaz

A continuación se resumen los síntomas, dosis y resultados de los pacientes con deficiencia de TK2 que han recibido terapia de desoxinucleósidos bajo la supervisión y el control de los autores de la invención.

Paciente 1

45 Este paciente nació en los Estados Unidos en febrero de 2011. Sus síntomas se presentaron a los 12 meses con hipotonía y cabeza floja. Nunca ha caminado. También tiene debilidad de los músculos respiratorios y recibió ventilación mecánica a los 19 meses, la cual todavía recibe 24 horas/día. También tenía una sonda de alimentación desde los 19 meses.

Anteriormente recibía 100 mg/kg/día y después 200 mg/kg/día de dCMP y dTMP. Con esta terapia, era capaz de agarrar objetos pequeños y su peso aumentó de 10,4 kg a 19,5 kg.

50 En octubre de 2015, comenzó a recibir 260 mg/kg/día de dC y dT, que se aumentó a 340 mg/kg/día de dC y dT. Después de dos meses, movía mejor las manos y la cabeza, podía mantenerse de pie 5 minutos con el apoyo de una persona, comenzaba a toser, y su frecuencia cardíaca era más lenta (de 140-170 lpm durante el día, a 100-120 lpm durante día).

El 23 de marzo de 2016, la dosis se aumentó a 400 mg/kg/día de dC y dT. Después de 6 semanas con esta terapia,

mostró mejoras adicionales: era capaz de sentarse en una silla aproximadamente 5 horas/día; se mantenía de pie en un "bipedestador" durante 1,5 horas; casi agarraba y sostenía pequeños animales de peluche; presionaba botones de ordenador; desataba sus pañales y apuntaba su pene para mojar a la persona que cambiaba el pañal; y mantenía las rodillas flexionadas durante unos segundos.

- 5 El único efecto adverso observado durante el tratamiento fue diarrea.

Paciente 2

10 Esta paciente nació en España en 1987. Comenzó a mostrar síntomas a los 3 años de edad, incluyendo debilidad muscular proximal. Perdió la capacidad de caminar a la edad de 13 años y recibía ventilación 24 horas al día. Anteriormente estaba tomando 200 mg/kg/día de dAMP y dCMP y mostró un aumento de peso y una disminución de 24 a 22 horas al día de ventilación.

Ha estado recibiendo terapia de desoxinucleósidos desde junio de 2015 con 400 mg/kg/día de dC y dT, y ha mostrado una mejora en la fuerza muscular, su peso y la ventilación se han estabilizado, y está disfrutando de una mejor calidad de vida.

Los únicos efectos adversos observados durante el tratamiento fueron diarrea y pérdida de cabello.

- 15 Paciente 3

Este paciente nació en España en 1985. Sus síntomas comenzaron a los 6 años de edad con debilidad muscular facial, proximal y axial. Comenzó recibiendo 200 mg/kg/día de dT y dC en junio de 2015 y hasta la fecha, su estado ha mejorado con mejoras en la prueba de caminar de 6 minutos, tiempo para levantarse y salir, y subir y bajar 4 escalones.

- 20 El único efecto adverso observado durante el tratamiento fue diarrea.

Paciente 4

Este paciente nació en España en febrero de 2009. Sus síntomas se manifestaron a los seis meses con falta de crecimiento. Comenzó recibiendo 230 mg/kg/día de dC y dT en julio de 2015. En enero de 2016, mostró una mejoría en su estado y estaba comiendo mejor.

- 25 No se observaron efectos adversos.

Paciente 5

Este paciente nació en España en 1957 y comenzó a tener síntomas a los 50 años de ortopnea y debilidad diafragmática. Está recibiendo BiPAP por la noche. Comenzó con 200 mg/kg/día de dC y dT en noviembre de 2015.

No se observaron efectos adversos.

- 30 Paciente 6

35 Este paciente nació en España en octubre de 2011 y comenzó a mostrar síntomas a los 15 meses, incluyendo hipotonía y debilidad. Perdió la locomoción a los 22 meses y tiene debilidad muscular respiratoria. Comenzó la ventilación mecánica a los 16 meses y actualmente recibe BiPAP doce horas al día. Anteriormente recibía 100 mg/kg/día de dCMP y dAMP que se aumentó a 400 mg/kg/día. Su fuerza como se muestra en la escala de Egen Klassification mejoró (de 28/30 a 13/30) y su peso aumentó de 9,8 kg a 12,3 kg.

Comenzó la terapia con desoxinucleósidos en abril de 2015 con 400 mg/kg/día de dC y dT. En octubre de 2015, su cambio en la escala de Egen Klassification pasó de 13/30 a 11/30 y su peso aumentó a 16,5 kg desde 12,3 kg.

No se observaron efectos adversos.

Paciente 7

40 Esta paciente nació en España en noviembre de 2012. Comenzó a mostrar síntomas a los 17 meses, incluyendo debilidad e hipotonía. Perdió la locomoción a los 22 meses y comenzó la ventilación mecánica a los 29 meses. Anteriormente recibía 100 mg/kg/día de dCMP y dAMP que se aumentó a 400 mg/kg/día. Su fuerza como se muestra en la escala Egen Klassification mejoró (de 30/30 a 24/30) y su peso aumentó de 11 kg a 15,7 kg.

45 Comenzó la terapia con desoxinucleósidos en abril de 2015 con una dosis de 400 mg/kg/día de dT y dC. En noviembre de 2015, su cambio en la escala Egen Klassification pasó de 24/30 a 19/30 y su peso aumentó de 15,7 kg a 17 kg.

No se observaron efectos adversos.

Paciente 8

5 Esta paciente nació en Chile en septiembre de 1989 y comenzó a mostrar síntomas a los 11 meses con caídas frecuentes y deterioro progresivo de la marcha. Perdió la capacidad de caminar sola a los 4 años de edad. Había estado recibiendo terapia de nucleótidos anteriormente y mostró una mejora en su movilidad, incluyendo caminar sin ayuda, estar de pie más tiempo, subir escaleras, asistir a clases de gimnasia y atender sus necesidades personales.

