



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 302 898**

51 Int. Cl.:

**A61K 47/48** (2006.01)

**A61K 47/26** (2006.01)

**A61K 31/711** (2006.01)

**A61K 48/00** (2006.01)

**C07K 14/72** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **03077205 .7**

86 Fecha de presentación : **11.07.2003**

87 Número de publicación de la solicitud: **1495769**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **12.01.2005**

54

Título: **Transferencia de genes a células musculares mediada por el receptor de manosa-6-fosfato.**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.08.2008**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.08.2008**

73

Titular/es: **LBR Medbiotech B.V.**  
**Einsteinweg 55**  
**2333 CC Leiden, NL**

72

Inventor/es: **Platenburg, Gerard Johannes**

74

Agente: **Tomás Gil, Tesifonte Enrique**

ES 2 302 898 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

Transferencia de genes a células musculares mediada por el receptor de manosa-6-fosfato.

5 **Campo de la invención**

La presente invención pertenece al campo de los conjugados de glucósidos. Se refiere a mejorar la absorción muscular de compuestos en general. En particular, se refiere a conjugados de glucósidos-oligonucleótidos para el uso en estrategias antisentido, particularmente, en estrategias antisentido *in vivo*.

10 **Antecedentes de la invención**

Una terapia genética potencial fue investigada, dirigida a restaurar el marco de lectura en células musculares de pacientes con distrofia muscular de Duchenne (DMD) a través de la modulación focalizada de empalme de preARNM con distrofina. Considerando que el exón 45 es el único exón más frecuentemente deletado en la DMD, mientras que las deleciones del exón (45+ 46) causan sólo una forma moderada de la distrofia muscular de Becker (BMD), se configuró un sistema de base antisentido para inducir la omisión del exón 46 del transcrito en los miotubos cultivados de ratón y de origen humano. En los cultivos de miotubos de dos pacientes de DMD sin relacionar que tienen una deleción del exón 45, la omisión inducida del exón 46 en sólo el 15% del ARNm condujo a cantidades normales de distrofina localizada de forma adecuada (por supuesto carente de los dominios correspondientes al exón a 45 & 46) en al menos el 75% de los miotubos (van Deutekom *et al.* 2001). Usando la misma estrategia de base antisentido con una secuencia antisentido diferente, en otro estudio la omisión de otros 11 exones fue demostrada en el gen de distrofina en miotubos humanos cultivados (Aartsma-Rus *et al.* 2002). La tecnología para inducir la omisión de estos 12 exones diferentes (en la población de DMD provocando defectos genéticos), en total, permite una corrección superior al 50% de las deleciones y el 22% de las duplicaciones en la población presente en la base de datos de mutaciones en DMD de Leiden.

No obstante, la barrera más grande que se debe superar es la pobre absorción muscular *in vivo* de estos oligonucleótidos antisentido, y esto se aplica a otras moléculas con potencial de terapéutico también, por las células pertinentes. Una terapia eficaz para DMD requerirá que esencialmente todos los músculos esqueléticos incluidos aquellos de los brazos y piernas y los músculos implicados en la respiración al igual que el músculo cardíaco estén focalizados. Ninguno de los mecanismos investigados hasta la fecha tienen la capacidad de entregar específicamente oligonucleótidos (antisentido), menos aún genes enteros, esencialmente a todos los tejidos/células musculares simultáneamente en todo el cuerpo. Los métodos para la entrega de genes *in vivo* o de otros compuestos en el músculo que han sido publicados hasta el momento incluyen la inyección de ADN desnudo con o sin electrotransferencia, entrega intravascular (ambos estudiados en Herweijer y Wolff, 2003) y uso de microburbujas (Lu *et al.* 2003). La inyección directa de ADN en el músculo esquelético es un método seguro y simple, pero está impedido por las bajas eficiencias de transfección. Las eficiencias pueden ser mejoradas significativamente mediante el pretratamiento del músculo con hialuronidasa, seguido de electrotransferencia y usando este método un plásmido de distrofina fue expresado en el 22% de las fibras en el músculo de un ratón mdx durante hasta 8 semanas (Collins *et al.* 2003). No obstante, un impedimento grave para la aplicación clínica de este método, es el daño de la fibra muscular inducido por los potentes campos eléctricos requeridos para lograr la entrega eficaz de los genes. Un modo para limitar el daño en los músculos, es la inyección músculo-esquelético de una mezcla de ADN desnudo y microburbujas. Se descubrió que el uso de una microburbuja de gas de octa-fluoropropano envuelto con albúmina comercialmente disponible, Optison, mejora la eficiencia de la transfección y esto fue asociado a una reducción significativa en el daño muscular (Lu *et al.* 2003). No obstante, la mayor desventaja de la inyección muscular directa permanece, siendo ésta que cada músculo tiene que ser tratado por separado, y por lo tanto no se puede realizar el tratamiento de toda la masa muscular de un individuo a través de estos métodos.

