

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 699 827**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/7088** (2006.01)

**C12N 15/113** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.06.2010 E 17203913 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.09.2018 EP 3305302**

54 Título: **Composiciones y métodos para la modulación de corte y empalme de SMN2 en un sujeto**

30 Prioridad:

**17.06.2009 US 218031 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**13.02.2019**

73 Titular/es:

**BIOPEN MA INC. (50.0%)  
225 Binney Street  
Cambridge, MA 02142, US y  
COLD SPRING HARBOR LABORATORY (50.0%)**

72 Inventor/es:

**BENNETT, C. FRANK;  
HUNG, GENE;  
RIGO, FRANK;  
KRAINER, ADRIAN R.;  
HUA, YIMIN;  
PASSINI, MARCO A.;  
SHIHABUDDIN, LAMYA;  
CHENG, SENG H. y  
KLINGER, KATHERINE W.**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**ES 2 699 827 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

Composiciones y métodos para la modulación de corte y empalme de SMN2 en un sujeto

## 5 LISTA DE SECUENCIAS

La presente solicitud se presenta junto con una Lista de Secuencias en formato electrónico. La Lista de Secuencias se proporciona como un fichero titulado 20100617\_CORE0086WOSEQ.txt, creado el 17 de junio de 2010, tiene 5 Kb de tamaño.

10

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las moléculas de ARNm eucariotas recientemente sintetizadas, conocidas como transcripciones o pre-ARNm primarias, se procesan antes de la traducción. El procesamiento de los pre-ARNm incluye la adición de una caperuza metilada 5' y una cola poli(A) de aproximadamente 200-250 bases al extremo 3' de la transcripción. El procesamiento de ARNm a partir de pre-ARNm también implica frecuentemente el corte y empalme del pre-ARNm, lo cual ocurre en la maduración del 90-95% de los ARNm de mamífero. Los intrones (o secuencias intermedias) son regiones de un pre-ARNm (o el ADN que lo codifica) que no se incluyen en la secuencia de codificación del ARNm maduro. Los exones son regiones de una transcripción primaria que permanecen en el ARNm maduro. Los exones se cortan y empalman juntos para formar la secuencia de ARNm maduro. Las uniones de corte y empalme también se denominan como sitios de corte y empalme con el lado 5' de la unión denominado a menudo "sitio de corte y empalme 5'", o "sitio donante de corte y empalme" y el lado 3' del "sitio de corte y empalme 3'" o "sitio aceptor de corte y empalme". En el corte y empalme, el extremo 3' de un exón aguas arriba se une al extremo 5' del exón aguas abajo. Por lo tanto, el pre-ARNm sin corte y empalme tiene una unión de exón/intrón en el extremo 5' de un intrón de una unión de intrón/exón en el extremo 3' de un intrón. Después de que el intrón se elimina, los exones están contiguos en lo que a veces se denomina como la unión de exón/exón o límite en el ARNm maduro. Los sitios de corte y empalme crípticos son aquellos que son utilizados con menos frecuencia, pero que se pueden utilizar cuando el sitio de corte y empalme usual está bloqueado o no disponible. El corte y empalme alternativo, definido como el corte y empalme en conjunto de diferentes combinaciones de exones, con frecuencia da como resultado múltiples transcripciones de ARNm de un solo gen.

Hasta el 50% de enfermedades genéticas humanas que son resultado de una mutación puntual, dan como resultado un procesamiento aberrante de pre-ARNm. Dichas mutaciones puntuales pueden interrumpir un sitio de corte y empalme actual o crear un sitio de corte y empalme nuevo, dando como resultado transcripciones de ARNm compuestas por una combinación diferente de exones o con eliminaciones en los exones. Las mutaciones puntuales también pueden dar como resultado la activación de un sitio de corte y empalme críptico o interrumpir los elementos *cis* de regulación (es decir, potenciadores o silenciadores de corte y empalme (Cartegni et al., Nat. Rev. Genet., 2002, 3, 285-298; Drawczak et al., Hum. Genet., 1992, 90, 41-54). Los oligonucleótidos antisentido han sido utilizados para dirigir mutaciones que conducen a un corte y empalme aberrante en varias enfermedades genéticas, con el objeto de redirigir el corte y empalme para dar un producto de corte y empalme deseable (Kole, Acta Biochimica Polonica, 1997, 44, 231-238).

Los compuestos antisentido también se han utilizado para alterar la relación de variantes de corte y empalme alternativas de origen natural, tal como las formas largas y cortas del pre-ARNm de Bcl-x (Patente de Estados Unidos 6.172.216; Patente de Estados Unidos 6.214.986; Taylor et al., Nat. Biotechnol. 1999, 17, 1097-1100) o para forzar el salto de los exones específicos que contienen codones de terminación prematuros (Wilton et al., Neuromuscul. Disord., 1999, 9, 330-338). La Patente de Estados Unidos 5.627.274 y el documento WO 94/26887 describen composiciones y métodos para combatir el corte y empalme aberrante en una molécula de pre-ARNm que contiene una mutación que utiliza oligonucleótidos antisentido, que no activan ARNsa H.

50

La atrofia muscular espinal próxima, (SMA) es un trastorno neurodegenerativo, genético, caracterizado por la pérdida de neuronas motoras espinales. SMA es una enfermedad recesiva autosómica de aparición temprana, y actualmente es la causa principal de muerte entre infantes. La severidad de SMA varía entre pacientes y, por lo tanto, se ha clasificado en tres tipos. SMA de tipo I es la forma más grave con aparición en el momento del nacimiento o a los 6 meses, y típicamente da como resultado la muerte a los 2 años. Los niños con SMA de tipo I no tienen la capacidad de sentarse o caminar. SMA de tipo II es la forma intermedia y los pacientes tienen la capacidad de sentarse, pero no de ponerse en pie o caminar. Los pacientes con SMA de tipo III, una forma crónica de la enfermedad, típicamente desarrollan SMA después de los 18 meses de edad (Lefebvre et al., Hum. Mol. Genet., 1998, 7, 1531-1536).

60

La base molecular de SMA se origina por la pérdida tanto de copias del gen de supervivencia de la neurona motora 1 (SMN1), que también se conoce como SMN telomérico, una proteína que es parte de un complejo multiproteico considerado como implicado en la biogénesis y reciclaje de snRNP. Un gen casi idéntico, SMN2, que también puede conocerse como SMN Centromérico, existe en una región duplicada en el cromosoma 5q13 y modula la gravedad de la enfermedad. La expresión del gen SMN1 normal da como resultado únicamente la expresión de una proteína de supervivencia de la neurona motora (SMN). Aunque SMN1 y SMN2 tienen el potencial de codificar la misma proteína, SMN2 contiene una mutación silenciosa en la traducción en la posición +6 del exón 7, que da como resultado una inclusión ineficiente del exón 7 en las transcripciones de SMN2. Por lo tanto, la forma predominante de SMN2 es una versión truncada, que carece del exón 7, el cual es inestable e inactivo (Cartegni y Krainer, Nat. Genet., 2002, 30, 377-384). La expresión del gen SMN2 da como resultado aproximadamente del 10-20% de la proteína SMN y del 80-90% de la proteína SMN delta 7 no estable/no funcional. La proteína SMN desempeña una función bien establecida en el ensamblaje del espliceosoma y también puede transmitir el tráfico del ARNm en el axón y el extremo nervioso de las neuronas.

15 La tecnología antisentido es un medio eficaz para modular la expresión de uno o más productos génicos específicos, incluyendo productos de corte y empalme alternativos, y es útil únicamente en varias aplicaciones terapéuticas, de diagnóstico y de investigación. El principio detrás de la tecnología antisentido, es que un compuesto antisentido, que hibrida en un ácido nucleico diana, modula actividades de expresión genética tales como transcripción, corte y empalme o traducción a través de uno de varios mecanismos antisentido. La especificidad de secuencia de los compuestos antisentido los hace extremadamente atractivos como herramientas para validación de dianas y la funcionalización génica, así como productos terapéuticos para modular selectivamente la expresión de genes implicados en la enfermedad.

20 Se conocen en la técnica ciertos compuestos antisentido complementarios a SMN2. Véase, por ejemplo, el documento WO 2007/002390; Hua et al., American J. of Human Genetics (abril de 2008) 82, 1-15; Singh et al., RNA Bio. 6:3, 1-10 (2009). Ciertos compuestos antisentido y métodos descritos en el presente documento, poseen características deseables en comparación con los compuestos y métodos conocidos en la técnica. Se han descrito moléculas de ácido nucleico de péptido quimérico diseñadas para modular el corte y empalme de SMN2 y (documento WO 02/38738; Cartegni y Krainer, Nat. Struct. Biol., 2003, 10, 120-125). Hua Y et al (2008) The American Journal of Human Genetics 82: 834-848, describen compuestos antisentido que se dirigen al pre-ARNm de Smn2 humano, y su prueba de un efecto sobre la inclusión del exón 7 en ratones transgénicos SMN2 humanos.

## RESUMEN DE LA INVENCION

En un aspecto, la presente invención proporciona un compuesto antisentido que comprende un oligonucleótido antisentido complementario al intrón 7 de un pre-ARNm que codifica SMN2 humano, para su uso en el tratamiento de un sujeto humano que tiene atrofia muscular espinal (SMA), donde el compuesto se administra en el líquido cefalorraquídeo en el espacio intratecal del sujeto humano, donde el oligonucleótido antisentido tiene una secuencia de nucleobases que consiste en la secuencia de nucleobases de SEQ ID NO: 1, donde cada nucleósido del oligonucleótido antisentido comprende un resto de azúcar modificado, donde cada resto de azúcar modificado es un resto de azúcar 2'-metoxietilo y donde cada enlace internucleosídico es un enlace de fosforotioato.

La invención también proporciona el uso de un compuesto antisentido que comprende un oligonucleótido antisentido complementario al intrón 7 de un pre-ARNm que codifica SMN2 humano en la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento de un sujeto humano que tiene atrofia muscular espinal (SMA), donde el medicamento se administra en el líquido cefalorraquídeo en el espacio intratecal del sujeto humano, donde el oligonucleótido antisentido tiene una secuencia de nucleobases que consiste en la secuencia de nucleobases de SEQ ID NO: 1, donde cada nucleósido del oligonucleótido antisentido comprende un resto de azúcar modificado, donde cada resto de azúcar modificado es un resto de azúcar 2'-metoxietilo y donde cada enlace internucleosídico es un enlace de fosforotioato.

50 Otros aspectos de la invención se exponen en las presentes reivindicaciones.

En ciertos casos, la presente divulgación proporciona métodos que comprenden administrar a un sujeto un compuesto antisentido que comprende un oligonucleótido antisentido complementario al intrón 7 de un ácido nucleico que codifica SMN2 humano pre-ARNm, donde el compuesto antisentido se administra en el líquido cefalorraquídeo. En ciertos casos, la administración es en el espacio intratecal. En ciertos casos, la administración es en el líquido cefalorraquídeo en el cerebro. En ciertos casos, la administración comprende un bolo intravenoso. En ciertos casos, la administración comprende una infusión con una bomba de administración.

60 En ciertos casos, el compuesto antisentido se administra a una dosis de 0,01 a 10 miligramos de compuesto

antisentido por kilogramo de peso corporal del sujeto. En ciertos casos, la dosis es de 0,01 a 10 miligramos de compuesto antisentido por kilogramo de peso corporal del sujeto. En ciertos casos, la dosis es de 0,01 a 5 miligramos de compuesto antisentido por kilogramo de peso corporal del sujeto. En ciertos casos, la dosis es de 0,05 a 1 miligramos de compuesto antisentido por kilogramo de peso corporal del sujeto. En ciertos casos, la dosis es de 5 0,01 a 0,5 miligramos de compuesto antisentido por kilogramo de peso corporal del sujeto. En ciertos casos, la dosis es de 0,05 a 0,5 miligramos de compuesto antisentido por kilogramo de peso corporal del sujeto.

En ciertos casos, la dosis se administra a diario. En ciertos casos, la dosis se administra semanalmente. En ciertos casos, el compuesto antisentido se administra continuamente y donde la dosis es la cantidad administra al día. En 10 ciertos casos, el método comprende administrar al menos una dosis de inducción durante una fase de inducción y administrar al menos una dosis de mantenimiento durante una fase de mantenimiento. En ciertos casos, la dosis de inducción es de 0,05 a 5,0 miligramos de compuesto antisentido por kilogramo de peso corporal del sujeto. En ciertos casos, la dosis de mantenimiento es de 0,01 a 1,0 miligramos de compuesto antisentido por kilogramo de peso corporal del sujeto. En ciertos casos, la duración de la fase de inducción es de al menos 1 semana. En ciertos 15 casos, la duración de la fase de mantenimiento es de al menos 1 semana. En ciertos casos, cada dosis de inducción y cada dosis de mantenimiento comprende una única inyección. En ciertos casos, cada dosis de inducción y cada dosis de mantenimiento comprenden independientemente dos o más inyecciones. En ciertos casos, el compuesto antisentido se administra al menos 2 veces durante un periodo de tratamiento de al menos 1 semana. En ciertos casos, el periodo de tratamiento es de al menos un mes. En ciertos casos, el periodo de tratamiento es de al menos 20 2 meses. En ciertos casos, el periodo de tratamiento es de al menos 4 meses. En ciertos casos, la dosis de inducción se administra por uno o más bolos intravenosos y la dosis de mantenimiento se administra mediante una bomba de infusión.

En ciertos casos, el método comprende evaluar la tolerabilidad y/o la eficacia del compuesto antisentido. En ciertos 25 casos, la cantidad de dosis o frecuencia del compuesto antisentido se reduce después de una indicación de que la administración del compuesto antisentido no se tolera. En ciertos casos, la cantidad de dosis o frecuencia del compuesto antisentido se mantiene o se reduce tras una indicación de que la administración del compuesto antisentido es eficaz. En ciertos casos, la dosis de compuesto antisentido se aumenta después de una indicación de que la administración del compuesto antisentido no es eficaz. En ciertos casos, la frecuencia de administración del 30 compuesto antisentido se reduce tras una indicación de que la administración del compuesto antisentido es eficaz. En ciertos casos, la frecuencia de administración del compuesto antisentido se aumenta después de una indicación de que la administración del compuesto antisentido no es eficaz.

En ciertos casos, los métodos comprenden la coadministración del compuesto antisentido y al menos otra terapia. 35 En ciertos casos, un compuesto antisentido y al menos otra terapia se coadministran al mismo tiempo. En ciertos casos, un compuesto antisentido se administra antes de la administración de la al menos otra terapia. En ciertos casos, un compuesto antisentido se administra después de la administración de la al menos otra terapia. En ciertos casos, la al menos otra terapia comprende la administración de uno o más de ácido valproico, riluzol, hidroxiurea y butirato. En ciertos casos, al menos otra terapia comprende la administración de tricostatina A. En ciertos casos, la al 40 menos otra terapia comprende la administración de células madre. En ciertos casos, al menos otra terapia es una terapia génica. En ciertos casos, la terapia génica se administra al LCR y un compuesto antisentido se administra por vía sistémica. En ciertos casos, la terapia génica se administra al LCR y un compuesto antisentido se administra por vía sistémica y al LCR. En ciertos casos, la descripción proporciona regímenes de tratamiento en los que inicialmente, se administra un compuesto antisentido al LCR y por vía sistémica, seguido de la administración de 45 terapia génica al LCR y la administración sistémica del compuesto antisentido. En ciertos casos de este tipo, el sujeto es un infante en el momento del tratamiento inicial. En ciertos casos de este tipo, el sujeto tiene menos de 2 años. En ciertos casos, el compuesto antisentido se administra al SNC de un sujeto hasta que el sujeto tiene la edad suficiente para la terapia génica. En ciertos casos, el compuesto antisentido se administra por vía sistémica.

50 En ciertos casos, el compuesto antisentido se administra a una concentración de aproximadamente 0,01 mg/ml, aproximadamente 0,05 mg/ml, aproximadamente 0,1 mg/ml, aproximadamente 0,5 mg/ml, aproximadamente 1 mg/ml, aproximadamente 5 mg/ml, aproximadamente 10 mg/ml, aproximadamente 50 mg/ml, o aproximadamente 100 mg/ml.

55 En ciertos casos, la inclusión del exón 7 del ARNm de SMN2 en una neurona motora en el sujeto se aumenta. En ciertos casos, la inclusión de los aminoácidos del exón 7 en el polipéptido SMN2 en una neurona motora en el sujeto se aumenta.

60 En ciertos casos, la descripción proporciona métodos para aumentar la inclusión del exón 7 del ARNm de SMN2 en una neurona motora en un sujeto que comprende administrar al sujeto un compuesto antisentido que comprende un

oligonucleótido antisentido complementario al intrón 7 de un ácido nucleico que codifica SMN2 humano, y aumentar de este modo la inclusión del exón 7 del ARNm de SMN2 en la neurona motora en el sujeto.

5 En ciertos casos, la descripción proporciona métodos para aumentar la inclusión de los aminoácidos de exón 7 en el polipéptido SMN2 en una neurona motora en un sujeto que comprende administrar al sujeto un compuesto antisentido que comprende un oligonucleótido antisentido complementario al intrón 7 de un ácido nucleico que codifica SMN2 humano, y aumentar de este modo la inclusión de los aminoácidos del exón 7 en el polipéptido SMN2 en la neurona motora en el sujeto.

10 En ciertos casos, el sujeto tiene SMA. En ciertos casos, el sujeto tiene SMA de tipo I. En ciertos casos, el sujeto tiene SMA de tipo II. En ciertos casos, el sujeto tiene SMA de tipo III.

15 En ciertos casos, una primera dosis se administra en el útero. En ciertos casos, la primera dosis se administra antes de completar la formación de la barrera hematoencefálica. En ciertos casos, una primera dosis se administra dentro de la primera semana del nacimiento del sujeto. En ciertos casos, una primera dosis se administra dentro del primer mes del nacimiento del sujeto. En ciertos casos, una primera dosis se administra dentro de los 3 meses del nacimiento del sujeto. En ciertos casos, una primera dosis se administra dentro de los 6 meses del nacimiento del sujeto. En ciertos casos, una primera dosis se administra cuando el sujeto tiene de 1 a 2 años de edad. En ciertos casos, una primera dosis se administra cuando el sujeto tiene de 1 a 15 años de edad. En ciertos casos, una primera  
20 dosis se administra cuando el sujeto es mayor de 15 años de edad.

En ciertos casos, el sujeto es un mamífero. En ciertos casos, el sujeto es un ser humano.

25 En ciertos casos, los métodos comprenden identificar un sujeto que tiene SMA. En ciertos casos, el sujeto se identifica midiendo la actividad eléctrica de uno o más músculos del sujeto. En ciertos casos, el sujeto se identifica por una prueba genética para determinar si el sujeto tiene una mutación en el gen SMN1 del sujeto. En ciertos casos, el sujeto se identifica por biopsia muscular.

30 En ciertos casos, la administración del compuesto antisentido da como resultado un aumento en la cantidad de ARNm de SMN2 que tiene el exón 7 de al menos el 10%. En ciertos casos, el aumento en la cantidad de ARNm de SMN2 que tiene el exón 7 es de al menos el 20%. En ciertos casos, el aumento en la cantidad de ARNm de SMN2 que tiene el exón 7 es de al menos el 50%. En ciertos casos, la cantidad de ARNm de SMN2 que tiene el exón 7 es de al menos el 70%.

35 En ciertos casos, la administración del compuesto antisentido da como resultado un aumento en la cantidad de polipéptido SMN2 que tiene aminoácidos del exón 7 de al menos el 10%. En ciertos casos, donde el aumento en la cantidad de polipéptido SMN2 que tiene aminoácidos del exón 7 es de al menos el 20%. En ciertos casos, el aumento en la cantidad de polipéptido SMN2 que tiene aminoácidos del exón 7 es de al menos el 50%. En ciertos casos, el aumento en la cantidad de polipéptido SMN2 que tiene aminoácidos del exón 7 es de al menos el 70%.  
40

45 En ciertos casos, la administración del compuesto antisentido mejora al menos un síntoma de SMA en el sujeto. En ciertos casos, la administración del compuesto antisentido da como resultado una función motora mejorada en el sujeto. En ciertos casos, la administración del compuesto antisentido da como resultado una pérdida de la función motora retrasada o reducida en el sujeto. En ciertos casos, la administración del compuesto antisentido da como resultado una función respiratoria mejorada. En ciertos casos, la administración del compuesto antisentido da como resultado una mejora de la supervivencia.

50 En ciertos casos, al menos un nucleósido del oligonucleótido antisentido comprende un resto de azúcar modificado. En ciertos casos, al menos un resto de azúcar modificado comprende un resto de azúcar 2'-metoxietilo. En ciertos casos, esencialmente cada nucleósido del oligonucleótido antisentido comprende un resto de azúcar modificado. En ciertos casos, los nucleósidos que comprenden un resto de azúcar modificado comprenden todos la misma modificación de azúcar. En ciertos casos, donde cada resto de azúcar modificado comprende un resto de azúcar 2'-metoxietilo. En ciertos casos, cada nucleósido del oligonucleótido antisentido comprende un resto de azúcar modificado. En ciertos casos, todos los nucleósidos comprenden la misma modificación de azúcar. En ciertos casos,  
55 cada resto de azúcar modificado comprende un resto de azúcar 2'-metoxietilo. En ciertos casos, al menos un enlace internucleosídico es un enlace internucleosídico de fosforotioato. En ciertos casos, cada enlace internucleosídico es un enlace internucleosídico de fosforotioato.

60 En ciertos casos, el oligonucleótido antisentido consiste en 10 a 25 nucleósidos unidos. En ciertos casos, el oligonucleótido antisentido consiste en 12 a 22 nucleósidos unidos. En ciertos casos, el oligonucleótido antisentido

consiste en 15 a 20 nucleósidos unidos. En ciertos casos, el oligonucleótido antisentido consiste en 18 nucleósidos unidos.

En ciertos casos, el oligonucleótido antisentido es al menos un 90% complementario al ácido nucleico que codifica SMN2 humano. En ciertos casos, el oligonucleótido antisentido es completamente complementario al ácido nucleico que codifica SMN2 humano. En ciertos casos, el oligonucleótido tiene una secuencia de nucleobases que comprende al menos 10 nucleobases contiguas de la secuencia de nucleobases de SEQ ID NO: 1. En ciertos casos, el oligonucleótido tiene una secuencia de nucleobases que comprende al menos 15 nucleobases contiguas de la secuencia de nucleobases de SEQ ID NO: 1. En ciertos casos, el oligonucleótido tiene una secuencia de nucleobases que comprende la secuencia de nucleobases de SEQ ID NO: 1. En ciertos casos, el oligonucleótido tiene una secuencia de nucleobases que consiste en la secuencia de nucleobases de SEQ ID NO: 1.

En ciertos casos, el compuesto antisentido comprende un grupo conjugado o grupo terminal.

15 En ciertos casos, el compuesto antisentido consiste en el oligonucleótido antisentido.

En ciertos casos, el compuesto antisentido también se administra por vía sistémica. En ciertos casos, la administración sistémica es por inyección intravenosa o intraperitoneal. En ciertos casos, la administración sistémica y la administración al sistema nervioso central se realizan al mismo tiempo. En ciertos casos, la administración sistémica y la administración al sistema nervioso central se realizan en diferentes momentos.

En ciertos casos, la descripción proporciona la administración sistémica de compuestos antisentido, en solitario o junto con la administración al LCR. En ciertos casos, las composiciones farmacéuticas se administran por vía sistémica. En ciertos casos, las composiciones farmacéuticas se administran por vía subcutánea. En ciertos casos, las composiciones farmacéuticas se administran por vía intravenosa. En ciertos casos, las composiciones farmacéuticas se administran por inyección intramuscular.

En ciertos casos, las composiciones farmacéuticas se administran tanto directamente al LCR (por ejemplo, inyección IT y/o ICV y/o infusión) como por vía sistémica.

30

En ciertos casos, la descripción proporciona métodos para administrar a un sujeto que tiene al menos un síntoma asociado con SMA, al menos una dosis de un compuesto antisentido que comprende un oligonucleótido que consiste en 15 a 20 nucleósidos unidos y que tiene una secuencia de nucleobases que es complementaria al 100% con la SEQ ID NO. 7 en toda su longitud, y donde cada nucleósido es un nucleósido modificado por 2'-MOE; y donde al menos una dosis se administra entre 0,1 mg/kg y 5 mg/kg al LCR. En ciertos casos de este tipo, la dosis es entre 0,5 mg/kg y 2 mg/kg. En ciertos casos, al menos una dosis se administra por bolo intravenoso. En ciertos casos de este tipo, la dosis se administra por inyección de bolo intratecal. En ciertos casos, se administra al menos una segunda dosis. En ciertos casos de este tipo, la segunda dosis se administra al menos 2 semanas después de la primera dosis. En ciertos casos, la segunda dosis se administra al menos 4 semanas después de la primera dosis. En ciertos casos, la segunda dosis se administra al menos 8 semanas después de la primera dosis. En ciertos casos, la segunda dosis se administra al menos 12 semanas después de la primera dosis. En ciertos casos, la segunda dosis se administra al menos 16 semanas después de la primera dosis. En ciertos casos, la segunda dosis se administra al menos 20 semanas después de la primera dosis. En ciertos casos, el sujeto tiene menos de 2 años de edad en el momento de la primera dosis. En ciertos casos, el sujeto tiene entre 2 y 15 años de edad. En ciertos casos, el sujeto tiene entre 15 y 30 años de edad. En ciertos casos, el sujeto tiene más de 30 años de edad. En ciertos casos, al menos un síntoma asociado con SMA se reduce o su progresión se ha ralentizado. En ciertos casos, el oligonucleótido es ISIS396443.

En ciertos casos, la descripción proporciona métodos para administrar a un sujeto que tiene al menos un síntoma asociado con SMA, al menos una dosis de un compuesto antisentido que comprende un oligonucleótido que consiste en 15 a 20 nucleósidos unidos y que tiene una secuencia de nucleobases que comprende que es complementario al 100% con la SEQ ID NO. 7 en toda su longitud, y donde cada nucleósido es un nucleósido modificado por 2'-MOE; y donde al menos una dosis se administra por vía sistémica. En ciertos casos de este tipo, al menos una dosis se administra por bolo intravenoso. En ciertos casos de este tipo, la dosis se administra por inyección de bolo intravenoso. En ciertos casos, la dosis administrada es entre 0,5 mg/kg y 50 mg/kg. En ciertos casos, la dosis es entre 1 mg/kg y 10 mg/kg. En ciertos casos, la dosis es entre 1 mg/kg y 5 mg/kg. En ciertos casos, la dosis es entre 0,5 mg/kg y 1 mg/kg. En ciertos casos, se administra al menos una segunda dosis. En ciertos casos de este tipo, la segunda dosis se administra al menos 2 semanas después de la primera dosis. En ciertos casos, la segunda dosis se administra al menos 4 semanas después de la primera dosis. En ciertos casos, la segunda dosis se administra al menos 8 semanas después de la primera dosis. En ciertos casos, la segunda dosis se administra al

menos 12 semanas después de la primera dosis. En ciertos casos, la segunda dosis se administra al menos 16 semanas después de la primera dosis. En ciertos casos, la segunda dosis se administra al menos 20 semanas después de la primera dosis. En ciertos casos, el sujeto tiene menos de 2 años de edad en el momento de la primera dosis. En ciertos casos, el sujeto tiene entre 2 y 15 años de edad. En ciertos casos, el sujeto tiene entre 15 y 30 años de edad. En ciertos casos, el sujeto tiene más de 30 años de edad. En ciertos casos, al menos un síntoma asociado con SMA se reduce o su progresión se ha ralentizado. En ciertos casos, el oligonucleótido es ISIS396443.

