

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 545 223**

51 Int. Cl.:

A61K 31/70 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.06.2006 E 12188625 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.06.2015 EP 2548560**

54 Título: **Composiciones y procedimientos para modular el corte y empalme de SMN2**

30 Prioridad:

23.06.2005 US 693542 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.09.2015

73 Titular/es:

ISIS PHARMACEUTICALS, INC. (50.0%)

2855 Gazelle Court

Carlsbad, CA 92010, US y

COLD SPRING HARBOR LABORATORY (50.0%)

72 Inventor/es:

BAKER, BRENDA F.;

KRAINER, ADRIAN R. y

HUA, YIMIN

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 545 223 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).

Composiciones y procedimientos para modular el corte y empalme de SMN2

Descripción

5 Antecedentes de la invención

10 Moléculas de ARNm eucarióticas recién sintetizadas, también conocidas como transcritos primarios o pre-ARNm, fabricados en el núcleo, se procesan antes o durante el transporte al citoplasma para traducción. El procesamiento de los pre-ARNm incluye la adición de un capuchón metilado en 5' y una cola de poli(A) de 200-250 bases en el extremo 3' del transcrito.

15 La siguiente etapa en el procesamiento del ARNm es el corte y empalme del pre-ARNm, que se produce en la maduración del 90-95 % de los ARNm de mamífero. Los intrones (o secuencias intermedias) son regiones de un transcrito primario (o el ADN que lo codifica) que no están incluidos en la secuencia de codificación del ARNm maduro. Los exones son regiones de un transcrito primario que permanecen en el ARNm maduro cuando alcanza el citoplasma. Los exones se cortan y empalman juntos para formar la secuencia del ARNm maduro. Las uniones de corte y empalme también se denominan sitios de corte y empalme y el lado 5' de la unión a menudo se denomina el "sitio de corte y empalme en 5'" o "sitio donante de corte y empalme" y el lado 3' de el "sitio de corte y empalme en 3'" o "sitio aceptor de corte y empalme". En el corte y empalme, el extremo 3' del exón cadena arriba se une al extremo 5' del exón cadena abajo. Por tanto, el ARN no sometido a corte y empalme (o pre-ARNm) tiene una unión exón/intrón en el extremo 5' de un intrón y una unión intrón/exón en el extremo 3' de un intrón. Una vez eliminado el intrón, los exones están contiguos en lo que en ocasiones se denomina la unión o límite exón/exón en el ARNm maduro. Los sitios de corte y empalme crípticos son aquéllos que se usan con menor frecuencia pero que se pueden usar cuando el sitio de corte y empalme habitual se bloquea o no está disponible. El corte y empalme alternativo, definido como el corte y empalme junto con diferentes combinaciones de exones, a menudo tiene como resultado múltiples transcritos de ARNm de un solo gen.

30 Hasta el 50 % de las enfermedades genéticas humanas resultantes de una mutación puntual se debe a un corte y empalme aberrante. Dichas mutaciones puntuales pueden alterar un sitio de corte y empalme actual o crear un nuevo corte y empalme, lo que tiene como resultado transcritos de ARNm compuestos por una combinación diferente de exones o con deleciones en los exones. Las mutaciones puntuales también pueden tener como resultado la activación de un sitio de corte y empalme críptico o alterar los elementos cis reguladores (es decir, potenciadores o silenciadores de corte y empalme) (Cartegni y col., Nat. Rev. Genet., 2002, 3, 285-298; Drawczak y col., Hum. Genet., 1992, 90, 41-54).

35 Se han usado oligonucleótidos antisentido dirigidos mutaciones que conducen a corte y empalme aberrantes en varias enfermedades genéticas con el fin de redirigir el corte y empalme para dar un producto de corte y empalme deseado (Kole, Acta Biochimica Polonica, 1997, 44, 231-238). Dichas enfermedades incluyen β -talasemia (Dominski y Kole, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, 90, 8673-8677; Sierakowska y col., Nucleosides & Nucleotides, 1997, 16,1173-1182; Sierakowska y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, 93, 12840-44; Lacerra y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, 97, 9591-9596); distrofia de Kobe (Takeshima y col., J. Clin. Invest., 1995, 95, 515-520); distrofia muscular de Duchenne (Dunckley y col., Nucleosides & Nucleotides, 1997, 16, 1665-1668; Dunckley y col., Human Mol. Genetics, 1998, 5, 1083-90); osteogénesis imperfecta (Wang y Marini, J. Clin Invest., 1996, 97, 448-454); y fibrosis quística (Friedman y col., J. Biol. Chem., 1999, 274, 36193-36199).

45 También se han usado compuestos antisentido para alterar la proporción de las formas largas y cortas de pre-ARNm de Bcl-x (patente de EE.UU. 6,172,216; patente de EE.UU. 6,214,986; Taylor y col., Nat. Biotechnol. 1999, 17, 1097-1100) o para forzar sortear exones específicos que contienen codones de terminación prematuros (Wilton y col., Neuromuscul. Disord., 1999, 9, 330-338). La patente de EE.UU. 5,627,274 y el documento WO 94/26887 divulgan composiciones y procedimientos para combatir el corte y empalme aberrantes en una molécula de pre-ARNm que contiene una mutación usando oligonucleótidos antisentido que no activan la RNAsa H.

55 La atrofia muscular espinal proximal (SMA) es un trastorno genético neurodegenerativo caracterizado por la pérdida de neuronas motoras espinales. La SMA es una enfermedad autosómica recesiva de inicio precoz y actualmente es la principal causa de muerte entre los lactantes. La gravedad de la SMA varía de un paciente a otro y, por tanto, se ha clasificado en tres tipos. La SMA de tipo I es la forma más grave con inicio en el nacimiento o en los primeros 6 meses y normalmente produce la muerte en un plazo de 2 años. Los niños con SMA de tipo I no pueden sentarse ni caminar. La SMA de tipo II es la forma intermedia y los pacientes se pueden sentar, pero no pueden estar de pie ni caminar. Los pacientes con SMA de tipo II, una forma crónica de la enfermedad, normalmente desarrollan SMA después de los 18 meses de edad (Lefebvre y col., Hum. Mol. Genet., 1998, 7, 1531-1536).

60 La SMA se debe a la pérdida de ambas copias de la supervivencia de la neurona motora 1 (SMN1), una proteína que forma parte de un complejo multiproteico que se piensa que está implicado en la biogénesis y reciclado de snRNP. Un gen casi idéntico, SMN2, existe en una región duplicada del cromosoma 5q13. Aunque SMN1 y SMN2 tienen el potencial de codificar la misma proteína, la SMN2 contiene una mutación traducionalmente silente en la posición + 6 del exón 7, que tiene como resultado una inclusión ineficiente del exón 7 en los transcritos de

SMN2. Por tanto, la forma predominante de SMN2 es una versión truncada que carece del exón 7 y que es inestable e inactiva (Cartegni y Krainer, Nat. Genet., 2002, 30, 377-384).