Cambió a la terapia de desoxinucleósidos en febrero de 2016 con una dosis de 260 mg/kg/día de dC y dT, y después aumentó a una dosis de 400 mg/kg/día de dC y dT en mayo de 2016 y continuó mostrando mejoría.

No se observaron efectos adversos.

Paciente 9

10 Este paciente nació en Guatemala en septiembre de 1989. Comenzó con 130 mg/kg/día de dC y dT en agosto de 2015 y aumentó a 260 mg/kg/día en febrero de 2016. Ha mostrado una mejor energía.

No se observaron efectos adversos.

**Referencias**

15 Akman, et al. (2008) Thymidine kinase 2 (H126N) knock in mice show the essential role of balanced deoxy ucleotide pools for mitochondrial DNA maintenance. *Hum. Mol. Genet.* 17:2433-2440

Alston, et al. (2013) Late-onset respiratory failure due to TK2 mutations causing multiple mtDNA deletions. *Neurology* 81 :2051-3

Bartesaghi, et al. (2010) Loss of thymidine kinase 2 alters neuronal bioenergetics and leads to neurodegeneration. *Hum. Mol. Genet.* 19: 1669-77

20 Béhin, et al. (2012) Adult cases of mitochondrial DNA depletion due to TK2 defect An expanding spectrum. *Neurology* 78:644-648

Blakely, et al. (2008) Novel mutations in the TK2 gene associated with fatal mitochondrial DNA depletion myopathy. *Neuromuscular Disorders* 18:557-560

25 Bourdon, et al. (2007) Mutation of RRM2B, encoding p53 -controlled ribonucleotide reductase (p53R2), causes severe mitochondrial DNA depletion. *Nature Genetics* 39:776-780

Carrozzo, et al. (2003) Mutation analysis in 16 patients with mtDNA depletion. *Hum. Mutat.* 21 :453-454

Chanprasert, et al. (2013) Molecular and clinical characterization of the myopathic form of mitochondrial DNA depletion syndrome caused by mutations in the thymidine kinase (TK2) gene. *Mol. Genet. Metab.* 110:153-61

30 Chanprasert, et al. (2012) TK2-Related Mitochondrial DNA Depletion Syndrome, Myopathic Form. GeneReviews® Internet, 6 de diciembre, 2012

Collins, et al. (2009) Progressive myotiber loss with extensive fibro-fatty replacement in a child with mitochondrial DNA depletion syndrome and novel thymidine kinase 2 gene mutations. *Neuromuscular Disorders* 19:784-787

Copeland (2008) Inherited mitochondrial diseases of DNA replication. *Ann. Rev. Med.* 59: 131 – 146

DiMauro, et al. (1987) Cytochrome c oxidase deficiency in Leigh syndrome. *Ann. Neurol.* 22:498-506

35 DiMauro, Schon. (2003) Mitochondrial respiratory-chain diseases. *New England Journal of Medicine* 348 :2656-2668

DiMauro, Hirano. (2005) Mitochondrial encephalomyopathies: an update. *Neuromuscul. Disord.* 15:276-286

Dorado, et al. (2011) Onset and organ specificity of Tk2 deficiency depends on Tkl down-regulation and transcriptional compensation. *Hum. Mol. Genet.* 20:155-64

40 Elpeleg, et al. (2005) Deficiency of the ADP-forming succinyl-CoA synthase activity is associated with encephalomyopathy and mitochondrial DNA depletion. *Am. J. Hum. Genet.* 76: 1081-1086

Ferraro, et al. (2010) Quantitation of cellular deoxynucleoside triphosphates. *Nucleic Acids Research* 38:e85

Galbiati, et al. (2006) New mutations in TK2 gene associated with mitochondrial DNA depletion. *Pediatr. Neurol.* 34: 177-185

45 Garone, et al. (2012). MP VI 7 Mutations Causing Adult-Onset Multisystemic Disorder With Multiple Mitochondrial DNA Deletions. *Arch Neurol* 69: 1648- 1651