En ciertos casos, la descripción proporciona métodos para administrar a un sujeto que tiene al menos un síntoma asociado con SMA, al menos una dosis al LCR y al menos una dosis sistémica de un compuesto antisentido que comprende un oligonucleótido que consiste en 15 a 20 nucleósidos unidos y que tiene una secuencia de nucleobases que es complementaria al 100% con la SEQ ID NO. 7 en toda su longitud, y donde cada nucleósido es un nucleósido modificado por 2'-MOE. En ciertos casos de este tipo, la dosis al LCR es entre 0,1 mg/kg y 5 mg/kg. En ciertos casos, la dosis sistémica es entre 0,5 mg/kg y 50 mg/kg. En ciertos casos, al menos una dosis al LCR se administra por bolo intravenoso. En ciertos casos de este tipo, al menos una dosis al LCR se administra por inyección de bolo intratecal. En ciertos casos, al menos una dosis sistémica se administra por bolo intravenoso. En ciertos casos de este tipo, al menos una dosis sistémica se administra por inyección subcutánea. En ciertos casos, la dosis al LCR y la dosis sistémica se administran al mismo tiempo. En ciertos casos, la dosis al LCR y la dosis sistémica se administran en momentos diferentes. En ciertos casos, el sujeto tiene menos de 2 años de edad en el momento de la primera dosis. En ciertos casos, el sujeto tiene entre 2 y 15 años de edad. En ciertos casos, el sujeto tiene entre 15 y 30 años de edad. En ciertos casos, el sujeto tiene más de 30 años de edad. En ciertos casos, al menos un síntoma asociado con SMA se reduce o su progresión se ha ralentizado. En ciertos casos, el oligonucleótido es ISIS396443.

En ciertos casos, la descripción proporciona métodos para administrar a un sujeto que tiene al menos un síntoma asociado con SMA, al menos una dosis sistémica de un compuesto antisentido que comprende un oligonucleótido que consiste en 15 a 20 nucleósidos unidos y que tiene una secuencia de nucleobases que es complementaria al 100% con la SEQ ID NO. 7 en toda su longitud, y donde cada nucleósido es un nucleósido modificado por 2'-MOE; y al menos una dosis de un agente de terapia génica. En ciertos casos, la dosis sistémica es entre 0,5 mg/kg y 50 mg/kg. En ciertos casos, al menos una dosis sistémica se administra por bolo intravenoso. En ciertos casos de este tipo, al menos una dosis sistémica se administra por inyección subcutánea. En ciertos casos, la dosis sistémica y el agente de terapia génica se administran al mismo tiempo. En ciertos casos, la dosis sistémica y el agente de terapia génica se administran en momentos diferentes. En ciertos casos, el agente de terapia génica se administra al LCR. En ciertos casos de este tipo, el agente de terapia génica se administra por inyección intratecal y/o infusión. En ciertos casos de este tipo, el agente de terapia génica se administra por inyección intracerebroventricular y/o infusión. En ciertos casos, el sujeto tiene menos de 2 años de edad en el momento de la primera dosis. En ciertos casos, el sujeto tiene entre 2 y 15 años de edad. En ciertos casos, el sujeto tiene entre 15 y 30 años de edad. En ciertos casos, el sujeto tiene más de 30 años de edad. En ciertos casos, al menos un síntoma asociado con SMA se reduce o su progresión se ha ralentizado. En ciertos casos, el oligonucleótido es ISIS396443.

En ciertos casos, la descripción proporciona métodos para seleccionar un sujeto que tenga al menos un síntoma asociado con SMA y administrar un compuesto antisentido de acuerdo con cualquiera de los métodos anteriores. En ciertos casos de este tipo, al menos un síntoma de SMA se evalúa después de la administración. En ciertos casos de este tipo, se mejora al menos un síntoma de SMA. En ciertos casos de este tipo, al menos un síntoma de SMA no progresa o progresa más lentamente en comparación con un sujeto que no ha recibido la administración de un compuesto antisentido.

En ciertos casos, la descripción proporciona un compuesto antisentido que comprende un oligonucleótido antisentido complementario al intrón 7 de un ácido nucleico que codifica SMN2 humano, para su uso en cualquier de los métodos anteriores. En ciertos casos, la descripción proporciona tal compuesto para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección asociada con la supervivencia de la neurona motora 1 (SMN1).

En ciertos casos, la descripción proporciona uso de un compuesto antisentido que comprende un oligonucleótido antisentido complementario al intrón 7 de un ácido nucleico que codifica SMN2 humano en la fabricación de un medicamento, para su uso en cualquier de los métodos anteriores. En ciertos casos, el medicamento es para tratar una enfermedad o afección asociada con la supervivencia de la neurona motora 1 (SMN1).

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La figura 1 muestra resultados de la duración de acción del estudio descrito en el Ejemplo 4, en el que el porcentaje de SMN2 que incluye el exón 7 (eje y) se evaluó a las 0, 2, 4, 6, y 8 semanas después de la terminación de 7 días de

tratamiento (eje x). La muestra de la semana "0" se tomó el 1 día después de la terminación del tratamiento. CON representa ratones tratados con solución salina. No hubo diferencia en el % de inclusión entre ratones tratados con solución salina de control en diferentes puntos de tiempo de 0 a 6 meses.

5 La figura 2 muestra resultados de la duración de acción de un estudio descrito en el Ejemplo 4, en el que se evaluó el porcentaje de SMN2 que incluye el exón 7 a los 0, 0,5, 1, 2, 5, y 6 meses después de la terminación de 7 días de tratamiento. La muestra del mes "0" se tomó el 1 día después de la terminación del tratamiento. CON representa ratones tratados con solución salina. No hubo diferencia en el % de inclusión entre ratones tratados con solución salina de control en diferentes puntos de tiempo de 0 a 6 meses.

10 La figura 3 muestra los resultados de un experimento analizado en el Ejemplo 6 que mide el efecto de la administración embrionaria de ISIS396443 en la longitud de la cola en la cepa de ratones con SMA de Taiwán. La figura 3A muestra el primero de dichos experimentos y la figura 3B muestra un experimento repetido que puede probar una concentración diferente de compuesto antisentido, como se observa, y que incluye datos de ratones normales para comparación.

15 La figura 4 muestra resultados de western blots analizados en el Ejemplo 7. El eje Y es el porcentaje de SMN en las diversas muestras que incluyen el exón 7.

Las figuras 5 y 6 muestran resultados de experimentos analizados en el Ejemplo 7. Se realizaron varias evaluaciones de ratones con SMA (cepa de Taiwán) después del tratamiento con un compuesto antisentido o con un nucleótido de control.

La figura 7 muestra una curva de supervivencia de un experimento analizado en el Ejemplo 7.

20 La figura 8 muestra resultados de una evaluación de varias neuronas motoras en diferentes porciones de médula espinal, después del tratamiento con un compuesto antisentido o con un oligonucleótido de control, como se describe en el Ejemplo 7.

La figura 9 muestra resultados de una evaluación de un ARN de SMN completo (incluyendo exón 7) en animales tratados con antisentido, como se analiza en el Ejemplo 7.

25 La figura 10 muestra la curva de supervivencia de un experimento analizado en el Ejemplo 7, en el que los animales (1) estaban sin tratar; (2) se les administró una dosis simple de compuesto antisentido al nacer (Día P0); o (3) se les administró una primera dosis en P0 y una segunda dosis el día 21 (P21).

La figura 11 muestra una curva de supervivencia de un experimento descrito en el Ejemplo 7, que compara animales que recibieron la segunda dosis con animales que recibieron únicamente la primera dosis.

30 La figura 12 muestra resultados de un experimento analizado en el Ejemplo 9, en el que se administró el compuesto antisentido a monos mediante infusión intratecal y la concentración del compuesto se evaluó en diferentes tejidos después de 96 horas.

La figura 13 muestra una curva de supervivencia para los experimentos analizados en el Ejemplo 12, en los que se administran diferentes de compuesto antisentido a ratones con SMA grave mediante inyección subcutánea.

### 35 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Debe interpretarse que tanto la descripción general anterior como la siguiente descripción detallada son solamente ejemplares y explicativos, y no restringen la invención, según se reivindica. En el presente documento, el uso del singular incluye el plural, a menos que se indique específicamente otra cosa. Como se usa en el presente documento, el uso de "o" significa "y/o" a menos que se indique otra cosa. Además, el uso del término "que incluye", así como otras formas, tales como "incluye" e "incluido", no es limitante. Además, términos tales como "elemento" o "componente" incluyen tanto elementos como componentes que comprenden una unidad y elementos y componentes que comprenden más de una subunidad a menos que se indique específicamente otra cosa.

45 Los encabezados de sección utilizados en el presente documento son solo para fines organizativos y no deben interpretarse como limitantes de la materia objeto descrita.

#### 50 I. Definiciones

A menos que se proporcionen definiciones específicas, la nomenclatura utilizada en relación con los procedimientos y técnicas química analítica, química orgánica sintética y química medicinal y farmacéutica que se describe en el presente documento es la bien conocida y usada comúnmente en la técnica. Las técnicas estándar pueden usarse para síntesis químicas, y análisis químico. Se pueden encontrar ciertas técnicas y procedimientos de este tipo, por ejemplo, en "Carbohydrate Modifications in Antisense Research" Editado por Sangvi y Cook, American Chemical Society, Washington D.C., 1994; "Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Publishing Co., Easton, Pa., 18ª edición, 1990; y "Antisense Drug Technology, Principles, Strategies, and Applications" Editado por Stanley T. Crooke, CRC Press, Boca Raton, Florida; y Sambrook et al., "Molecular Cloning, A laboratory Manual", 2ª Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

60



A menos que se indique otra cosa, los siguientes términos tienen los siguientes significados:

"Nucleósido" significa un compuesto que comprende un resto de base heterocíclica y un resto de azúcar. Los nucleósidos incluyen, pero sin limitación, nucleósidos de origen natural, nucleósidos modificados, y nucleósidos que tienen bases miméticas y/o grupos de azúcar. Los nucleósidos pueden ser modificados con cualquiera de una  
5 diversidad de sustituyentes.

El "resto de azúcar" significa un azúcar o sustituto de azúcar natural o modificado.

"Azúcar natural" significa un resto de ribofuranosa de ADN (2'-H) o ARN (2'-OH).

10

"Azúcar modificado" significa un resto de ribofuranosa que comprende al menos un sustituyente diferente de un azúcar natural.

"Sustituto de azúcar" significa una estructura diferente de un anillo de ribofuranosa, que tiene la capacidad de  
15 sustituir el azúcar de un nucleósido. Los ejemplos de sustitutos de azúcar incluyen, pero sin limitación, sistemas de apertura de anillo, anillos de 6 miembros, azúcares en los que el oxígeno se reemplaza con, por ejemplo, azufre o nitrógeno. Por ejemplo, los sustitutos de azúcar incluyen, pero sin limitación, morfolinos y azúcares que contienen 4'-tio.

20 "Nucleobase" significa la porción base heterocíclica de un nucleósido. Las nucleobases pueden ser de origen natural o pueden ser modificadas. En ciertos casos, una nucleobase puede comprender cualquier átomo o grupo de átomos con la capacidad de que el hidrógeno se una a una nucleobase de otro ácido nucleico.

El "nucleótido" significa un nucleósido que comprende un grupo de unión a fosfato. Como se usa en el presente  
25 documento, los nucleósidos incluyen nucleótidos.

El "nucleósido modificado" es un nucleósido que comprende al menos una modificación comparada con nucleósidos de ARN o ADN de origen natural. Dicha modificación puede estar en el resto de azúcar y/o en la nucleobase.

30 El "nucleósido bicíclico" o "BNA" significa un nucleósido, donde el resto de azúcar del nucleósido comprende un puente que conecta dos átomos de carbono del anillo de azúcar, formando de este modo un resto de azúcar bicíclica.

"Nucleósido bicíclico 4'-2'" significa un nucleósido bicíclico que comprende un anillo de furanosa que comprende un  
35 puente que conecta dos átomos de carbono del anillo de furanosa que conecta el átomo de carbono 2' y el átomo de carbono 4' del anillo de azúcar.

"Modificado en 2'" o "2'-sustituido" significa un nucleósido que un azúcar que comprende un sustituyente en la  
40 posición 2' diferente a H u OH.

"2'-OMe" o "2'-OCH<sub>3</sub>" o "2'-O-metilo" significa cada uno un nucleósido que comprende un azúcar que comprende un  
grupo -OCH<sub>3</sub> en la posición 2' del anillo de azúcar.

"MOE" o "2'-MOE" o "2'-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>" o "2'-O-metoxietilo" significa cada uno un nucleósido que comprende un  
45 azúcar que comprende un grupo -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub> en la posición 2' del anillo de azúcar.

"Oligonucleótido" significa un compuesto que comprende una pluralidad de nucleósidos unidos. En ciertos casos, una o más de la pluralidad de nucleósidos está modificada. En ciertos casos, un oligonucleótido comprende uno o  
50 más ribonucleósidos (ARN) y/o desoxirribonucleósidos (ADN).

"Oligonucleósido" significa un oligonucleótido en el que ninguno de los enlaces de internucleósido contiene un átomo  
de fósforo. Como se usa en el presente documento, oligonucleótidos incluye oligonucleósidos.

"Oligonucleótido modificado" significa un oligonucleótido que comprende al menos un nucleósido modificado y/o al  
55 menos un enlace de internucleósido modificado.

"Enlace de internucleósido" significa un enlace covalente entre los nucleósidos adyacentes de un oligonucleótido.

"Enlace de internucleósido de origen natural" significa un enlace de fosfodiéster de 3' a 5'.

60

"Enlace de internucleósido modificado" significa cualquier enlace de internucleósido además de un enlace de internucleósido de origen natural.

5 "Compuesto oligomérico" significa un compuesto que comprende un oligonucleótido. En ciertos casos, un compuesto oligomérico consiste en un oligonucleótido. En ciertos casos, el compuesto oligomérico comprende además uno o más grupos conjugados y/o terminales.

10 "Compuesto antisentido" significa un compuesto oligomérico, al menos una porción del cual es al menos parcialmente complementaria con un ácido nucleico diana con el que se hibrida, donde dicha hibridación da como resultado al menos una actividad antisentido.

"Oligonucleótido antisentido" significa un compuesto antisentido donde el compuesto oligomérico consiste en un oligonucleótido.

15 "Actividad antisentido" se refiere a cualquier efecto detectable y/o medible atribuible a la hibridación de un compuesto antisentido con su ácido nucleico diana. En ciertos casos, dicha actividad antisentido es un aumento o disminución en una cantidad de ácido nucleico o proteína. En ciertos casos, dicha actividad antisentido es un cambio en la relación de variantes de corte y empalme de un ácido nucleico o proteína. En ciertos casos, dicha actividad antisentido es un cambio fenotípico en una célula y/o sujeto.

20 "Detección" o "medición" de la actividad antisentido puede ser directa o indirecta. Por ejemplo, en ciertos casos, la actividad antisentido se evalúa detectando y/o midiendo la cantidad de ácido nucleico o proteína diana o las cantidades relativas de las variantes de corte y empalme de un ácido nucleico o proteína diana. En ciertos casos, la actividad antisentido se detecta observando un cambio fenotípico en una célula o animal. En relación con cualquier actividad, respuesta o efecto, los términos "detectar" y "medir", indican que se realiza una prueba de detección o medición. Dicha detección y/o medición puede incluir valores de cero. Por lo tanto, si una prueba de detección o medición da como resultado un hallazgo de una falta de actividad (actividad de cero), no obstante, se ha realizado la etapa para detectar o medir la actividad.

30 "Ácido nucleico diana" se refiere a cualquier molécula de ácido nucleico cuya expresión, cantidad, o actividad tiene la capacidad de modularse a través de un compuesto antisentido.

"ARNm diana" significa una molécula de ARN preseleccionada que codifica una proteína.

35 "pre-ARNm diana" significa una transcripción de ARN preseleccionada que no se ha procesado completamente en el ARNm. Particularmente, el pre-ARNm incluye uno o más intrones.

"Proteína diana" significa una proteína codificada por un ácido nucleico diana.

40 "Modulación" significa una perturbación de función o actividad. En ciertos casos, la modulación significa un aumento en la expresión génica. En ciertos casos, la modulación significa una disminución de la expresión génica.

"Expresión" significa cualquier función y etapas mediante las cuales una información codificada de un gen se convierte en estructuras presentes y que operan en una célula.

45 "Secuencia de nucleobases" significa el orden de nucleobases contiguas, en una orientación 5' a 3', independiente de cualquier modificación de azúcar, enlace y/o nucleobase.

"Nucleobase contigua" significa nucleobases inmediatamente adyacentes entre sí en un ácido nucleico.

50 "Complementariedad de nucleobases" significa la capacidad de dos nucleobases de emparejarse de forma no covalente a través de un enlace de hidrógeno.

55 "Complementariedad" significa que un primer ácido nucleico tiene la capacidad de hibridar un segundo ácido nucleico en condiciones de hibridación rigurosas. Por ejemplo, un compuesto antisentido es complementario con su ácido nucleico diana, si es capaz de hibridarse con el ácido nucleico diana en condiciones de hibridación rigurosas.

"Completamente complementario" significa que cada nucleobase de un primer ácido nucleico es capaz de emparejarse con una nucleobase en cada posición contigua correspondiente en un segundo ácido nucleico.

60

- "Porcentaje de complementariedad" de un compuesto antisentido significa el porcentaje de nucleobases del compuesto antisentido que son complementarias con porción de longitud igual de un ácido nucleico diana. El porcentaje de complementariedad se calcula dividiendo el número de nucleobases del oligonucleótido antisentido, que son complementarias con las nucleobases en las posiciones contiguas correspondientes en el ácido nucleico diana a través de la longitud total del compuesto antisentido.
- 5 "Porcentaje de identidad" significa el número de nucleobases en el primer ácido nucleico que son idénticas a las nucleobases en las posiciones correspondientes en un segundo ácido nucleico, dividido entre el número total de nucleobases en el primer ácido nucleico.
- 10 "Hibridar" significa la hibridación de los ácidos nucleicos complementarios que tiene lugar a través de la complementariedad de nucleobases.
- "Apareamiento incorrecto" significa una nucleobase en un primer ácido nucleico que es capaz de emparejarse con una nucleobase en una posición correspondiente de un segundo ácido nucleico.
- 15 "Secuencia de nucleobases idéntica" significa que tiene la misma secuencia de nucleobases, independiente de cualquier modificación química con respecto a los nucleósidos.
- 20 Las "modificaciones diferentes" o "modificadas en forma diferentes" se refieren a nucleósidos o enlaces internucleosídicos que tienen modificaciones de nucleósido o enlaces nucleosídicos diferentes de cualquier otro, incluyendo la ausencia de modificaciones. Por lo tanto, por ejemplo, un nucleósido MOE y un nucleósido de ADN no modificado están "modificados de forma diferente" incluso aunque el nucleósido de ADN no esté modificado. Asimismo, el ADN y el ARNm están "modificados de forma diferente" incluso aunque ambos sean nucleósidos no modificados de origen natural. Los nucleósidos que son los mismos pero que comprenden diferentes nucleobases no están modificados de forma diferente, a menos que se indique otra cosa. Por ejemplo, un nucleótido que comprende un azúcar modificado por 2'-OMe y una nucleobase de adenina y un nucleósido que comprende un azúcar modificado por 2'-OMe y una nucleobase de tiamina no están modificados de forma diferente.
- 25 "Las mismas modificaciones" se refiere a nucleósidos y enlaces internucleosídicos (incluyendo nucleósidos y enlaces internucleosídicos no modificados) que son iguales que otros. Por lo tanto, por ejemplo, dos nucleósidos de ADN no modificados tienen la "misma modificación" incluso aunque el nucleósido de ADN no esté modificado.
- "Tipo de modificación" o nucleósido de un "tipo" significa la modificación de un nucleósido e incluye nucleósidos modificados y no modificados. Por consiguiente, a menos que se indique otra cosa, un "nucleósido" que tiene una modificación de un primer tipo" puede ser un nucleósido no modificado.
- 35 Las "regiones separadas" de un oligonucleótido significa una porción de un oligonucleótido, donde los nucleósidos y enlaces internucleosídicos dentro de la región comprenden todas las mismas modificaciones; y los nucleósidos y/o enlaces internucleosídicos de cualquier porción adyacente, incluyen al menos una modificación diferente.
- 40 "Motivo" significa un patrón de nucleobases modificadas y/o no modificadas, azúcares y/o enlaces internucleosídicos en un oligonucleótido.
- 45 "Oligonucleótido completamente modificado" significa que cada nucleobase, cada azúcar y/o cada enlace internucleosídico está modificado.
- "Oligonucleótido modificado de manera uniforme" significa que cada nucleobase, cada azúcar, y/o cada enlace internucleosídico tiene la misma modificación en todo el oligonucleótido modificado.
- 50 "Motivo alterno" significa un oligonucleótido o una porción del mismo, que tiene al menos cuatro regiones separadas de nucleósidos modificados en un patrón  $(AB)_nA_m$ , donde A representa una región de nucleósidos que tiene un primer tipo de modificación; B representa una región de nucleósidos que tiene un diferente tipo de modificación; n es 2-15; y m es 0 o 1. Por lo tanto, en ciertos casos, los motivos alternos incluyen 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 o más regiones alternas. En ciertos casos, cada región A y cada región B comprenden independientemente 1-4 nucleósidos.
- 55 "Sujeto" significa un ser humano o animal no humano seleccionado para tratamiento o terapia.
- 60 "Sujeto que lo necesita" significa un sujeto identificado como que necesita una terapia o tratamiento. En dichos

casos, un sujeto tiene una o más indicaciones de tener o desarrollar SMA.

"Administración" significa proporcionar un agente o composición farmacéutica a un sujeto, e incluye, pero sin limitación, la administración por parte de un profesional médico o autoadministración.

5

"Administración parenteral" significa administración a través de inyección o infusión. La administración parenteral incluye, pero sin limitación, administración subcutánea, administración intravenosa, o administración intramuscular.

10 "Administración sistémica" significa administración a un área diferente del lugar de actividad previsto. Los ejemplos de administración sistémica son la administración subcutánea y administración intravenosa, y administración intraperitoneal.

"Administración subcutánea" significa administración justo debajo de la piel.

15 "Administración intravenosa" significa administración en una vena.

"Líquido cefalorraquídeo" o "LCR" significa el fluido que llena el espacio alrededor del cerebro y la médula espinal.

20 "Administración al líquido cefalorraquídeo" significa cualquier administración que administra una sustancia directamente al LCR.

"Intracerebroventricular" o "ICV", significa administración en un sistema ventricular del cerebro.

25 "Intratecal" o "IT" significa administración al LCR debajo de la membrana aracnoidea, que cubre el cerebro y la médula espinal. La inyección IT se realiza a través de la teca de la médula espinal en el espacio subaracnoideo, donde se inyecta un agente farmacéutico en la capa que rodea la médula espinal.

30 "Fase de inducción" significa una fase de dosificación durante la cual se inicia la administración y se logran concentraciones de estado estable del agente farmacéutico activo en un tejido diana. Por ejemplo, una fase de inducción es una fase de dosificación durante la cual se logran concentraciones de estado estable del oligonucleótido antisentido en el hígado.

35 "Fase de mantenimiento" significa una fase de dosificación después de que se han logrado las concentraciones de estado estable del tejido diana del fármaco.

"Duración" significa el periodo de tiempo durante el cual continua una actividad o evento. Por ejemplo, la duración de una fase de inducción es el periodo de tiempo durante el cual se administran las dosis de inducción.

40 "Dosis de mantenimiento" significa una dosis administrada en una sola administración durante la fase de mantenimiento. Como se usa en el presente documento, "dosis de inducción" significa una dosis administrada en una sola administración durante la fase de inducción.

45 "Coadministración" significa la administración de dos o más agentes farmacéuticos a un sujeto. Los dos o más agentes farmacéuticos pueden estar en una sola composición farmacéutica o pueden estar en composiciones farmacéuticas separadas. Cada uno de los dos o más agentes farmacéuticos pueden administrarse a través de las mismas, o diferentes rutas de administración. La coadministración incluye la administración en paralelo o secuencialmente.

50 "Terapia" significa un método de tratamiento de enfermedad. En ciertos casos, la terapia incluye, pero sin limitación, terapias quirúrgicas, terapias químicas e intervenciones físicas, tal como respiración asistida, tubos de alimentación y terapia física, para el propósito de aumentar la resistencia.

55 "Tratamiento" significa la aplicación de uno o más procedimientos específicos usados para la curación o mejoría de una enfermedad. En ciertos casos, el procedimiento específico es la administración de uno o más agentes farmacéuticos.

60 "Mejora" significa una disminución de la gravedad de al menos un indicador de una afección o enfermedad. En ciertos casos, la mejora incluye un retraso o disminución en el progreso de uno o más indicadores de una afección o enfermedad. La gravedad de indicadores puede determinarse mediante medidas subjetivas u objetivos, que se conocen por los expertos en la técnica.

"Prevenir de la aparición de" significa que se evita el desarrollo de una afección o enfermedad en un sujeto que está en riesgo de desarrollar la enfermedad o afección. En ciertos casos, un sujeto en riesgo de desarrollar la enfermedad o afección recibe un tratamiento similar al tratamiento recibido por un sujeto que ya tiene la enfermedad o afección.

5

"Retraso de la aparición de" significa retrasar el desarrollo de una afección o enfermedad en un sujeto que está en riesgo de desarrollar la enfermedad o afección.

"Ralentizar el progreso de" significa que la gravedad de al menos un síntoma asociado con una enfermedad o afección empeora de forma menos rápida.

10

"Aminoácidos del exón 7" significa la porción de una proteína SMN que corresponde al exón 7 del ARNm de SMN. Los aminoácidos del exón 7 están presentes en la proteína SMN expresada de ARNm de SMN, donde el exón 7 se excluyó durante el corte y empalme.

15

"Proteína SMN" significa una proteína de supervivencia de la neurona motora de longitud completa normal. SMN puede expresarse en un gen SMN1 o de un gen SMN2, con la condición de que el exón 7 esté presente en el ARNm maduro y los aminoácidos del exón 7 estén presentes en la proteína SMN.

"Dosis" significa una cantidad especificada de un agente farmacéutico proporcionada en una sola administración o durante una cantidad de tiempo especificada. En ciertos casos, se puede administrar una dosis en dos o más bolos, comprimidos o inyecciones. Por ejemplo, en ciertos casos, donde se desea una administración subcutánea o intratecal o ICV, la dosis deseada requiere un volumen que no se adapta fácilmente a través de una sola inyección. En dichos casos, se pueden utilizar dos o más inyecciones para lograr la dosis deseada. En el establecimiento de una infusión continua, la dosis puede expresarse como la cantidad de un agente farmacéutico administrada por unidad de tiempo.

20

"Unidad de dosificación" significa una forma en la que se proporciona un agente farmacéutico. En ciertos casos, una unidad de dosificación es un vial que contiene un oligonucleótido liofilizado. En ciertos casos, una unidad de dosificación es un vial que contiene un oligonucleótido reconstituido.

30

"Cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad de un agente farmacéutico que proporciona un beneficio terapéutico para un animal.

"Composición farmacéutica" significa una mezcla de sustancias adecuadas para administración a un individuo que incluye un agente farmacéutico. Por ejemplo, una composición farmacéutica puede comprender un oligonucleótido modificado y una solución acuosa estéril.

35

"Perfil de seguridad aceptable" significa un patrón de efectos secundarios que está dentro de los límites clínicamente aceptables.

40

"Efecto secundario" significa una respuesta fisiológica atribuible a un tratamiento diferente de los efectos deseados.

### **1. Ciertos oligonucleótidos modificados**

45

En ciertos casos, la presente descripción proporciona métodos y composiciones que implican oligonucleótidos antisentido que comprenden una o más modificaciones en comparación con oligonucleótidos de oligómeros de origen natural, tal como ADN o ARN. Dichos oligonucleótidos antisentido modificados pueden poseer una o más propiedades deseables. Ciertas modificaciones de este tipo alteran la actividad antisentido del oligonucleótido antisentido, por ejemplo, aumentando la afinidad del oligonucleótido antisentido por su ácido nucleico diana, aumentando su resistencia a una o más nucleasas, y/o alterando las farmacocinéticas o distribución tisular del oligonucleótido. En ciertos casos, dichos oligonucleótidos antisentido modificados comprenden uno o más nucleósidos modificados y/o uno o más enlaces de nucleósido modificados y/o uno o más grupos conjugados.