Se han descrito moléculas de ácido nucleico peptídico quimérico diseñadas para modular el corte y empalme de SMN2 (documento WO 02/38738; Cartegni y Krainer, Nat. Struct. Biol., 2003, 10, 120-125).

La tecnología antisentido es un medio eficaz para modular la expresión de uno o más productos génicos específicos, incluidos productos de corte y empalme alternativos, y es única en su utilidad en una serie de aplicaciones terapéuticas, diagnósticas y de investigación. El principio detrás de la tecnología antisentido es que un compuesto antisentido, que hibrida con un ácido nucleico diana, modula las actividades de la expresión génica, tales como la transcripción, la traducción o el corte y empalme, a través de uno de una serie de mecanismos antisentido. La especificidad de secuencia de los compuestos antisentido los convierte en herramientas extremadamente atractivas para la validación de dianas y la funcionalización génica, así como agentes terapéuticos para modular de forma selectiva la expresión de genes implicados en la enfermedad.

En el presente documento se divulgan compuestos antisentido útiles para modular la expresión génica y vías asociadas mediante mecanismos antisentido, que pueden incluir mecanismos antisentido basados en la ocupación de la diana. En el presente documento se proporcionan compuestos antisentido dirigidos a SMN2 para uso en la modulación del corte y empalme de SMN2. Un experto en la técnica, una vez armado con la presente divulgación, podrá, sin experimentación indebida, identificar, preparar y explotar otros compuestos antisentido para estos usos.

Singh et al. (2006) Molecular and Cellular Biology, vol 26, N° 4, páginas 1333-1346 enseña compuestos antisentido que se pretende que promuevan la inclusión del exón 7 en el ARNm de SMN2.

Sumario de la invención

La invención proporciona un oligonucleótido antisentido dirigido al intrón 7 de una molécula de ácido nucleico que codifica SMN2, en el que dicho oligonucleótido tiene una longitud de 20 nucleótidos y comprende una modificación 2'-O-metoxietilazúcar en cada posición, en el que la secuencia de nucleótidos de dicho oligonucleótido comprende las SEC ID N°: 83, SEC ID N°: 85, SEC ID N°: 87 o SEC ID N°: 89.

La invención también proporciona un procedimiento de estimular la inclusión del exón 7 en los transcritos de SMN2 en una célula, tejido u órgano, que comprende poner en contacto dicha célula, tejido u órgano *in vitro* con el oligonucleótido antisentido de la invención.

La invención también proporciona un oligonucleótido antisentido de la invención para usar en terapia y opcionalmente para el uso en el tratamiento de atrofia muscular espinal.

La invención también proporciona el uso de un oligonucleótido antisentido de la invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la atrofia muscular espinal.

La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende el oligonucleótido antisentido de la invención y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

Sumario de la divulgación

La presente divulgación está dirigida a compuestos antisentido dirigidos e hibridables con una molécula de ácido nucleico que codifica SMN2. Se divulgan compuestos antisentido dirigidos al intrón 6, el exón 7 o el intrón 7 de SMN2 que modulan el corte y empalme de los pre-ARNm de SMN2. En una realización, la modulación del corte y empalme tiene como resultado un incremento en la inclusión del exón 7. En otra realización, la modulación del corte y empalme tiene como resultado una disminución en la inclusión del exón 7. En el presente documento se contemplan y divulgan compuestos antisentido de 12 a 20 nucleótidos de longitud dirigidos al intrón 6, al exón 7 o al intrón 7 de SMN2, en el que los compuestos comprenden modificaciones de 2'-O-metoxietilazúcar.

En un aspecto de la divulgación, los compuestos antisentido están dirigidos a elementos reguladores de corte y empalme en *cis*. Los elementos reguladores incluyen potenciadores de corte y empalme exónico, silenciadores de corte y empalme exónico, potenciadores de corte y empalme intrónico y silenciadores de corte y empalme intrónico. Los silenciadores de corte y empalme intrónico y exónico son las dianas preferidas.

En una realización, los compuestos antisentido comprenden al menos una porción de 8 bases nucleotídicas de uno de los compuestos de ejemplo divulgados en el presente documento.

También se divulgan procedimientos para modular el corte y empalme del ARNm de SMN2 en una célula, tejido u órgano usando uno o más de los compuestos de la invención. En una realización, la modulación del corte y empalme es la inclusión del exón. En otra realización, la modulación del corte y empalme es el sorteo del exón. En

un aspecto, el compuesto está dirigido a un elemento silenciador de corte y empalme intrónico. En otro aspecto, el compuesto está dirigido a un elemento silenciador de corte y empalme exónico.

También se divulgan compuestos antisentido de 10 a 50, 12 a 30 o 12 a 20 nucleótidos de longitud dirigidos al intrón 6, al exón 7 o al intrón 7 de SMN2, que comprenden modificaciones de 2'-O-metoxietilazúcar para usar en terapia. También se divulgan composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más de los compuestos de la invención. También se divulga el uso de un oligonucleótido antisentido divulgado en el presente documento para la preparación de un medicamento para modular el corte y empalme de un pre-ARNm de SMN2. En un aspecto, la modulación del corte y empalme tiene como resultado un incremento en la inclusión del exón 7. También se divulga el uso de un oligonucleótido antisentido divulgado en el presente documento para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la atrofia muscular espinal.

Descripción detallada

La tecnología antisentido es un medio eficaz para modular la expresión de uno o más productos génicos específicos, y es única en su utilidad en una serie de aplicaciones terapéuticas, diagnósticas y de investigación. En el presente documento se proporcionan compuestos antisentido útiles para modular la expresión génica mediante mecanismos de acción antisentido, incluidos mecanismos antisentido basados en la ocupación de la diana. En un aspecto, los compuestos antisentido proporcionados en el presente documento modulan el corte y empalme de un gen diana. Dicha modulación incluye estimular o inhibir la inclusión del exón. También se proporciona en el presente documento compuestos antisentido dirigidos a elementos reguladores de corte y empalme en cis presentes en moléculas de pre-ARNm, incluidos potenciadores de corte y empalme exónico, silenciadores de corte y empalme exónico, potenciadores de corte y empalme intrónico y silenciadores de corte y empalme intrónico. Se piensa que la alteración de los elementos reguladores de corte y empalme en cis altera la selección de corte y empalme, que puede conducir a una alteración en la composición de los productos de corte y empalme.