- Garone, et al. (2014). Deoxypyrimidine monophosphate bypass therapy for thymidine kinase 2 deficiency. *EMBO Mol Med* 6: 1016-1027
- Garone, et al. (2016) in preparation, "Phenotypic Spectrum and Retrospective Natural History of Thymidine Kinase 2 Deficiency"
- 5 Gotz, et al. (2008) Thymidine kinase 2 defects can cause multi-tissue mtDNA depletion syndrome. *Brain* 131 :2841-2850
- Hirano, et al. (2001) Defects of intergenomic communication: autosomal disorders that cause multiple deletions and depletion of mitochondrial DNA. *Semin. Cell. Develop. Biol.* 12:417-427
- 10 Hirano, et al. (2004) MtDNA maintenance and stability genes: MNGIE and mtDNA depletion syndromes. En: Kohler, Bauer, editors. *Mitochondrial Function and Biogenetics*. Berlin: Springer- Verlag. pág. 177-200
- Leshinsky-Silver, et al. (2008) A defect in the thymidine kinase 2 gene causing isolated mitochondrial myopathy without mtDNA depletion. *Eur. J. Paediatr. Neurol.* 12:309-13
- Lesko, et al. (2010) Two novel mutations in thymidine kinase-2 cause early onset fatal encephalomyopathy and severe mtDNA depletion. *Neuromuscul. Disord.* 20: 198-203
- 15 Longley, et al. (2006). Mutant POLG2 disrupts DNA polymerase gamma subunits and causes progressive external ophthalmoplegia. *Am J Hum Genet.* 78: 1026-1034
- Lopez, et al. (2009) Unbalanced deoxynucleotide pools cause mitochondrial DNA instability in thymidine phosphorylase deficient mice. *Human Molecular Genetics* 18:714-22
- 20 Mancuso, et al. (2003) Mitochondrial myopathy of childhood associated with mitochondrial DNA depletion and a homozygous mutation (T77M) in the TK2 gene. *Arch. Neurol.* 60: 1007-9
- Mancuso, et al. (2002) Mitochondrial DNA depletion: mutations in thymidine kinase gene with myopathy and SMA. *Neurology.* 59:1197-202
- Mandel, et al. (2001) The deoxyguanosine kinase gene is mutated in individuals with depleted hepatocerebral mitochondrial DNA. *Nature Genet.* 29:337-341
- 25 Martí, et al. (2010) Hearing loss in a patient with the myopathic form of mitochondrial DNA depletion syndrome and a novel mutation in the TK2 gene. *Pediatr. Res.* 68:151-4
- Martí, et al. (2012a) Measurement of mitochondrial dNTP pools. *Methods Mol. Biol.* 837: 135-148
- Martí, et al. (2012b) Assessment of thymidine phosphorylase function: measurement of plasma thymidine (and deoxyuridine) and thymidine phosphorylase activity. *Methods Mol. Biol.* 837: 121-133
- 30 Naviaux, Nguyen. (2004) POLG mutations associated with Alpers' syndrome and mitochondrial DNA depletion. *Ann. Neurol.* 55:706-712
- Nishino, et al. (1999). Thymidine phosphorylase gene mutations in MNGIE, a human mitochondrial disorder. *Science* 283:689-692.
- 35 Oskoui, et al. (2006) Clinical spectrum of mitochondrial DNA depletion due to mutations in the thymidine kinase 2 gene. *Arch. Neurol.* 63: 1122-1 126.
- Ostergaard, et al. (2007) Deficiency of the alpha subunit of succinate-coenzyme A ligase causes fatal infantile lactic acidosis with mitochondrial DNA depletion. *Am. J. Hum. Genet.* 81: 383-387
- Paradas, et al. (2012) TK2 mutation presenting as indolent myopathy. *Neurology* 29:504-506
- 40 Ronchi, et al. (2012). Next-generation sequencing reveals DGUOK mutations in adult patients with mitochondrial DNA multiple deletions. *Brain* 135:3404-3415.
- Roos, et al. (2014) Mitochondrial DNA depletion in single fibers in a patient with novel TK2 mutations. *Neuromuscul. Disord.* 24:713-20
- Saada, et al. (2001) Mutant mitochondrial thymidine kinase in mitochondrial DNA depletion myopathy. *Nature Genet.* 29:342-344
- 45 Saada, et al. (2003) Mitochondrial deoxyribonucleoside triphosphate pools in thymidine kinase 2 deficiency. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 310:963-966

- Sarzi, et al. (2007) Twinkle helicase (PEOI) gene mutation causes mitochondrial DNA depletion. *Ann. Neurol.* 62: 579-587
- Spelbrink, et al. (2001). Human mitochondrial DNA deletions associated with mutations in the gene encoding Twinkle, a phage T7 gene 4-like protein localized in mitochondria. *Nature Genet.* 28:223-231
- 5 Spinazzola, et al. (2006) MPV17 encodes an inner mitochondrial membrane protein and is mutated in infantile hepatic mitochondrial DNA depletion. *Nature Genet.* 38:570-575
- Tulinius, et al. (2005) Novel mutations in the thymidine kinase 2 gene (TK2) associated with fatal mitochondrial myopathy and mitochondrial DNA depletion. *Neuromuscul. Disord.* 15:412-415
- 10 Tyynismaa, et al. (2012) Thymidine kinase 2 mutations in autosomal recessive progressive external ophthalmoplegia with multiple mitochondrial DNA deletions. *Hum. Mol. Genet.* 21:66-75
- Tyynismaa, et al. (2009). A heterozygous truncating mutation in RRM2B causes autosomal-dominant progressive external ophthalmoplegia with multiple mtDNA deletions. *Am. J. Hum. Genet.* 85: 290-295
- Van Goethem, et al. (2001) Mutation of POLG is associated with progressive external ophthalmoplegia characterized by mtDNA deletions. *Nature Genet.* 28:211-212.
- 15 Vila, et al. (2003) Reversion of mtDNA depletion in a patient with TK2 deficiency. *Neurology* 60:1203-1205
- Wang, et al. (2005) Molecular insight into mitochondrial DNA depletion syndrome in two patients with novel mutations in the deoxyguanosine kinase and thymidine kinase 2 genes. *Mol. Genet. Metab.* 84:75-82.