50

#### **55 a. Ciertos nucleósidos modificados**

En ciertos casos, los oligonucleótidos antisentido comprenden uno o más nucleótidos modificados. Dichos nucleósidos modificados pueden incluir un azúcar modificado y/o una nucleobase modificada. En ciertos casos, la incorporación de dichos nucleósidos modificados en un oligonucleótido da como resultado una afinidad aumentada por un ácido nucleico diana y/o estabilidad aumentada, incluyendo, pero sin limitación, degradación de la resistencia

60

a la nucleasa aumentada, y/o propiedades de toxicidad y/o captación mejoradas del oligonucleótido modificado.

### **i. Ciertas nucleobases**

5 La porción de base de origen natural de los nucleósidos son de base heterocíclica, típicamente purinas y pirimidinas. Además de las nucleobases "no modificadas" o "naturales", tal como las nucleobases de purina adenina (A) y guanina (G), y las nucleobases de pirimidina timina (T), citosina (C) y uracilo (U), muchas nucleobases modificadas o miméticos de nucleobases que se conocen por los expertos en la técnica, son adecuados para la incorporación en los compuestos descritos en el presente documento. En ciertos casos, una nucleobase modificada es una  
 10 nucleobase que es muy similar en estructura a la nucleobase parental, tal como, por ejemplo, una purina 7-deaza, una citosina 5-metilo, o abrazadera de G. En ciertos casos, el mimético de nucleobases incluye estructuras más complicadas, tal como, por ejemplo, un mimético de nucleobase de fenoxazina tricíclica. Los métodos para la preparación de las nucleobases modificadas mencionadas anteriormente se conocen bien por los expertos en la técnica.

15

### **ii. Ciertos azúcares modificados y sustitutos de azúcar**

Los oligonucleótidos antisentido de la presente descripción pueden contener opcionalmente uno o más nucleósidos, donde el resto de azúcar está modificado, en comparación con un azúcar natural. Los oligonucleótidos que  
 20 comprenden dichos nucleósidos modificados de azúcar pueden tener estabilidad de nucleasa aumentada, afinidad de unión aumentada, o alguna otra propiedad biológica beneficiosa. Dichas modificaciones incluyen, sin limitación, adición de grupos sustituyentes, puenteo de átomos de anillo no germinal para formar un ácido nucleico bicíclico (BNA), reemplazo de un átomo de oxígeno de anillo de ribosilo con S, N(R), o C(R<sub>1</sub>)(R)<sub>2</sub> (R = H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> o un grupo protector) y combinaciones de estos, tal como, por ejemplo, un nucleósido 2'-F-5'-metilo-sustituido (véase la  
 25 Solicitud Internacional PCT WO 2008/101157 Publicada el 8/21/08 para otros nucleósidos 5',2'-bis sustituidos descritos) o reemplazo del átomo de oxígeno del anillo de ribosilo con S con sustitución adicional en la posición 2' (véase la Solicitud de Patente de Estados Unidos publicada US2005-0130923, publicada el 16 de junio de 2005) o, como alternativa, sustitución 5' de BNA (véase la Solicitud Internacional PCT WO 2007/134181 Publicada el 11/22/07 donde LNA está sustituido, por ejemplo, con un grupo 5'-metilo o 5'-vinilo).

30

Los ejemplos de nucleósidos que tienen restos de azúcar modificados incluyen, sin limitación, nucleósidos que comprenden grupos de sustituyentes 5'-vinilo, 5'-metilo (R o S), 4'-S, 2'-F, 2'-OCH<sub>3</sub> y 2'-O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>. El sustituyente en la posición 2' puede seleccionarse también de alilo, amino, azido, tio, O-alilo, O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, OCF<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-N(R<sub>m</sub>)(R<sub>n</sub>), y O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-N(R<sub>m</sub>)(R<sub>n</sub>), donde cada R<sub>m</sub> y R<sub>n</sub> es,  
 35 independientemente, H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> sustituido o sin sustituir.

Los ejemplos de ácidos nucleicos bicíclicos (BNA) incluyen, sin limitación, nucleósidos que comprenden un puente entre los átomos del anillo ribosilo 4' y 2'. En ciertos casos, los compuestos antisentido proporcionados en el presente documento incluyen uno o más nucleósidos de BNA donde el puente comprende una de las fórmulas: 4'-β-  
 40 D-(CH<sub>2</sub>)-O-2' (β-D-LNA); 4'-(CH<sub>2</sub>)-S-2'; 4'-α-L-(CH<sub>2</sub>)-O-2' (α-L-LNA); 4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-2' (ENA); 4'-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-O-2' (véase el documento PCT/US2008/068922, publicado como el documento WO 2009/006478); 4'-CH(CH<sub>3</sub>)-O-2' y 4'-CH(CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>)-O-2' (véase la Patente de Estados Unidos 7.399.845, presentada el 15 de julio de 2008); 4'-CH<sub>2</sub>-N(OCH<sub>3</sub>)-2' (véase el documento PCT/US2008/ 064591, publicado como el documento WO 2008/150729); 4'-CH<sub>2</sub>-O-N(CH<sub>3</sub>)-2' (véase la Solicitud de Patente de Estados Unidos publicada US2004-0171570, publicada el 2 de  
 45 septiembre de 2004); 4'-CH<sub>2</sub>-N(R)-O-2' (véase la Patente de Estados Unidos 7.427.672, presentada el 23 de septiembre de 2008); 4'-CH<sub>2</sub>-C(CH<sub>3</sub>)-2' y 4'-CH<sub>2</sub>-C(=CH<sub>2</sub>)-2' (véase el documento PCT/US2008/ 066154, publicado como el documento WO 2008/154401); y donde R es, independientemente, H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, o un grupo protector.

En ciertos casos, la presente descripción proporciona nucleósidos modificados que comprenden restos de azúcar  
 50 modificados que no son restos de azúcar bicíclicos. Se conocen ciertos nucleósidos modificados de este tipo. En ciertos casos, el anillo de azúcar de un nucleósido puede modificarse en cualquier posición. Los ejemplos de modificaciones de azúcar útiles en esta descripción incluyen, pero sin limitación, compuestos que comprenden un grupo sustituyente de azúcar seleccionado de: OH, F, O-alquilo, S-alquilo, N-alquilo, o O-alquil-O-alquilo, donde el alquilo, alquenilo y alquinilo pueden ser alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>10</sub> sustituido o sin sustituir o alquenilo y alquinilo C<sub>2</sub> a C<sub>10</sub>. En  
 55 ciertos casos, dichos sustituyentes están en la posición 2' del azúcar.

En ciertos casos, los nucleósidos modificados comprenden un sustituyente en la posición 2' del azúcar. En ciertos casos, dichos sustituyentes se seleccionan de entre: un haluro (incluyendo, pero sin limitación, F), alilo, amino, azido, tio, O-alilo, O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, -OCF<sub>3</sub>, O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-CH<sub>3</sub>, 2'-O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>, O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-N(R<sub>m</sub>)(R<sub>n</sub>), u O-CH<sub>2</sub>-  
 60 C(=O)-N(R<sub>m</sub>)(R<sub>n</sub>), donde cada R<sub>m</sub> y R<sub>n</sub> es, independientemente, H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> sustituido o sin sustituir.

En ciertos casos, los nucleósidos modificados adecuados para su uso en la presente descripción son: 2-metoxietoxi, 2'-O-metilo (2'-O-CH<sub>3</sub>), 2'-fluro (2'-F).

- 5 En ciertos casos, los nucleósidos modificados que tienen un grupo sustituyente en la posición 2' se seleccionan de: O[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>O]<sub>m</sub>CH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH<sub>2</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ONH<sub>2</sub>, OCH<sub>2</sub>C(=O)N(H)CH<sub>3</sub>, y O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ON[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>]<sub>2</sub>, donde n y m son de 1 a aproximadamente 10. Otros grupos sustituyentes de azúcar 2' incluyen: alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>10</sub>, alquilo sustituido, alqueno, alquino, alcarilo, aralquilo, O-alcarilo o O-aralquilo, SH, SCH<sub>3</sub>, OCN, Cl, Br, CN, CF<sub>3</sub>, OCF<sub>3</sub>, SOCH<sub>3</sub>, SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, ONO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub>, heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, 10 polialquilamino, sililo sustituido, un grupo de escisión de ARN, un grupo indicador, un intercalador, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas, o un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un compuesto oligomérico, y otros sustituyentes que tienen propiedades similares.

- En ciertos casos, los nucleósidos modificados comprenden una cadena lateral 2'-MOE (Baker et al., J. Biol. Chem., 15 1997, 272, 11944-12000). Dicha sustitución 2'-MOE se ha descrito con una afinidad de unión mejorada en comparación con los nucleósidos no modificados y con otros nucleósidos modificados, tales como 2'-O-metilo, O-propilo y O-aminopropilo. Los oligonucleótidos que tienen el sustituyente 2'-MOE también han demostrado ser inhibidores antisentido de la expresión génica con características prometedoras para su uso *in vivo* (Martin, P., Helv. Chim. Acta, 1995, 78, 486-504; Altmann et al., Chimia, 1996, 50, 168-176; Altmann et al., Biochem. Soc. Trans., 20 1996, 24, 630-637; y Altmann et al., Nucleosides Nucleotides, 1997, 16, 917-926).

- En ciertos casos, los grupos de sustituyentes de 2'-azúcar están en la posición arabino (arriba) o en la posición ribo (abajo). En ciertos casos, una modificación 2'-arabino es 2'-F arabino (FANA). También se pueden hacer modificaciones similares en otras posiciones en el azúcar, particularmente la posición 3' del azúcar en un nucleósido 25 terminal 3' o en los oligonucleótidos unidos por 2'-5' y la posición 5' del nucleótido terminal 5'.

- En ciertos casos, los nucleósidos adecuados para su uso en la presente descripción tienen sustitutos de azúcar tales como ciclobutilo en lugar del azúcar ribofuranosilo. Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de tales estructuras de azúcar modificadas incluyen, los documentos U.S.: 4.981.957; 5.118.800; 30 5.319.080; 5.359.044; 5.393.878; 5.446.137; 5.466.786; 5.514.785; 5.519.134; 5.567.811; 5.576.427; 5.591.722; 5.597.909; 5.610.300; 5.627.053; 5.639.873; 5.646.265; 5.658.873; 5.670.633; 5.792.747; y 5.700.920.

- En ciertos casos, la presente divulgación proporciona nucleósidos que comprenden una modificación en la posición 2' del azúcar. En ciertos casos, la descripción proporciona nucleósidos que comprenden una modificación en la 35 posición 5' del azúcar. En ciertos casos, la descripción proporciona nucleósidos que comprenden modificaciones en la posición 2' y la posición 5' del azúcar. En ciertos casos, los nucleósidos modificados pueden ser útiles para la incorporación en oligonucleótidos. En cierto caso, los nucleósidos modificados se incorporan en los oligonucleósidos en el extremo 5' del oligonucleótido.

#### 40 **b. Ciertos enlaces internucleosídicos**

- Los oligonucleótidos antisentido de la presente descripción pueden contener opcionalmente uno o más enlaces internucleosídicos modificados. Las dos clases principales de grupos de unión se definen por la presencia o ausencia de un átomo de fósforo. Los enlaces que contienen fósforo representativos incluyen, pero sin limitación, 45 fosfodiésteres (P=O), fosfotriésteres, metilfosfonatos, fosforamidato y fosforotioatos (P=S). Los grupos de unión representativos que no contienen fósforo incluyen, pero sin limitación, metilmetilimino (-CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)-O-CH<sub>2</sub>-), tiodiéster (-O-C(O)-S-), tionocarbamato (-O-C(O)(NH)-S-); siloxano (-O-Si(H)<sub>2</sub>-O-); y N,N'-dimetilhidrazina (-CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)-N(CH<sub>3</sub>)-). Los oligonucleótidos que tienen grupos de unión sin fósforo se denominan oligonucleósidos. Se pueden usar enlaces modificados, en comparación con enlaces fosfodiéster naturales, para alterar, típicamente 50 aumentar, la resistencia a la nucleasa de los oligonucleótidos. En ciertos casos, los enlaces que tienen un átomo quiral se pueden preparar como mezclas racémicas, como enantiómeros separados. Los enlaces quirales representativos incluyen, pero sin limitación, alquilfosfonatos y fosforotioatos. Los métodos de preparación de enlaces que contienen fósforo y que no contienen fósforo se conocen bien por los expertos en la técnica.

- 55 Los oligonucleótidos antisentido descritos en el presente documento contienen uno o más centros asimétricos y, por lo tanto, dan lugar a enantiómeros, diastereómeros y otras configuraciones estereoisómeras que pueden definirse, en términos de estereoquímica absoluta, como (R) o (S), tal como para anómeros de azúcar, o como (D) o (L), tal como para los aminoácidos et al. Incluidos en los compuestos antisentido proporcionados en el presente documento están todos los isómeros posibles, así como sus formas racémicas y ópticamente puras.

60

En ciertos casos, los oligonucleótidos antisentido tienen al menos un enlace internucleosídico modificado. En ciertos casos, los oligonucleótidos antisentido tienen al menos 2 enlaces internucleosídicos modificados. En ciertos casos, los oligonucleótidos antisentido tienen al menos 3 enlaces internucleosídicos modificados. En ciertos casos, los oligonucleótidos antisentido tienen al menos 10 enlaces internucleosídicos modificados. En ciertos casos, cada enlace internucleosídico de un oligonucleótido antisentido es un enlace internucleosídico modificado. En ciertos casos, dichos enlaces internucleosídicos modificados son enlaces fosforotioato.

### **c. Longitudes**

10 En ciertos casos, la presente descripción proporciona oligonucleótidos antisentido de cualquiera de una diversidad de intervalos de longitudes. En ciertos casos, la descripción proporciona compuestos antisentido u oligonucleósidos antisentido que comprenden o que consisten en nucleósidos unidos a X-Y, donde X e Y se seleccionan cada uno independientemente de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, y 50; con la condición de que  $X < Y$ . Por ejemplo, en

15 ciertos casos, la descripción proporciona compuestos antisentido u oligonucleótidos antisentido que comprenden o que consisten en: 8-9, 8-10, 8-11, 8-12, 8-13, 8-14, 8-15, 8-16, 8-17, 8-18, 8-19, 8-20, 8-21, 8-22, 8-23, 8-24, 8-25, 8-26, 8-27, 8-28, 8-29, 8-30, 9-10, 9-11, 9-12, 9-13, 9-14, 9-15, 9-16, 9-17, 9-18, 9-19, 9-20, 9-21, 9-22, 9-23, 9-24, 9-25, 9-26, 9-27, 9-28, 9-29, 9-30, 10-11, 10-12, 10-13, 10-14, 10-15, 10-16, 10-17, 10-18, 10-19, 10-20, 10-21, 10-22, 10-23, 10-24, 10-25, 10-26, 10-27, 10-28, 10-29, 10-30, 11-12, 11-13, 11-14, 11-15, 11-16, 11-17, 11-18, 11-19, 11-20,

20 11-21, 11-22, 11-23, 11-24, 11-25, 11-26, 11-27, 11-28, 11-29, 11-30, 12-13, 12-14, 12-15, 12-16, 12-17, 12-18, 12-19, 12-20, 12-21, 12-22, 12-23, 12-24, 12-25, 12-26, 12-27, 12-28, 12-29, 12-30, 13-14, 13-15, 13-16, 13-17, 13-18, 13-19, 13-20, 13-21, 13-22, 13-23, 13-24, 13-25, 13-26, 13-27, 13-28, 13-29, 13-30, 14-15, 14-16, 14-17, 14-18, 14-19, 14-20, 14-21, 14-22, 14-23, 14-24, 14-25, 14-26, 14-27, 14-28, 14-29, 14-30, 15-16, 15-17, 15-18, 15-19, 15-20, 15-21, 15-22, 15-23, 15-24, 15-25, 15-26, 15-27, 15-28, 15-29, 15-30, 16-17, 16-18, 16-19, 16-20, 16-21, 16-22, 16-

25 23, 16-24, 16-25, 16-26, 16-27, 16-28, 16-29, 16-30, 17-18, 17-19, 17-20, 17-21, 17-22, 17-23, 17-24, 17-25, 17-26, 17-27, 17-28, 17-29, 17-30, 18-19, 18-20, 18-21, 18-22, 18-23, 18-24, 18-25, 18-26, 18-27, 18-28, 18-29, 18-30, 19-20, 19-21, 19-22, 19-23, 19-24, 19-25, 19-26, 19-29, 19-28, 19-29, 19-30, 20-21, 20-22, 20-23, 20-24, 20-25, 20-26, 20-27, 20-28, 20-29, 20-30, 21-22, 21-23, 21-24, 21-25, 21-26, 21-27, 21-28, 21-29, 21-30, 22-23, 22-24, 22-25, 22-26, 22-27, 22-28, 22-29, 22-30, 23-24, 23-25, 23-26, 23-27, 23-28, 23-29, 23-30, 24-25, 24-26, 24-27, 24-28, 24-29,

30 24-30, 25-26, 25-27, 25-28, 25-29, 25-30, 26-27, 26-28, 26-29, 26-30, 27-28, 27-29, 27-30, 28-29, 28-30, o 29-30 nucleósidos unidos.

En ciertos casos, los compuestos antisentido u oligonucleótidos antisentido de la presente descripción tienen una longitud de 15 nucleósidos. En ciertos casos, los compuestos antisentido u oligonucleótidos antisentido de la

35 presente descripción tienen una longitud de 16 nucleósidos. En ciertos casos, los compuestos antisentido u oligonucleótidos antisentido de la presente descripción tienen una longitud de 17 nucleósidos. En ciertos casos, los compuestos antisentido u oligonucleótidos antisentido de la presente descripción tienen una longitud de 18 nucleósidos. En ciertos casos, los compuestos antisentido u oligonucleótidos antisentido de la presente descripción tienen una longitud de 19 nucleósidos. En ciertos casos, los compuestos antisentido u oligonucleótidos antisentido

40 de la presente descripción tienen una longitud de 20 nucleósidos.

### **d. Ciertos motivos oligonucleotídicos**

En ciertos casos, los oligonucleótidos antisentido tienen subunidades químicamente modificadas dispuestas en

45 orientaciones específicas a lo largo de su longitud. En ciertos casos, los oligonucleótidos antisentido de la descripción están completamente modificados. En ciertos casos, los oligonucleótidos antisentido de la descripción están modificados de manera uniforme. En ciertos casos, los oligonucleótidos antisentido de la descripción están modificados de manera uniforme, y cada nucleósido comprende una resto de azúcar 2'-MOE. En ciertos casos, los oligonucleótidos antisentido de la descripción están modificados de manera uniforme, y cada nucleósido comprende

50 una resto de azúcar 2'-OMe. En ciertos casos, los oligonucleótidos antisentido de la descripción están modificados de manera uniforme, y cada nucleósido comprende un resto de azúcar morfolino.

En ciertos casos, los oligonucleótidos antisentido de la descripción comprenden un motivo alterno. En ciertos casos de este tipo, los tipos de modificación alterna se seleccionan de entre 2'-MOE, 2'-F, un nucleósido modificado por

55 azúcar bicíclico, y ADN (2'-desoxi no modificado). En ciertos casos de este tipo, cada región alterna comprende un solo nucleósido.

En ciertos casos, los oligonucleótidos de la presente descripción comprenden uno o más bloques de nucleósidos de un primer tipo y uno o más bloques de nucleósidos de un segundo tipo.

60



En ciertos casos, una o más regiones alternas en un motivo alterno incluyen más de un solo nucleósido de un tipo. Por ejemplo, los compuestos oligoméricos de la presente descripción pueden incluir una o más regiones de cualquiera de los siguientes motivos de nucleósidos:

- 5 Nu<sub>1</sub> Nu<sub>1</sub> Nu<sub>2</sub> Nu<sub>2</sub> Nu<sub>1</sub> Nu<sub>1</sub>;  
 Nu<sub>1</sub> Nu<sub>2</sub> Nu<sub>2</sub> Nu<sub>1</sub> Nu<sub>2</sub> Nu<sub>2</sub>;  
 Nu<sub>1</sub> Nu<sub>1</sub> Nu<sub>2</sub> Nu<sub>1</sub> Nu<sub>1</sub> Nu<sub>2</sub>;  
 Nu<sub>1</sub> Nu<sub>2</sub> Nu<sub>2</sub> Nu<sub>1</sub> Nu<sub>2</sub> Nu<sub>1</sub> Nu<sub>1</sub> Nu<sub>2</sub> Nu<sub>2</sub>;  
 Nu<sub>1</sub> Nu<sub>2</sub> Nu<sub>1</sub> Nu<sub>2</sub> Nu<sub>1</sub> Nu<sub>1</sub>;  
 10 Nu<sub>1</sub> Nu<sub>1</sub> Nu<sub>2</sub> Nu<sub>1</sub> Nu<sub>2</sub> Nu<sub>1</sub> Nu<sub>2</sub>;  
 Nu<sub>1</sub> Nu<sub>2</sub> Nu<sub>1</sub> Nu<sub>2</sub> Nu<sub>1</sub> Nu<sub>1</sub>;  
 Nu<sub>1</sub> Nu<sub>2</sub> Nu<sub>2</sub> Nu<sub>1</sub> Nu<sub>1</sub> Nu<sub>2</sub> Nu<sub>2</sub> Nu<sub>1</sub> Nu<sub>2</sub> Nu<sub>1</sub> Nu<sub>2</sub> Nu<sub>1</sub> Nu<sub>1</sub>;  
 Nu<sub>2</sub> Nu<sub>1</sub> Nu<sub>2</sub> Nu<sub>2</sub> Nu<sub>1</sub> Nu<sub>1</sub> Nu<sub>2</sub> Nu<sub>2</sub> Nu<sub>1</sub> Nu<sub>2</sub> Nu<sub>1</sub> Nu<sub>2</sub> Nu<sub>1</sub> Nu<sub>1</sub>; o  
 Nu<sub>1</sub> Nu<sub>2</sub> Nu<sub>1</sub> Nu<sub>2</sub> Nu<sub>2</sub> Nu<sub>1</sub> Nu<sub>1</sub> Nu<sub>2</sub> Nu<sub>2</sub> Nu<sub>1</sub> Nu<sub>2</sub> Nu<sub>1</sub> Nu<sub>2</sub> Nu<sub>1</sub> Nu<sub>1</sub>;

15

donde Nu<sub>1</sub> es un nucleósido de un primer tipo y Nu<sub>2</sub> es un nucleósido de un segundo tipo. En ciertos casos, uno de Nu<sub>1</sub> y Nu<sub>2</sub> es un nucleósido 2'-MOE y el otro de Nu<sub>1</sub> y Nu<sub>2</sub> es uno seleccionado de: un nucleósido modificado de 2'-OMe, BNA, y un nucleósido de ADN o ARN no modificado.

## 20 **2. Compuestos oligoméricos**

En ciertos casos, la presente divulgación proporciona compuestos oligoméricos. En ciertos casos, los compuestos oligoméricos están compuestos solo por un oligonucleótido. En ciertos casos, un compuesto oligomérico comprende un oligonucleótido y uno o más grupos conjugados y/o terminales. Dichos grupos conjugados y/o terminales pueden  
 25 añadirse a oligonucleótidos que tengan cualquiera de los motivos químicos analizados anteriormente. Por lo tanto, por ejemplo, un compuesto oligomérico que comprende un oligonucleótido que tiene una región de nucleósidos alternos puede comprender un grupo terminal.

### a. Ciertos grupos conjugados

30

En ciertos casos, los oligonucleótidos de la presente descripción se modifican mediante la unión de uno o más grupos conjugados. En general, los grupos conjugados modifican una o más propiedades del compuesto oligomérico unido, incluyen, pero sin limitación, farmacodinámica, farmacocinética, estabilidad, unión, absorción, distribución celular, captación celular, carga y depuración. Los grupos conjugados se utilizan de forma rutinaria en las técnicas  
 35 químicas y se unen directamente o a través de un resto de unión a conjugado opcional o un grupo de unión a de conjugado a un compuesto precursor tal como un compuesto oligomérico, tal como un oligonucleótido. Los grupos conjugados incluyen, sin limitación, intercaladores, moléculas indicadoras, poliaminas, poliamidas, polietilenglicoles, tioéteres, poliéteres, colesteroles, tiocolesteroles, restos de ácido cólico, folato, lípidos, fosfolípidos, biotina, fenazina, fenantridina, antraquinona, adamantano, acridina, fluoresceínas, rodaminas, cumarinas y colorantes. Ciertos grupos  
 40 conjugados se han descrito previamente, por ejemplo: resto de colesterol (Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 6553-6556), ácido cólico (Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4, 1053-1060), un tioéter, por ejemplo, hexil-S-tritilol (Manoharan et al., Ann. N.Y. Acad. Sci., 1992, 660, 306-309; Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1993, 3, 2765-2770), un tiocolesterol (Oberhauser et al., Nucl. Acids Res., 1992, 20, 533-538), una cadena alifática, por ejemplo, residuos do-decan-diol o undecilo (Saison-Behmoaras et al., EMBO J., 1991,  
 45 10, 1111-1118; Kabanov et al., FEBS Lett., 1990, 259, 327-330; Svinarchuk et al., Biochimie, 1993, 75, 49-54), un fosfolípido, por ejemplo, di-hexadecil-rac-glicerol o trietil-amonio 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654; Shea et al., Nucl. Acids Res., 1990, 18, 3777-3783), una poliamina o una cadena de polietilenglicol (Manoharan et al., Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14, 969-973), o ácido adamantano acético (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654), un resto palmitilo (Mishra et al.,  
 50 Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264, 229-237), o un resto octadecilamina o hexilamino-carbonil-oxicolesterol (Crooke et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277, 923-937).

En ciertos casos, un grupo conjugado comprende una sustancia de fármaco activa, por ejemplo, aspirina, warfarina, fenilbutazona, ibuprofeno, suprofen, fenbufeno, ketoprofeno, (S)-(+)-pranoprofeno, carprofeno, dansilsarcosina,  
 55 ácido 2,3,5-triyodobenzoico, ácido flufenámico, ácido folínico, una benzotiazida, clorotiazida, una diazepina, indometacina, una barbitúrico, una cefalosporina, un fármaco sulfá, un antidiabético, un antibacteriano o un antibiótico. Se describen conjugados de oligonucleótido-fármaco y sus preparación en la Solicitud de Patente de Estados Unidos 09/334.130, publicada como el documento US 6.656.730.

60 Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de conjugados oligonucleotídicos

incluyen, pero sin limitación, los documentos U.S.: 4.828.979; 4.948.882; 5.218.105; 5.525.465; 5.541.313; 5.545.730; 5.552.538; 5.578.717, 5.580.731; 5.580.731; 5.591.584; 5.109.124; 5.118.802; 5.138.045; 5.414.077; 5.486.603; 5.512.439; 5.578.718; 5.608.046; 4.587.044; 4.605.735; 4.667.025; 4.762.779; 4.789.737; 4.824.941; 4.835.263; 4.876.335; 4.904.582; 4.958.013; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5 5.245.022; 5.254.469; 5.258.506; 5.262.536; 5.272.250; 5.292.873; 5.317.098; 5.371.241, 5.391.723; 5.416.203, 5.451.463; 5.510.475; 5.512.667; 5.514.785; 5.565.552; 5.567.810; 5.574.142; 5.585.481; 5.587.371; 5.595.726; 5.597.696; 5.599.923; 5.599.928 y 5.688.941.

Los grupos conjugados pueden unirse a uno o ambos extremos de un oligonucleótido (grupos conjugados 10 terminales) y/o en cualquier posición interna.

**b. Grupos terminales**

En ciertos casos, los compuestos oligoméricos comprenden grupos terminales en uno o ambos extremos. En ciertos 15 casos, un grupo terminal puede comprender cualquiera de los grupos conjugados analizados anteriormente. En ciertos casos, los grupos terminales pueden comprender nucleósidos adicionales y/o nucleósidos abásicos invertidos. En ciertos casos, un grupo terminal es un grupo estabilizador.