El procesamiento de los pre-ARNm eucarióticos es un proceso complejo que requiere una multitud de señales y factores proteicos para conseguir un corte y empalme adecuado del ARNm. La definición de exón por el espliceosoma requiere más que las señales de corte y empalme canónicas que definen los límites intrón-exón. Una de estas señales adicionales se proporciona mediante secuencias silenciadoras y potenciadoras reguladoras de acción en cis. Se han identificado potenciadores de corte y empalme exónico (ESE), silenciadores de corte y empalme exónico (ESS), potenciadores de corte y empalme intrónico (ISE) y silenciadores de corte y empalme intrónico (ISS), que reprimen o potencial el uso de sitios donantes de corte y empalme o de sitios aceptores de corte y empalme en función de su sitio y su modo de acción (Yeo y col. 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, bien estimulando o inhibiendo el uso de sitios de corte y empalme concretos y, por tanto, modulando la proporción de los productos de corte y empalme (Scamborova y col., 2004, Mol. Cell. Biol. 24(5):1855-1869; Hovhannisyan y Carstens, 2005, Mol. Cell. Biol. 25(1):250-263; Minovitsky y col., 2005, Nucleic Acids Res. 33(2):714-724). Poco se sabe sobre los factores trans que interaccionan con los elementos de corte y empalme intrónico; no obstante, en varios estudios se ha proporcionado información sobre los elementos de corte y empalme exónico. Por ejemplo, se sabe que los ESE están implicados en el corte y empalme tanto alternativo como constitutivo actuando como sitios de unión para miembros de la familia de proteínas SR. Las proteínas SR se unen a elementos de corte y empalme mediante su dominio de unión a ARN y estimulan el corte y empalme reclutando los componentes del espliceosoma con interacciones proteína-proteína mediadas por su dominio RS, que está compuesto por varios dipéptidos de Arg-Ser (Cartegni y Krainer, 2003, Nat. Struct. Biol. 10(2):120-125; Wang y col., 2005, Nucleic Acids Res. 33(16):5053-5062). Se ha descubierto que los ESE están enriquecidos en regiones de exones que están cercanas a los sitios de corte y empalme, en particular de 80 a 120 bases desde los extremos de los sitios aceptores de corte y empalme (Wu y col., 2005, Genomics 86:329-336). Se han determinado secuencias consenso para cuatro miembros de la familia de proteínas SR, SF2/ASF, SC35, SRp40 y SRp55 (Cartegni y col., 2003, Nucleic Acids Res. 31(13):3568-3571).

Aunque los factores trans que se unen a los elementos reguladores de corte y empalme intrónico no se han estudiado extensamente, se ha sugerido que tanto las proteínas SR como las ribonucleoproteínas heterogéneas (hnRNP) interaccionan con estos elementos (Yeo y col., 2004, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101 (44):15700-15705). Se han identificado dos elementos potenciadores de corte y empalme intrónico (ISE) en SMN2, uno en el intrón 6 y el otro en el intrón 7 (Miyajima y col., 2002, J. Biol. Chem. 22: 23271-23277). Ensayos de desplazamiento de gel usando el ISE en el intrón 7 han mostrado la formación de complejos ARN-proteína, que sugieren que estas proteínas trans pueden ser importantes para la regulación del corte y empalme (Miyaso y col. 2003, J. Biol. Chem. 278(18):15825-15831).

El papel de la SMN2 en enfermedades tales como la atrofia muscular espinal (SMA) la convierte en una importante diana terapéutica. La SMA es un trastorno genético caracterizado por la degeneración de neuronas motoras espinales. La SMA se debe a la pérdida de ambas copias funcionales de SMN1. No obstante, la SMN2 tiene el potencial de codificar la misma proteína que SMN1 y, por tanto, superar el efecto genético de los pacientes de SMA. La SMN2 contiene una mutación traduccionalmente silente (C→T) en la posición +6 del exón 7 (nucleótido 66 de la SEC ID N° 1), que tiene como resultado una inclusión ineficiente del exón 1 en los transcritos de SMN2. Por

tanto, la forma predominante de SMN2, una que carece del exón 7, es inestable e inactiva. Por tanto, los compuestos terapéuticos capaces de modular el corte y empalme de SMN2 de forma que el porcentaje de los transcritos de SMN2 que contiene el exón 7 aumenta, sería útil para el tratamiento de la SMA.

5 Visión general

En el presente documento se divulgan compuestos oligoméricos, incluidos oligonucleótidos antisentido y otros compuestos antisentido para usar en la modulación de la expresión de moléculas de ácido nucleico que codifican SMN2. Esto se consigue proporcionando compuestos oligoméricos que hibridan con una o más moléculas de ácido nucleico diana que codifican SMN2. Como se usa en el presente documento, "ácido nucleico diana" y "molécula de ácido nucleico que codifica SMN2" ese han usado por comodidad para abarcar ADN que codifica SMN2, ARN (incluyendo pre-ARNm y ARNm o partes de los mismos) transcritos a partir de tal ADN, y también el ADNc derivado de tal ARN.

En el presente documento se divulgan compuestos antisentido para uso en la modulación del corte y empalme de de pre-ARNm de SMN2. En una realización, los compuestos antisentido divulgados están dirigidos al exón 7 de SMN2 de modo que se modula el corte y empalme del ARNm de SMN. En otra realización, los compuestos antisentido están dirigidos al intrón 6 de SMN2. En otra realización, los compuestos antisentido están dirigidos al intrón 7 de SMN2. La modulación del corte y empalme puede tener como resultado la inclusión del exón 7 o el sorteo del exón 7.

También se divulgan compuestos antisentido dirigidos a los elementos reguladores en cis. En una realización, el elemento regulador está en un exón. En una realización, el elemento regulador está en un intrón.

25 Modulación del corte y empalme

Como se usa en el presente documento, la modulación del corte y empalme se refiere a alterar el procesamiento de un transcrito de pre-ARNm de modo que la molécula de ARNm sometida a corte y empalme contiene una combinación diferente de exones como resultado del sorteo del exón o de la inclusión del exón, una delección en uno o más exones, o una secuencia adicional que normalmente no se encuentra en el ARNm sometido a corte y empalme (p. ej., secuencia intrónica). En el contexto de la presente invención, la modulación de corte y empalme se refiere a alterar el corte y empalme del pre-ARNm de SMN2 para conseguir el sorteo del exón o la inclusión del exón. En una realización, el sorteo del exón tiene como resultado un transcrito de ARNm de SMN2 que carece del exón 7 y la inclusión del exón tiene como resultado un transcrito de ARNm de SMN2 que contiene el exón 7.