La entrega intravascular del ADN es un método más atractivo, porque un grupo de músculos entero puede ser cubierto con una única inyección. La entrega intravascular por medio de un catéter a los grupos de los músculos esqueléticos del brazo, en combinación con el bloqueo del flujo sanguíneo con un brazalete de presión sanguínea, ha sido realizado con éxito en conejos, perros y simios rhesus (Herweijer y Wolff, 2003). En los simios rhesus, se han observado eficiencias de transfección que varían desde menos del 1% hasta más del 30% en diferentes músculos de la pierna y del brazo (Zhang *et al.* 2001). También, se reivindica que la entrega no está limitada al músculo esquelético, sino que la entrega se hace también en el músculo cardíaco (Herweijer *et al.*, 2000). No obstante, el tratamiento de todo el cuerpo seguirá requiriendo inyecciones múltiples y además, el tratamiento de los músculos respiratorios parece imposible con este método.

De forma ideal, la terapia de los músculos de todo el cuerpo usa inyecciones intravenosas individuales de un compuesto dotado de una capacidad de focalización específica de la célula. Hasta el momento, se han descrito dos moléculas con el potencial de focalizar la célula muscular. La primera es una secuencia peptídica con mayor enlace al músculo esquelético y cardíaco *in vivo*, que se identificó a través del cribado de una biblioteca de expresión en el fago aleatoria (Samoylova y Smith, 1999). La selectividad muscular del clon del fago que tiene este péptido fue estimada dentro de la gama de 9 a 20 veces para el músculo esquelético y de 5 a 9 veces para el músculo cardíaco (dependiendo del tejido de control) en comparación con el fago sin inserto. No obstante, todavía no ha sido mostrado si este péptido puede ser usado o no para la focalización *in vivo* de compuestos conjugados en células musculares. La otra molécula que ha sido descrita es una parte de Fv de un anticuerpo monoclonal (mAb) que es selectivamente transportado en el músculo esquelético *in vivo* (Weisbart *et al.* 2003). Los fragmentos Fv monocatenarios de la murina mAb fueron

inyectados en las venas de la cola de ratones y 4 horas más tarde los fragmentos fueron encontrados en el 20% de las células músculo-esqueléticas, principalmente localizados en el núcleo. Se demostró que la mAb se enlaza a la proteína miosina IIb en los lisatos de células músculo-esqueléticas, pero no se enlazó a ninguna proteína en los lisatos de células del músculo cardíaco. En consecuencia, este anticuerpo puede ser útil para focalizar los músculos esqueléticos, pero no el músculo cardíaco.

Los residuos de manosa-6-fosfato (M6P) son únicamente reconocidos por los dos elementos de la familia de la lectina tipo P, el receptor de manosa-6-fosfato dependiente del catión (CD-MPR) de ~ 46-kDa y el receptor del factor de crecimiento de tipo insulina II/manosa-6-fosfato (IGF-II/MPR) de ~ 300 kDa (Dahms y Hancock, 2002). Las lectinas tipo P juegan un papel esencial en la generación de lisosomas funcionales dentro de las células eucariotas mayores, dirigiendo las enzimas lisosomales recién sintetizadas que llevan la señal M6P a los lisosomas. Las enzimas lisosomales son sintetizadas por la membrana enlazada a los ribosomas y transferidas al retículo endoplasmático (ER), donde las proteínas nacientes son glicosiladas con cadenas oligosacáridas de alto contenido en manosa. Los residuos de manosa son luego fosforilados durante el tránsito adicional de las proteínas a través del recorrido biosintético ER-Golgi, generando el ligando M6P usado en la focalización de las enzimas lisosomales hasta el lisosoma por medio de los receptores de M6P (Dahms y Hancock, 2002). En la superficie de la célula el IGF-II/MPR, pero no el CD-MPR, enlaza e interioriza una población diversa de proteínas conteniendo M6P y es responsable de la endocitosis de la mayoría de las enzimas lisosomales extracelulares (Ghosh *et al.* 2003. Hassan, 2003). El IGF-II/MPR está presente en diferentes tejidos humanos tales como el riñón, el hígado, el bazo y el pulmón y también en el músculo cardíaco y esquelético (Funk *et al.* 1992. Wenk *et al.* 1991), y puede en consecuencia ser usado para focalizar y absorber compuestos conteniendo M6P en el compartimiento lisosomal de células musculares. La posibilidad de tal enfoque ha sido demostrada con la enzima lisosomal  $\alpha$ -glucosidasa (GAA). En primer lugar, se demostró que la GAA aislada del testículo bovino fue endocitada de una manera dependiente del receptor de M6P por las células músculo-esqueléticas humanas cultivadas, obtenidas de biopsias musculares (Reuser *et al.* 1984). La absorción podría completamente ser inhibida por M6P y por  $\beta$ -galactosidasa del testículo bovino, una enzima lisosomal que lleva las cadenas de azúcar fosforiladas de tipo con alto contenido en manosa. Estos resultados muestran que los receptores de M6P están presentes en la membrana plasmática de las células músculo-esqueléticas e implicadas en la absorción de las enzimas lisosomales conteniendo M6P. También, cuando GAA recombinante humana (rhGAA), producida en células de CHO o leche de ratón, fue añadida a GAA humana *-/-* fibroblastos en cultivo celular, la enzima fue interiorizada en un receptor de M6P de manera dependiente (Bijvoet *et al.* 1998. Martiniuk *et al.* 2000). Finalmente, después de la inyección de rhGAA en ratones noqueados con GAA, se demostró la absorción en los músculos cardíacos, esqueléticos, músculos de las piernas y respiratorios, entre ellos el diafragma (Bijvoet *et al.* 1998. Martiniuk *et al.* 2000).