En ciertos casos, los compuestos oligoméricos comprenden uno o más grupos estabilizadores terminales que 20 potencian las propiedades tales como, por ejemplo, la estabilidad de la nucleasa. Se incluyen en los grupos estabilizadores las estructuras de caperuza. Los términos "estructura de caperuza" o "resto de caperuza terminal", como se usa en el presente documento, se refieren a modificaciones químicas, que pueden unirse a uno o ambos extremos de un compuesto oligomérico. Ciertas modificaciones terminales de este tipo protegen los compuestos oligoméricos que tienen restos de ácido nucleico terminal de la degradación de la exonucleasa, y pueden ayudar en 25 el suministro y/o localización dentro de una célula. La caperuza puede estar presente en el extremo 5' (5'-cap) o en el extremo 3' (3'-cap), o puede estar presente en ambos extremos. (para más detalles, véanse, Wincott et al., Publicación PCT Internacional N.º WO 97/26270; Beaucage y Tyer, 1993, Tetrahedron 49, 1925; Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N.º US 2005/0020525; y el documento WO 03/004602.

En ciertos casos, uno o más nucleósidos adicionales se añaden a uno o ambos extremos terminales de un 30 oligonucleótido de un compuesto oligomérico. Dichos nucleósidos terminales adicionales se denominan en el presente documento como nucleósidos de grupo terminal. En un compuesto bicatenario, dichos nucleósidos de grupo terminal son salientes terminales (3' y/o 5'). En el establecimiento de compuestos antisentido bicatenarios, dichos nucleósidos de grupo terminal pueden o no ser complementarios con un ácido nucleico diana. En ciertos 35 casos, el grupo terminal es un grupo terminal no nucleósido. Dichos grupos no terminales pueden ser cualquier grupo terminal distinto de un nucleósido.

**c. Motivos de compuestos oligoméricos**

40 En ciertos casos, los compuestos oligoméricos de la presente descripción comprenden un motivo:  $T_1-(Nu_1)_{n1}-(Nu_2)_{n2}-(Nu_1)_{n3}-(Nu_2)_{n4}-(Nu_1)_{n5}-T_2$ , donde:

$Nu_1$ , es un nucleósido de un primer tipo;

$Nu_2$ , es un nucleósido de un segundo tipo;

45 cada uno de  $n1$  y  $n5$  es, independientemente, de 0 a 3;

la suma de  $n2$  más  $n4$  es entre 10 y 25;

$n3$  es de 0 y 5; y

cada  $T_1$  y  $T_2$  es independientemente, H, un grupo protector hidroxilo, un grupo conjugado unido opcionalmente, o un 50 grupo de protección.

En ciertos casos de este tipo, la suma de  $n2$  y  $n4$  es 13 o 14;  $n1$  es 2;  $n3$  es 2 o 3; y  $n5$  es 2. En ciertos casos de este tipo, los compuestos oligoméricos de la presente descripción comprenden un motivo seleccionado de la Tabla A.

Tabla A				
n1	n2	n3	n4	n5
2	16	0	0	2
2	2	3	11	2
2	5	3	8	2
2	8	3	5	2
2	11	3	2	2

2	9	3	4	2
2	10	3	3	2
2	3	3	10	2
2	4	3	9	2
2	6	3	7	2
2	7	3	6	2
2	8	6	2	2
2	2	2	12	2
2	3	2	11	2
2	4	2	10	2
2	5	2	9	2
2	6	2	8	2
2	7	2	7	2
2	8	2	6	2
2	9	2	5	2
2	10	2	4	2
2	11	2	3	2
2	12	2	2	2

La Tabla A pretende ilustrar, pero no limitar, la presente descripción. Los compuestos oligoméricos representados en la Tabla A comprenden cada uno 20 nucleósidos. Los compuestos oligoméricos que comprenden más o menos nucleósidos pueden diseñarse fácilmente seleccionando diferentes números de nucleósidos para uno o más de n<sub>1</sub>-n<sub>5</sub>. En ciertos casos, Nu<sub>1</sub> y Nu<sub>2</sub> se seleccionan cada uno de entre: 2'-MOE, 2'-OMe, ADN, y un nucleósido bicíclico.

### 3. Antisentido

En ciertos casos, los compuestos oligoméricos de la presente descripción son compuestos antisentido. Por consiguiente, en tales casos, los compuestos oligoméricos se hibridan con un ácido nucleico diana, dando como resultado una actividad antisentido.

#### a. Hibridación

En ciertos casos, la descripción proporciona compuestos antisentido que se hibridan específicamente con un ácido nucleico diana cuando existe un grado de complementariedad suficiente para evitar unión inespecífica del compuesto antisentido a secuencias de ácido nucleico no diana en condiciones en las que se desea unión específica, es decir, en condiciones fisiológicas en el caso de ensayos *in vivo* o tratamiento terapéutico, y en condiciones en las que se realizan ensayos en el caso de ensayos *in vitro*.

Por lo tanto, "condiciones de hibridación rigurosas" o "condiciones rigurosas" significa condiciones en las que un compuesto antisentido se hibrida con una secuencia diana, pero con un número mínimo de otras secuencias. Las condiciones rigurosas dependen de la secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias, y las "condiciones rigurosas" en las que los oligonucleótidos antisentido que hibridan con una secuencia diana se determinan por la naturaleza y composición de los oligonucleótidos antisentido y los ensayos en los que se están investigando.

Se entiende en la técnica que la incorporación de modificaciones de afinidad de nucleótidos puede permitir un mayor número de apareamientos incorrectos en comparación con un compuesto no modificado. De manera similar, ciertas secuencias de nucleobases pueden ser más tolerantes a los emparejamientos incorrectos que otras secuencias de nucleobases. Un experto en la técnica es capaz de determinar un número apropiado de emparejamientos incorrectos entre oligonucleótidos, o entre un oligonucleótido antisentido y un ácido nucleico diana, tal como mediante la determinación de la temperatura de fusión (T<sub>m</sub>). T<sub>m</sub> o ΔT<sub>m</sub> pueden calcularse mediante técnicas que son familiares para un experto en la técnica. Por ejemplo, las técnicas descritas en Freier et al. (Nucleic Acids Research, 1997, 25, 22: 4429-4443) permiten que un experto en la técnica evalúe modificaciones de nucleótidos para determinar su capacidad para aumentar la temperatura de fusión de un dúplex de ARN:ADN.

#### b. Procesamiento de pre-ARNm

En ciertos casos, los compuestos antisentido proporcionados en el presente documento son complementarios a un pre-ARNm. En ciertos casos, dichos compuestos antisentido alteran el corte y empalme del pre-ARNm. En ciertos casos de este tipo, se altera la relación de una variante de un ARNm maduro correspondiente a un pre-ARNm diana

con respecto a otra variante de ese ARNm maduro. En ciertos casos de este tipo, la relación de una variante de una proteína expresada desde el pre-ARNm diana con respecto a otra variante de la proteína se altera. Ciertos compuestos oligoméricos y secuencias de nucleobases que pueden usarse para alterar el corte y empalme de un pre-ARNm se pueden encontrar, por ejemplo, en los documentos US 6.210.892; US 5.627.274; US 5.665.593; 5 5.916.808; US 5.976.879; US2006/0172962; US2007/002390; US2005/0074801; US2007/0105807; US2005/0054836; WO 2007/090073; WO2007/047913, Hua et al., PLoS Biol 5(4):e73; Vickers et al., J. Immunol. 2006 Mar 15; 176(6):3652-61; y Hua et al., American J. of Human Genetics (April 2008) 82, 1-15. En ciertos casos, las secuencias antisentido que alteran el corte y empalme se modifican de acuerdo con los motivos de la presente descripción.

10

El antisentido es un medio eficaz para modular la expresión de uno o más productos génicos específicos, y es útil únicamente en varias aplicaciones terapéuticas, de diagnóstico y de investigación. En el presente documento se proporcionan compuestos antisentido útiles para modular la expresión génica a través de mecanismos de acción antisentido, incluyendo mecanismos antisentido basados en la ocupación de la diana. En un aspecto, los 15 compuestos antisentido proporcionados en el presente documento modulan el corte y empalme de un gen diana. Dicha modulación incluye promover o inhibir la inclusión de exones. Además, en el presente documento se proporcionan compuestos antisentido dirigidos a elementos reguladores de corte y empalme *cis* presentes en moléculas de pre-ARNm, incluyendo potenciadores de corte y empalme exónicos, silenciadores de corte y empalme exónicos, potenciadores de corte y empalme intrónicos y silenciadores de corte y empalme intrónicos. Se piensa que 20 los elementos reguladores de corte y empalme *cis* alteran la selección del sitio de corte y empalme, lo que puede conducir a una alteración en la composición de los productos de corte y empalme.

El procesamiento de pre-ARNm eucariotas es un proceso complejo que requiere una multitud de señales y factores proteicos para lograr un corte y empalme de ARNm apropiado. La definición de exón por el espliceosoma requiere 25 más que las señales de corte y empalme canónicas que definen los límites intrón-exón. Una señal adicional de este tipo se proporciona por las secuencias de potenciador regulador y silenciador que actúan en *cis*. Se han identificado potenciadores de corte y empalme exónicos (ESE), silenciadores de corte y empalme exónicos (ESS), potenciadores de corte y empalme intrónicos (ISE) y silenciadores de corte y empalme intrónico (ISS) que reprimen o mejoran el uso de sitios donantes de corte y empalme o sitios aceptores de corte y empalme, dependiendo de su sitio y modo 30 de acción (Yeo et al. 2004, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101(44):15700-15705). La unión de proteínas específicas (factores *trans*) a estas secuencias reguladoras dirige el proceso de corte y empalme, ya sea promoviendo o inhibiendo el uso de sitios de corte y empalme particulares y, por lo tanto, modulando la proporción de productos de corte y empalme (Scamborova et al. 2004, Mol. Cell. Biol. 24(5):1855-1869; Hovhannisyan y Carstens, 2005, Mol. Cell. Biol. 25(1):250-263; Minovitsky et al. 2005, Nucleic Acids Res. 33(2):714-724).

35

#### **4. Composiciones farmacéuticas**

En ciertos casos, la presente descripción proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más compuestos antisentido. En ciertos casos, dicha composición farmacéutica comprende una solución salina estéril y 40 uno o más compuestos antisentido. En ciertos casos, dicha composición farmacéutica consiste en una solución salina estéril y uno o más compuestos antisentido.

En ciertos casos, los compuestos antisentido se pueden mezclar con sustancias activas y/o inertes farmacéuticamente aceptables para la preparación de composiciones o formulaciones farmacéuticas. Las 45 composiciones y los métodos para la formulación de composiciones farmacéuticas dependen de una serie de criterios, incluyendo, pero sin limitación, la ruta de administración, la extensión de la enfermedad, o la dosis que se administrará.

En ciertos casos, los compuestos antisentido se pueden utilizar en composiciones farmacéuticas combinando dichos 50 compuestos oligoméricos con un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado. Un diluyente farmacéuticamente aceptable incluye una solución salina tamponada con fosfato (PBS). PBS es un diluyente adecuado para su uso en composiciones para administración parenteral. Por consiguiente, en ciertos casos, en los métodos descritos en el presente documento se emplea una composición farmacéutica que comprende un compuesto antisentido y un diluyente farmacéuticamente aceptable. En ciertos casos, el diluyente 55 farmacéuticamente aceptable es PBS.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden compuestos antisentido incluyen cualquier sal, éster o sal aceptables de dichos ésteres. En ciertos casos, las composiciones farmacéuticas que comprenden compuestos antisentido comprenden uno o más oligonucleótidos que, tras la administración a un animal, incluido un ser humano, 60 es capaz de proporcionar (directa o indirectamente) el metabolito biológicamente activo o residuo del mismo. Por

consiguiente, por ejemplo, la descripción también se refiere a sales farmacéuticamente aceptables de compuestos antisentido, profármacos, sales farmacéuticamente aceptables de tales profármacos, y otros bioequivalentes. Las sales farmacéuticamente aceptables adecuadas incluyen, pero sin limitación, sales de sodio y potasio.

- 5 Un profármaco puede incluir la incorporación de nucleósidos adicionales en uno o ambos extremos de un compuesto oligomérico que se escinden por nucleasas endógenas dentro del cuerpo, para formar el compuesto oligomérico antisentido activo.

Los vectores a base de lípidos se han usado en terapias de ácidos nucleicos en una diversidad de métodos. Por ejemplo, en un método, el ácido nucleico se introduce en liposomas preformados o lipoplejos hechos de mezclas de lípidos catiónicos y lípidos neutros. En otro método, los complejos de ADN con lípidos mono o policatiónicos se forman sin la presencia de un lípido neutro.

Se describen ciertas preparaciones en Akinc et al., Nature Biotechnology 26, 561 - 569 (01 de mayo de 2008).

15

### **5. Administración a un sujeto**

En ciertos casos, las composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más compuestos antisentido se administran a un sujeto. En ciertos casos, dichas composiciones farmacéuticas se administran por inyección. En ciertos casos, dichas composiciones farmacéuticas se administran por infusión.

20

En ciertos casos, las composiciones farmacéuticas se administran por inyección o infusión en el LCR. En ciertos casos, las composiciones farmacéuticas se administran mediante inyección directa o infusión en la columna vertebral. En ciertos casos, las composiciones farmacéuticas se administran mediante inyección o infusión en el cerebro. En ciertos casos, las composiciones farmacéuticas se administran mediante inyección intratecal o infusión en lugar de en el propio tejido de la médula espinal. Sin desear quedar ligado a la teoría, en ciertos casos, el compuesto antisentido se libera en el LCR circundante y puede penetrar en el parénquima de la médula espinal. Una ventaja adicional de la administración intratecal es que la vía intratecal imita la administración de la punción lumbar (es decir, la punción lumbar) que ya se usa en forma rutinaria en seres humanos.

30

En ciertos casos, las composiciones farmacéuticas se administran mediante inyección o infusión intracerebroventricular (ICV). La administración intracerebroventricular o intraventricular de una composición farmacéutica que comprende uno o más compuestos antisentido se puede realizar en uno o más de los ventrículos del cerebro, que están llenos de líquido cefalorraquídeo (LCR). El LCR es un líquido transparente que llena los ventrículos, está presente en el espacio subaracnoideo y rodea el cerebro y la médula espinal. El LCR es producido por los plexos coroideos y a través de la exudación o la transmisión de líquido tisular por el cerebro a los ventrículos. El plexo coroideo es una estructura que reviste el suelo del ventrículo lateral y la parte superior del tercer y cuarto ventrículos. Ciertos estudios han indicado que estas estructuras son capaces de producir 400-600 cc de líquido al día, en consonancia con una cantidad para llenar los espacios del sistema nervioso central cuatro veces en un día. En seres humanos adultos, el volumen de este fluido se ha calculado entre 125 y 150 ml (4-5 oz). El LCR está en continua formación, circulación y absorción. Ciertos estudios han indicado que se pueden producir aproximadamente 430 a 450 ml (casi 2 tazas) de LCR cada día. Ciertos cálculos estiman que la producción equivale a aproximadamente 0,35 ml por minuto en adultos y 0,15 por minuto en bebés humanos. Los plexos coroideos de los ventrículos laterales producen la mayoría de los LCR. Fluye a través del agujero de Monro hacia el tercer ventrículo, donde se añade a la producción desde el tercer ventrículo y continúa hacia abajo a través del acueducto de Sylvius hasta el cuarto ventrículo. El cuarto ventrículo añade más LCR; el fluido viaja entonces hasta el espacio subaracnoideo a través de los agujeros de Magendie y Luschka. Después, circula por toda la base del cerebro, hacia abajo alrededor de la médula espinal y hacia arriba sobre los hemisferios cerebrales. El LCR se vacía en la sangre a través de las vellosidades aracnoideas y los senos vasculares intracraneales.

35

En ciertos casos, dichas composiciones farmacéuticas se administran por vía sistémica. En ciertos casos, las composiciones farmacéuticas se administran por vía subcutánea. En ciertos casos, las composiciones farmacéuticas se administran por vía intravenosa. En ciertos casos, las composiciones farmacéuticas se administran por inyección intramuscular.

40

En ciertos casos, las composiciones farmacéuticas se administran tanto directamente al LCR (por ejemplo, inyección IT y/o ICV y/o infusión) como por vía sistémica.

45

En ciertos casos, un compuesto antisentido administrado por vía sistémica entra en las neuronas. En ciertos casos, los compuestos antisentido administrados por vía sistémica pueden penetrar en la barrera hematoencefálica,

50

los compuestos antisentido administrados por vía sistémica pueden penetrar en la barrera hematoencefálica,

55

los compuestos antisentido administrados por vía sistémica pueden penetrar en la barrera hematoencefálica,

60

particularmente en sujetos jóvenes en los que la barrera hematoencefálica no está completamente formada (por ejemplo, en sujetos en el útero y/o en sujetos recién nacidos). En ciertos casos, las células nerviosas pueden absorber cierta cantidad de compuesto antisentido administrado por vía sistémica, incluso en sujetos en los que la barrera hematoencefálica está completamente formada. Por ejemplo, los compuestos antisentido pueden entrar en una neurona en o cerca de la unión neuromuscular (captación retrógrada). En ciertos casos, dicha captación retrógrada da como resultado una actividad antisentido dentro de la neurona, incluyendo, pero sin limitación, una neurona motora, y proporciona un beneficio terapéutico por la actividad antisentido en el interior de la neurona.

En ciertos casos, la administración sistémica proporciona un beneficio terapéutico por la actividad antisentido que se produce en células y/o tejidos distintos de las neuronas. Si bien la evidencia sugiere que se requiere SMN funcional en el interior de las neuronas para la función neuronal normal, la consecuencia de la reducción de SMN funcional en otras células y tejidos no está bien caracterizada. En ciertos casos, la actividad antisentido en células no neuronales da como resultado la restauración de la función de SMN en esas células no neuronales, lo que a su vez da como resultado un beneficio terapéutico.

En ciertos casos, la función de SMN mejorada en células no neuronales proporciona una función celular neuronal mejorada, ya sea que se mejore o no la función de SMN en el interior de las neuronas. Por ejemplo, en ciertos casos, la administración sistémica de composiciones farmacéuticas de la presente descripción da como resultado una actividad antisentido en células musculares. Dicha actividad antisentido en las células musculares puede proporcionar un beneficio para las neuronas motoras asociadas con esa célula muscular o para las neuronas en general. En dichos casos, la célula muscular que tiene la función de SMN restaurada puede proporcionar un factor que mejora la viabilidad y/o función neuronal. En ciertos casos, dicha actividad antisentido es independiente del beneficio de la actividad antisentido que se produce a partir de compuestos antisentido dentro de las neuronas. En ciertos casos, la administración sistémica de composiciones farmacéuticas de la presente descripción da como resultado una actividad antisentido en otras células no neuronales, incluyendo las células que no están en asociación inmediata con las neuronas. Dicha actividad antisentido en células no neuronales puede mejorar la función de las neuronas. Por ejemplo, la actividad antisentido en una célula no neuronal (por ejemplo, una célula hepática) puede dar como resultado que esa célula produzca un factor que mejore la función de las neuronas. Nota: dado que el término "actividad antisentido" incluye actividades directas e indirectas, un beneficio para la función neuronal es una "actividad antisentido", incluso si no entra ningún compuesto antisentido en la neurona.

En ciertos casos, la administración sistémica de una composición farmacéutica da como resultado un beneficio terapéutico independiente de las actividades antisentido directas o indirectas en las neuronas. Típicamente, en el contexto de SMA, la función neuronal disminuye, dando como resultado síntomas significativos. Los síntomas adicionales pueden ser resultado de la disminución de la actividad de SMN en otras células. Ciertos síntomas pueden estar enmascarados por la gravedad relativa de los síntomas de la función neuronal disminuida. En ciertos casos, la administración sistémica da como resultado una función SMN restaurada o mejorada en células no neuronales. En ciertos casos de este tipo, dicha función de SMN restaurada o mejorada en células no neuronales tiene un beneficio terapéutico. Por ejemplo, en ciertos casos, los sujetos que tienen SMA tienen un crecimiento reducido. Dicho crecimiento reducido puede no ser resultado de una función disminuida en las células neuronales. De hecho, el crecimiento reducido puede estar relacionado con una función alterada de las células en otro órgano, tal como la glándula pituitaria, y/o puede ser el resultado de deficiencias de SMN en todas las células del cuerpo. En tales casos, la administración sistémica puede dar como resultado una actividad de SMN mejorada en células hipofisarias y/u otras células, dando como resultado un crecimiento mejorado. En ciertos casos, la administración al LCR restaura la función neuronal suficiente para permitir que un sujeto viva más tiempo, sin embargo, uno o más síntomas se desconocen previamente porque los sujetos típicamente murieron antes de que aparecieran tales síntomas, porque el sujeto vive más tiempo. Ciertos síntomas emergentes pueden ser letales. En ciertos casos, los síntomas emergentes son tratados por administración sistémica. Independientemente del mecanismo, en ciertos casos, una diversidad de síntomas de SMA, incluyendo, pero sin limitación, síntomas enmascarados previamente por síntomas más graves asociados con una función neuronal alterada, pueden tratarse mediante administración sistémica.

En ciertos casos, la administración sistémica de composiciones farmacéuticas de la presente descripción da como resultado un aumento de la actividad de SMN en células musculares. En ciertos casos, dicha actividad de SMN mejorada en las células musculares proporciona un beneficio terapéutico. Se ha informado que la actividad de SMN mejorada en el músculo solo es insuficiente para proporcionar un beneficio terapéutico (por ejemplo, Gravrílina, et al., Hum Mol Genet 2008 17(8):1063-1075). En ciertos casos, la presente descripción proporciona métodos que mejoran la función de SMN en el músculo y proporcionan un beneficio terapéutico. En ciertos casos, el beneficio terapéutico puede atribuirse a una función de SMN mejorada en otras células (en solitario o en combinación con células musculares). En ciertos casos, la función de SMN mejorada en el músculo solo puede proporcionar beneficios.

En ciertos casos, la administración sistémica da como resultado una supervivencia mejorada.

#### 6. Atrofia muscular espinal (SMA)

- 5 SMA es un trastorno genético caracterizado por la degeneración de las neuronas motoras espinales. La SMA es causada por la pérdida homocigota de ambas copias funcionales del gen SMN1. Sin embargo, el gen SMN2 tiene el potencial de codificar la misma proteína que SMN1 y superar de este modo el defecto genético de los pacientes con SMA. SMN2 contiene una mutación silenciosa en la traducción (C → T) en la posición +6 del exón 7, lo que da como
- 10 resultado una inclusión ineficiente del exón 7 en las transcripciones de SMN2. Por lo tanto, la forma predominante de SMN2, que carece del exón 7, es inestable e inactiva. Por lo tanto, los compuestos terapéuticos capaces de modular el corte y empalme de SMN2 de tal manera que el porcentaje de las transcripciones de SMN2 que contienen el exón 7 se aumenta, serán útiles para el tratamiento de SMA.
- 15 En ciertos casos, la presente descripción proporciona compuestos antisentido complementarios con un pre-ARNm que codifica SMN2. En ciertos casos, el compuesto antisentido altera el corte y empalme de SMN2. Ciertas secuencias y regiones útiles para alterar el corte y empalme de SMN2 se pueden encontrar en el documento PCT/US06/024469, publicado como el documento WO 2007/002390. En ciertos casos, los compuestos oligoméricos que tienen cualquier motivo descrito en el presente documento tienen una secuencia de nucleobases
- 20 complementaria con el intrón 7 de SMN2. Algunas de estas secuencias de nucleobases se ilustran en la tabla no limitante a continuación.

Secuencia	Longitud	SEQ ID
TGCTGGCAGACTTAC	15	3
CATAATGCTGGCAGA	15	4
TCATAATGCTGGCAG	15	5
TTCATAATGCTGGCA	15	6
TTTCATAATGCTGGC	15	2
ATTCACTTTCATAATGCTGG	20	7
TCACTTTCATAATGCTGG	18	1
CTTTCATAATGCTGG	15	8
TCATAATGCTGG	12	9
ACTTTCATAATGCTG	15	10
TTCATAATGCTG	12	11
CACTTTCATAATGCT	15	12
TTTCATAATGCT	12	13
TCACTTTCATAATGC	15	14
CTTTCATAATGC	12	15
TTCACTTTCATAATG	15	16
ACTTTCATAATG	12	17
ATTCACTTTCATAAT	15	18
CACTTTCATAAT	12	19
GATTCACTTTCATAA	15	20
TCACTTTCATAA	12	21
TTCACTTTCATA	12	22
ATTCACTTTCAT	12	23
AGTAAGATTCACTTT	15	24

- Los compuestos antisentido de la presente descripción se pueden usar para modular la expresión de SMN2 en un sujeto, tal como un ser humano. En ciertos casos, el sujeto tiene atrofia muscular espinal. En ciertos sujetos de este
- 25 tipo, el gen SMN1 está ausente o, de lo contrario, no produce cantidades suficientes de proteína SMN funcional. En ciertos casos, los compuestos antisentido de la presente descripción modulan eficazmente el corte y empalme de SMN2, dando como resultado un aumento en la inclusión del exón 7 en el ARNm de SMN2 y, finalmente, en la proteína SMN2 que incluye los aminoácidos correspondientes al exón 7. Dicha proteína SMN2 alternativa se parece a la proteína SMN de tipo silvestre. Los compuestos antisentido de la presente descripción que modulan eficazmente
- 30 la expresión de ARNm de SMN2 o productos proteicos de expresión se consideran compuestos antisentido activos.

La modulación de la expresión de SMN2 se puede medir en un fluido corporal, que puede o no contener células; tejido; u órgano del animal. Los métodos de obtención de muestras para análisis, tales como fluidos corporales (por ejemplo, esputo, suero, LCR), tejidos (por ejemplo, biopsia) u órganos, y los métodos de preparación de las

muestras para permitir el análisis se conocen bien por los expertos en la técnica. Los métodos para el análisis de los niveles de ARN y proteínas se analizan anteriormente y se conocen bien por los expertos en la técnica. Los efectos del tratamiento pueden evaluarse midiendo los biomarcadores asociados con la expresión del gen diana en los fluidos, tejidos u órganos mencionados anteriormente, recogidos de un animal en contacto con uno o más compuestos de la descripción, mediante métodos clínicos de rutina conocidos en la técnica.

También se contemplan los métodos por los cuales los fluidos corporales, órganos o tejidos se ponen en contacto con una cantidad eficaz de uno o más de los compuestos antisentido o composiciones de la descripción. Los fluidos corporales, órganos o tejidos pueden ponerse en contacto con uno o más de los compuestos de la descripción que dan como resultado la modulación de la expresión de SMN2 en las células de fluidos corporales, órganos o tejidos. Se puede determinar una cantidad eficaz controlando el efecto modulador del compuesto antisentido o los compuestos o composiciones sobre los ácidos nucleicos diana o sus productos por métodos rutinarios para el experto en la técnica.

15 La descripción también proporciona un compuesto antisentido como se describe en el presente documento, para su uso en cualquiera de los métodos como se describe en el presente documento. Por ejemplo, la descripción proporciona un compuesto antisentido que comprende un oligonucleótido antisentido complementario a un ácido nucleico que codifica SMN2 humano, para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección asociada con la proteína de la supervivencia de la neurona motora (SMN), tal como atrofia muscular espinal (SMA). Como un ejemplo adicional, la descripción proporciona un compuesto antisentido que comprende un oligonucleótido antisentido complementario a un ácido nucleico que codifica SMN2 humano, para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección asociada con la proteína de la supervivencia de la neurona motora (SMN) administrando el compuesto antisentido directamente en el sistema nervioso central (SNC) o el LCR.

25 La divulgación también proporciona el uso de un compuesto antisentido como se describe en el presente documento en la fabricación de un medicamento para su uso en cualquiera de los métodos como se describe en el presente documento. Por ejemplo, la descripción proporciona el uso de un compuesto antisentido que comprende un oligonucleótido antisentido complementario con un ácido nucleico que codifica SMN2 humano en la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad o afección asociada con la proteína de la supervivencia de la neurona motora (SMN), tal como atrofia muscular espinal (SMA). Como ejemplo adicional, la descripción proporciona el uso de un compuesto antisentido que comprende un oligonucleótido antisentido complementario con un ácido nucleico que codifica SMN2 humano en la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad o afección asociada con la proteína de la supervivencia de la neurona motora (SMN) mediante la administración del medicamento directamente en el sistema nervioso central (SNC) o el LCR.