Como se usa en el presente documento, un corte y empalme alternativo se define como el corte y empalme junto con diferentes combinaciones de exones, que pueden tener como resultado múltiples transcritos de ARNm de un único gen. En el contexto de la presente invención, un transcrito de de ARNm de SMN2 que contiene el exón 7 y un transcrito de de ARNm de SMN2 que carece del exón 7 son dos productos del corte y empalme alternativo.

Compuestos

La expresión "compuesto oligomérico" se refiere a una estructura polimérica capaz de hibridar con una región de una molécula de ácido nucleico. Esta expresión incluye oligonucleótidos, oligonucleósidos, análogos de oligonucleótidos, miméticos de oligonucleótidos y combinaciones químicas de estos. Un "compuesto antisentido" o "compuesto oligomérico antisentido" se refiere a un compuesto oligomérico que es, al menos parcialmente, complementario a la región de una molécula de ácido nucleico diana con la que hibrida y que modula su expresión. En consecuencia, aunque se puede decir que todos los compuestos antisentido son compuestos oligoméricos, no todos los compuestos oligoméricos son compuestos antisentido. Un "oligonucleótido antisentido" es un compuesto antisentido que es un oligómero basado en ácido nucleico. Un oligonucleótido antisentido puede modificarse químicamente. Ejemplos no limitantes de compuestos oligoméricos incluyen cebadores, sondas, compuestos antisentido, oligonucleótidos antisentido, oligonucleótidos de secuencias de guía externas (SGE), empalmadores alternativos y ARNsi. Como tales, estos compuestos se pueden introducir en forma de monocatenaria, bicatenaria, circular, ramificada o en horquilla y pueden contener elementos estructurales tales como protuberancias o bucles. Compuestos oligoméricos bicatenarios pueden ser dos hebras hibridadas para formar compuestos bicatenarios o una sola hebra con suficiente autocomplementariedad para permitir la hibridación y la formación de un compuesto completamente o parcialmente bicatenario.

Los compuestos oligoméricos de acuerdo con la presente divulgación pueden comprender un compuestos oligoméricos de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 bases nucleotídicas (es decir, de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 nucleósidos unidos). Un experto en la técnica apreciará que esto abarca compuestos antisentido de 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 o 50 bases nucleotídicas.

En una realización, los compuestos antisentido de la divulgación tienen de 12 a 30 bases nucleotídicas. Un

experto en la técnica apreciará que esto comprende compuestos antisentido de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 bases nucleotídicas.

5 En una realización, los compuestos antisentido de la divulgación tienen de 12 a 20 bases nucleotídicas. Un experto en la técnica apreciará que esto comprende compuestos antisentido de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 bases nucleotídicas.

10 En una realización, los compuestos antisentido de la invención tienen porciones antisentido de 20 bases nucleotídicas.

En una realización, los compuestos antisentido de la invención tienen porciones antisentido de 18 bases nucleotídicas.

15 En una realización, los compuestos antisentido de la invención tienen porciones antisentido de 15 bases nucleotídicas.

En una realización, los compuestos antisentido de la divulgación tienen porciones antisentido de 12 bases nucleotídicas.

20 Los compuestos antisentido de 10 - 50 bases nucleotídicas de longitud que comprenden una tira de al menos ocho (8) bases nucleotídicas consecutivas seleccionadas de entre los compuestos antisentido ilustrativos también se consideran compuestos antisentido adecuados como diana.

25 Los compuestos de la divulgación incluyen secuencias oligonucleotídicas que comprenden al menos las 8 bases nucleotídicas consecutivas desde el extremo 5' de uno de los compuestos antisentido ilustrativos (siendo las bases nucleotídicas restantes una tira consecutiva de bases nucleotídicas que continúan cadena arriba del extremo 5' del compuesto antisentido hasta que el oligonucleótido contiene de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 bases nucleotídicas). Otros compuestos de están representados por secuencias oligonucleotídicas que comprenden al menos las 8 bases nucleotídicas consecutivas desde el extremo 3' de uno de los compuestos antisentido
30 ilustrativos (siendo las bases nucleotídicas restantes una tira consecutiva de bases nucleotídicas que continúan cadena abajo del extremo 3' del compuesto antisentido hasta que el oligonucleótido contiene de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 bases nucleotídicas). También se entiende que los compuestos pueden representados por secuencias oligonucleotídicas que comprenden al menos 8 bases nucleotídicas consecutivas de una porción interna de la secuencia de un compuesto ilustrativo y se puede extender en una o ambas direcciones hasta que el
35 nucleótido contiene de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 bases nucleotídicas. Los compuestos descritos en el presente documento son específicamente hibridables con el ácido nucleico diana.

40 Un experto en la técnica armado con los compuestos antisentido ilustrados en el presente documento podrá, sin experimentación indebida, identificar otros compuestos antisentido.

Hibridación

45 Como se usa en el presente documento, "hibridación" quiere decir el apareamiento de las hebras complementarias de los compuestos antisentido con su secuencia nucleico. Aunque no está limitado a un mecanismo concreto, el mecanismo más habitual de apareamiento implica enlaces de hidrógeno que pueden ser enlaces de hidrógeno de Watson-Crick, de Hoogsteen o de Hoogsteen inverso, entre nucleósidos o bases nucleotídicas complementarias. Por ejemplo, la base natural adenina es complementaria a las bases nucleotídicas naturales timidina y uracilo, que se aparean a través de la formación de enlaces de hidrógeno. La base natural
50 guanina es complementaria de las bases naturales citosina y 5-metil-citosina. La hibridación se puede producir en varias circunstancias.

Un compuesto antisentido es específicamente hibridable cuando hay un grado suficiente de complementariedad para evitar la unión inespecífica del compuesto antisentido con secuencias de un ácido nucleico no diana en condiciones en las que se desea unión específica, es decir en condiciones fisiológicas en el caso de los
55 ensayos *in vivo* o tratamiento terapéutico, y en las condiciones en las que se realizan los ensayos en el caso de los ensayos *in vitro*.

60 Como se usa en el presente documento, "condiciones rigurosas de hibridación" o "condiciones rigurosas" se refiere a condiciones en las cuales un compuesto antisentido hibrida con su secuencia diana pero con un número mínimo de otras secuencias. Las condiciones rigurosas son dependientes de la secuencia y serán diferentes en circunstancias diferentes y "condiciones rigurosas" en las que los compuestos antisentido hibridan con una secuencia diana vienen determinadas por la naturaleza y la composición de los compuestos antisentido y de los ensayos en los que se están investigando.