US 6,172,208 describe un conjugado que comprende un glucósido, en particular manosa-6-fosfato, enlazado a un oligonucleótido.

### Descripción de la invención

La presente invención proporciona un método nuevo de entrega de compuestos en compartimientos extralisosomales, tales como el citoplasma, ER y el núcleo de las células, en particular las células musculares. Se encontró de forma imprevista que los conjugados que comprenden un glucósido, tal como M6P monosacárido, fueron capaces de entregar compuestos enlazados en el núcleo de las células musculares, a pesar de la explicación de la técnica anterior de que M6P está focalizado específicamente en el compartimiento lisosomal de las células.

En una forma de realización de la invención, se proporcionan conjugados de compuesto-glucósido. Un "conjugado" como se utiliza en este caso se refiere a un ligando, tal como un glucósido, que es químicamente conjugado con un compuesto de interés. El ligando es capaz de enlazarse con un receptor específico y de ese modo dirige (o focaliza) el conjugado para este receptor. En una forma de realización de la invención el ligando es capaz de enlazarse a un receptor de M6P, preferiblemente a IGF-II/MPR. Preferiblemente el receptor de M6P es de una célula muscular. El glucósido es preferiblemente un mono-, di- o cualquier sacárido de mayor orden. En una forma de realización preferida el sacárido es un residuo de M6P, aunque otros sacáridos con especificidad de enlace para receptores de células musculares pueden ser usados. El conjugado puede comprender uno, dos, tres o más glucósidos. Por ejemplo, el conjugado puede comprender (M6P)<sub>2</sub> o (M6P)<sub>4</sub> o residuos de M6P adicionales. En el caso de que el conjugado comprenda más de un glucósido se prefiere que el glucósido terminal sea un M6P.

Por tanto, la invención se refiere al uso de un conjugado de un glucósido enlazado a un oligonucleótido seleccionado de ARN, ADN, morfolino, 2'-O-metil ARN, 2'-O-alil ARN, ácido nucleico peptídico (PNA) y ácido nucleico bloqueado (LNA), donde dicho glucósido es un ligando capaz de enlazarse a un receptor de manosa-6-fosfato de una célula muscular para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad y donde la entrega de dicho oligonucleótido se hace en un compartimiento extralisosomal de dicha célula muscular. También la invención se refiere a un conjugado que comprende un glucósido enlazado a un oligonucleótido, donde dicho oligonucleótido es seleccionado de ARN, ADN, morfolino, 2'-O-metil ARN, o 2'-O-alil ARN, ácido nucleico peptídico (PNA) y ácido nucleico bloqueado (LNA), dicho glucósido siendo un ligando capaz de enlazarse a un receptor de manosa-6-fosfato de una célula muscular y dicho oligonucleótido comprendiendo al menos 20 nucleótidos idénticos o complementarios a un gen de distrofina humano.

En una forma de realización dicho oligonucleótido o derivado o imitación del mismo está en orientación antisentido. En una forma de realización dicho oligonucleótido o derivado o imitación del mismo comprende al menos 20

## ES 2 302 898 T3

nucleótidos idénticos o complementarios a un gen de distrofina humano. En una forma de realización dicho oligonucleótido o derivado o imitación del mismo es seleccionado de uno de los siguientes: morfolino, 2'-O-metil ARN o 2'-O-alil ARN.

5 En una forma de realización preferida dicho receptor de manosa-6-fosfato es un receptor del factor de crecimiento de tipo insulina II/manosa-6-fosfato (IGF-II/MPR).

10 En una forma de realización dicho glucósido del conjugado de la invención es un mono-, di- o trisacárido, o cualquier sacárido de mayor orden, y en el que dicho sacárido comprende al menos un residuo de manosa-6-fosfato. En otra forma de realización dicho sacárido comprende al menos dos residuos de manosa-6-fosfato. En otra forma de realización dichos di-, tri- o sacáridos de mayor orden son enlazados por medio de enlaces ( $\alpha$ 1,2), ( $\alpha$ 1,3) o ( $\alpha$ 1,6). En otra forma de realización dicho glucósido es un oligosacárido biantenarico o triantenarico comprendiendo mono-, di- o trisacáridos o cualquier sacárido de mayor orden, donde dichos sacáridos comprenden al menos un residuo de manosa-6-fosfato, preferiblemente dichos sacáridos comprenden al menos dos residuos de manosa-6-fosfato.

15 En otra forma de realización dicho compuesto del conjugado de la invención es un factor de crecimiento, una vacuna, una vitamina, un anticuerpo o una entidad catiónica para ácidos nucleicos complejos.

20 En otra forma de realización dicho glucósido es enlazado a dicho compuesto por medio de un espaciador lábil que puede ser dividido intracelularmente.