35 En ciertos casos, los compuestos oligoméricos que tienen cualquier motivo descrito en el presente documento tienen una secuencia de nucleobases complementaria con el exón 7 de SMN2.

40 En ciertos casos, los compuestos oligoméricos que tienen cualquier motivo descrito en el presente documento tienen una secuencia de nucleobases complementaria con el intrón 6 de SMN2.

En ciertos casos, un compuesto antisentido comprende un oligonucleótido antisentido que tiene una secuencia de nucleobases que comprende al menos 10 nucleobases de la secuencia: TCACTTTCATAATGCTGG (SEQ ID NO: 1).

45 En ciertos casos, un oligonucleótido antisentido tiene una secuencia de nucleobases que comprende al menos 11 nucleobases de dicha secuencia. En ciertos casos, un oligonucleótido antisentido tiene una secuencia de nucleobases que comprende al menos 12 nucleobases de dicha secuencia. En ciertos casos, un oligonucleótido antisentido tiene una secuencia de nucleobases que comprende al menos 13 nucleobases de dicha secuencia. En ciertos casos, un oligonucleótido antisentido tiene una secuencia de nucleobases que comprende al menos 14 nucleobases de dicha secuencia. En ciertos casos, un oligonucleótido antisentido tiene una secuencia de nucleobases que comprende al menos 15 nucleobases de dicha secuencia. En ciertos casos, un oligonucleótido antisentido tiene una secuencia de nucleobases que comprende al menos 16 nucleobases de dicha secuencia. En ciertos casos, un oligonucleótido antisentido tiene una secuencia de nucleobases que comprende al menos 17 nucleobases de dicha secuencia. En ciertos casos, un oligonucleótido antisentido tiene una secuencia de nucleobases que comprende las nucleobases de dicha secuencia. En ciertos casos, un oligonucleótido antisentido tiene una secuencia de nucleobases que consiste en las nucleobases de dicha secuencia. En ciertos casos, un oligonucleótido antisentido consiste en 10-18 nucleósidos unidos y tiene una secuencia de nucleobases un 100% idéntica a una porción de longitud equivalente de la secuencia: TCACTTTCATAATGCTGG (SEQ ID NO: 1).

60



## **7. Ciertos sujetos**

En ciertos casos, un sujeto tiene uno o más indicadores de SMA. En ciertos casos, el sujeto ha reducido la actividad eléctrica de uno o más músculos. En ciertos casos, el sujeto tiene un gen SMN1 mutante. En ciertos casos, el gen SMN1 del sujeto está ausente o es incapaz de producir proteína SMN funcional. En ciertos casos, el sujeto es diagnosticado por una prueba genética. En ciertos casos, el sujeto se identifica por biopsia muscular. En ciertos casos, un sujeto no puede sentarse erguido. En ciertos casos, un sujeto no puede ponerse en pie o caminar. En ciertos casos, un sujeto requiere asistencia para respirar y/o comer. En ciertos casos, un sujeto se identifica mediante la medición electrofisiológica de músculo y/o biopsia muscular.

10

En ciertos casos, el sujeto tiene SMA de tipo I. En ciertos casos, el sujeto tiene SMA de tipo II. En ciertos casos, el sujeto tiene SMA de tipo III. En ciertos casos, se diagnostica que el sujeto tiene SMA en el útero. En ciertos casos, se diagnostica que el sujeto tiene SMA dentro de la primera semana después del nacimiento. En ciertos casos, se diagnostica que el sujeto tiene SMA dentro del primer mes del nacimiento. En ciertos casos, se diagnostica que el sujeto tiene SMA a los 3 meses de edad. En ciertos casos, se diagnostica que el sujeto tiene SMA a los 6 meses de edad. En ciertos casos, se diagnostica que el sujeto tiene SMA a la edad de 1 año. En ciertos casos, se diagnostica que el sujeto tiene SMA entre 1 y 2 años de edad. En ciertos casos, se diagnostica que el sujeto tiene SMA entre 1 y 15 años de edad. En ciertos casos, se diagnostica que el sujeto tiene SMA cuando el sujeto es mayor de 15 años de edad.

20

En ciertos casos, la primera dosis de una composición farmacéutica de acuerdo con la presente descripción se administra en el útero. En ciertos casos, la primera dosis se administra antes del desarrollo completo de la barrera hematoencefálica. En ciertos casos, la primera dosis se administra sistemáticamente al sujeto en el útero. En ciertos casos, la primera dosis se administra en el útero después de la formación de la barrera hematoencefálica. En ciertos casos, la primera dosis se administra al LCR.

25

En ciertos casos, la primera dosis de una composición farmacéutica de acuerdo con la presente descripción se administra cuando el sujeto tiene menos de una semana de edad. En ciertos casos, la primera dosis de una composición farmacéutica de acuerdo con la presente descripción se administra cuando el sujeto tiene menos de un mes de edad. En ciertos casos, la primera dosis de una composición farmacéutica de acuerdo con la presente descripción se administra cuando el sujeto tiene menos de 3 meses de edad. En ciertos casos, la primera dosis de una composición farmacéutica de acuerdo con la presente descripción se administra cuando el sujeto tiene menos de 6 meses de edad. En ciertos casos, la primera dosis de una composición farmacéutica de acuerdo con la presente descripción se administra cuando el sujeto tiene menos de un año de edad. En ciertos casos, la primera dosis de una composición farmacéutica de acuerdo con la presente descripción se administra cuando el sujeto tiene menos de 2 años de edad. En ciertos casos, la primera dosis de una composición farmacéutica de acuerdo con la presente descripción se administra cuando el sujeto tiene menos de 15 años de edad. En ciertos casos, la primera dosis de una composición farmacéutica de acuerdo con la presente descripción se administra cuando el sujeto tiene más de 15 años de edad.

40

## **8. Ciertas dosis**

En ciertos casos, la presente divulgación proporciona cantidades y frecuencias de dosis. En ciertos casos, las composiciones farmacéuticas se administran como un bolo intravenoso. En ciertos casos de este tipo, la dosis del bolo intravenoso es de 0,01 a 25 miligramos de compuesto antisentido por kilogramo de peso corporal del sujeto. En ciertos casos de este tipo, la dosis del bolo intravenoso es de 0,01 a 10 miligramos de compuesto antisentido por kilogramo de peso corporal del sujeto. En ciertos casos, la dosis es de 0,05 a 5 miligramos de compuesto antisentido por kilogramo de peso corporal del sujeto. En ciertos casos, la dosis es de 0,1 a 2 miligramos de compuesto antisentido por kilogramo de peso corporal del sujeto. En ciertos casos, la dosis es de 0,5 a 1 miligramos de compuesto antisentido por kilogramo de peso corporal del sujeto. En ciertos casos, dichas dosis se administran dos veces al mes. En ciertos casos, dichas dosis se administran cada mes. En ciertos casos, dichas dosis se administran cada 2 meses. En ciertos casos, dichas dosis se administran cada 6 meses. En ciertos casos, dichas dosis se administran mediante bolo intravenoso al LCR. En ciertos casos, dichas dosis se administran por bolo intravenoso intratecal. En ciertos casos, dichas dosis se administran mediante inyección sistémica en bolo (por ejemplo, inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa). En ciertos casos, los sujetos reciben bolos intravenosos en el LCR y los bolos intravenosos sistémicos. En dichos casos, las dosis del bolo al LCR y el bolo sistémico pueden ser iguales o diferentes entre sí. En ciertos casos, el LCR y las dosis sistémicas se administran a diferentes frecuencias. En ciertos casos, la descripción proporciona un régimen de dosificación que comprende al menos una inyección intratecal en bolo y al menos una inyección subcutánea en bolo.

60

En ciertos casos, las composiciones farmacéuticas se administran por infusión continua. Dicha infusión continua se puede lograr mediante una bomba de infusión que administra composiciones farmacéuticas al LCR. En ciertos casos, dicha bomba de infusión administra la composición farmacéutica IT o ICV. En ciertos casos de este tipo, la dosis administrada es entre 0,05 y 25 miligramos de compuesto antisentido por kilogramo de peso corporal del sujeto al día. En ciertos casos, la dosis administrada es de 0,1 a 10 miligramos de compuesto antisentido por kilogramo de peso corporal del sujeto al día. En ciertos casos, la dosis administrada es de 0,5 a 10 miligramos de compuesto antisentido por kilogramo de peso corporal del sujeto al día. En ciertos casos, la dosis administrada es de 0,5 a 5 miligramos de compuesto antisentido por kilogramo de peso corporal del sujeto al día. En ciertos casos, la dosis administrada es de 1 a 5 miligramos de compuesto antisentido por kilogramo de peso corporal del sujeto al día.

10 En ciertos casos, la descripción proporciona un régimen de dosificación que comprende infusión en el SNC y al menos una inyección sistémica en bolo. En ciertos casos, la descripción proporciona un régimen de dosificación que comprende infusión en el SNC y al menos una inyección subcutánea en bolo. En ciertos casos, la dosis, ya sea por bolo o por infusión, se ajusta para lograr o mantener una concentración de compuesto antisentido de 0,1 a 100 microgramos por gramo de tejido del SNC. En ciertos casos, la dosis, ya sea por bolo o por infusión, se ajusta para

15 lograr o mantener una concentración de compuesto antisentido de 1 a 10 microgramos por gramo de tejido del SNC. En ciertos casos, la dosis, ya sea por bolo o por infusión, se ajusta para lograr o mantener una concentración de compuesto antisentido de 0,1 a 1 microgramos por gramo de tejido del SNC.

En ciertos casos, la dosificación de un sujeto se divide en una fase de inducción y una fase de mantenimiento. En ciertos casos, la dosis administrada durante la fase de inducción es mayor que la dosis administrada durante la fase de mantenimiento. En ciertos casos, la dosis administrada durante la fase de inducción es menor que la dosis administrada durante la fase de mantenimiento. En ciertos casos, la fase de inducción se logra mediante bolo intravenoso y la fase de mantenimiento se logra mediante infusión continua.

25 En ciertos casos, la descripción proporciona la administración sistémica de compuestos antisentido, en solitario o junto con la administración al LCR. En ciertos casos, la dosis para administración sistémica es de 0,1 mg/kg a 200 mg/kg. En ciertos casos, la dosis para administración sistémica es de 0,1 mg/kg a 100 mg/kg. En ciertos casos, la dosis para administración sistémica es de 0,5 mg/kg a 100 mg/kg. En ciertos casos, la dosis para administración sistémica es de 1 mg/kg a 100 mg/kg. En ciertos casos, la dosis para administración sistémica es de 1 mg/kg a 50

30 mg/kg. En ciertos casos, la dosis para administración sistémica es de 1 mg/kg a 25 mg/kg. En ciertos casos, la dosis para administración sistémica es de 0,1 mg/kg a 25 mg/kg. En ciertos casos, la dosis para administración sistémica es de 0,1 mg/kg a 10 mg/kg. En ciertos casos, la dosis para administración sistémica es de 1 mg/kg a 10 mg/kg. En ciertos casos, la dosis para administración sistémica es de 1 mg/kg a 5 mg/kg. En ciertos casos que comprenden la administración tanto sistémica como al LCR, las dosis para estos dos rutas se determinan independientemente.

35

#### **a. Cálculo de las dosis humanas adecuadas**

En ciertos casos, el sujeto es un ser humano. En ciertos casos, una dosis humana se calcula o se estima a partir de datos de experimentos con animales, tales como los que se describen en el presente documento. En ciertos casos, una dosis humana se calcula o se estima a partir de datos de experimentos con monos y/o ratones, tales como los descritos en el presente documento. En ciertos casos, una dosis humana se calcula o se estima a partir de datos de experimentos con ratones, tales como los que se describen en el presente documento. En ciertos casos, las dosis humanas adecuadas se pueden calcular usando datos farmacocinéticos del ratón junto con el conocimiento del peso cerebral y/o las tasas de rotación del líquido cefalorraquídeo (LCR). Por ejemplo, el peso del cerebro del ratón es de aproximadamente 0,4 g, que es aproximadamente el 2% de su peso corporal. En los seres humanos, el peso promedio del cerebro es de 1,5 kg, que es aproximadamente el 2,5% del peso corporal. En ciertos casos, la administración en el LCR da como resultado la eliminación de una porción del compuesto a través de la captación en el tejido cerebral y el metabolismo posterior. Al utilizar la relación entre el peso del cerebro humano y de ratón como factor de escala, se puede calcular una estimación de la eliminación y la depuración a través del tejido cerebral.

45 Además, la tasa de rotación del LCR se puede usar para estimar la eliminación del compuesto del LCR a la sangre. La tasa de rotación del LCR del ratón es de aproximadamente 10-12 veces al día (0,04 ml producidos a 0,325  $\mu$ l/min). La tasa de rotación del LCR humano es de aproximadamente 4 veces al día (100-160 ml producidos a 350 - 400  $\mu$ l/min). La depuración, y por lo tanto, los requisitos de dosificación pueden basarse en la escala de eliminación del peso del cerebro, y/o la escala de rotación del LCR. La depuración extrapolada del LCR humano se puede usar

50 para estimar dosis equivalentes en seres humanos que se aproximan a las dosis en ratones. De esta manera, se pueden estimar las dosis en seres humanos que tienen en cuenta las diferencias en el metabolismo tisular basándose en el peso del cerebro y las tasas de rotación del LCR. Dichos métodos de cálculo y estimación se conocen por los expertos en la técnica.

60 A modo de ejemplo no limitativo, en ciertos casos, se puede estimar una dosis humana equivalente a partir de una

dosis de ratón deseada multiplicando la dosis de ratón mg/kg por un factor de aproximadamente 0,25 a aproximadamente 1,25, dependiendo de la depuración y la eliminación de un compuesto particular. Por lo tanto, por ejemplo, en ciertos casos, una dosis equivalente en seres humanos de una dosis de 0,01 mg para un ratón de 20 g variará de aproximadamente 8,75 mg a aproximadamente 43,75 mg de dosis total para un ser humano de 70 kg.

- 5 Asimismo, por ejemplo, en ciertos casos, una dosis equivalente en seres humanos de una dosis de 0,01 mg para un ratón recién nacido de 4 g variará de aproximadamente 1,9 mg a aproximadamente 9,4 mg de dosis total para un ser humano recién nacido de 3 kg. Estas dosis de ejemplo son simplemente para ilustrar cómo un experto puede determinar una dosis humana adecuada y no pretende limitar la presente descripción.
- 10 En ciertos casos, una dosis humana para administración sistémica (ya sea administrada sola o en combinación con la administración al LCR) se calcula o se estima a partir de datos de experimentos con animales, tales como los descritos en el presente documento. Típicamente, una dosis adecuada para seres humanos (en mg/kg) para la dosis sistémica es entre 0,1 y 10 veces una dosis eficaz en animales. Por lo tanto, únicamente con fines ejemplares, una dosis subcutánea de 50 µg en un ratón recién nacido de 2 g es una dosis de 25 mg/kg. Se predice que la dosis correspondiente para un ser humano está entre 2,5 mg/kg y 250 mg/kg. Para un bebé de 3 kilogramos, la dosis correspondiente es de entre 7,5 mg y 750 mg. Para un niño de 25 kg, la dosis correspondiente es de 62,5 mg a 6250 mg.

### 9. Regímenes de tratamiento

- 20 En ciertos casos, las cantidades de dosis anteriores, las frecuencias de dosis, las vías de administración, las fases de inducción y mantenimiento, y el momento de la primera dosis se combinan para proporcionar regímenes de dosificación para sujetos que tienen SMA. Dichos regímenes de dosificación pueden seleccionarse y ajustarse para proporcionar una mejoría de uno o más síntomas de SMA y/o para reducir o evitar la toxicidad o los efectos secundarios atribuibles a la administración de la composición farmacéutica. En ciertos casos, los sujetos están en el útero o son recién nacidos. En dichos casos, la administración de composiciones farmacéuticas, particularmente por infusión continua, presenta desafíos particulares. Por consiguiente, en ciertos casos, la presente descripción proporciona la administración de composiciones farmacéuticas por administración en bolo mientras el sujeto está en el útero o es muy joven, seguido de una infusión continua a través de una bomba de infusión implantada cuando el sujeto es mayor y la colocación de dicha bomba es más práctica. Además, en ciertos casos, a medida que el sujeto crece, la dosis absoluta se aumenta para lograr la misma relación dosis: peso corporal o similar. La siguiente tabla está destinada a ilustrar regímenes de tratamiento y no pretende limitar las posibles combinaciones de tratamientos que se realizarán fácilmente por un experto en la técnica.

Periodo de dosificación	Primero	Segundo	Tercero	Cuarto	Quinto
<b>Régimen 1</b>					
<u>Edad del sujeto</u>	En el útero, antes de la formación de la barrera hematoencefálica	En el útero, después de la formación de la barrera hematoencefálica	> 1 semana	6 meses	1,5 años
<u>Cantidad de dosis</u>	50 µg	50 µg	100 µg	10 µg/día	50 µg/día
<u>Frecuencia</u>	Administración única	Administración única	Mensual	Continua	Continua
<u>Ruta de administración</u>	Inyección sistémica	Inyección IT	Inyecciones IT	Infusión IT	Infusión IT
<u>Duración</u>	N/A	N/A	6 meses	1 año	En curso
<b>Régimen 2</b>					
<u>Edad del sujeto</u>	En el útero, después de la formación de la barrera hematoencefálica	> 1 semana	6 meses	1,5 años	N/A
<u>Cantidad de dosis</u>	50 µg	100 µg	5 mg/día	10 mg/día	N/A
<u>Frecuencia</u>	Administración única	Mensual	Continua	Continua	N/A
<u>Ruta de administración</u>	Inyección ICV	Inyección ICV	Infusión ICV	Infusión ICV	N/A
<u>Duración</u>	N/A	6 meses	1 año	En curso	N/A
<b>Régimen 3</b>					
<u>Edad del sujeto</u>	> 1 semana	6 meses	1,5 años	2,5 años*	

<u>Cantidad de dosis</u>	100 µg	500 µg/día	20 mg/día	20 mg/día	100 mg
<u>Frecuencia</u>	2 veces al mes	Continua	Continua	Continua	2 veces al mes
<u>Ruta de administración</u>	Inyección ICV	Infusión ICV	Infusión ICV	Infusión ICV	IP
<u>Duración</u>	6 meses	1 año	1 año	En curso	En curso
* Nota: el 4º periodo de dosificación en el régimen 3 ilustra la infusión continua de LCR combinada con la administración sistémica periódica. Estos regímenes de tratamiento pretenden ilustrar y no limitar la presente descripción.					

En ciertos casos, el régimen de dosificación comprende una administración sistémica, en solitario o en combinación con la administración en el LCR (por ejemplo, el régimen 3, anterior). La tabla, a continuación, ilustra adicionalmente dichos regímenes.

5

Administración sistémica			Administración al LCR		
Dosis	Ruta	Frecuencia	Dosis	Ruta	Frecuencia
1-5 mg/kg	subcutánea	semanal	5-10 mg/kg	IT en bolo	mensual
1-5 mg/kg	subcutánea	mensual	1-5 mg/kg	bolo ICV	2 meses
10-50 mg/kg	subcutánea	mensual	0,5-1 mg/kg	IT en bolo	6 meses
0,5-25 mg/kg	subcutánea	mensual	10 mg/kg/día	Infusión IT	continua durante 7 días cada 6 meses
0,1-10 mg/kg	subcutánea	mensual	ninguna		
ninguna			0,5-1 mg/kg	IT en bolo	6 meses

Estos regímenes de tratamiento pretenden ilustrar y no limitar la presente descripción. Un experto en la técnica será capaz de seleccionar una combinación apropiada de las dosis y las administraciones en vista de la presente descripción y basándose en una diversidad de factores, tales como la gravedad de la afección y la salud general y la edad del sujeto.

10

## 10. Coadministración

En ciertos casos, las composiciones farmacéuticas de la presente descripción se coadministran con al menos otra composición farmacéutica para tratar SMA y/o para tratar uno o más síntomas asociados con SMA. En ciertos casos, dicha otra composición farmacéutica se selecciona de tricostatina A, ácido valproico, riluzol, hidroxiurea y un butirato o derivado de butirato. En ciertos casos, las composiciones farmacéuticas de la presente descripción se coadministran con tricostatina A. En ciertos casos, las composiciones farmacéuticas de la presente descripción se coadministran con un derivado de quinazolina, por ejemplo, como se describe en Thurmond, et al., J. Med Chem. 2008, 51, 449-469. En ciertos casos, una composición farmacéutica de la presente descripción y al menos otra composición farmacéutica se coadministran al mismo tiempo. En ciertos casos, una composición farmacéutica de la presente descripción y al menos otra composición farmacéutica se coadministran en diferentes momentos.

En ciertos casos, las composiciones farmacéuticas de la presente descripción se coadministran con un agente de terapia génica. En ciertos casos de este tipo, el agente de terapia génica se administra al LCR y la composición farmacéutica de la presente descripción se administra por vía sistémica. En ciertos casos de este tipo, el agente de terapia génica se administra al LCR y la composición farmacéutica de la presente descripción se administra al LCR y por vía sistémica. En ciertos casos, una composición farmacéutica de la presente descripción y un agente de terapia génica se coadministran al mismo tiempo. En ciertos casos, una composición farmacéutica de la presente descripción y un agente de terapia génica se coadministran en momentos diferentes. Se han informado ciertos enfoques de terapia génica para el tratamiento de SMA (por ejemplo, Coady et al., PLoS ONE 2008 3(10): e3468; Passini et al., J Clin Invest 2010 Apr 1, 120(4): 1253-64).

En ciertos casos, las composiciones farmacéuticas de la presente descripción se coadministran con al menos otra terapia para SMA. En ciertos casos, dicha otra terapia para SMA es la cirugía. En ciertos casos, dicha otra terapia es la terapia física, incluyendo, pero sin limitación, ejercicios diseñados para fortalecer los músculos necesarios para respirar, tal como la terapia para la tos. En ciertos casos, otra terapia es una intervención física, tal como una sonda de alimentación o un dispositivo para la respiración asistida.

En ciertos casos, las composiciones farmacéuticas de la presente descripción se coadministran con una o más composiciones farmacéuticas que reducen un efecto secundario no deseado de las composiciones farmacéuticas de la presente descripción.

40

**11. Efectos fenotípicos**

En ciertos casos, la administración de al menos una composición farmacéutica de la presente descripción da como resultado un cambio fenotípico en el sujeto. En ciertos casos, dichos cambios fenotípicos incluyen, pero sin limitación: aumento de la cantidad absoluta de ARNm de SMN que incluye el exón 7; aumento en la relación de ARNm de SMN que incluye el exón 7 con respecto al ARNm de SMN que carece del exón 7; aumento de la cantidad absoluta de proteína SMN que incluye el exón 7; aumento en la relación de proteína SMN que incluye el exón 7 con respecto a la proteína SMN que carece del exón 7; mejora de la fuerza muscular, mejora la actividad eléctrica en al menos un músculo; mejora de la respiración; aumento de peso; y supervivencia. En ciertos casos, al menos un cambio fenotípico se detecta en una neurona motora del sujeto. En ciertos casos, la administración de al menos una composición farmacéutica de la presente descripción da como resultado que un sujeto pueda sentarse, ponerse en pie y/o caminar. En ciertos casos, la administración de al menos una composición farmacéutica de la presente descripción da como resultado que un sujeto pueda comer, beber y/o respirar sin ayuda. En ciertos casos, la eficacia del tratamiento se evalúa mediante la evaluación electrofisiológica del músculo. En ciertos casos, la administración de una composición farmacéutica de la presente divulgación mejora al menos un síntoma de SMA y tiene poco o ningún efecto antiinflamatorio. En cierto caso de este tipo, la ausencia de efecto inflamatorio está determinada por la ausencia de un aumento significativo en los niveles de Alfl durante el tratamiento.

En ciertos casos, la administración de al menos una composición farmacéutica de la presente descripción retrasa la aparición de al menos un síntoma de SMA. En ciertos casos, la administración de al menos una composición farmacéutica de la presente descripción retarda la progresión de al menos un síntoma de SMA. En ciertos casos, la administración de al menos una composición farmacéutica de la presente descripción reduce la gravedad de al menos un síntoma de SMA.

En ciertos casos, la administración de al menos una composición farmacéutica de la presente descripción da como resultado un efecto secundario no deseado. En ciertos casos, se identifica un régimen de tratamiento que da como resultado la mejoría deseada de los síntomas y mientras se evitan los efectos secundarios no deseados.

**12. Unidades de dosificación**

En ciertos casos, las composiciones farmacéuticas de la presente descripción se preparan como unidades de dosificación para administración. Ciertas unidades de dosificación de este tipo se encuentran en concentraciones seleccionadas de 0,01 mg a 100 mg. En ciertos casos de este tipo, una composición farmacéutica de la presente divulgación comprende una dosis de compuesto antisentido seleccionado de 0,01 mg, 0,1 mg, 0,5 mg, 1 mg, 5 mg, 10 mg, 20 mg, 25 mg, 50 mg, 75 mg, 100 mg, 150 mg, y 200 mg. En ciertos casos, una composición farmacéutica comprende una dosis de oligonucleótido seleccionada de 0,1 mg, 0,5 mg, 1 mg, 5 mg, 10 mg, 25 mg, y 50 mg.

**13. Kits**

En ciertos casos, la presente descripción proporciona kits que comprenden al menos una composición farmacéutica. En ciertos casos, dichos kits comprenden además un medio de administración, por ejemplo, una jeringa o una bomba de infusión.

**Descripción no limitante**

Mientras que ciertos compuestos, composiciones y métodos descritos en el presente documento se han descrito con especificidad de acuerdo con ciertos casos, los siguientes ejemplos sirven solo para ilustrar los compuestos descritos en el presente documento y no pretenden limitarlos. Aunque la lista de secuencias que acompaña a esta presentación identifica cada secuencia como "ARN" o "ADN" según se requiera, en realidad, esas secuencias pueden modificarse con cualquier combinación de modificaciones químicas. Un experto en la técnica apreciará fácilmente que tal designación como "ARN" o "ADN" para describir oligonucleótidos modificados es, en ciertos casos, arbitraria. Por ejemplo, un oligonucleótido que comprende un nucleósido que comprende un resto de azúcar 2'-OH y una base de timina podría describirse como un ADN que tiene un azúcar modificado (2'-OH para 2'-H natural del ADN) o como un ARN que tiene una base modificada (timina (uracilo metilado) para el uracilo natural del ARN).

Por consiguiente, las secuencias de ácido nucleico proporcionadas en el presente documento, incluyendo, pero sin limitación, las de la lista de secuencias, pretenden incluir ácidos nucleicos que contienen cualquier combinación de ARN y/o ADN natural o modificado, incluyendo, pero sin limitación, tales ácidos nucleótidos que tienen nucleobases modificadas. A modo de ejemplo adicional y sin limitación, un compuesto oligomérico que tiene la secuencia de nucleobases "ATCGATCG" incluye cualquier compuesto oligomérico que tenga dicha secuencia de nucleobases, ya

sea modificada o no modificada, incluyendo, pero sin limitación, dichos compuestos que comprenden bases de ARN, tal como las que tienen secuencia "AUCGAUCG" y aquellas que tienen algunas bases de ADN y algunas bases de ARN tal como "AUCGATCG" y compuestos oligoméricos que tienen otras bases modificadas, tales como "AT<sup>m</sup>CGAUCG", donde <sup>m</sup>C indica una base de citosina que comprende un grupo metilo en la posición 5.

5

### Ejemplo 1 - Compuestos antisentido dirigidos a SMN2

Los siguientes oligonucleótidos se sintetizaron usando técnicas estándar previamente indicadas.