65 Complementariedad

“Complementariedad”, como se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad de un apareamiento proceso entre dos bases nucleotídicas en cualquiera de las dos hebras del compuesto oligomérico o un compuesto antisentido con su ácido nucleico diana. Por ejemplo, si una base nucleotídica en una posición determinada de un compuesto antisentido puede unirse por puentes de hidrógeno a una base nucleotídica en cierta posición de un ácido nucleico diana, la posición del enlace de hidrógeno entre el nucleótido y el ácido nucleico diana se considera una posición complementaria.

La “complementariedad” también se puede ver en el contexto de un compuesto antisentido y su diana, en lugar de un modo base por base. El compuesto antisentido y el ADN o ARN son complementarios entre sí cuando un número suficiente de posiciones complementarias en cada molécula está ocupado por bases nucleotídicas que pueden unirse entre sí por puentes de hidrógeno. Por tanto, “específicamente hibridable” y “complementario” son términos que se usan para indicar un grado suficiente de apareamiento preciso o de complementariedad sobre un número suficiente de bases nucleotídicas de forma que se produzca una unión estable y específica entre el compuesto antisentido y un ácido nucleico diana. Un experto en la técnica reconoce que la inclusión de apareamientos erróneos es posible sin eliminar la actividad del compuesto antisentido. Por tanto, la invención está dirigida a los compuesto antisentido que pueden contener hasta aproximadamente 20 % de nucleótidos que alteran el apareamiento de las bases del compuesto antisentido con la diana. Preferentemente, los compuestos no contienen más de aproximadamente 15%, más preferentemente no más de aproximadamente 10%, más preferentemente no más de aproximadamente o ningún despareamiento. Los nucleótidos restantes no alteran la hibridación (p. ej., bases universales).

En la técnica se entiende que la incorporación de modificaciones de afinidad en el nucleótido puede hacer que se produzca un mayor número de apareamientos erróneos en comparación con un compuesto no modificado. De forma similar, ciertas secuencias oligonucleotídicas pueden ser más tolerantes a los apareamientos erróneos que otras secuencias oligonucleotídicas. Un experto en la técnica es capaz de determinar un número adecuado de apareamientos erróneos entre oligonucleótidos o entre un oligonucleótido y un ácido nucleico diana, tal como mediante la determinación de la temperatura de fusión.

Identidad

Los compuestos antisentido, o una porción de los mismos, pueden tener un porcentaje definido de identidad con una SEC ID N° o un compuesto que tenga un número Isis específico. Como se usa en el presente documento, una secuencia es idéntica a la secuencia divulgada en el presente documento si tiene la misma capacidad de apareamiento de bases nucleotídicas. Por ejemplo, un ARN que contiene uracilo en lugar de timidina en las secuencias divulgadas de la presente invención se consideraría idéntico, ya que ambos se aparearían con adenina. Esta identidad puede estar a lo largo de toda la longitud del compuesto oligomérico o en una porción del compuesto antisentido (p. ej., las bases nucleotídicas 1-20 de un compuesto de 27 unidades pueden compararse con un compuesto de 20 unidades para determinar el porcentaje de identidad del compuesto oligomérico con la SEC ID N°. Los expertos en la técnica entienden que un compuesto antisentido no tiene que tener una secuencia idéntica a la de los descritos en el presente documento para funcionar de un modo similar al compuesto antisentido descrito en el presente documento. Versiones más cortas de los compuestos antisentido enseñados en el presente documento o versiones no idénticas del compuesto antisentido enseñados en el presente documento entrarán dentro del alcance de la invención. Las versiones no idénticas son aquéllas en las que cada base no tiene la misma actividad de apareamiento que los compuestos antisentido enseñados en el presente documento. Las bases no tienen la misma actividad de apareamiento por ser más cortas o por tener al menos un sitio abásico. Como alternativa, una versión no idéntica puede incluir al menos una base sustituida con una base diferente con distinta actividad de apareamiento (p. ej., G puede estar sustituida por C, A o T). El porcentaje de identidad se calcula de acuerdo con el número de bases que tienen idéntico apareamiento de bases correspondiente a la SEC ID N° o al compuesto antisentido con el que se está comparando. Las bases no idénticas pueden estar adyacentes, dispersas por el oligonucleótido o ambas cosas.

Por ejemplo, un compuesto de 16 unidades que tiene la misma secuencia que las bases nucleotídicas 2-17 es un 80% idéntico al compuesto de 20 unidades. Como alternativa, un compuesto de 20 unidades que contiene cuatro bases nucleotídicas no idénticas al compuesto de 20 unidades es también un 80% idéntico al compuesto de 20 unidades. Un compuesto de 14 unidades que tiene la misma secuencia que las bases nucleotídicas 1-14 de un compuesto de 18 unidades es un 78% idéntico al compuesto de 18 unidades. Dichos cálculos entran dentro de la capacidad de los expertos en la técnica.

El porcentaje de identidad se basa en el porcentaje de bases nucleotídicas en la secuencia original presentes en una porción de la secuencia modificada. Por tanto, un compuesto antisentido de 30 bases nucleotídicas que comprende la secuencia completa de la complementaria de un segmento diana activo de 20 bases nucleotídicas tendría una porción de identidad del 100% con el complementario del segmento diana activo de 20 bases nucleotídicas, al tiempo que además comprende una porción adicional de 10 bases nucleotídicas. En el contexto de la invención, el complementario de un segmento diana activo puede constituir una única porción. En una realización preferida, los oligonucleótidos de la presente invención tienen una identidad de al menos aproximadamente el 80 %, más preferentemente al menos aproximadamente el 85 %, incluso más preferentemente

al menos aproximadamente el 90 %, más preferentemente al menos aproximadamente el 95 % con al menos una porción del complementario de los segmentos diana activos presentados en el presente documento.

Es bien sabido por los expertos en la técnica que es posible incrementar o disminuir la longitud de un compuesto antisentido y/o introducir bases apareadas erróneamente sin eliminar actividad. Por ejemplo, en Woolf y col. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7305-7309, 1992), se analizó en una serie de ASO de 13-25 bases nucleotídicas de longitud su capacidad para inducir la escisión de un ARN diana. Los ASO de 25 bases nucleotídicas de longitud con 8 u 11 apareamientos erróneos de bases cerca de los extremos de los ASO fueron capaces de dirigir la escisión específica del ARNm diana, aunque en menor medida que los ASO que no contenían apareamientos erróneos. De un modo similar, se consiguió una escisión específica de la diana usando un ASO de 13 bases nucleotídicas, incluidos aquéllos con 1 o 3 apareamientos erróneos. Maher y Dolnick (Nuc. Acid. Res. 16:3341-3358,1988) analizaron en una serie de ASO de 14 bases nucleotídicas en tándem y un ASO de 28 y 42 bases nucleotídicas compuestos por la secuencia de dos o tres de los ASO en tándem, respectivamente, su capacidad para detener la traducción de DHFR humano en un ensayo de reticulocitos de conejo. Cada uno de los tres ASO de 14 bases nucleotídicas pudo inhibir la traducción, aunque a un nivel más modesto que los ASO de 28 o 42 bases nucleotídicas. Se entiende que los compuestos antisentido de la presente invención pueden variar en longitud y en porcentaje de complementariedad con la diana siempre que mantengan la actividad deseada. Los procedimientos para determinar la actividad deseada se divulgan en el presente documento y son bien conocidos para los expertos en la técnica.