25 En otra forma de realización la invención se refiere a un método para la producción de un conjugado de compuesto-glucósido, caracterizado por enlazar al menos un glucósido comprendiendo al menos un residuo de manosa-6-fosfato con un oligonucleótido seleccionado de cualquiera de los siguientes: ADN, ARN, PNA, LNA, morfolino, 2'-O-metil ARN, o 2'-O-alil ARN.

30 El sistema de focalización de M6P se entiende que importa en el compartimento lisosomal de las células y GAA puede sólo ejercer su efecto en los lisosomas allí donde debe, y en una preparación terapéutica, hidroliza el glicógeno provocando la enfermedad.

35 El proceso de empalme de exones se desarrolla en el núcleo y ciertamente no en los lisosomas donde no hay ARN para empalmar. El descubrimiento sorprendente que hicimos es que M6P cuando se acopla a una molécula antisentido complementaria a un sitio de empalme puede también dirigir su carga a la maquinaria de empalme que se encuentra en una ubicación claramente diferente del "bien conocido destino" normalmente usado por M6P y su carga (GAA). Este descubrimiento inesperado no permitió usar M6P para focalizar las células musculares con compuestos bioactivos para varios compartimentos celulares tales como el núcleo (como un resultado inesperado, puesto que el sistema de focalización de M6P se considera que lleva la carga directa al compartimento lisosomal).

40 Por tanto, la invención se refiere además al uso de cualquiera de los conjugados de compuesto-glucósido de la invención para alterar la secuencia de un ARN o sus precursores, para modificar o modular su composición y disposición de sus exones de manera que una proteína pueda ser capaz de restablecer la funcionalidad de una célula a la cual que es entregada, en particular las células musculares. En un aspecto los conjugados de compuesto-glucósido de la invención pueden ser usados para bloquear o estimular cualquier ARN pudiendo llevar a un rendimiento o mejora de los músculos cardíacos, respiratorios o esqueléticos con el fin de mejorar la progresión de ciertas enfermedades o empeoramientos asociados a p. ej. el envejecimiento.

45 En otro aspecto la invención describe un método para entregar un compuesto en el núcleo de las células que comprenden un receptor de factor de crecimiento de tipo insulina II/manosa-6-fosfato (IGF-II/MPR), donde un conjugado de compuesto-glucósido de la invención es puesto en contacto con dichas células. En un aspecto dicha puesta en contacto comprende la inyección en un tejido animal o humano. En otro aspecto dichas células son células musculares de un paciente con distrofia muscular de Duchenne (DMD) y dicho compuesto es un oligonucleótido antisentido que causa una omisión del exón, en particular la omisión del exón 46, e induce o restaura la síntesis de distrofina o variantes de la misma.

50 En otro aspecto la invención describe un método para tratar enfermedades musculares tales como la distrofia muscular de Beckers, la atrofia espinal muscular (SMA), la miopatía de Bethlem, la miopatía miotubular, la distrofia muscular de cinturas (Limb-Girdle) 2A y 2B, la miopatía de Miyoshi y la distrofia muscular deficitaria de merosina, donde las células musculares de los pacientes son puestas en contacto con un conjugado de compuesto-glucósido de la invención.

55 Además la invención describe un método para inducir la síntesis o el funcionamiento de cualquier especie de ARN en células musculares, donde dichas células son puestas en contacto con un conjugado de compuesto-glucósido de la invención, con el cual dicho compuesto inhibe o reduce la actividad de ARNs o proteínas que reprimen la síntesis o el funcionamiento de dichas especies de ARN.

60 Además la invención describe un método para inhibir la síntesis o el funcionamiento de cualquier especie de ARN en células musculares que causan una enfermedad o predisposición a una enfermedad, que puede ser de origen vírico o

bacteriano, donde dichas células musculares son puestas en contacto con un conjugado de compuesto-glucósido según la invención, con el cual dicho compuesto inhibe la síntesis del funcionamiento de dichas especies de ARN.

Además los conjugados de compuesto-glucósido de la invención pueden ser usados para aumentar la masa muscular corporal de animales de granja. Por ejemplo, las células musculares pueden ser focalizadas con un conjugado que comprende un compuesto que está diseñado para aumentar la masa muscular, tal como por ejemplo un oligonucleótido que inhibe la producción de miostatina. Por consiguiente, la invención también se refiere a tal método.

Además la invención describe un método de entrega de una vacuna en las células musculares, donde las células musculares son puestas en contacto con un conjugado de compuesto-glucósido según la invención, donde dicho compuesto es una vacuna.

Además la invención describe el uso de un conjugado de compuesto-glucósido según la invención en el tratamiento terapéutico de enfermedades musculares. En particular la invención se refiere al uso de un conjugado de compuesto-glucósido según la invención para la preparación de un medicamento. En una forma de realización la invención se refiere al uso de un conjugado de compuesto-glucósido según la invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico de enfermedades musculares.

En otra forma de realización el conjugado de compuesto-glucósido además comprende un marcador. En una forma de realización dicho marcador es directamente o indirectamente detectable por métodos visuales, químicos o moleculares. En una forma de realización dicho marcador es un marcador fluorescente, un marcador quimioluminiscente, un marcador radiactivo, un marcador enzimático o un marcador molecular.