**REIVINDICACIONES**

1. Una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición que comprende una mezcla de desoxicitidina (dC) y desoxitimidina (dT) para usar en un método de tratamiento de la deficiencia de timidina quinasa 2 (TK2) en un sujeto humano que lo necesite.
- 5 2. La composición para usar según la reivindicación 1, en donde la cantidad terapéuticamente efectiva es
  - a) entre 100 mg/kg/día y 1.000 mg/kg / día de cada desoxinucleósido en la composición; o:
  - b) entre 200 mg/kg/día y 800 mg/kg/día de cada desoxinucleósido en la composición; o:
  - c) entre 250 mg/kg/día y 400 mg/kg/día de cada desoxinucleósido en la composición.
- 10 3. La composición para usar según la reivindicación 1, en donde la cantidad terapéuticamente efectiva es entre 100 mg/kg/día y 400 mg/kg/día de cada desoxinucleósido en la composición.
4. La composición para usar según la reivindicación 1, en donde la cantidad terapéuticamente efectiva es entre 250 mg/kg/día y 400 mg/kg/día de cada desoxinucleósido en la composición.
5. La composición para para usar según la reivindicación 1, en donde la cantidad terapéuticamente efectiva es
  - a) entre 100 mg/kg/día y 1.000 mg/kg/día de los desoxinucleósidos totales en la composición; o:
  - 15 b) entre 200 mg/kg/día y 800 mg/kg/día de los desoxinucleósidos totales en la composición; o:
  - c) entre 250 mg/kg/día y 400 mg/kg/día de los desoxinucleósidos totales en la composición.
6. La composición para usar según cualquier reivindicación precedente, en donde la proporción de desoxicitidina (dC) y desoxitimidina (dT) es 50/50, 5/95, 10/90, 15/85, 20/80, 25/75, 30/70, 35/65, 40/60, 45/55, 55/45, 60/40, 65/35, 70/30, 75/25, 80/20, 85/15, 90/10 o 95/5.
- 20 7. La composición para usar según la reivindicación 6, en donde dicha relación de desoxicitidina (dC) y desoxitimidina (dT) es 50/50.
8. La composición para usar según cualquier reivindicación precedente, en donde la composición se administra una vez al día, dos veces al día, tres veces al día, cuatro veces al día, cinco veces al día o seis veces al día.
9. La composición para usar según cualquier reivindicación precedente, en donde la composición se administra por vía oral, intratecal, enteral o intravenosa.
- 25 10. La composición para usar según la reivindicación 9, en donde la composición se administra por vía oral; y en donde dicha composición comprende además leche de vaca, leche materna humana, leche de inicio o agua.
11. La composición para usar según cualquier reivindicación precedente, que comprende además administrar al sujeto un inhibidor de timidina fosforilasa.
- 30 12. La composición para usar según la reivindicación 11, en donde el inhibidor de la timidina fosforilasa es tipiracilo.
13. La composición para usar según cualquier reivindicación precedente, que comprende además administrar al sujeto un inhibidor de citidina desaminasa.
14. La composición para usar según la reivindicación 13, en donde el inhibidor de la citidina desaminasa es la tetrahidrouridina [THU].
- 35 15. La composición para usar según la reivindicación 1, en donde la cantidad terapéuticamente efectiva de la composición administrada al sujeto se aumenta con el tiempo; opcionalmente en donde una primera cantidad terapéuticamente efectiva de la composición administrada al sujeto es aproximadamente 100 mg/kg/día de composición, y en donde la cantidad terapéuticamente efectiva de la composición se aumenta a lo largo del tiempo a 200 mg/kg/día, a 400 mg/Kg/día, a 800 mg/kg/día, a 1.000 mg/kg/día.
- 40 16. La composición para usar de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde la composición comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.
17. La composición para usar según la reivindicación 1, en donde el método de tratamiento comprende además vigilar al sujeto después de la administración de la composición, que comprende:
  - a. observar la fuerza y control muscular;
  - 45 b. observar diferencias en altura y peso;

c. observar la movilidad; y

d. determinar una mejora en el estado del sujeto si cualquiera de las observaciones (a) - (c) aumenta después de la administración de la composición, y determinar que no hay mejora si cualquiera de las observaciones (a) - (c) es igual o menor después de la administración de la composición.

- 5 18. La composición para usar según la reivindicación 17, en donde si la determinación de que no hay mejora se realiza en la etapa (d), se aumenta la cantidad terapéuticamente efectiva de la composición.
19. La composición para usar según la reivindicación 1, en donde el método de tratamiento comprende además vigilar al sujeto para detectar un efecto adverso después de la administración de la composición, en donde si se observa un efecto adverso, se disminuye la cantidad terapéuticamente efectiva de la composición.
- 10 20. La composición para usar según la reivindicación 19, que comprende además vigilar en el sujeto el efecto adverso observado después de disminuir la cantidad terapéuticamente efectiva de la composición, en donde si el efecto adverso ya no se observa, se aumenta la cantidad terapéuticamente efectiva de la composición.
21. La composición para usar según la reivindicación 19, en donde un efecto adverso es la intolerancia gastrointestinal.
- 15 22. La composición para usar según la reivindicación 19, en donde el efecto adverso se elige del grupo que consiste en diarrea y distensión abdominal.