Ácidos nucleicos diana

Como se usa en el presente documento, "dirigir" o "dirigido" se refieren al procedimiento de diseñar un compuesto oligomérico que el compuesto hibride específicamente con una molécula de ácido nucleico seleccionado.

"Dirigir" un compuesto oligomérico a una molécula de ácido nucleico diana puede ser un procedimiento de múltiples etapas. Normalmente, el procedimiento comienza con la identificación de un ácido nucleico diana cuya expresión se ha de modular. Como se usa en el presente documento, las expresiones "ácido nucleico diana" y "ácido nucleico que codifica SMN2" engloban ADN que codifica SMN2, ARN (incluyendo pre-ARNm y ARNm) transcritos a partir de tal ADN, y también el ADNc derivado de tal ARN. Por ejemplo, el ácido nucleico diana puede ser un gen celular (o ARNm transcrito a partir del gen), cuya expresión se asocia con un trastorno o estado de enfermedad concreto, o una molécula de ácido nucleico de un agente infeccioso. Como se divulga en el presente documento, el ácido nucleico diana codifica SMN2. En una realización preferida, el ácido nucleico diana es pre-ARNm de SMN2.

Regiones, segmentos y sitios diana

El procedimiento de apuntar a una diana normalmente incluye también la determinación de al menos una región, segmento o sitio diana dentro del ácido nucleico diana para que se produzca la interacción antisentido de modo que tenga lugar el efecto deseado (p. ej., modulación del corte y empalme). "Región" se define como una porción del ácido nucleico diana que tiene al menos una estructura, función o característica identificables. Las regiones diana pueden incluir un exón o un intrón. Dentro de las regiones de los ácidos nucleico diana están los segmentos. "Segmentos" se definen como porciones más pequeñas o subporciones de regiones dentro de un ácido nucleico diana. "Sitios", como se usa en la presente invención, se definen como posiciones de bases nucleotídicas únicas dentro de un ácido nucleico diana.

Kits, reactivos de investigación y diagnósticos

Los compuestos antisentido de la presente invención se pueden utilizar para diagnóstico y como reactivos y kits de investigación. Además, los compuestos antisentido que pueden inhibir la expresión génica o modular la expresión génica (p. ej., modulación del corte y empalme) con especificidad, a menudo son usados por los expertos en la técnica para aclarar la función de genes concretos o distinguir entre funciones de varios miembros de una vía biológica.

Para usar en kits y diagnóstico, los compuestos antisentido de la presente invención, bien solos o en combinación con otros compuestos o terapéuticos, se pueden usar como herramientas en análisis diferencial y/o de combinación para aclarar los patrones de expresión de una porción o todo el complemento de genes expresados dentro de las células o tejidos. Los procedimientos de análisis de la expresión génica son bien conocidos para los expertos en la técnica.

Terapias

Los compuestos antisentido de la invención se pueden usar para modular la expresión de SMN2 en un animal, tal como un ser humano. En una realización no limitante, los procedimientos comprenden la etapa de administrar a dicho animal que necesite terapia por una enfermedad o afección asociada con SMN2 una cantidad eficaz de un compuesto antisentido que module la expresión de SMN2 (p. ej., modular el corte y empalme de SMN2). Una enfermedad o afección asociada con SMN2 incluye, entre otras, la atrofia muscular espinal. En una

realización, los compuestos antisentido de la presente invención modulan de forma eficaz el corte y empalme de SMN2 y tiene como resultado un incremento en la inclusión del exón 7. Los compuestos antisentido de la presente invención que modulan de forma eficaz a expresión de un ARN de SMN2 productos proteicos de la expresión se consideran compuestos antisentido activos.

5 Por ejemplo, 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. Procedimientos de obtener muestras para análisis, tales como fluidos corporales (p. ej., esputo, suero), tejidos (p. ej., biopsia) u órganos y procedimientos de preparación de las muestras para permitir el análisis son bien conocidos para los expertos en la técnica. Procedimientos para el análisis de ARN y los niveles de proteínas se tratan anteriormente y son bien conocidos para los expertos en la técnica. Los efectos del tratamiento se pueden evaluar midiendo 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 invención, mediante procedimientos clínicos rutinarios conocidos en la técnica. Estos biomarcadores incluyen, entre otros: transaminasas hepáticas, bilirrubina albúmina, nitrógeno ureico en sangre, creatinina y otros marcadores de función renal y hepática; interleucinas, factores de necrosis tumoral, moléculas de adhesión intracelular, proteína C reactiva, quimiocinas, citocinas y otros marcadores de inflamación.

Los compuestos antisentido de la presente invención se pueden usar en composiciones farmacéuticas añadiendo una cantidad eficaz de un compuesto a un diluyente o transportador adecuado farmacéuticamente aceptable. Transportadores y diluyentes aceptables son bien conocidos para los expertos en la técnica. La selección de un diluyente o transportador se basa en una serie de factores, incluidos, entre otros, la solubilidad del compuesto y la vía de administración. Dichas consideraciones son bien conocidas por expertos en la técnica. En un aspecto, los compuestos antisentido de la presente invención modulan el corte y empalme de SMN2. Los compuestos de la invención también se pueden usar en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades y trastornos relacionados con SMN2.

También se contemplan procedimientos mediante los que fluidos corporales, órganos o tejidos se ponen en contacto con una cantidad eficaz de uno o más de los compuestos antisentido o las composiciones de la invención. Los fluidos corporales, órganos o tejidos se pueden poner en contacto con uno o más de los compuestos de la invención, dando como resultado la modulación de la expresión de SMN2 en las células de los fluidos corporales, órganos o tejidos. Una cantidad eficaz se puede determinar monitorizando el efecto modulador del compuesto antisentido o compuestos o composiciones sobre los ácidos nucleicos diana o sus productos mediante procedimientos de rutina para el experto en la técnica.