Además la invención describe un método para realizar pruebas de diagnóstico *in vivo* o *in vitro*, donde un conjugado de la invención comprendiendo además un marcador es puesto en contacto con células musculares y se detecta directa o indirectamente la presencia o ausencia de dicho marcador. Aún además la invención se refiere a un kit de detección diagnóstica que comprende un conjugado de la invención comprendiendo además un marcador y opcionalmente comprendiendo además reactivos de detección.

## 30 Ejemplos

### Ejemplo 1

#### *Unidades estructurales generales para la síntesis de los compuestos glucósidos*

Para poder producir los compuestos glucósidos, se diseñó una síntesis de fase múltiple. Todas las síntesis fueron realizadas usando procedimientos estándares de síntesis por química orgánica. Las unidades estructurales separadas IA y 1B (Fig 1A y 1B respectivamente) fueron sintetizadas, mientras que los bloques restantes (Fig 1C y 1D) fueron comprados (figura 1).

### Ejemplo 2

#### *Ensamblaje de bloque de construcción 1*

El bloque de construcción 1 (Figura 2) está compuesto por el glucósido enlazado a través de un espaciador a una fracción X. El espaciador está compuesto de un C<sub>4</sub>-, C<sub>5</sub>-, o C<sub>11</sub>-alquilo o tetraetilenglicol. Fracción X está compuesta de un enlace de fosfato, amida o bisulfuro.

### Ejemplo 3

#### *Ensamblaje del bloque de construcción 2*

El Bloque de construcción 2 (figura 3) está diseñado para conectar el bloque de construcción 1 al compuesto, en el ejemplo 4 con un oligonucleótido.

### Ejemplo 4

*Ensamblaje del (man-6P)<sub>2</sub> -en (man-6P)<sub>4</sub>-oligonucleótidos con C<sub>4</sub>-, C<sub>5</sub>-, y C<sub>11</sub>-alquilo y espaciadores de tetraetilenglicol*

Mediante la síntesis de la fase sólida de la amidita estándar se sintetizaron los oligonucleótidos (man-6)<sub>x</sub> (figura 4).

## Referencias

- 5 • **Aartsma-Rus A., Bremmer-Bout M., Janson A. A. M., den Dunnen J. T., van Ommen G. J. B. and van Deutekom J. C. T. (2002)** Targeted exon skipping as a potential gene correction therapy for Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord.* 12, S71-S77.
- 10 • **Bijvoet A. G. A., Kroos M. A., Pieper F. R., Van der Vliet M., de Boer H. A., Van der Ploeg A. T., Verbeet M. P. and Reuser A. J. (1998)** Recombinant human acid  $\alpha$ -glucosidase: high-level production in mouse milk, biochemical characteristics, correction of enzyme deficiency in GSDII KO mice. *Hum. Mol. Genet.* 7, 1815-1824.
- 15 • **Dahms N. M. and Hancock M. K. (2002)** P-type lectins. *Biochim. Biophys. Acta* 1572, 317-340.
- **Funk B., Kessler U., Eisenmenger W., Hansmann A., Kolb H. J. and Kiess W. (1992)** Expression of the insulin-like growth factor-II/mannose-6-phosphate receptor in multiple human tissues during fetal life and early infancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 75, 424-431.
- 20 • **Ghosh P., Dahms N. M. and Komfeld S. (2003)** Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 202-212.
- **Gollins H., McMahon J., Wells K. E. and Wells D. J. (2003)** High-efficiency plasmid gene transfer into dystrophic muscle. *Gene Ther.* 10, 504-512.
- 25 • **Hassan A. B. (2003)** Keys to the hidden treasures of the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor 2 receptor. *Am. J. Pathol.* 162, 3-6.
- **Herweijer H., Whitesell L. F., Buck J., Bates M. K., Budker V., Zhang G., Wolff J. A. and Wolff M. R. (2000)** Retrograde coronary venous delivery of naked plasmid DNA. *Mol. Ther.* 1, S202.
- 30 • **Herweijer H. and Wolff J. A. (2003)** Progress and prospects: naked DNA gene transfer and therapy. *Gene Ther.* 10, 453-458.
- **Lu Q. L., Liang H.-D., Partridge T. and Blomley M. J. K. (2003)** Microbubble ultrasound improves the efficiency of gene transduction in skeletal muscle *in vivo* with reduced tissue damage. *Gene Ther.* 10, 396-405.
- 35 • **Martiniuk F., Chen A., Donnabella V., Arvanitopoulos E., Slonim A. E., Raben N., Plotz P. and Rom W. N. (2000)** Correction of glycogen storage disease type II by enzyme replacement with a recombinant human acid maltase produced by over-expression in a CHO-DHFRneg cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276, 917-923.
- 40 • **Reuser A. J. J., Kroos M. A., Ponne N. J., Wolterman R. A., Loonen M. C. B., Busch H. F. M., Visser W. J. and Bolhuis P. A. (1984)** Uptake and stability of human and bovine acid-glucosidase in cultured fibroblasts and skeletal muscle cells from glycogenosis type II patients. *Exp. Cell Res.* 155, 178-189.
- 45 • **Samoylova T. I. and Smith B. F. (1999)** Elucidation of muscle-binding peptides by phage display screening. *Muscle Nerve* 22, 460-466.
- **van Deutekom J. C. T., Bremmer-Bout M., Janson A. A. M., Ginjaar I. B., Baas F., den Dunnen J. T. and van Ommen G. J. B. (2001)** Antisense-induced exon skipping restores dystrophin expression in DMD patient derived muscle cells. *Hum. Mol. Genet.* 10, 1547-1554.
- 50 • **Weisbart R. H., Yang F., Chan G., Wakelin R., Ferreri K., Zack D. J., Harrison B., Leinwand L. A. and Cole G. M. (2003)** Cell type specific targeted intracellular delivery into muscle of a monoclonal antibody that binds myosin IIb. *Mol. Immunol.* 39, 783-789.
- 55 • **Wenk J., Hille A. and von Figura K. (1991)** Quantitation of Mr 46000 and Mr 300000 mannose-6-phosphate receptors in human cells and tissues. *Biochem. Int.* 23, 723-731.
- **Zhang G., Budker V., Williams P., Subbotin V. and Wolff J. A. (2001)** Efficient expression of naked DNA delivered intra-arterially to limb muscles of nonhuman primates. *Hum. Gene Ther.* 12, 427-438.