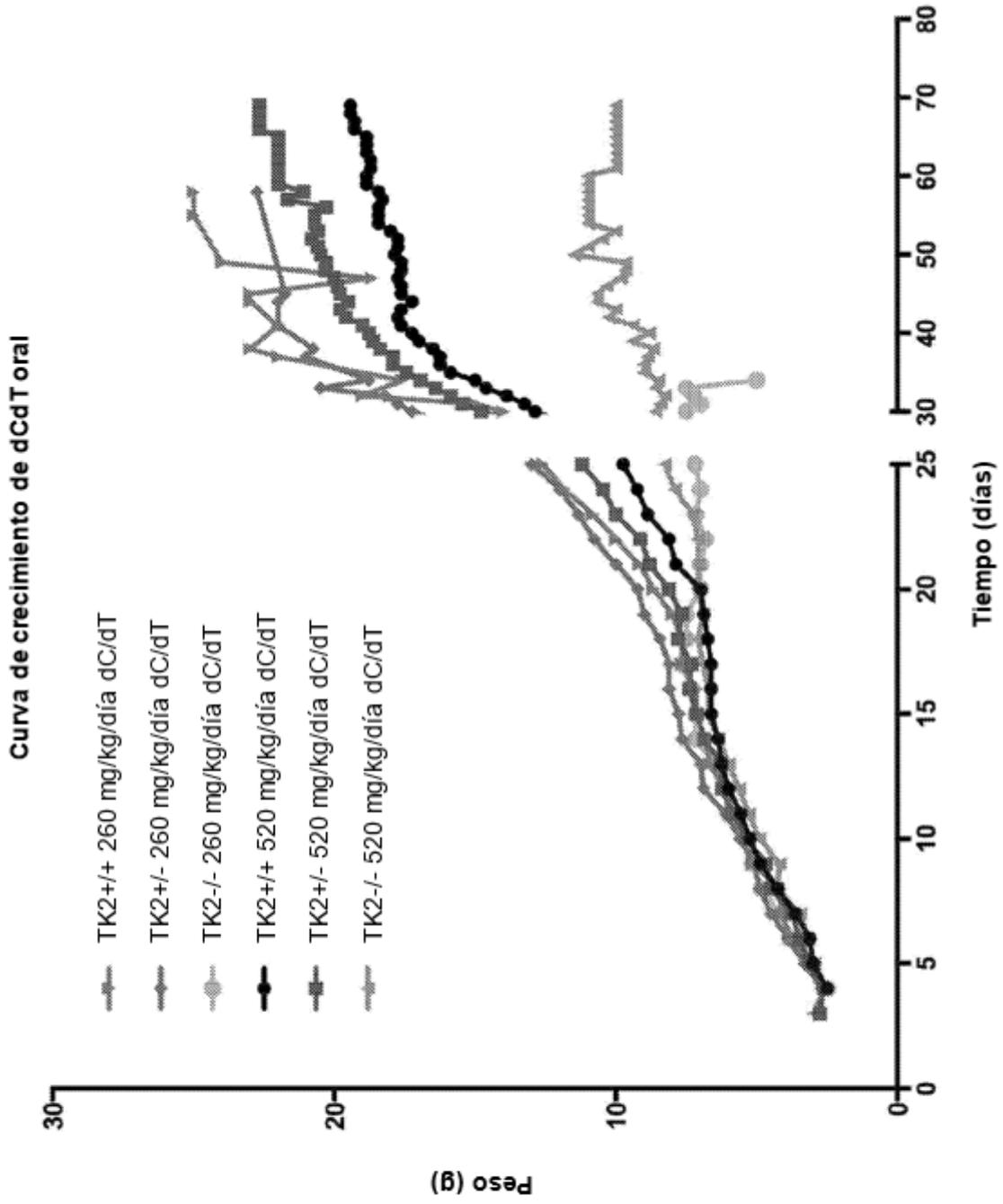


Figura 1