Por tanto, en el presente documento se divulga el uso de un compuesto antisentido aislado dirigido a SMN2 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o trastorno por medio del procedimiento descrito con anterioridad. En una realización, el compuesto antisentido está dirigido al exón 7 de SMN2. En otra realización, el compuesto antisentido está dirigido al intrón 6 de SMN2. En otra realización más, el compuesto antisentido está dirigido al intrón 7 de SMN2.

40 **Modificaciones químicas**

Como se conoce en la técnica, un nucleósido es una combinación de base-azúcar. La porción de base del nucleósido normalmente es una base heterocíclica (en ocasiones denominada "base nucleotídica" o, simplemente, "base"). Las dos clases más habituales de dichas bases heterocíclicas son las purinas y las pirimidinas. Los nucleótidos son nucleósidos que incluyen además un grupo fosfato unido covalentemente a la porción azúcar del nucleósido. Para los nucleósidos que incluyen un azúcar de pentofuranosilo, el grupo fosfato se puede unir al resto hidroxilo en 2', 3' o 5' del azúcar. Al formar oligonucleótidos, los grupos fosfato unen covalentemente a los nucleósidos adyacentes entre sí para formar un compuesto polimérico lineal. Dentro de los oligonucleótidos, normalmente se hace referencia a los grupos fosfato como formadores del esqueleto internucleosídico del oligonucleótido. El enlace natural o estructura de ARN y de ADN es un enlace fosfodiéster 3' a 5'. A menudo es preferible incluir modificaciones químicas en los oligonucleótidos para alterar su actividad. Las modificaciones químicas pueden alterar la actividad del oligonucleótido mediante, por ejemplo: incremento de la afinidad de un oligonucleótido antisentido por su ARN diana, incremento de la resistencia a la nucleasa y/o alteración de la farmacocinética del oligonucleótido. El uso de sustancias químicas que incrementan la afinidad de un oligonucleótido por su diana puede permitir el uso de compuestos oligoméricos más cortos.

Como se usa en el presente documento, el término "base nucleotídica" o "resto de base heterocíclica" se refiere a una parte de base heterocíclica de un nucleósido. En general, una base nucleotídica es cualquier grupo que contiene uno o más átomos o grupos de átomos capaces de unir el hidrógeno con una base de otro ácido nucleico. Además de las bases nucleotídicas "no modificadas" o "naturales", tal como las bases nucleotídicas de purina adenina (A) y guanina (G), y las bases nucleotídicas de pirimidina timina (T), citosina (C) y uracilo (U), muchas bases nucleotídicas modificadas o miméticas de bases nucleotídicas conocidas para los expertos en la técnica son susceptibles a la presente invención. Las expresiones base nucleotídica modificada y mimético de base nucleotídica pueden solaparse pero, en general, una base nucleotídica modificada hace referencia a una base nucleotídica que es bastante similar en cuanto a estructura a la base nucleotídica parental, tal como, por ejemplo, una 7-deazapurina,

una 5-metil-citosina o una pinza G, mientras que un mimético de base nucleotídica incluir estructuras más complicadas, tales como, por ejemplo, un mimético de base nucleotídica de fenoxazina tricíclica. Los procedimientos para la preparación de las bases nucleotídicas modificadas indicadas anteriormente son bien conocidos para los expertos en la técnica.

Los compuestos antisentido de la presente invención pueden también contener uno o más nucleósidos que tienen restos de azúcar modificado. El anillo de azúcar de furanosilo de un nucleósido se puede modificar de diversos modos, incluidos, entre otros, la adición de un grupo sustituyente, la formación de puentes de dos átomos de anillo no germinales para formar un ácido bicíclico-nucleico (BNA) y la sustitución de un átomo o grupo tal como -S-, -N(R)-o -C(R₁)(R₂) para el oxígeno del anillo en la posición 4'. Se conocen bien restos de azúcar modificado y se pueden usar para alterar, normalmente incrementar, la afinidad del compuesto antisentido por su diana y/o incrementar la resistencia a nucleasas. Una lista representativa de azúcares modificados preferidos incluye, entre otros, azúcares modificados bicíclicos (BNA), incluidos LNA y ENA (puente 4'-(CH₂)₂-O-2'); y azúcares sustituidos, especialmente azúcares sustituidos en 2' que tienen un grupo sustituyente 2'-F, 2'-OCH₂ o 2'-O (CH₂)₂-OCH₃. Los azúcares también pueden reemplazarse con grupos miméticos de azúcar, entre otros. Los procedimientos para las preparaciones de los azúcares modificados son bien conocidos para los expertos en la técnica.

La presente invención incluye grupos de unión internucleósidos que unen los nucleósidos o unidades monoméricas modificadas de otro modo para formar un compuesto antisentido. Las dos clases principales de grupos de unión internucleósidos se definen por la presencia o ausencia de un átomo de fósforo. Enlaces internucleósidos representativos que contienen fósforo incluyen, entre otros, fosforodiestéres, fosfortriésteres, metilfosfonatos, fosfoamidato y fosfortioatos. Grupos de unión internucleósidos sin fósforo representativos incluyen, entre otros, metilmetilimino (-CH₂-N(CH₃)O-CH₂-), tiodiéster (-O-C(O)-S-), tionocarbamato (-O-C(O)(NH)-S-); siloxano (-O-Si(H) 2-O-); y N,N'-dimetilhidrazina (-CH₂-N(CH₃)-N(CH₃)-). Los compuestos antisentido que tienen grupos de unión internucleósidos sin fósforo se denominan oligonucleósidos. Se pueden usar enlaces internucleósidos modificados, en comparación con los enlaces fosfodiéster naturales, para alterar, normalmente aumentar, la resistencia a la nucleasa del compuesto antisentido. Se pueden preparar enlaces internucleosídicos que tienen un átomo quiral como racémicos, quirales o mezclas. Enlaces internucleosídicos quirales representativos incluyen, entre otros, alquilfosfonatos y fosfortioatos. Los procedimientos para la preparación de enlaces que contienen fósforo y que no contienen fósforo son bien conocidos para los expertos en la técnica.

Como se usa en el presente documento, el término "mimético" hace referencia a grupos que están sustituidos por un azúcar, una base nucleotídica y/o un enlace internucleosídico. Generalmente se usa un mimético en lugar del azúcar o de la combinación azúcar-unión internucleosídica, y la base nucleotídica se mantiene por hibridación a una diana seleccionada. Ejemplos representativos de miméticos de azúcar incluyen, entre otros, ciclohexenilo o morfolino. Ejemplos representativos de un mimético para una combinación de azúcar-unión internucleosídica incluyen, entre otros, ácidos nucleicos peptídicos (PNA) o grupos morfolino unidos por enlaces aquirales sin carga. En algunos casos se usa un mimético en lugar de la base nucleotídica. Miméticos de bases nucleotídicas representativos son bien conocidos en la técnica e incluyen, entre otros, análogos de fenoxacina tricíclica y bases universales (Berger y col., Nuc Acid Res. 2000,28:2911-14). Los procedimientos para la síntesis de azúcar, nucleósidos y miméticos de bases nucleotídicas son bien conocidos para los expertos en la técnica.