## 60 Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citada por el solicitante ha sido recopilada exclusivamente para la información del lector. No forma parte del documento de patente europea. La misma ha sido confeccionada con la mayor diligencia; la OEP sin embargo no asume responsabilidad alguna por eventuales errores u omisiones.

## Patentes citadas en la descripción

- US 6172208 B [0007]

## 5 Bibliografía distinta de patentes citada en la descripción

- AARTSMA-RUS A.; BREMMER-BOUT M.; JANSON A. A. M.; DEN DUNNEN J. T.; VAN OMMEN G. J. B.; VAN DEUTEKOM J. C. T. Targeted exon skipping as a potential gene correction therapy for Duchenne muscular dystrophy *Neuromuscul. Disord.*, 2002, vol. 12, S71-S77 [0033]
- 10 • BIJVOET A. G. A.; KROOS M. A.; PIEPER F. R.; VAN DER VLIET M.; DE BOER H. A.; VAN DER PLOEG A. T.; VERBEET M. P.; REUSER A. J. Recombinant human acid  $\alpha$ -glucosidase: high-level production in mouse milk, biochemical characteristics, correction of enzyme deficiency in *GSDII KO mice Hum. Mol. Genet.*, 1998, vol. 7, 1815-1824 [0033]
- 15 • DAHMS N. M. HANCOCK M. K. P-type lectins *Biochim. Biophys. Acta*, 2002, vol. 1572, 317-340 [0033]
- FUNK B.; KESSLER U.; EISENMENGER W.; HANSMANN A.; KOLB H. J.; KIESS W. Expression of the insulin-like growth factor-II/mannose-6-phosphate receptor in multiple human tissues during fetal life and early infancy *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1992, vol. 75, 424-431 [0033]
- 20 • GHOSH P.; DAHMS N. M.; KOMFELD S. Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2003, vol. 4, 202-212 [0033]
- 25 • GOLLINS H.; MCMAHON J.; WELLS K. E.; WELLS D. J. High-efficiency plasmid gene transfer into dystrophic muscle *Gene Ther.*, 2003, vol. 10, 504-512 [0033]
- HASSAN A. B. Keys to the hidden treasures of the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor 2 receptor *Am. J. Pathol.*, 2003, vol. 162, 3-6 [0033]
- 30 • HERWEIJER H.; WHITESELL L. F.; BUCK J.; BATES M. K.; BUDKER V.; ZHANG G.; WOLFF J. A.; WOLFF M. R. Retrograde coronary venous delivery of naked plasmid *DNA Mol. Ther.*, 2000, vol. 1, S202- [0033]
- HERWEIJER H.; WOLFF J. A. Progress and prospects: naked DNA gene transfer and therapy *Gene Ther.*, 2003, vol. 10, 453-458 [0033]
- 35 • LU Q. L.; LIANG H.-D.; PARTRIDGE T.; BLOMLEY M. J. K. Microbubble ultrasound improves the efficiency of gene transduction in skeletal muscle *in vivo* with reduced tissue damage *Gene Ther.*, 2003, vol. 10, 396-405 [0033]
- 40 • MARTINIUK F.; CHEN A.; DONNABELLA V.; ARVANITOPOULOS E.; SLONIM A. E.; RABEN N.; PLOTZ P.; ROM W. N. Correction of glycogen storage disease type II by enzyme replacement with a recombinant human acid maltase produced by over-expression in a CHO-DHFRneg cell line *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2000, vol. 276, 917-923 [0033]
- 45 • REUSER A. J. J.; KROOS M. A.; PONNE N. J.; WOLTERMAN R. A.; LOONEN M. C. B.; BUSCH H. F. M.; VISSER W. J.; BOLHUIS P. A. Uptake and stability of human and bovine acid  $\alpha$ -glucosidase in cultured fibroblasts and skeletal muscle cells from glycogenesis type II patients *Exp. Cell Res.*, 1984, vol. 155, 178-189 [0033]
- 50 • SAMOYLOVA T. I.; SMITH B. F. Elucidation of muscle-binding peptides by phage display screening *Muscle Nerve*, 1999, vol. 22, 460-466 [0033]
- VAN DEUTEKOM J. C. T.; BREMMER-BOUT M.; JANSON A. A. M.; GINJAAR I. B.; BAAS F.; DEN DUNNEN J. T.; VAN OMMEN G. J. B. Antisense-induced exon skipping restores dystrophin expression in DMD patient derived muscle cells *Hum. Mol. Genet.*, 2001, vol. 10, 1547-1554 [0033]
- 55 • WEISBART R. H.; YANG F.; CHAN G.; WAKELIN R.; FERRERI K.; ZACK D. J.; HARRISON B.; LEINWAND L. A.; COLE G. M. Cell type specific targeted intracellular delivery into muscle of a monoclonal antibody that binds myosin IIb *Mol. Immunol.*, 2003, vol. 39, 783-789 [0033]
- 60 • WENK J.; HILLE A.; VON FIGURA K. Quantitation of Mr 46000 and Mr 300000 mannose-6-phosphate receptors in human cells and tissues *Biochem. Int.*, 1991, vol. 23, 723-731 [0033]
- 65 • ZHANG G.; BUDKER V.; WILLIAMS P.; SUBBOTIN V.; WOLFF J. A. Efficient expression of naked DNA delivered intra-arterially to limb muscles of nonhuman primates *Hum. Gene Ther.*, 2001, vol. 12, 427-438 [0033]