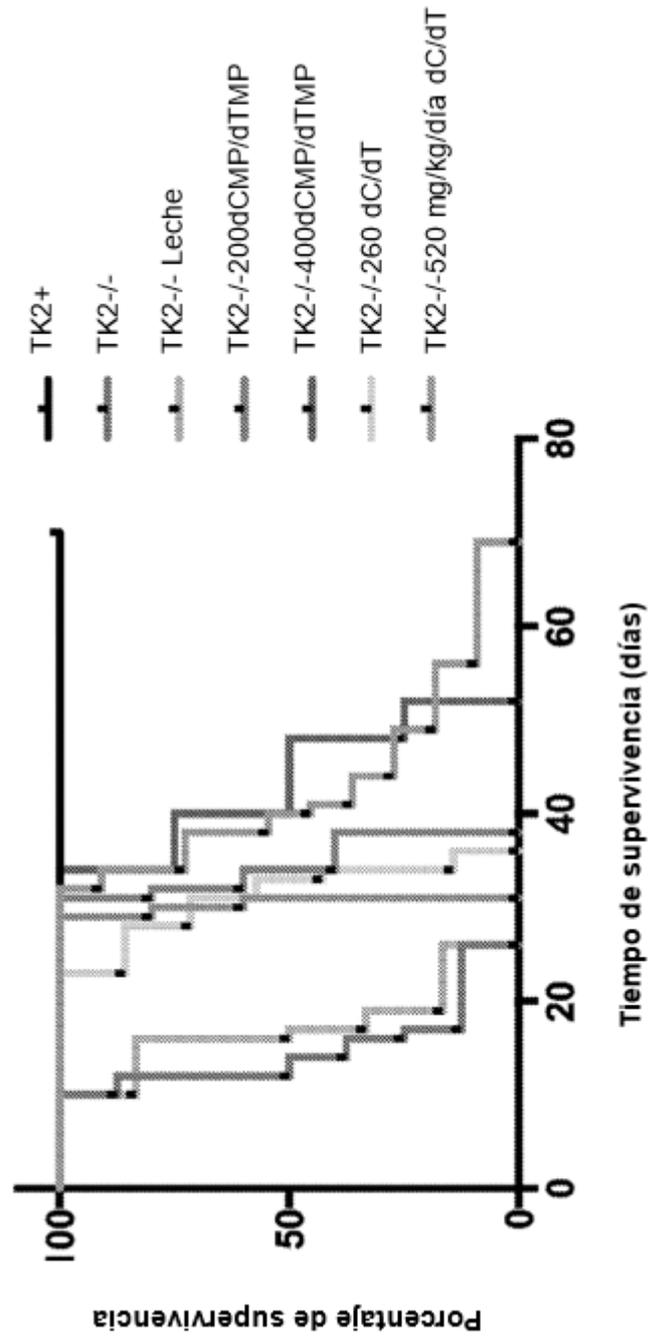
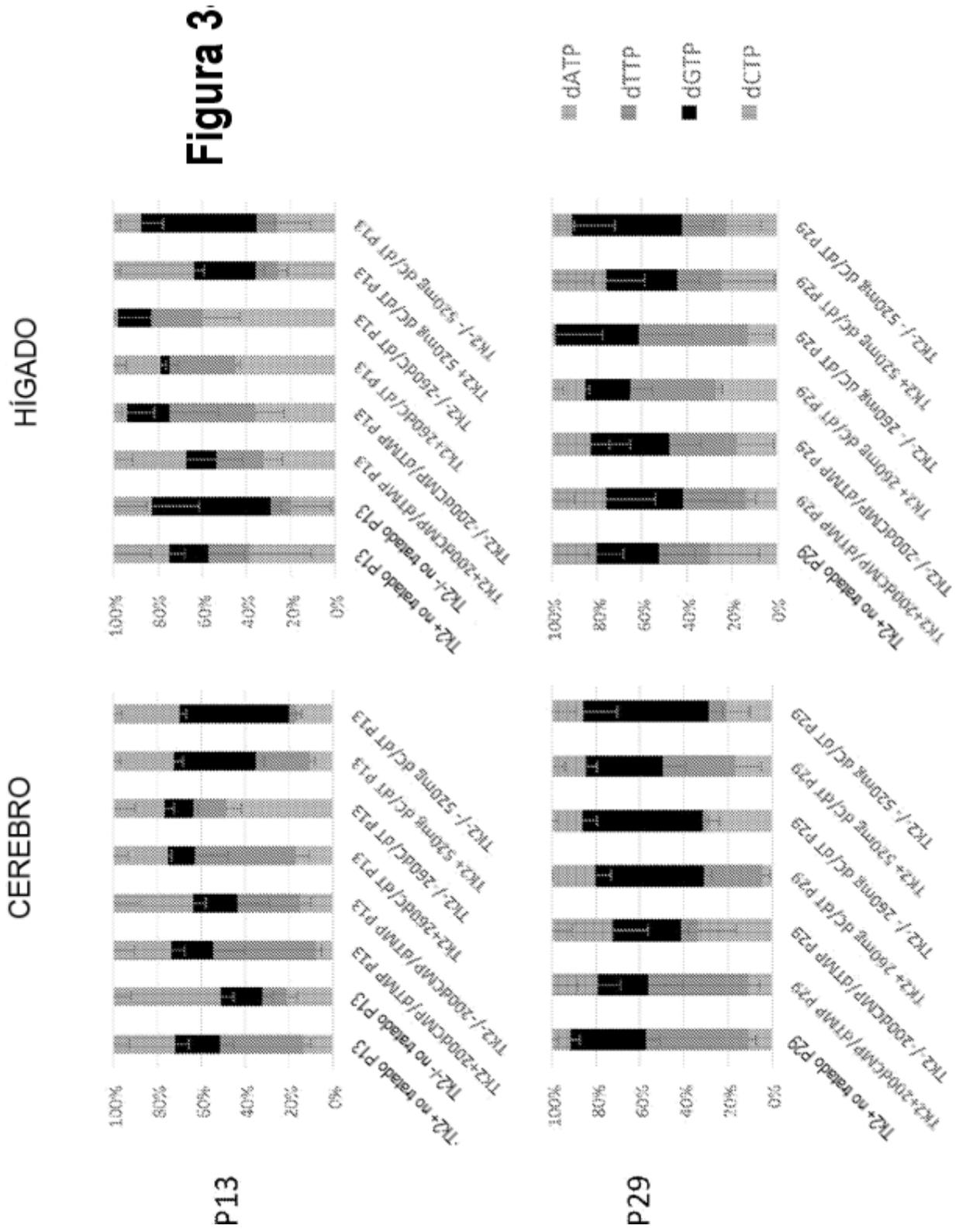