Referencia N.º	Secuencia	Longitud	Química	SEQ ID
ISIS396443	TCACTTTCATAATGCTGG	18	2'-MOE completo; PS completo	1
ISIS396449	TTTCATAATGCTGGC	15	2'-MOE completo; PS completo	2
PS = enlace internucleosídico de fosforotioatos				

10

### Ejemplo 2 - Ratones transgénicos de SMN Smn<sup>-/-</sup>

La eficacia terapéutica y la seguridad usando los compuestos antisentido como se describe anteriormente se pueden probar en un modelo animal apropiado. Por ejemplo, los modelos animales que parecen más similares a las enfermedades humanas incluyen especies animales que desarrollan espontáneamente una alta incidencia de la enfermedad en particular o aquellas que han sido inducidas a hacerlo.

En particular, se conocen modelos animales para SMA. Como se ha explicado anteriormente, la base molecular de SMA, un trastorno neuromuscular autosómico recesivo, es la pérdida homocigota del gen 1 de la supervivencia de la neurona motora (SMN1). Una copia casi idéntica del gen SMN1, llamada SMN2, se encuentra en los seres humanos y modula la gravedad de la enfermedad. A diferencia de los seres humanos, los ratones tienen un solo gen (Smn) que es equivalente a SMN1. La pérdida homocigota de este gen es letal para los embriones y produce una muerte celular masiva, lo que indica que el producto del gen Smn es necesario para la función y la supervivencia celular. La introducción de 2 copias de SMN2 en ratones que carecen de SMN rescata la letalidad embrionaria, dando como resultado ratones con el fenotipo SMA (Monani et al., Hum. Mol. Genet. (2000) 9:333-339. Un alto número de copias de SMN2 rescata a los ratones porque se produce suficiente proteína SMN en las neuronas motoras. Véase, también, Hsieh-Li, et al., Nat. Genet. (2000) 24:66-70, que informa sobre la producción de líneas de ratones transgénicos que expresan SMN2 humano. En particular, los ratones transgénicos que albergaban SMN2 en el fondo Smn<sup>-/-</sup> mostraron cambios patológicos en la médula espinal y músculos esqueléticos similares a los de los pacientes con SMA. La gravedad de los cambios patológicos en estos ratones se correlacionó con la cantidad de proteína SMN que contenía la región codificada por el exón 7. Los ratones heterocigotos que carecen de una copia de Smn se denominan Smn<sup>-/+</sup> y son un modelo para la forma menos grave de SMA, tipo III.

La severidad del fenotipo SMA va en función del número de copias de SMN2 humano en los ratones. La cepa "Taiwán" tiene 4 copias de SMN2 humano, dando como resultado ratones que tienen un fenotipo de SMA moderado a grave, similar al Tipo I o Tipo II.

Los ratones Delta-7 (Smn<sup>-/-</sup>, hSMN2<sup>+/+</sup>, SMNΔ7<sup>+/+</sup>) también carecen de Smn de ratón y expresan SMN2 humano. Los ratones Delta 7 tienen un fenotipo más grave y mueren poco después del nacimiento, típicamente, aproximadamente 15-20 días después del nacimiento.

### Ejemplo 3 - Administración sistémica de compuestos antisentido *in vivo* en SMN2 (cepa de Taiwán) de Smn<sup>-/-</sup>

Los ratones de Taiwán se trataron mediante inyección intraperitoneal con solución salina o con 35 mg/kg de ISIS396443 o un control de oligonucleótidos antisentido apareado incorrectamente una vez al día durante 5 días y se sacrificaron 2 días después el día 7. Se recogieron el hígado y el riñón y el ARN se aisló usando técnicas estándar. SMN2 con y sin el exón 7 se visualizó mediante RT-PCR. La administración con ISIS396443 dio como resultado un aumento sustancial en la inclusión del exón 7 en el SMN2 de riñón e hígado en comparación con los animales tratados con solución salina y control de apareamiento incorrecto.

### Ejemplo 4 - Administración intracerebroventricular (ICV) de compuestos antisentido *in vivo* en SMN2 (cepa de Taiwán) de Smn<sup>-/-</sup>

A los ratones de Taiwán se les inyectó ICV con solución salina o con 150 µg de ISIS396443 cada día durante 7 días. Los ratones se sacrificaron el día 8 y se extrajo el ARN del cerebro y la médula espinal. El análisis por RT-PCR

mostró un aumento sustancial en la inclusión del exón 7 en el SMN2 en muestras de cerebro y médula espinal obtenidas de animales tratados con ISIS396443. Estos resultados indican que el tratamiento ICV con oligonucleótido antisentido dirigido a SMN puede rescatar la condición de SMA porque la exclusión del exón 7 está asociada con el fenotipo de SMA.

5

#### **Dosis-respuesta**

A los ratones de Taiwán se les inyectó ICV solución salina o 10, 50, 100, o 150 µg de ISIS396443 cada día durante 7 días (5 ratones en cada grupo de tratamiento) y se sacrificaron el día 8. Se aisló el ARN y se analizó mediante RT-PCR. El grupo de tratamiento de 10 µg mostró una inclusión moderada del exón 7. Los grupos de 50 µg, 100 µg y 150 µg mostraron una inclusión sustancial del exón 7.

10

#### **Duración de respuesta**

15 Para determinar la duración del efecto, 24 ratones se inyectaron ICV con 50 µg de ISIS396443 cada día durante 7 días. Cuatro ratones se sacrificaron en el momento de la dosis final (tiempo 0), y cuatro ratones se sacrificaron en cada una de: 1 semana, 2 semanas, 4 semanas y 8 semanas después de la dosis final. Todos los ratones tratados mostraron una inclusión sustancial en el exón 7 por RT-PCR y el efecto en la semana 8 no mostró diferencias con los otros grupos, como se muestra en la figura 1:

20 Estos resultados indican que la administración ICV de ISIS396443 a 50 µg al día durante 7 días es eficaz durante al menos 8 semanas después del tratamiento.

El experimento se repitió para probar puntos de tiempo más largos. Los ratones de tipo III se trataron mediante infusión con ICV de ISIS396443 a 50 µg/día durante 7 días. Los ratones se sacrificaron 0, 0,5, 1, 2, 4 y 6 meses después del final del periodo de infusión de 7 días. El ARN se recogió de las médulas espinales y se analizó por transferencia Northern. Como se muestra en el gráfico a continuación, el efecto de la infusión de ISIS396443 persistió durante 6 meses después de la infusión, como se muestra en la figura 2. Esta larga duración del efecto tiene varias explicaciones posibles. Puede reflejar la estabilidad de ISIS396443, la estabilidad de la proteína SMN corregida y/o que la dosis fue lo suficientemente alta como para que, incluso después de la pérdida del compuesto con respecto al metabolismo, la dosis restante continuara proporcionando beneficios. Por lo tanto, estos datos pueden respaldar la administración de dosis más bajas, así como dosis poco frecuentes.

25

30

#### **Ejemplo 5 - Administración de compuestos antisentido por infusión intracerebroventricular continua (ICV)**

35 Usando una bomba micro-osmótica (Azlet Osmotic Pumps, Cupertino, CA, Estados Unidos), se administró ISIS396443 en el líquido cefalorraquídeo (LCR) a través del ventrículo lateral derecho en ratones adultos SMA Smn<sup>+</sup> o Smn<sup>-</sup> de tipo III con un transgen SMN2 humano (cepa de Taiwán). Los estudios de dosis-respuesta revelaron que la infusión intracerebroventricular (ICV) del ISIS396443 incrementó la inclusión del exón 7 de SMN2 en la médula espinal a ~90%, en comparación con ~10% en ratones tratados con solución salina. El análisis Western blotting e inmunohistoquímico demostraron un fuerte aumento de los niveles de proteína SMN transgénica humana en neuronas motoras de la médula espinal. Estos resultados indican que la infusión en el SNC del oligonucleótido antisentido ISIS396443 puede rescatar la condición de SMA porque la exclusión del exón 7 está asociada con el fenotipo de SMA.

40

#### **45 Ejemplo 6 - Administración embrionaria**

Se administró una única inyección ICV de 20 µg o 10 µg de ISIS396443 a ratones embrionarios de Taiwán en el día 15 de gestación (E15). Los animales se sacrificaron el día 7 después del nacimiento (P7). El ARN se aisló de la médula espinal lumbar y se analizó mediante RT-PCR. La administración embrionaria única de ISIS 396443 dio como resultado una inclusión sustancial del exón 7. Estos resultados indican que el tratamiento con el oligonucleótido antisentido ISIS396443 en el útero puede rescatar la condición de SMA porque la exclusión del exón 7 está asociada con el fenotipo de SMA.

50

Se repitió el experimento anterior y los animales se sacrificaron a las 11 semanas. Los ratones taiwaneses sin tratar desarrollan colas necróticas, que se acortan con el tiempo. La inyección embrionaria única de 20 µg de ISIS396443 retrasó significativamente el inicio de la degradación de la cola, como se muestra en la figura 3A. Estos resultados indican que el tratamiento embrionario con oligonucleótido antisentido dirigido a SMN retrasa el inicio de SMA.

55

Estos resultados se confirmaron en otro estudio usando las mismas condiciones, excepto que las dosis probadas fueron de 20 µg y 10 µg de ISIS396443 y el estudio incluyó ratones normales para la comparación. Los resultados

60

de ese experimento se muestran en la figura 3B.

#### **Ejemplo 7 - Administración *in vivo* en el modelo de ratón delta-7**

5 Se aparearon parejas reproductivas de heterocigoto (SMN<sup>+/-</sup>, hSMN2<sup>+/+</sup>, SMNΔ7<sup>+/+</sup>) y, el día del nacimiento (P0), las crías recién nacidas se trataron con ISIS396443 (18-mer, SEQ ID NO. 1), ISIS396449 (15-mer, SEQ ID NO. 2), ISIS387954 (20-mer, SEQ ID NO.7) o un ASO de control desordenado (ISIS439273; 18-mer). Los ratones se inyectaron bilateralmente en los ventrículos laterales cerebrales para una dosis total de 8 μg (4 μg en cada ventrículo lateral). Todas las inyecciones se realizaron con una aguja de micropipeta de vidrio finamente estirada según se describe (Passini et al, J. Virol. (2001) 75:12382-12392). Después de las inyecciones, a las crías se les amputó el dedo y se genotiparon (Le et al., Hum. Mol. Genet. (2005) 14:845-857) para identificar los ratones con SMA (SMN<sup>-/-</sup>, hSMN2<sup>+/+</sup>, SMNΔ7<sup>+/+</sup>), heterocigotos, y de tipo silvestre (SMN<sup>+/+</sup>, hSMN2<sup>+/+</sup>, SMNΔ7<sup>+/+</sup>). De todas las camadas se seleccionaron 7 crías para controlar el tamaño de la camada en la supervivencia. Algunas de las camadas no se inyectaron con el objeto de generar grupos de control no tratados.

15 La amplia distribución de 18-mer, se detectó en la médula espinal a los 14 días posteriores a la inyección en ratones SMA, incluyendo regiones torácicas, lumbares y cervicales de la médula espinal. Además, los estudios de colocalización con ChAT, confirmaron que la gran mayoría de las células dirigidas mediante ISIS396443 en la médula espinal, eran neuronas motoras. No se detectó señal en ratones no tratados, de control.

20 El análisis de Western blot a los 14 días, mostró una cantidad de SMN en el cerebro y la médula espinal que fueron del 40-60% de los niveles de tipo silvestre, en comparación con el 10% en controles de SMA sin tratar. No se detectó señal por encima del antecedente en ratones de control tratados con una versión desordenada de ASO. Los resultados de los Western blots se proporcionan en la figura 4.

25 Los ratones con SMA tratados con ASO de SMA también presentaron un aumento significativo del peso, la función ambulatoria (reflejo del enderezamiento y fuerza de agarre), y coordinación (extensión de miembros posteriores) independientemente de la longitud del ASO en comparación con los ratones con SMA sin tratar o ratones con SMA tratados con un ASO desordenado. No se observó un aumento significativo en el peso corporal, la función ambulatoria (reflejo de enderezamiento y fuerza de agarre), o coordinación en ratones con SMA tratados con un ASO desordenado, en comparación con ratones con SMA sin tratar. Los resultados se proporcionan en las figuras 5 y 6.

35 De manera importante, los ratones con SMA tratados con ASO independientemente de la longitud de ASO, produjeron un aumento significativo en la supervivencia promedio como se muestra en la figura 7. La supervivencia desde el nacimiento fue de 31,5 (15-mer), 27,0 (18-mer), y 28,0 (20-mer) días, en comparación con 16,0 días en controles con SMA no tratados. En contraste, los ratones con SMA tratados con un control desordenado 18-mer, no mejoraron la supervivencia. Estos resultados demuestran que el tratamiento con oligonucleótido antisentido que se dirige al tratamiento con SMN incrementa la duración de la vida en sujetos afectados por SMA.

40 El ASO de SMA también aumento los recuentos de células de neuronas motoras en la médula espinal como se muestra en la figura 8.

45 Se midió el ARN de SMN mediante RT-PCR. Los ratones tratados con ASO de SMA habían aumentado los niveles de ARN de SMN en comparación con ratones con SMA sin tratar. Los resultados de ratones tratados con ASO 20-mer, en comparación con ratones con SMA sin tratar se muestran en la figura 9.

50 Para determinar si la supervivencia puede aumentarse adicionalmente mediante la administración de una segunda dosis, se repitió el experimento anterior con una dosis adicional de 20 μg el día 21. Los resultados se muestran en la figura 10. La gráfica anterior muestra el efecto de la primera dosis de 8 μg el día 0. El día P21, a la mitad de los ratones tratados se les proporcionó un segundo tratamiento.

55 El efecto del segundo tratamiento en comparación con ratones que recibieron únicamente el primer tratamiento se muestra en la figura 11. Este resultado indica que el segundo tratamiento ICV con oligonucleótido antisentido, aumentó adicionalmente la supervivencia.

#### **Ejemplo 8 - Actividad en ratones con SMA de tipo III**

60 Se probaron dos compuestos antisentido y un compuesto de control en un modelo de ratón de SMA. Los compuestos se describen en la tabla a continuación.



**Compuestos probados en ratones con SMA de la cepa Taiwán**

ISIS N.º	Secuencia	Descripción	SEQ ID
396443	TCACTTTCATAATGCTGG	2'-MOE uniforme; PS completo; 18-mer; complementariedad con el intrón 7 de SMN2 humano	1
449220	ATTCACCTTTCATAATGCTGG	2-OMe uniforme; PS completo; 20-mer; complementariedad con el intrón 7 de SMN2 humano	3
439272	TTAGTTTAATCACGCTCG	2'-MOE uniforme; PS completo; 18-mer; secuencia de control	4

5 Se obtuvieron ratones de la cepa Taiwán con SMA de tipo III en The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine). Estos ratones carecen de SMN de ratón y son homocigotos para SMN2 humano (mSMN -/-; hSMN2 +/-). Estos ratones se han descrito en Hsieh-Li HM, et al., Nature Genet. 24, 66-70 2000.

Los ratones se trataron con 3, 10, 30, o 100 µg de ISIS396443 o ISIS449220 al día o con 30 o 100 µg de compuesto de control ISIS439272 al día en solución salina tamponada con fosfato (PBS). Los ratones de control se trataron con PBS solo (dosis de 0). Todos los tratamientos se administraron mediante infusión intracerebroventricular (ICV) utilizando una bomba osmótica Azlet 1007D. Hubo cinco animales para cada dosis, sin embargo, dos de los ratones de la dosis más alta de ISIS449220 murieron antes del término del estudio. Los animales se sacrificaron el día 9 (dos días después de la dosis final) y se recogieron de cada animal secciones de cerebro y lumbares de las médulas espinales. Se realizó el análisis por PCR en tiempo real en cada muestra para determinar la cantidad de mensaje de SMN2 humano que incluye el exón 7 ((+)exón 7) y la cantidad de mensaje de SMN2 humano que carece del exón 7((-)exón 7). El análisis por PCR en tiempo real también se realizó para determinar los niveles de expresión del factor inflamatorio de aloinjerto (AIF1) y deshidrogenasa de gliceraldehído 3-fosfato (GADPH).

20 Los niveles de expresión para (+)exón 7 y (-)exón 7 se normalizaron para los niveles de GADPH. Los niveles de expresión normalizados posteriormente se dividieron por los niveles normalizados con GADPH procedentes de ratones de control tratados con PBS. Los valores de control de aumento resultante se indican en la tabla 17 a continuación. Los datos representan el aumento del control de los cinco ratones en cada grupo, excepto la dosis más alta de ISIS449220, que representan los 3 ratones supervivientes.

25

La administración de ISIS396443 dio como resultado un aumento notable en la inclusión del exón 7. A 10 µg/día, ISIS396443 dio como resultado casi dos veces (1,8 veces) de mensaje de SMN2 retenido por exón 7 en el cerebro, y en la médula espinal lumbar fue más de dos veces en comparación en comparación con el control sin tratar.

30

**Capacidad de los compuestos antisentido para alterar el corte y empalme en ratones con SMA**

Compuesto	Dosis (µg/día)	Cerebro		Médula lumbar	
		(+)exón 7	(-)exón 7	(+)exón 7	(-)exón 7
396443 (2'-MOE)	0	1,0	1,0	1,0	1,0
	3	1,3	1,0	1,4	1,0
	10	1,8	0,7	2,1	0,6
	30	2,4	0,6	3,4	0,3
	100	3,0	0,3	3,8	0,1
449220 (2'-OMe)	0	1,0	1,0	1,0	1,0
	3	0,9	1,1	1,0	1,1
	10	1,0	1,1	1,0	1,2
	30	1,0	1,2	1,1	1,2
	100*	1,0	1,0	1,2	1,1
439272 Control	0	1,0	1,0	1,0	1,0
	30	1,0	1,1	0,9	1,1
	100	1,0	1,0	1,0	1,0

\* datos de solamente 3 ratones para esta dosis

Se probó la expresión del factor inflamatorio de aloinjerto (AIF1) como una medida de inflamación. Después de la normalización de todas las muestras para (GADPH), se dividió la relación de AIF1 para cada grupo de tratamiento mediante el valor para el control de PBS. ISIS396443 no dio resultado ningún aumento en AIF1, incluso a la dosis más alta. ISIS449220 dio como resultado un aumento de AIF1 en la médula espinal tanto de cerebro como lumbar. Los datos en la Tabla 18 representan el aumento del control de los cinco ratones en cada grupo, excepto la dosis

35

más alta de ISIS449220, que representan los 3 ratones supervivientes.

**Toxicidad de compuestos antisentido en ratones con SMA**

Compuesto	Dosis (µg/día)	AIF-1/GAPDH	
		Cerebro	Lumbar
396443 (2'-MOE)	0	1,0	1,0
	3	10	1,0
	10	1,1	1,2
	30	1,0	1,0
	100	0,9	1,0
449220 (2'-OMe)	0	1,0	1,0
	3	1,0	1,0
	10	1,0	1,8
	30	1,2	2,9
	100*	1,8	3,3
439272 Control	0	0,9	0,9
	30	0,9	1,0
	100	0,9	1,2

\* datos de solamente 3 ratones para esta dosis

**5 Ejemplo 9 - Administración a monos**

Se usaron monos Cynomolgus para evaluar la distribución de ISIS395443 a diferentes dosis y rutas de administración. Se administró ISIS396443 a 2 monos. Un mono recibió una dosis de 3 mg mediante infusión ICV y el otro mono recibió una dosis de 3 mg mediante infusión IT. Ambas infusiones se administraron durante un periodo de 24 horas. Los monos se sacrificaron y los tejidos se recolectaron 96 horas después del final del periodo de infusión. La concentración de ISIS396443 se midió en muestras de secciones cervicales, torácicas y lumbares de la médula espinal. Los resultados se resumen en la tabla a continuación.

Animal N.º	Dosis	Ruta	Tejido	Concentración de ISIS396443 (µg/g)
1	3 mg durante 24 horas	Infusión ICV	Cervical	21,5
			Torácico	9,4
			Lumbar	23,9
2	3 mg durante 24 horas	Infusión IT	Cervical	12,5
			Torácico	22,6
			Lumbar	42,6

Dado que los monos cynomolgus son de aproximadamente 3 kg, esta dosis es de aproximadamente 1 mg/kg.

15

Para evaluar adicionalmente la distribución de ISIS39644, se dividieron veintiséis monos en seis grupos como se proporciona en la tabla a continuación.

Grupo	Dosis	Ruta	Concentración del compuesto (mg/ml)	Duración de infusión	Día del sacrificio	Número de monos
1	0	ICV	0	14 días	Día 19	2M/2F
2	3 mg	ICV	0,09	14 días	Día 19	2M/2F
3	3 mg	IT	1,25	1 día	Día 6	3M/2F
4	3 mg	IT	0,42	3 días	Día 8	2M/2F
5	3 mg	IT	0,18	7 días	Día 12	3M/2F
6	3 mg	IT	0,09	14 días	Día 19	2M/2F

20 La velocidad de infusión para todos los grupos fue de 100 µl/hora. Todos los monos recibieron un total de 3 mg de ISIS39644 en solución salina, excepto el grupo 1, que recibió únicamente una solución salina. Los monos se sacrificaron y los tejidos se recogieron 5 días después del final de la infusión.

25 Las concentraciones de ISIS39644 en muestras de tejido de monos se evaluaron usando técnicas estándar. Los resúmenes de los resultados se proporcionan en los gráficos en la figura 12. Las muestras también se evaluaron mediante histología. La histología no mostró ningún efecto adverso del tratamiento y confirmó la presencia de ISIS396443. No hubo evidencia de pérdida de células de Purkinje.

La infusión rápida pareció tener más ISIS396443 que la infusión lenta. Estos resultados sugieren que las velocidades de infusión más rápidas o la inyección en bolo pueden preferirse en ciertos casos. Dado que la administración en bolo tiene ciertas ventajas prácticas con respecto a la infusión, en ciertos casos, es el método de administración preferido en el LCR. En ciertos casos, el método de administración preferido en el LCR es mediante inyección IT en bolo.

**Ejemplo 10 - Generación de un modelo de ratón de SMA grave y tratamiento ICV**

- 10 Se generaron ratones que tenían un fenotipo de SMA grave (ratones con sSMA). Los ratones con sSMA homocigotos llevan 2 copias de SMN2 humano y no de SMN de ratón. La vida promedio es de aproximadamente 10 días. Además, los ratones con SMA son más pequeños y tienen colas más cortas. Los heterocigotos portan SMN de ratón y se desarrollan de manera normal.
- 15 Para estudiar el efecto de los compuestos antisentido en estos ratones con sSMA, se inyectaron ICV 20 µg de ISIS396443 el día P1. El tratamiento dio como resultado un aumento de la supervivencia promedio de 9,9 días (control tratado con solución salina) a 16,7 días. El análisis por RT-PCR mostró un aumento del ARN de SMN de longitud completa en tejidos de ratones tratados.

**20 Ejemplo 11 - Administración sistémica de ISIS 396443**

Los ratones con sSMA y los ratones de control heterocigoto sanos se dividieron en grupos para estudiar el efecto de ISIS396443 mediante inyección ICV en bolo y/o inyección subcutánea (SC) en bolo como se indica a continuación:

- 25 Grupo 1 - ICV+SC  
Una inyección ICV de 20 µg en P1 o P2 (día 1 o 2 después del nacimiento); y dos inyecciones subcutáneas de 50 µg/g administradas entre P0 y P3.
- Grupo 2 - SC+SC  
Dos inyecciones SC de 50 µg/g administradas entre P0 y P3; y una inyección subcutánea de 50 µg/g administrada entre P5 y P6; y una inyección subcutánea de 50 µg/g administrada entre P9 y P10.
- 30 Grupo 3 - SC  
Dos inyecciones SC de 50 µg/g administradas entre P0 y P3.
- Grupo 4 - control de solución salina de SMA  
Una inyección ICV de solución salina en P1 o P2; y dos inyecciones subcutáneas de solución salina administradas entre P0 y P3.
- 35 Grupo 5 - Control heterocigoto  
Una inyección ICV de 20 µg en P1 o P2; y dos inyecciones subcutáneas de 50 µg/g administradas entre P0 y P3 de ratones heterocigotos.
- 40 Cada grupo incluyó de 14 a 22 ratones. La supervivencia (en días) para ratones individuales en cada grupo se proporciona en la tabla a continuación. Muchos ratones en este estudio siguen vivos en el momento en que se prepara la presente solicitud de patente. Por lo tanto, un valor precedido de un ">" indica que el ratón ha vivido ese número de días y aún está vivo.

Ratón	Grupo 1 ICV+SC	Grupo 2 SC+SC	Grupo 3 SC	Grupo 4 Solución salina	Grupo 5 Het
1	>141	>130	>103	8	>146
2	>141	127	94	8	>146
3	22	>114	61	8	>146
4	>140	73	>103	8	>146
5	117	27	>103	8	>145
6	>124	27	>103	8	>145
7	>111	18	34	8	>145
8	>111	>102	26	8	>145
9	>111	>98	31	8	>145
10	>111	>98	69	9	>144
11	29	>102	69	9	>144
12	>110	>102	67	9	>144
13	>110	>102	>91	9	>144
14	>110	>102	>90	9	>143
15	>110	ND	>90	9	>143

16	>108	ND	>90	9	>143
17	>108	ND	>90	10	>129
18	>109	ND	86	10	>129
19	18	ND	>75	10	>129
20	ND	ND	69	10	ND
21	ND	ND	18	11	ND
22	ND	ND	>71	12	ND
23	ND	ND	ND	12	ND
24	ND	ND	ND	13	ND
25	ND	ND	ND	13	ND
26	ND	ND	ND	14	ND

**Ejemplo 12 - Respuesta a la dosis de la administración SC**

La supervivencia en ratones con sSMA que recibieron diferentes dosis de ISIS396443 subcutánea se evaluó a través de los siguientes grupos de dosificación.

Grupo 1-SC400 (intervalos de dosis de 80 mg/kg a 180 mg/kg)

Dos inyecciones SC con un total de 400 µg por ratón, administradas entre P0 a P3, la primera dosis fue de 150 µg en P0 o P1 (volumen de 3 µl) y la segunda fue de 250 µg administrada en P2 o P3 (volumen de 5 µl).

10 Grupo 2-SC200 (intervalos de dosis de 40 mg/kg a 90 mg/kg)

Dos inyecciones SC con un total de 200 µg por ratón, administradas entre P0 y P3, la primera dosis fue de 75 µg en P0-P1 (volumen de 1,5 µl) y la segunda fue de 125 µg administrada en P2 o P3 (volumen de 2,5 µl).

Grupo 3-SC100 (intervalos de dosis de 20 mg/kg a 45 mg/kg)

15 Dos inyecciones SC con un total de 100 µg por ratón, administradas entre P0 y P3, la primera dosis fue de 40 µg en P0 o P1 (volumen de 2 µl) y la segunda fue de 60 µg administrada en P2 o P3 (volumen de 3 µl).

Grupo 4-SMA solución salina (controles negativos)

Dos inyecciones SC de solución salina entre P0 y P3, la primera fue en P0 o P1 (volumen de 5 µl) y la segunda administrada en P2 o P3 (volumen de 5 µl).

Grupo 5 - Control heterocigoto (controles positivos)

20 Ratones sin ningún tratamiento.

Cada grupo incluyó de 14 a 26 ratones. La supervivencia (en días) para ratones individuales en cada grupo se proporciona en la tabla a continuación. Muchos ratones en este estudio siguen vivos en el momento en que se prepara la presente solicitud de patente. Por lo tanto, un valor precedido de un ">" indica que el ratón ha vivido ese

25 número de días y aún está vivo.