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de un conjugado de un glucósido enlazado a un oligonucleótido seleccionado de ARN, ADN, morfolino, 2'-O-metil ARN, 2'-O-alil ARN, ácido nucleico peptídico (PNA) y ácido nucleico bloqueado (LNA), donde dicho glucósido es un ligando capaz de enlazarse a un receptor de manosa-6-fosfato de una célula muscular para la preparación de un medicamento para la entrega de dicho oligonucleótido a un compartimento extralisosomal de dicha célula muscular.
- 10 2. Uso según la reivindicación 1, donde el medicamento es para el tratamiento de una enfermedad muscular.
3. Uso según la reivindicación 1 o 2, donde la enfermedad muscular está seleccionada entre la distrofia muscular de Beckers, la atrofia espinal muscular (SMA), la miopatía de Bethlem, la miopatía miotubular, la distrofia muscular de cinturas (Limb-Girdle) 2A y 2B, la miopatía de Miyoshi y la distrofia muscular deficitaria de merosina.
- 15 4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde dicho glucósido es un mono-, di- o trisacárido, o cualquier sacárido de mayor orden, y donde dicho sacárido comprende al menos un residuo de manosa-6-fosfato.
- 20 5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde dicho glucósido es un oligosacárido biantenarico o triantenarico comprendiendo mono-, di- o trisacáridos o cualquier sacárido de mayor orden, donde dichos sacáridos comprenden al menos un residuo de manosa-6-fosfato.
6. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde dicho glucósido está enlazado a dicho oligonucleótido por medio de un espaciador lábil que puede ser dividido intracelularmente.
- 25 7. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde dicho oligonucleótido se enlaza a dicho glucósido por medio de una entidad catiónica a ácidos nucleicos complejos.
8. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde dicho receptor de manosa-6-fosfato es un receptor de factor de crecimiento de tipo insulina II/manosa-6-fosfato (IGF-II/MPR).
- 30 9. Uso según la reivindicación 8 donde la entrega se hace en el núcleo de una célula muscular, donde dicha célula muscular comprende un receptor de factor de crecimiento de tipo insulina II/manosa-6-fosfato (TGF-II/MPR).
- 35 10. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde dichas células musculares son de un paciente con distrofia muscular de Duchenne (DMD) y donde dicho oligonucleótido es un oligonucleótido antisentido que provoca una omisión de exón e induce o restaura la síntesis de distrofina o variantes de la misma.
- 40 11. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, donde dicho oligonucleótido o derivado o imitación del mismo comprende al menos 20 nucleótidos idénticos o complementarios a un gen de distrofina humano.
- 45 12. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde la composición es para inducir la síntesis o función de cualquier especie de ARN en células musculares donde dicho oligonucleótido de dicho conjugado inhibe o reduce la actividad de ARNs o proteínas reprimiendo de ese modo la síntesis o el funcionamiento de dichas especies de ARN.
- 50 13. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde la composición es para inhibir la síntesis o función de cualquier especie de ARN en las células musculares que provocan una enfermedad o predisposición a una enfermedad, donde dicho oligonucleótido de dicho conjugado inhibe la síntesis o función de dichas especies de ARN.
- 55 14. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-13 donde dicho conjugado además comprende un marcador.
15. Uso según la reivindicación 14 para pruebas de diagnóstico *in vivo* o *in vitro* comprendiendo la detección directa o indirectamente de la presencia o ausencia de dicho marcador.
- 60 16. Conjugado que comprende un glucósido enlazado a un oligonucleótido, donde dicho oligonucleótido es seleccionado de ARN, ADN, morfolino, 2'-O-metil ARN, o 2'-O-alil ARN, ácido nucleico peptídico (PNA) y ácido nucleico bloqueado (LNA), dicho glucósido siendo un ligando capaz de enlazarse a un receptor de manosa-6-fosfato de una célula muscular y dicho oligonucleótido comprendiendo al menos 20 nucleótidos idénticos o complementarios a un gen de distrofina humano.
- 65 17. Conjugado según la reivindicación 16, donde dicho glucósido es un mono-, di- o trisacárido, o cualquier sacárido de mayor orden y donde dicho sacárido comprende al menos un residuo de manosa-6-fosfato.
18. Conjugado según la reivindicación 16, donde dicho glucósido es un oligosacárido biantenarico o triantenarico comprendiendo mono-, di- o trisacáridos o cualquier sacárido de mayor orden donde dichos sacáridos comprenden al menos un residuo de manosa-6-fosfato.