Figura 2



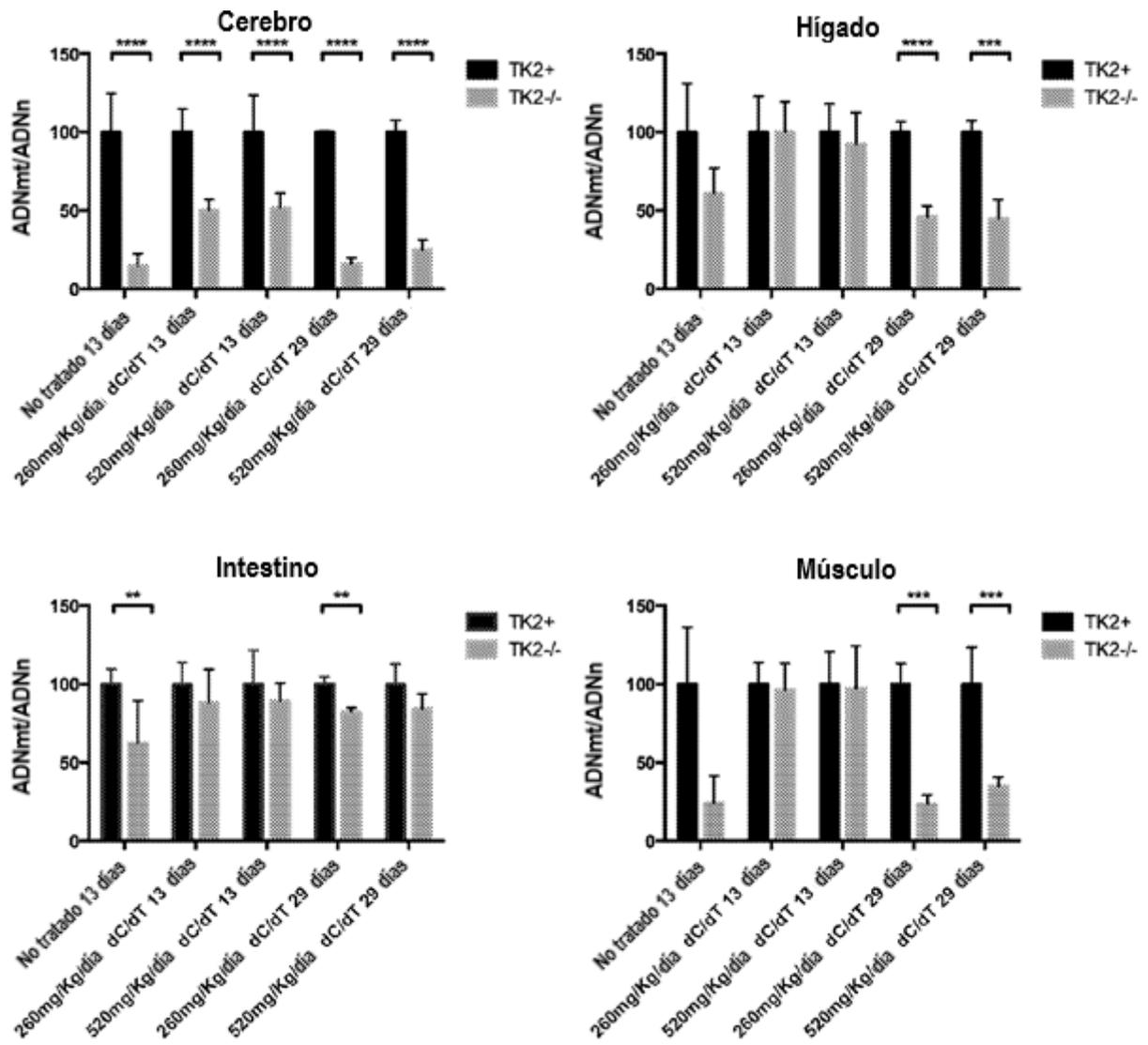


Figura 4

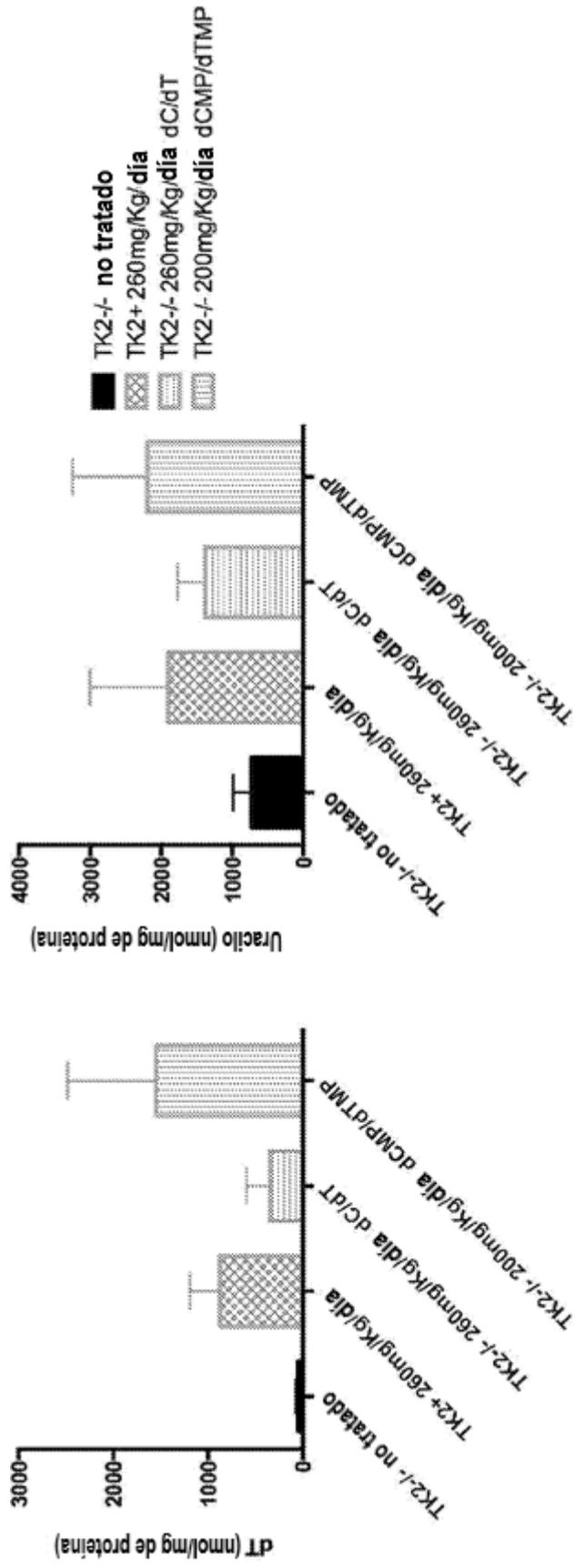


Figura 5

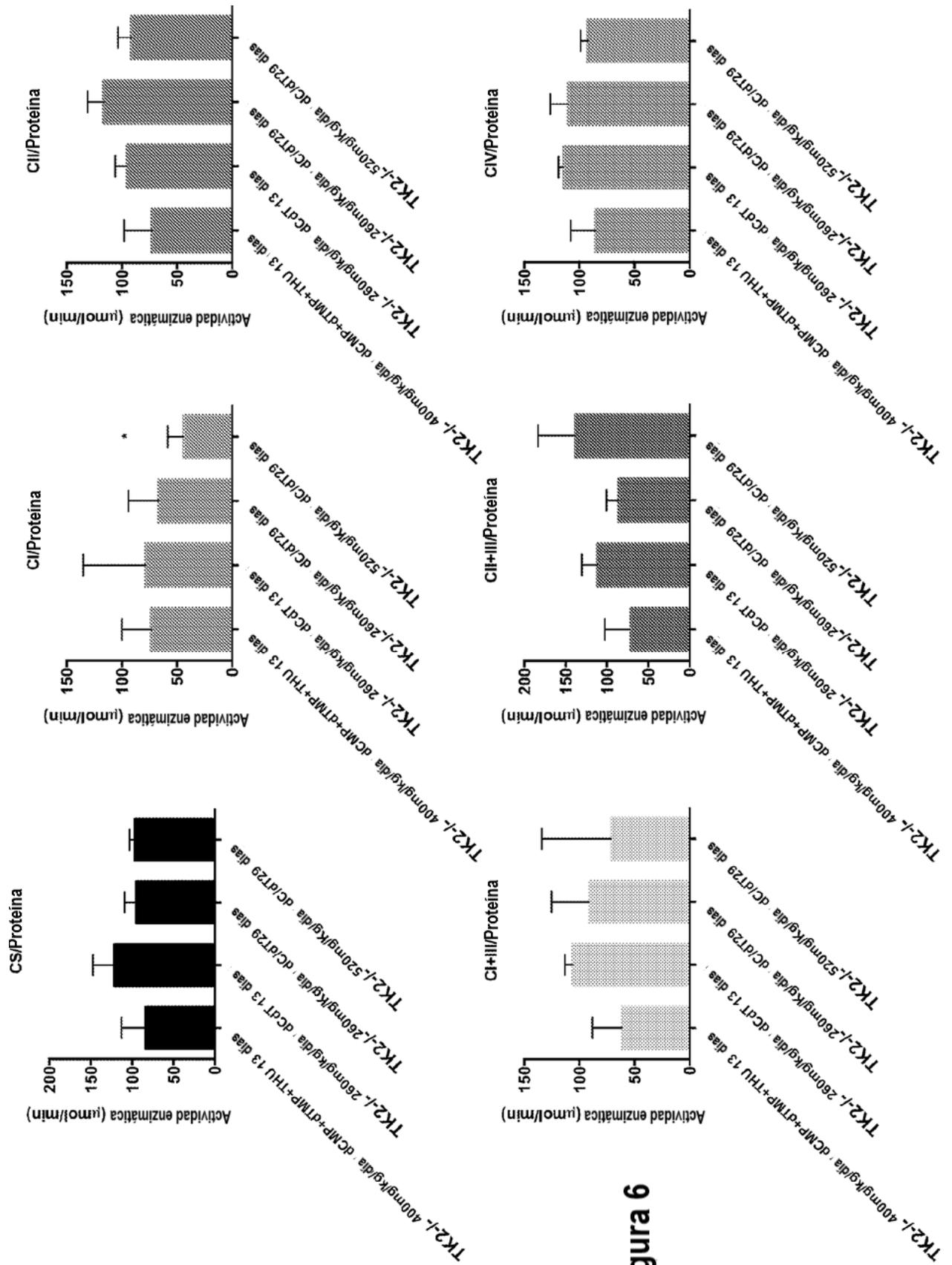