Ratón	Grupo 1 SC400	Grupo 2 SC200	Grupo 3 SC100	Grupo 4 Solución salina	Grupo 5 Het
1	>82	>93	11	8	>87
2	>82	>91	11	8	>87
3	>82	>91	11	9	>87
4	>82	>91	11	9	>87
5	>82	14	11	9	>87
6	>82	25	12	9	>87
7	>82	92	18	9	>86
8	>82	>93	19	9	>86
9	>82	>93	22	9	>86
10	>82	>90	69	9	>86
11	>82	>90	>77	9	>86
12	>80	>91	>77	10	>86
13	>80	>91	>77	10	>86
14	25	>90	>77	10	>86
15	ND	>90	>75	10	>85
16	ND	>90	>74	11	>85
17	ND	86	>74	11	>85
18	ND	>90	>74	12	ND
19	ND	>52	>74	12	ND
20	ND	ND	>74	13	ND

21	ND	ND	>74	13	ND
22	ND	ND	>71	13	ND
23	ND	ND	>49	13	ND
24	ND	ND	>49	14	ND
25	ND	ND	>49	15	ND
26	ND	ND	23	ND	ND

### Ejemplo 13 - Infusión ICV frente a bolo ICV

La administración mediante inyección de bolo intracerebroventricular (bolo ICV) se comparó con la administración mediante infusión intracerebroventricular continua (infusión ICV). Los ratones transgénicos con SMA de tipo III se dosificaron con ISIS387954. A los ratones de infusión ICV se les dio una dosis total de 0 (control de PBS), 87,5 µg, 175 µg, 350 µg, o 700 µg infundida durante 7 días y se sacrificaron 2 días más tarde. A los ratones de bolo ICV se les dio las mismas dosis totales, 0 (control de PBS), 87,5 µg, 175 µg, 350 µg, o 700 µg, en una sola inyección ICV y se sacrificaron 9 días más tarde. Hubo 5 ratones en cada grupo. Se recogió el ARN de la médula espinal lumbar y se analizó mediante PCR en tiempo real. Se normalizó la inclusión del intrón 7 para los controles tratados con solución salina. Los resultados se resumen en la tabla a continuación.

Grupo	Dosis	Coefficiente de aumento en la inclusión del intrón 7 con respecto al PBS
1	PBS (control)	1,0
2	87,5 µg por infusión ICV durante 7 días	2,1
3	175 µg por infusión ICV durante 7 días	2,4
4	350 µg por infusión ICV durante 7 días	3,2
5	700 µg por infusión ICV durante 7 días	3,6
6	PBS (control)	1,0
7	87,5 µg por bolo ICV	3,1
8	175 µg por bolo ICV	3,7
9	350 µg por bolo ICV	3,8
10	700 µg por bolo ICV	3,8

En este experimento, la misma dosis cuando se administró mediante inyección en bolo ICV dio como resultado mayor actividad que cuando se administró mediante infusión ICV durante 7 días.

También se realizó el análisis por PCR en tiempo real para determinar los niveles de expresión del factor inflamatorio de aloinjerto (AIF1) para evaluar la inflamación. Ninguna de las muestras de los ratones tratados mostró una diferencia significativa de los ratones de control.

### Ejemplo 14 - Respuesta a la dosis por bolo ICV

La administración mediante bolo intracerebroventricular se probó en dosis adicionales. A los ratones transgénicos se les administró 0, 10,9 µg, 21,9 µg, 43,4 µg, 87,5 µg, o 175 µg de ISIS387954 mediante una única inyección de bolo ICV, y se sacrificaron 9 días después como se ha descrito en el Ejemplo 13. Las muestras se recogieron del cerebro y de la médula espinal lumbar. Se preparó el ARN y se analizó mediante RT-PCR para determinar los cambios en la inclusión del intrón 7 y para determinar el cambio en AIF1. Ninguna de las muestras mostró un cambio en AIF1 en comparación con el control. Los resultados de la inclusión del intrón 7 se resumen en la tabla a continuación. El ED50 es a aproximadamente 22 µg.

Grupo	Dosis	Coefficiente de aumento en la inclusión del intrón 7 con respecto al PBS	
		Cerebro	Médula espinal lumbar
1	PBS (control)	1,0	1,0
2	10,9 µg por bolo ICV	2,4	2,2
3	21,9 µg por bolo ICV	2,8	2,7
4	43,4 µg por bolo ICV	3,2	3,4
5	87,5 µg por bolo ICV	3,5	3,4
6	175 µg por bolo ICV	4,4	3,7

La divulgación incluye además la material objeto de las reivindicaciones del documento WO 2010/148249 del que se deriva esta solicitud, cuyo contenido se reproduce a continuación como párrafos numerados.

1. Un método que comprende administrar a un sujeto un compuesto antisentido, que comprende un oligonucleótido antisentido complementario al intrón 7 de un ácido nucleico que codifica un pre-ARNm de SMN2 humano, donde el compuesto antisentido se administra en el líquido cefalorraquídeo.
- 5 2. El método del párrafo 1, donde la administración es en el espacio intratecal.
3. El método del párrafo 1, donde la administración es en el líquido cefalorraquídeo en el cerebro.
4. El método de cualquiera de los párrafos 1-3, donde la administración comprende un bolo intravenoso.
5. El método de cualquiera de los párrafos 1-3, donde la administración comprende infusión con una bomba de administración.
- 10 6. El método de cualquiera de los párrafos 1-5, donde el compuesto antisentido se administra a una dosis de 0,01 a 10 miligramos de compuesto antisentido por kilogramo de peso corporal del sujeto.
7. El método del párrafo 6, donde la dosis es de 0,01 a 10 miligramos de compuesto antisentido por kilogramo de peso corporal del sujeto.
8. El método del párrafo 6, donde la dosis es de 0,01 a 5 miligramos de compuesto antisentido por kilogramo de peso corporal del sujeto.
- 15 9. El método del párrafo 6, donde la dosis es de 0,05 a 1 miligramos de compuesto antisentido por kilogramo de peso corporal del sujeto.
10. El método del párrafo 6, donde la dosis es de 0,01 a 0,5 miligramos de compuesto antisentido por kilogramo de peso corporal del sujeto.
- 20 11. El método del párrafo 6, donde la dosis es de 0,05 a 0,5 miligramos de compuesto antisentido por kilogramo de peso corporal del sujeto.
12. El método de cualquiera de los párrafos 6-11, donde la dosis se administra a diario.
13. El método de cualquiera de los párrafos 6-11, donde la dosis se administra semanalmente.
14. El método de cualquiera de los párrafos 6-11, donde el compuesto antisentido se administra continuamente y donde la dosis es la cantidad administra al día.
- 25 15. El método de cualquiera de los párrafos 1-13 que comprende administrar al menos una dosis de inducción durante una fase de inducción y administrar al menos una dosis de mantenimiento durante una fase de mantenimiento.
16. El método del párrafo 15, donde la dosis de inducción es de 0,05 a 5,0 miligramos de compuesto antisentido por kilogramo de peso corporal del sujeto.
- 30 17. El método del párrafo 15 o 16, donde la dosis de mantenimiento es de 0,01 a 1,0 miligramos de compuesto antisentido por kilogramo de peso corporal del sujeto.
18. El método de cualquiera de los párrafos 15-17, donde la duración de la fase de inducción es de al menos 1 semana.
- 35 19. El método de cualquiera de los párrafos 15-18, donde la duración de la fase de mantenimiento es de al menos 1 semana.
20. El método de cualquiera de los párrafos 15-19, donde cada dosis de inducción y cada dosis de mantenimiento comprende una sola inyección.
21. El método de cualquiera de los párrafos 15-19, donde cada dosis de inducción y cada dosis de mantenimiento comprenden independientemente dos o más inyecciones.
- 40 22. El método de cualquiera de los párrafos 1-21, donde el compuesto antisentido se administra al menos 2 veces durante un periodo de tratamiento de al menos 1 semana.
23. El método del párrafo 22, donde el periodo de tratamiento es de al menos un mes.
24. El método del párrafo 22, donde el periodo de tratamiento es de al menos 2 meses.
- 45 25. El método del párrafo 22, donde el periodo de tratamiento es de al menos 4 meses.
26. El método de cualquiera de los párrafos 15-25, donde la dosis de inducción se administra por uno o más bolos intravenosos y la dosis de mantenimiento se administra mediante una bomba de infusión.
27. El método de cualquiera de los párrafos 1-26 que comprende evaluar la tolerabilidad y/o la eficacia del compuesto antisentido.
- 50 28. El método de cualquiera de los párrafos 1-27, donde la cantidad de dosis o frecuencia del compuesto antisentido se reduce después de una indicación de que la administración del compuesto antisentido no se tolera.
29. El método de cualquiera de los párrafos 1-28, donde la cantidad de dosis o frecuencia del compuesto antisentido se mantiene o se reduce tras una indicación de que la administración del compuesto antisentido es eficaz.
30. El método de cualquiera de los párrafos 1-29, donde la dosis de compuesto antisentido se aumenta después de una indicación de que la administración del compuesto antisentido no es eficaz.
- 55 31. El método de cualquiera de los párrafos 1-30, donde la frecuencia de administración del compuesto antisentido se reduce tras una indicación de que la administración del compuesto antisentido es eficaz.
32. El método de cualquiera de los párrafos 1-31, donde la frecuencia de administración del compuesto antisentido se aumenta después de una indicación de que la administración del compuesto antisentido no es eficaz.
- 60 33. El método de cualquiera de los párrafos anteriores, que comprende la coadministración del compuesto

- antisentido y al menos otra terapia.
34. El método del párrafo 33, donde el compuesto antisentido y al menos otra terapia se coadministran al mismo tiempo.
- 5 35. El método del párrafo 34, donde el compuesto antisentido se administra antes de la administración de la al menos otra terapia.
36. El método del párrafo 34, donde el compuesto antisentido se administra después de la administración de la al menos otra terapia.
37. El método de cualquiera de los párrafos 33-36 donde la al menos otra terapia comprende la administración de uno o más de ácido valproico, riluzol, hidroxurea y butirato.
- 10 38. El método de cualquiera de los párrafos 33-37, donde la al menos otra terapia comprende la administración de tricostatina-A.
39. El método de cualquiera de los párrafos 33-38, donde la al menos otra terapia comprende la administración de células madre.
40. El método de cualquiera de los párrafos 33-39, donde la al menos otra terapia es terapia génica.
- 15 41. El método de cualquiera de los párrafos anteriores, donde el compuesto antisentido se administra a una concentración de aproximadamente 0,01 mg/ml, aproximadamente 0,05 mg/ml, aproximadamente 0,1 mg/ml, aproximadamente 0,5 mg/ml, aproximadamente 1 mg/ml, aproximadamente 5 mg/ml, aproximadamente 10 mg/ml, aproximadamente 50 mg/ml, o aproximadamente 100 mg/ml.
42. El método de cualquiera de los párrafos 1-41, donde la inclusión del exón 7 del ARNm de SMN2 en una neurona motora en el sujeto se aumenta.
- 20 43. El método de cualquiera de los párrafos 1-42, donde la inclusión de los aminoácidos del exón 7 en el polipéptido SMN2 en una neurona motora en el sujeto se aumenta.
44. Un método para aumentar la inclusión del exón 7 del ARNm de SMN2 en una neurona motora en un sujeto que comprende administrar al sujeto un compuesto antisentido que comprende un oligonucleótido antisentido
- 25 complementario al intrón 7 de un ácido nucleico que codifica SMN2 humano y aumentar de este modo la inclusión del exón 7 del ARNm de SMN2 en la neurona motora en el sujeto.
45. Un método para aumentar la inclusión de aminoácidos del exón 7 en el polipéptido SMN2 en una neurona motora en un sujeto que comprende administrar al sujeto un compuesto antisentido que comprende un oligonucleótido antisentido complementario al intrón 7 de un ácido nucleico que codifica SMN2 humano y aumentar
- 30 de este modo la inclusión de los aminoácidos del exón 7 en el polipéptido SMN2 en la neurona motora en el sujeto.
46. El método de cualquiera de los párrafos 1-45, donde el sujeto tiene SMA.
47. El método de cualquiera de los párrafos 1-45, donde el sujeto tiene SMA de tipo I.
48. El método de cualquiera de los párrafos 1-45, donde el sujeto tiene SMA de tipo II.
49. El método de cualquiera de los párrafos 1-45, donde el sujeto tiene SMA de tipo III.
- 35 50. El método de cualquiera de los párrafos 1-49, donde una primera dosis se administra en el útero.
51. El método del párrafo 50, donde la primera dosis se administra antes de completar la formación de la barrera hematoencefálica.
52. El método de cualquiera de los párrafos 1-49, donde una primera dosis se administra dentro de la primera semana del nacimiento del sujeto.
- 40 53. El método de cualquiera de los párrafos 1-49, donde una primera dosis se administra dentro del primer mes del nacimiento del sujeto.
54. El método de cualquiera de los párrafos 1-49, donde una primera dosis se administra dentro de los 3 meses del nacimiento del sujeto.
55. El método de cualquiera de los párrafos 1-49, donde una primera dosis se administra dentro de los 6 meses del nacimiento del sujeto.
- 45 56. El método de cualquiera de los párrafos 1-49, donde una primera dosis se administra cuando el sujeto tiene de 1 a 2 años de edad.
57. El método de cualquiera de los párrafos 1-49, donde una primera dosis se administra cuando el sujeto tiene de 1 a 15 años de edad.
- 50 58. El método de cualquiera de los párrafos 1-49, donde una primera dosis se administra cuando el sujeto es mayor de 15 años de edad.
59. El método de cualquiera de los párrafos 1-58, donde el sujeto es un mamífero.
60. El método del párrafo 59, donde el sujeto es un ser humano.
61. El método de cualquiera de los párrafos 1-60, que comprende identificar un sujeto que tiene SMA.
- 55 62. El método del párrafo 61, donde el sujeto se identifica midiendo la actividad eléctrica de uno o más músculos del sujeto.
63. El método del párrafo 61, donde el sujeto se identifica por una prueba genética para determinar si el sujeto tiene una mutación en el gen SMN1 del sujeto.
64. El método del párrafo 61, donde el sujeto se identifica por una biopsia muscular.
- 60 65. El método del párrafo 42, donde la administración del compuesto antisentido da como resultado un aumento en

- la cantidad de ARNm de SMN2 que tiene el exón 7 de al menos el 10%.
66. El método del párrafo 65, donde el aumento en la cantidad de ARNm de SMN2 que tiene el exón 7 es de al menos el 20%.
- 5 67. El método del párrafo 65, donde el aumento en la cantidad de ARNm de SMN2 que tiene el exón 7 es de al menos el 50%.
68. El método del párrafo 65, donde el aumento en la cantidad de ARNm de SMN2 que tiene el exón 7 es de al menos el 70%.
69. El método del párrafo 43, donde la administración del compuesto antisentido da como resultado un aumento en la cantidad de polipéptido SMN2 que tiene aminoácidos del exón 7 de al menos el 10%.
- 10 70. El método del párrafo 69, donde el aumento en la cantidad de polipéptido SMN2 que tiene aminoácidos del exón 7 es de al menos el 20%.
71. El método del párrafo 69, donde el aumento en la cantidad de polipéptido SMN2 que tiene aminoácidos del exón 7 es de al menos el 50%.
72. El método del párrafo 69, donde el aumento en la cantidad de polipéptido SMN2 que tiene aminoácidos del exón 15 7 es de al menos el 70%.
73. El método de cualquiera de los párrafos 1-72, donde la administración del compuesto antisentido mejora al menos un síntoma de SMA en el sujeto.
74. El método del párrafo 73, donde la administración del compuesto antisentido da como resultado una función motora mejorada en el sujeto.
- 20 75. El método del párrafo 73, donde la administración del compuesto antisentido da como resultado una pérdida de la función motora retrasada o reducida en el sujeto.
76. El método del párrafo 73, donde la administración del compuesto antisentido da como resultado una función respiratoria mejorada.
77. El método del párrafo 73, donde la administración del compuesto antisentido da como resultado una mejora de la 25 supervivencia.
78. El método de cualquiera de los párrafos 1-77, donde al menos un nucleósido del oligonucleótido antisentido comprende un resto de azúcar modificado.
79. El método del párrafo 78, donde el al menos un resto de azúcar modificado comprende un resto de azúcar 2'-metoxietilo.
- 30 80. El método de cualquiera de los párrafos 1-79, donde esencialmente cada nucleósido del oligonucleótido antisentido comprende un resto de azúcar modificado.
81. El método del párrafo 80, donde los nucleósidos que comprenden un resto de azúcar modificado comprenden todos la misma modificación de azúcar.
82. El método del párrafo 81, donde cada resto de azúcar modificado comprende un resto de azúcar 2'-metoxietilo.
- 35 83. El método de cualquiera de los párrafos 1-79, donde cada nucleósido del oligonucleótido antisentido comprende un resto de azúcar modificado.
84. El método del párrafo 83, donde todos los nucleósidos comprenden la misma modificación de azúcar.
85. El método del párrafo 84, donde cada resto de azúcar modificado comprende un resto de azúcar 2'-metoxietilo.
86. El método de cualquiera de los párrafos 1-85, donde al menos un enlace internucleosídico es un enlace 40 internucleosídico de fosforotioato.
87. El método del párrafo 86, donde cada enlace internucleosídico es un enlace internucleosídico de fosforotioato.
88. El método de cualquiera de los párrafos 1-87, donde el oligonucleótido antisentido consiste en 10 a 25 nucleósidos unidos.
89. El método de cualquiera de los párrafos 1-87, donde el oligonucleótido antisentido consiste en 12 a 22 45 nucleósidos unidos.
90. El método de cualquiera de los párrafos 1-87, donde el oligonucleótido antisentido consiste en 15 a 20 nucleósidos unidos.
91. El método de cualquiera de los párrafos 1-87, donde el oligonucleótido antisentido consiste en 18 nucleósidos unidos.
- 50 92. El método de cualquiera de los párrafos 1-91, donde el oligonucleótido antisentido es al menos un 90% complementario al ácido nucleico que codifica SMN2 humano.
93. El método del párrafo 92, donde el oligonucleótido antisentido es completamente complementario al ácido nucleico que codifica SMN2 humano.
94. El método de cualquiera de los párrafos 1-93, donde el oligonucleótido tiene una secuencia de nucleobases que 55 comprende al menos 10 nucleobases contiguas de la secuencia de nucleobases de SEQ ID NO: 1.
95. El método del párrafo 94, donde el oligonucleótido tiene una secuencia de nucleobases que comprende al menos 15 nucleobases contiguas de la secuencia de nucleobases de SEQ ID NO: 1.
96. El método del párrafo 94, donde el oligonucleótido tiene una secuencia de nucleobases que comprende la secuencia de nucleobases de SEQ ID NO: 1.
- 60 97. El método del párrafo 94, donde el oligonucleótido tiene una secuencia de nucleobases que consiste en la



secuencia de nucleobases de SEQ ID NO: 1.

98. El método de cualquiera de los párrafos 1-97, donde el compuesto antisentido comprende un grupo conjugado o grupo terminal.

5 99. El método de cualquiera de los párrafos 1-97, donde el compuesto antisentido consiste en el oligonucleótido antisentido.

100. El método de cualquiera de los párrafos 1-99, donde el compuesto antisentido se administra también por vía sistémica.

101. El método del párrafo 100, donde la administración sistémica es por inyección intravenosa o intraperitoneal.

10 102. El método del párrafo 100 o 101, donde la administración sistémica y la administración al sistema nervioso central se realizan al mismo tiempo.

103. El método del párrafo 100 o 101, donde la administración sistémica y la administración al sistema nervioso central se realizan en momentos diferentes.

104. Un compuesto antisentido que comprende un oligonucleótido antisentido complementario al intrón 7 de un ácido nucleico que codifica SMN2 humano, para su uso en un método de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-103.

15 105. El compuesto antisentido de acuerdo con el párrafo 104, para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección asociada con la supervivencia de la neurona motora de 1 (SMN1).

106. Uso de un compuesto antisentido que comprende un oligonucleótido antisentido complementario al intrón 7 de un ácido nucleico que codifica SMN2 humano en la fabricación de un medicamento para su uso en un método de acuerdo con cualquier párrafo anterior.

20 107. El uso de acuerdo con el párrafo 106, donde el medicamento es para tratar una enfermedad o afección asociada con la supervivencia de la neurona motora 1 (SMN1).

#### LISTA DE SECUENCIAS

25 <110> Isis Pharmaceuticals, Inc.

Genzyme Corporation

Cold Spring Harbor Laboratory

C. Frank Bennett

Gene Hung

30 Frank Rigo

Adrian R. Krainer

Yimin Hua

Marco Passini

Lamya Shihabuddin

35 Seng H. Cheng

Katherine W. Klinger

#### <120> COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA LA MODULACIÓN DEL CORTE Y EMPALME DE SMN2

40 <130> CORE0086WO

<150> 61/218.031

<151> 17-06-2009

45 <160> 24

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

50 <211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

55 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 1

tcactttcat aatgctgg

18

60 <210> 2

<211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5 <220>  
    <223> Oligonucleótido sintético  
    <400> 2  
 ttcataatg ctggc                   15  
 10  
    <210> 3  
    <211> 15  
    <212> ADN  
    <213> Secuencia artificial  
 15  
    <220>  
    <223> Oligonucleótido sintético  
    <400> 3  
 20 tgctggcaga cttac                   15  
    <210> 4  
    <211> 15  
    <212> ADN  
 25 <213> Secuencia artificial  
    <220>  
    <223> Oligonucleótido sintético  
 30 <400> 4  
    cataatgctg gcaga                   15  
    <210> 5  
    <211> 15  
 35 <212> ADN  
    <213> Secuencia artificial  
    <220>  
    <223> Oligonucleótido sintético  
 40  
    <400> 5  
    tcataatgct ggcag                   15  
    <210> 6  
 45 <211> 15  
    <212> ADN  
    <213> Secuencia artificial  
    <220>  
 50 <223> Oligonucleótido sintético  
    <400> 6  
    ttcataatgc tggca                   15  
 55 <210> 7  
    <211> 20  
    <212> ADN  
    <213> Secuencia artificial  
 60 <220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 7  
 attcactttc ataatgctgg 20  
 5  
 <210> 8  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 8  
 15 ctttcataat gctgg 15

<210> 9  
 <211> 12  
 <212> ADN  
 20 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

25 <400> 9  
 tcataatgct gg 12

<210> 10  
 <211> 15  
 30 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

35  
 <400> 10  
 actttcataa tgctg 15

<210> 11  
 40 <211> 12  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 45 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 11  
 ttcataatgc tg 12

50 <210> 12  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

55 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 12  
 60 cacttcata atgct 15

<210> 13  
 <211> 12  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 13  
 10 tttcataatg ct 12  
  
 <210> 14  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 15 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 20 <400> 14  
 tcactttcat aatgc 15  
  
 <210> 15  
 <211> 12  
 25 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 30  
 <400> 15  
 ctttcataat gc 12  
  
 <210> 16  
 35 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 40 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 16  
 ttcactttca taatg 15  
  
 45 <210> 17  
 <211> 12  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 50 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 17  
 actttcataa tg 12  
 55  
 <210> 18  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 60

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 18  
 5 attcactttc ataataat 15

<210> 19  
 <211> 12  
 <212> ADN  
 10 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

15 <400> 19  
 cactttcata at 12

<210> 20  
 <211> 15  
 20 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

25 <400> 20  
 gattcacttt cataa 15

<210> 21  
 30 <211> 12  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 35 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 21  
 tcactttcat aa 12

40 <210> 22  
 <211> 12  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 22  
 ttactttca ta 12

50 <210> 23  
 <211> 12  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

55 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 23  
 60 attcactttc at 12

<210> 24

<211> 15

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

10 <400> 24

agtaagattc acttt

15

## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto antisentido que comprende oligonucleótido antisentido complementario al intrón 7 de un pre-ARNm que codifica SMN2 humano, para su uso en el tratamiento de un sujeto humano que tiene atrofia muscular espinal (SMA), donde el compuesto se administra en el líquido cefalorraquídeo en el espacio intratecal del sujeto humano, donde el oligonucleótido antisentido tiene una secuencia de nucleobases que consiste en la secuencia de nucleobases de SEQ ID NO: 1, donde cada nucleósido del oligonucleótido antisentido comprende un resto de azúcar modificado, donde cada resto de azúcar modificado es un resto de azúcar 2'-metoxietilo y donde cada enlace internucleosídico es un enlace de fosforotioato.
2. Uso de un compuesto antisentido que comprende un oligonucleótido antisentido complementario al intrón 7 de un pre-ARNm que codifica SMN2 humano en la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento de un sujeto humano que tiene atrofia muscular espinal (SMA), donde el medicamento se administra en el líquido cefalorraquídeo en el espacio intratecal del sujeto humano, donde el oligonucleótido antisentido tiene una secuencia de nucleobases que consiste en la secuencia de nucleobases de SEQ ID NO: 1, donde cada nucleósido del oligonucleótido antisentido comprende un resto de azúcar modificado, donde cada resto de azúcar modificado es un resto de azúcar 2'-metoxietilo y donde cada enlace internucleosídico es un enlace de fosforotioato.
3. El compuesto antisentido para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, o el uso de un compuesto antisentido de acuerdo con la reivindicación 2 donde la administración comprende un bolo intravenoso.
4. El compuesto antisentido para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 3, o el uso de un compuesto antisentido de acuerdo con la reivindicación 2 o 3, donde el compuesto antisentido se administra a una dosis de 0,01 a 10 miligramos de compuesto antisentido por kilogramo de peso corporal del sujeto humano.
5. El compuesto antisentido para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, o el uso de un compuesto antisentido de acuerdo con la reivindicación 4, donde la dosis es:
- (a) de 0,01 a 5 miligramos de compuesto antisentido por kilogramo de peso corporal del sujeto humano;
  - (b) de 0,05 a 1 miligramos de compuesto antisentido por kilogramo de peso corporal del sujeto humano;
  - (c) de 0,01 a 0,5 miligramos de compuesto antisentido por kilogramo de peso corporal del sujeto humano; o
  - (d) de 0,05 a 0,5 miligramos de compuesto antisentido por kilogramo de peso corporal del sujeto humano.
6. El compuesto antisentido para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3-5, o el uso de un compuesto antisentido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-5, para su uso en el tratamiento de un sujeto humano que tiene (i) SMA de tipo I; (ii) SMA de tipo II; o (iii) SMA de tipo III.
7. El compuesto antisentido para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3-6, o el uso de un compuesto antisentido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-6, donde la administración del compuesto antisentido da como resultado un aumento en la cantidad de ARNm de SMN2 que tiene el exón 7 de al menos el 10%.
8. El compuesto antisentido para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3-7, o el uso de un compuesto antisentido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-7, donde el sujeto humano tiene uno o más indicadores de SMA.
9. El compuesto antisentido para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3-8, o el uso de un compuesto antisentido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-8, donde el sujeto humano tiene al menos un síntoma asociado con SMA.
10. El compuesto antisentido para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3-9, o el uso de un compuesto antisentido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-9, donde el compuesto antisentido se administra tanto por vía sistémica como al sistema nervioso central y donde la administración sistémica y la administración al sistema nervioso central se realizan en diferentes momentos.
11. El compuesto antisentido para su uso, o el uso de un compuesto antisentido de acuerdo con la reivindicación 10, donde la administración sistémica es por administración subcutánea, inyección intravenosa o intraperitoneal.
12. El compuesto antisentido para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3-9, o el

uso de un compuesto antisentido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-9, donde una primera dosis del compuesto antisentido se administra dentro de la primera semana del nacimiento del sujeto humano.

13. El compuesto antisentido para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3-9, o el uso de un compuesto antisentido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-9, donde una primera dosis del compuesto antisentido se administra dentro del primer mes del nacimiento del sujeto humano.
14. El compuesto antisentido para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3-9, o el uso de un compuesto antisentido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-9, donde una primera dosis del compuesto antisentido se administra dentro de los tres meses del nacimiento del sujeto humano.
15. El compuesto antisentido para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3-9, o el uso de un compuesto antisentido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-9, donde una primera dosis del compuesto antisentido se administra dentro de los seis meses del nacimiento del sujeto humano.
- 15 16. El compuesto antisentido para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3-9, o el uso de un compuesto antisentido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-9, donde una primera dosis del compuesto antisentido se administra cuando el sujeto humano tiene de 1 a 2 años de edad.
- 20 17. El compuesto antisentido para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3-9, o el uso de un compuesto antisentido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-9, donde una primera dosis del compuesto antisentido se administra cuando el sujeto humano tiene de 1 a 15 años de edad.