## ES 2 302 898 T3

19. Conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 16-18, donde dicho glucósido está enlazado a dicho oligonucleótido por medio de un espaciador lábil que puede ser dividido intracelularmente.

5 20. Conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 16-19, dicho conjugado comprendiendo además un marcador.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

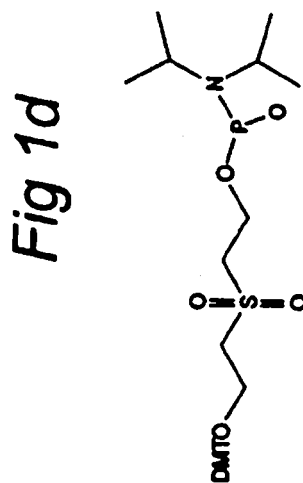
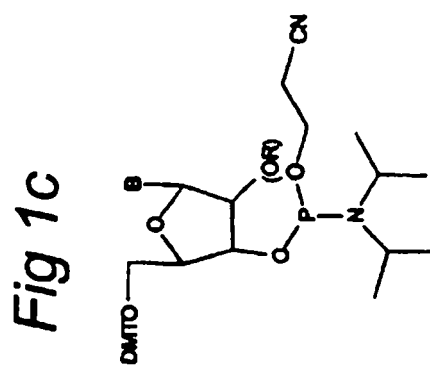
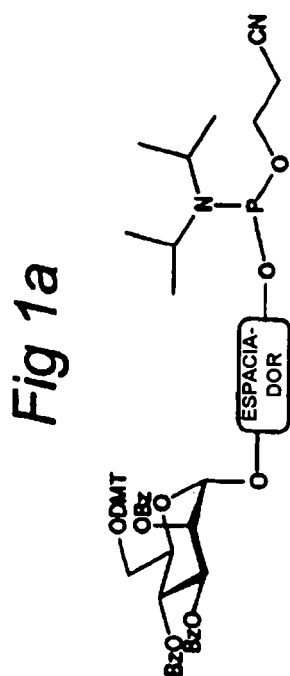
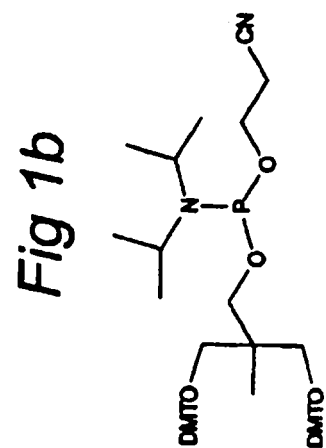




Fig 3

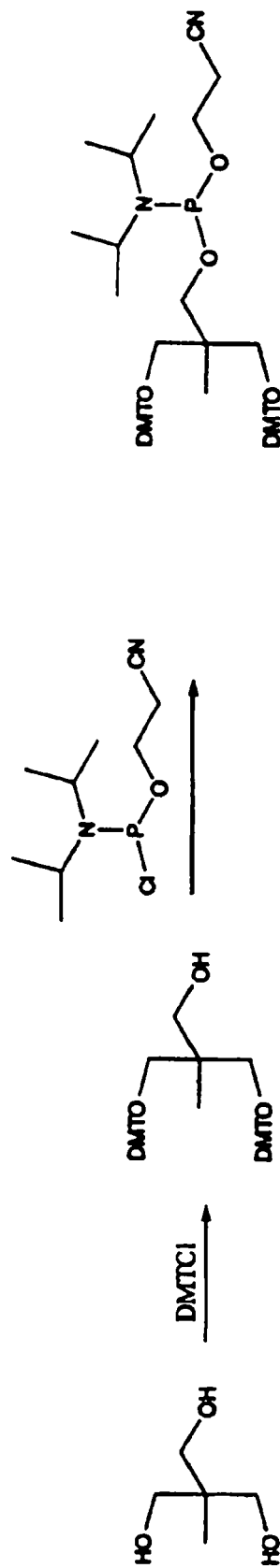


Fig 4