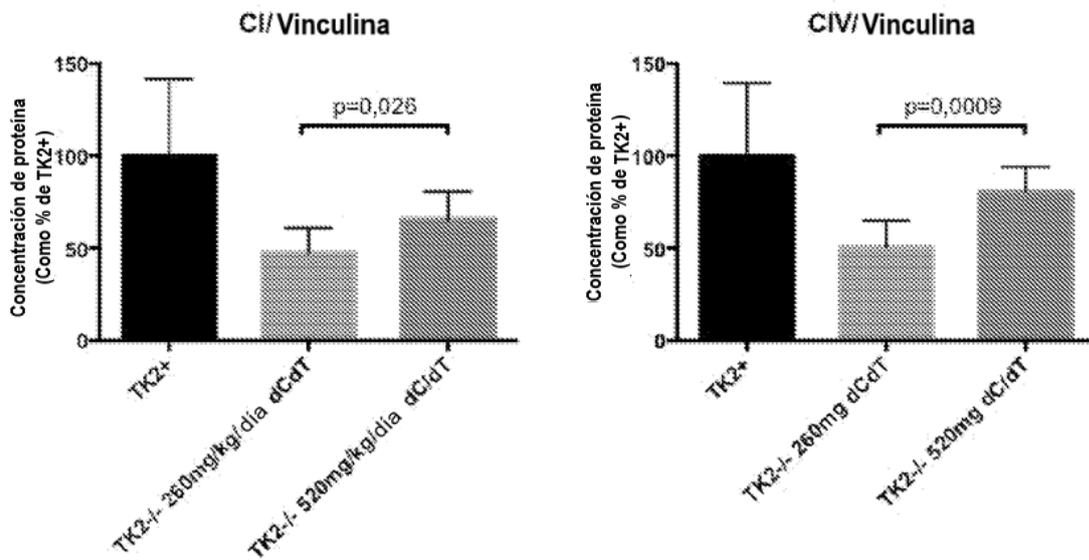
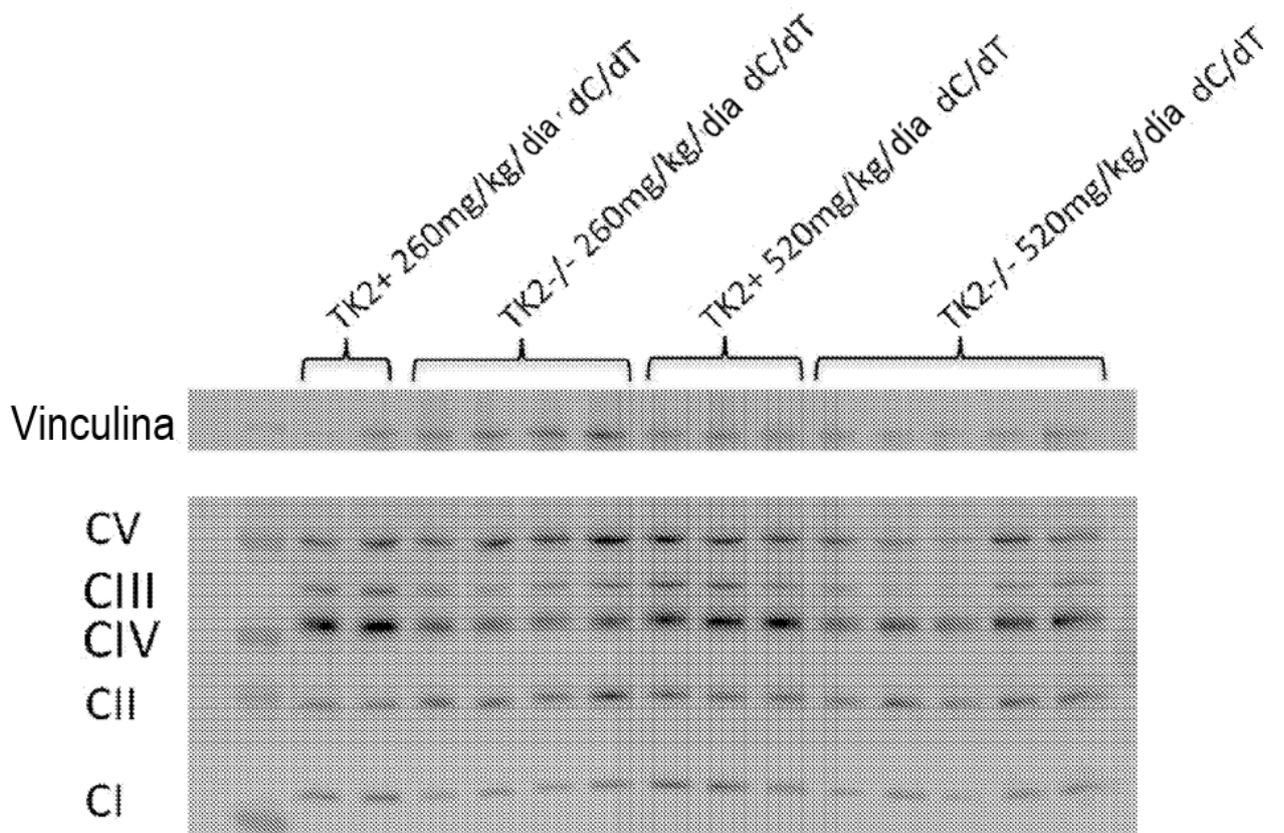


Figura 6

**Figura 7A**



**Figura 7B**