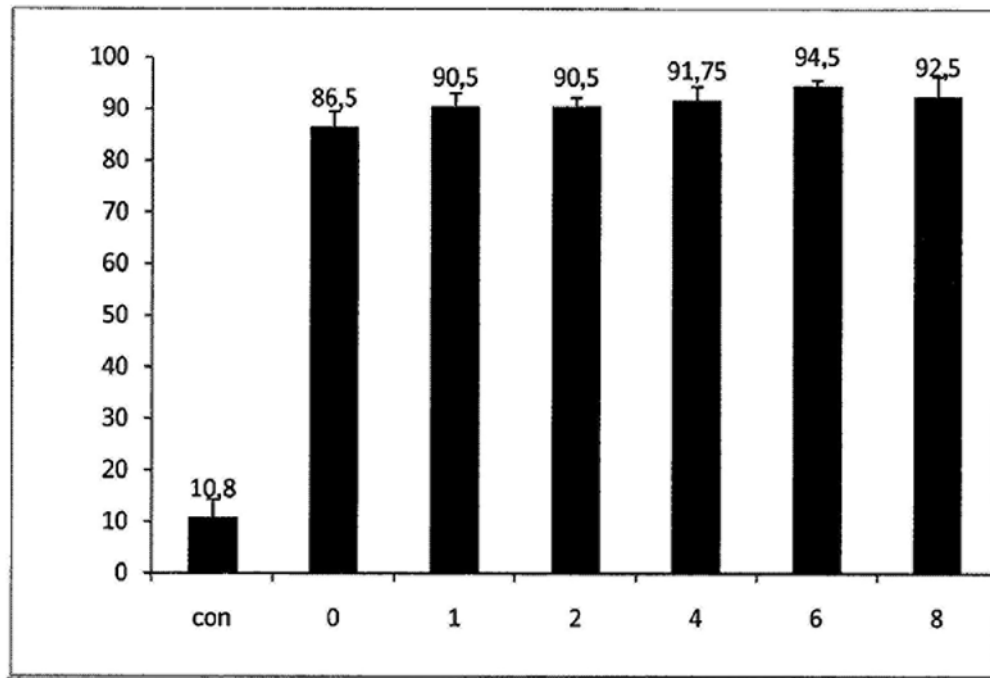


Figura 1

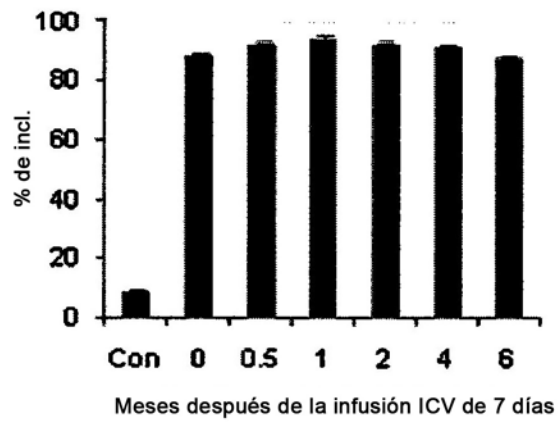
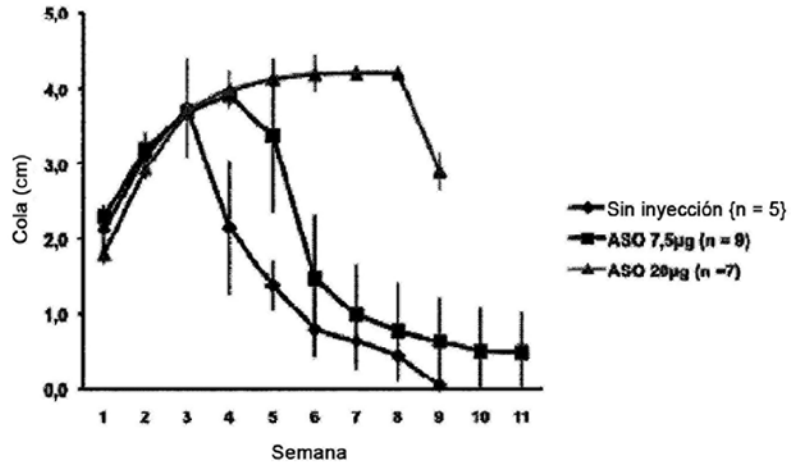


Figura 2

**A**



**B**

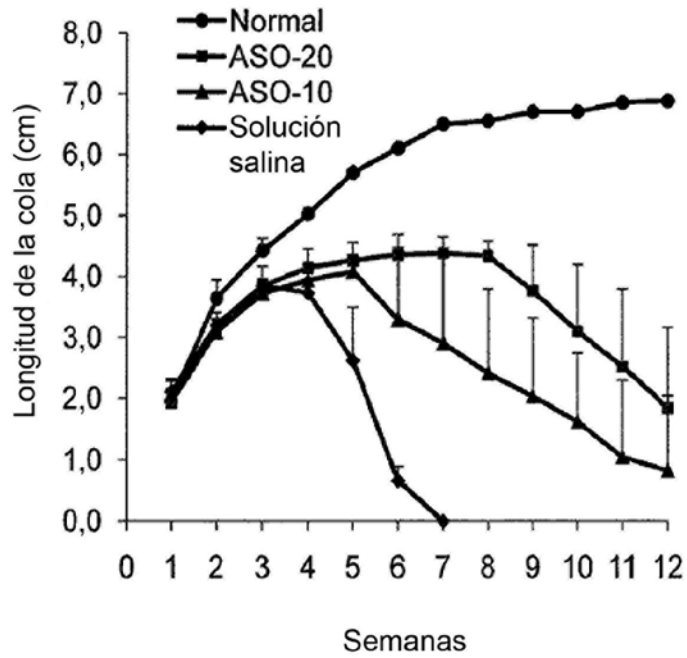
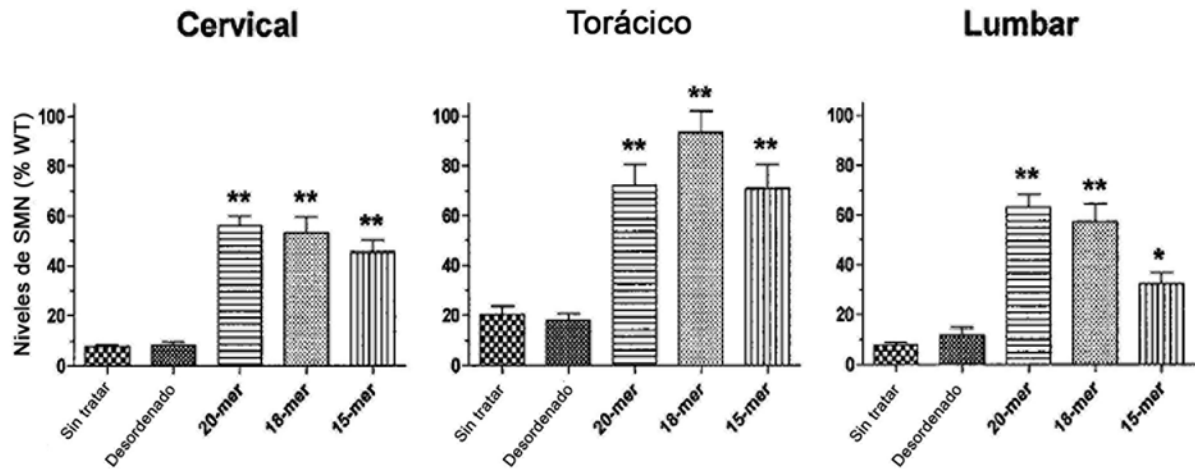


Figura 3

Western Blots de SMN de SMA



Dosis 4  $\mu$ g, 16 días después

Figura 4

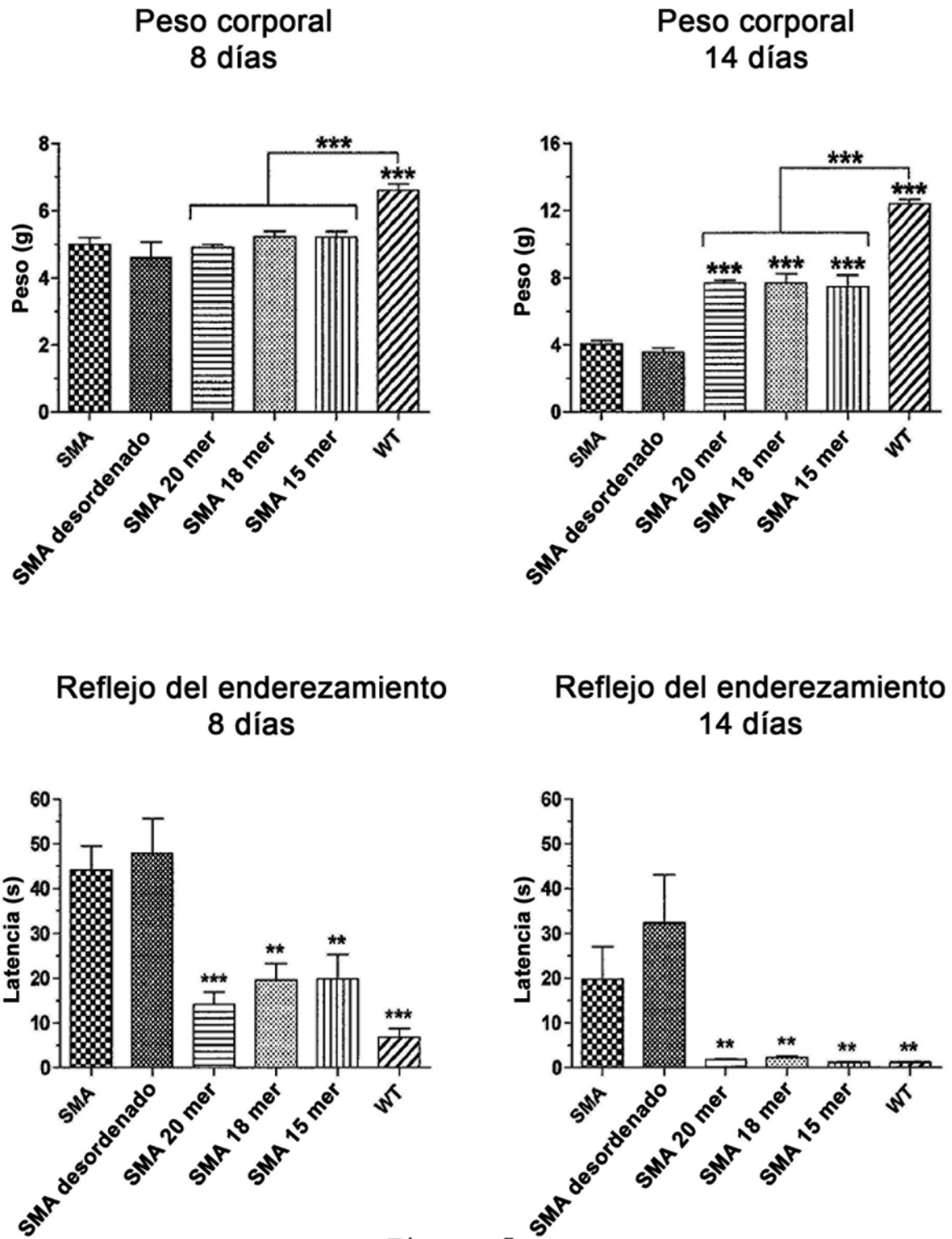


Figura 5

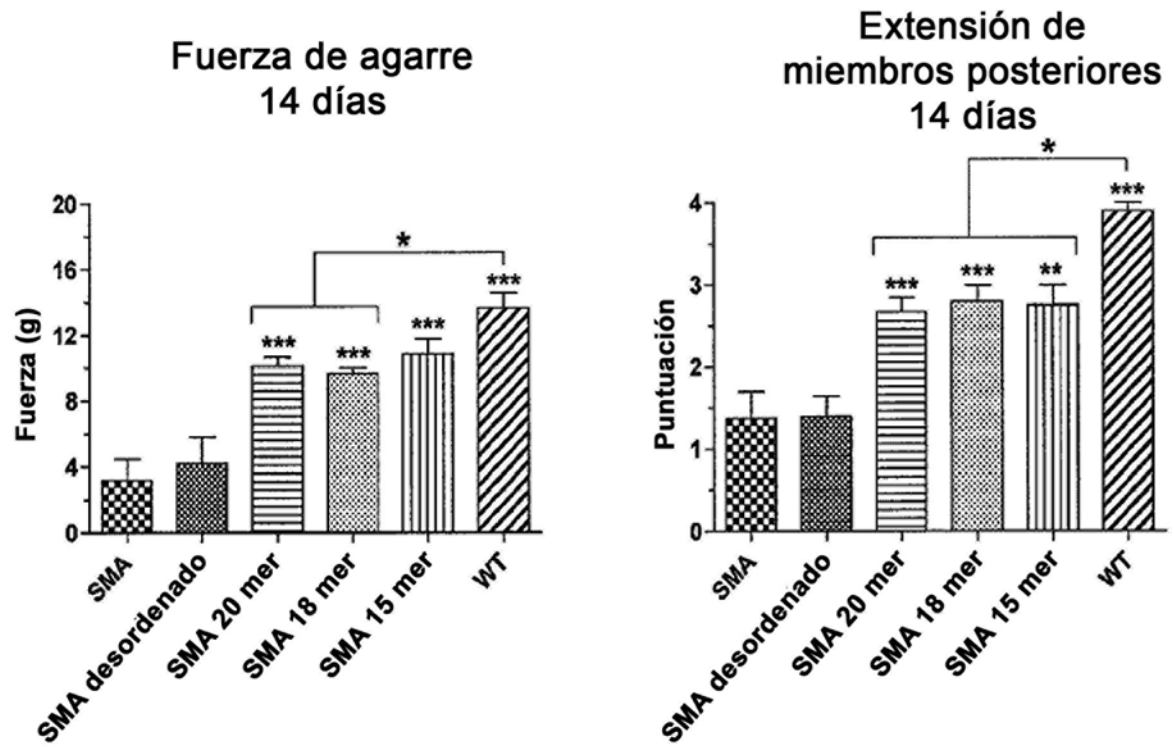


Figura 6

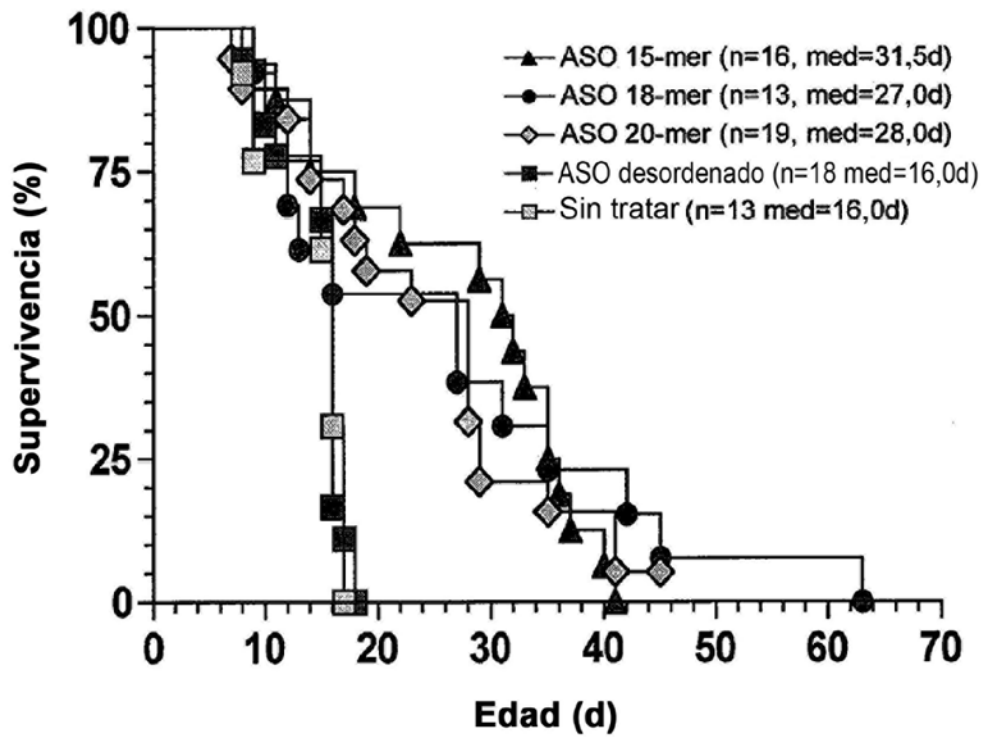
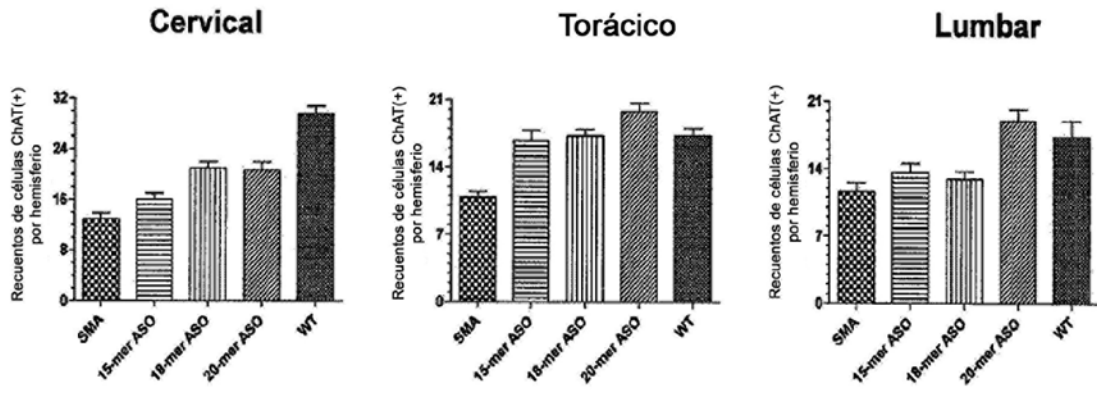


Figura 7

El tratamiento con ASO aumenta los recuentos de células de neuronas motoras en la médula espinal



Dosis 4 µg, 16 días después

Figura 8



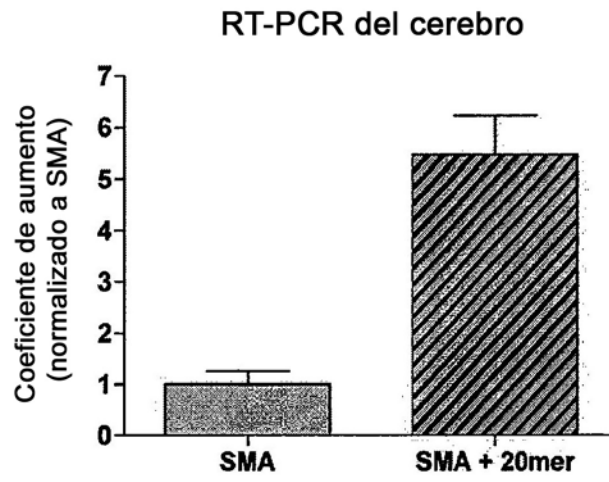


Figura 9

Inyecciones de 396443 en P0 (8 ug) y P21 (20 ug) frente a P0 solo (8 ug)

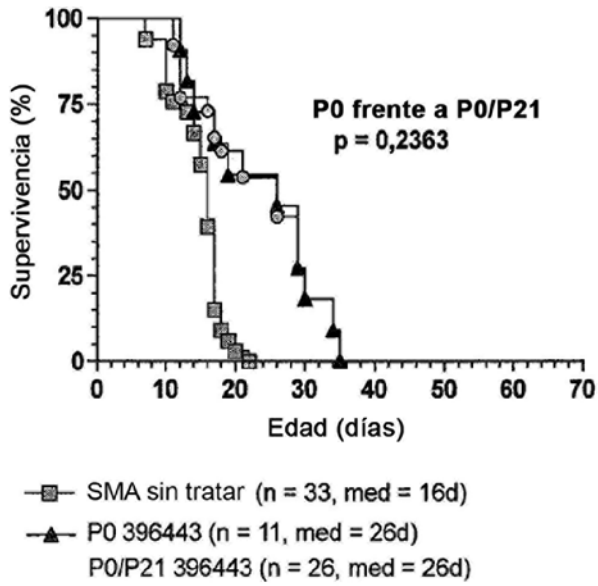


Figura 10

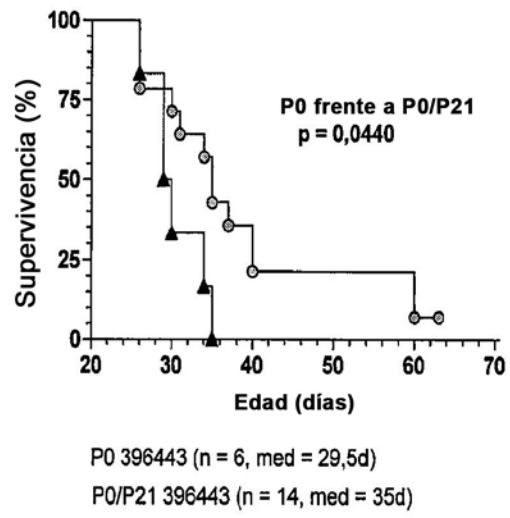


Figura 11

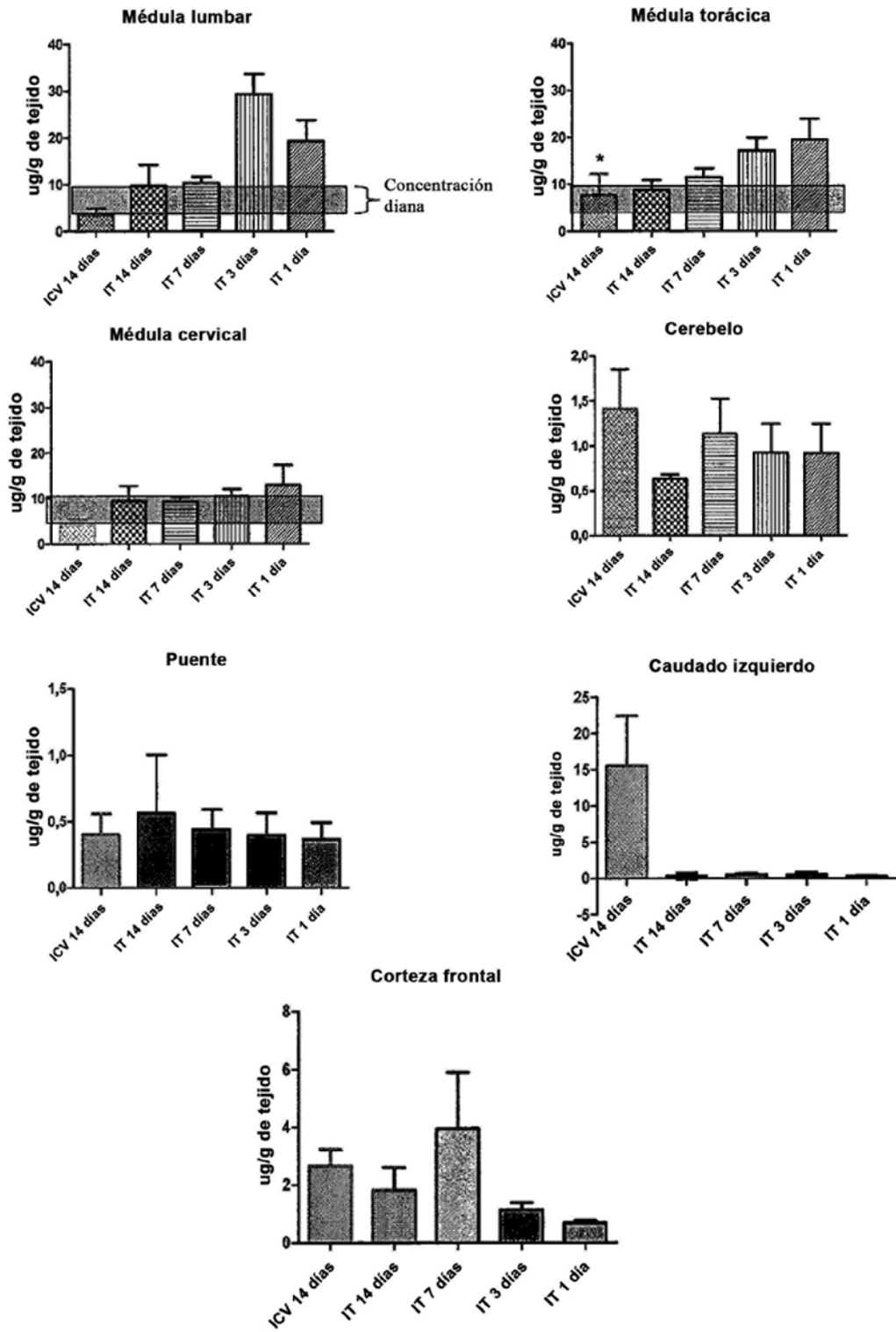


Figura 12

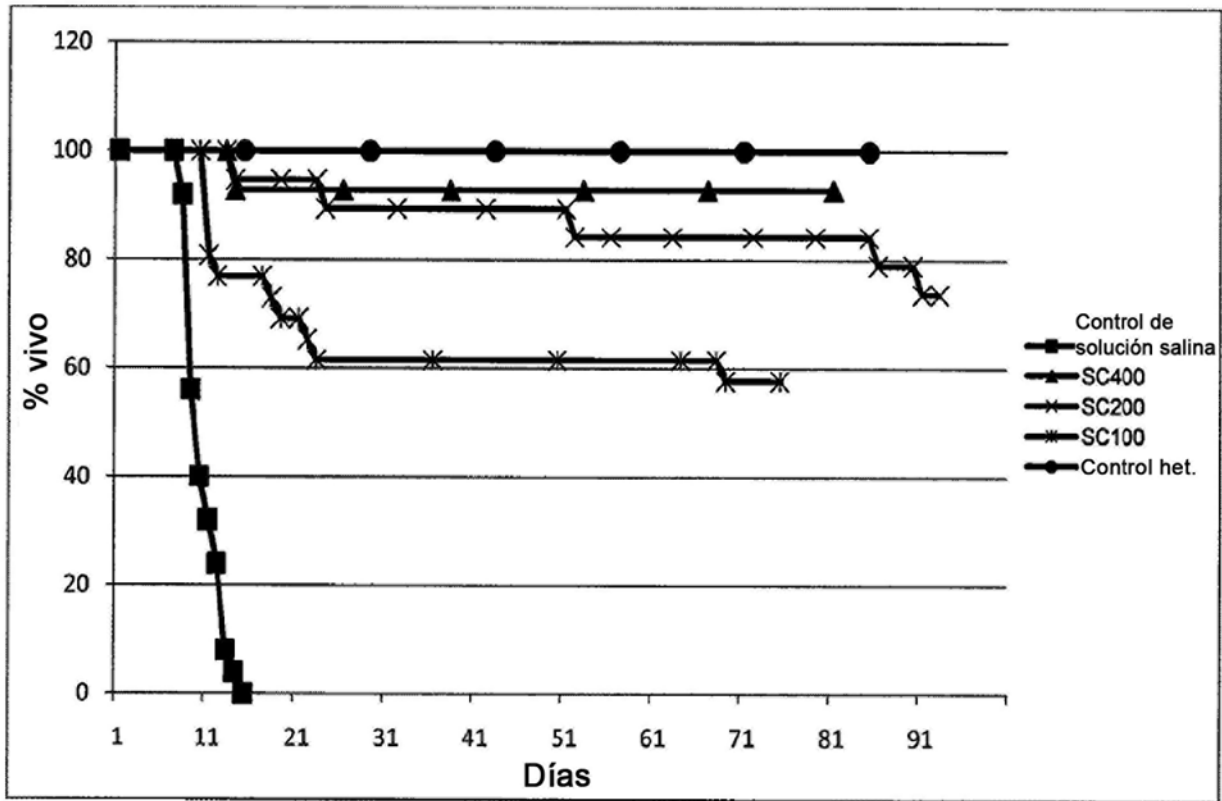


Figura 13