Como se usa en el presente documento, el término "nucleósido" incluye nucleósidos, nucleósidos abásicos, nucleósidos modificados y nucleósidos que tienen bases miméticas y/o grupos de azúcar.

En el contexto de la presente invención, el término "oligonucleótido" se refiere a un compuesto oligomérico que es un oligómero o polímero de ácido ribonucleico (ARN) o de ácido desoxirribonucleico (ADN). Este término incluye oligonucleótidos compuestos por bases nucleotídicas naturales y no naturales, azúcares y enlaces internucleosídicos covalentes, posiblemente que además incluyen conjugados de ácidos no nucleicos.

La presente invención proporciona compuestos que tienen grupos de fósforo reactivos útiles para formar enlaces internucleosídicos, incluidos, por ejemplo, enlaces internucleosídicos fosfodiéster y fosfortioato. Procedimientos de preparación y/o purificación de precursores o compuestos antisentido de la presente invención no son una limitación de las composiciones o procedimientos de la invención. Los procedimientos para la síntesis y purificación de ADN, ARN y los compuestos antisentido de la presente invención son bien conocidos para los expertos en la técnica.

Como se usa en el presente documento, "compuesto antisentido quimérico" se refiere a un compuesto antisentido que tiene al menos un azúcar, una base nucleotídica y/o un enlace internucleosídico que se modificó diferencialmente en comparación con los otros azúcares, bases nucleotídicas o enlaces internucleosídicos dentro del mismo compuesto oligomérico. El resto de los azúcares, bases nucleotídicas y enlaces internucleosídicos pueden estar modificados de forma independiente o no modificados. En general, un compuesto oligomérico quimérico tendrá nucleósidos modificados que pueden estar en posiciones aisladas o agrupados en regiones que definirán un motivo concreto. Cualquier combinación de modificaciones y/o grupos miméticos puede comprender un compuesto oligomérico quimérico de la presente invención.

Los compuestos oligoméricos quiméricos normalmente contienen al menos una región modificada de modo que confieren un incremento de la resistencia a la degradación por nucleasas, incremento de la captación celular y/o incremento de la afinidad de unión por el ácido nucleico diana. Una región adicional del compuesto oligomérico puede servir como sustrato para las enzimas capaces de escindir ARN:ADN o híbridos ARN:ARN. A modo de ejemplo, la RNasa H es una endonucleasa celular que escinde la hebra de ARN de un dúplex ARN:ADN. Por tanto, la activación de la RNasa H da lugar a la escisión del ARN diana, de modo que se potencia considerablemente la eficiencia de la inhibición de la expresión génica. En consecuencia, a menudo se pueden obtener resultados comparables con compuestos oligoméricos más cortos cuando se usan quimeras, en comparación con, por ejemplo, fosforotioato desoxioligonucleótidos que hibridan con la misma región diana. La escisión del ARN diana se puede detectar de forma rutinaria mediante electroforesis en gel y, en caso necesario, técnicas asociadas de hibridación de ácidos nucleicos conocidas en la técnica.

Como se usa en la presente invención, la expresión "motivo completamente modificado" hace referencia a un compuesto antisentido que comprende una secuencia contigua de nucleósidos en la que esencialmente cada nucleósido es un nucleósido de azúcar modificado que tiene una modificación uniforme.

Los compuestos descritos en la presente invención contienen uno o más centros asimétricos y pueden, por tanto, dar lugar a enantiómeros, diastereómeros y otras configuraciones estereoisoméricas que pueden definirse en términos de estereoquímica como (R) o (S), α o β (D) o (L), como para los aminoácidos. Con la presente invención se quiere incluir todos estos posibles isómeros, así como sus formas racémicas y óptimamente puras.

En un aspecto de la presente invención, los compuestos antisentido están modificados mediante unión covalente de uno o más grupos conjugados. Los grupos conjugados pueden estar unidos mediante uniones reversibles o irreversibles. Los grupos conjugados pueden estar unidos directamente a los compuestos antisentido o a través de un ligador. Los ligadores pueden ser ligadores mono o bifuncionales. Dichos procedimientos de unión y los ligadores son bien conocidos para los expertos en la técnica. En general, los grupos conjugados están unidos a compuestos antisentido para modificar un a o más propiedades. Dichas consideraciones son bien conocidas para los expertos en la técnica.

Síntesis de oligómeros

La oligomerización de nucleósidos modificados y no modificados se puede realizar de forma rutinaria de acuerdo con los procedimientos de la bibliografía (Protocols for Oligonucleotides and Analogs, Ed. Agrawal (1993), Humana Press) y/o ARN (Scaringe, Methods (2001), 23, 206-217. Gait et al., Applications of Chemically synthesized RNA in RNA: Protein Interactions, Ed. Smith (1998), 1-36. Gallo et al., Tetrahedron (2001), 57, 5707-5713).

Los compuestos antisentido de la presente invención pueden fabricarse de forma conveniente y rutinaria a través de la técnica bien conocida de la síntesis en fase sólida. El equipo para dicha síntesis se comercializa en diferentes proveedores incluidos, por ejemplo, Applied Biosystems (Foster City, CA). También se puede emplear adicionalmente o como alternativa cualquier otro medio para dicha síntesis. Es bien conocido el uso de técnicas similares para preparar oligonucleótidos tales como fosforotioatos y derivados alquilados. La invención no está limitada por el procedimiento de la síntesis de compuestos antisentido.

Purificación y análisis de oligómeros

Los expertos en la técnica conocen procedimientos de purificación y análisis de oligonucleótidos. Los procedimientos de análisis incluyen electroforesis capilar (EC) y espectroscopia de masas por electronebulización. Dichos procedimientos de síntesis y análisis pueden realizarse en placas de múltiples pocillos. El procedimiento de la invención no está limitado por el procedimiento de la purificación de oligómeros.

Sales, profármacos y bioequivalentes

Los compuestos antisentido de la presente invención comprenden cualquier sal, éster o sales de dichos ésteres farmacéuticamente aceptables, o cualquier otro equivalente funcional que, tras la administración a un animal, incluido un ser humano, puede proporcionar (directa o indirectamente) el metabolito biológicamente activo o un residuo del mismo. De acuerdo con esto, por ejemplo, la divulgación también se extiende a profármacos y sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos antisentido de la presente invención, sales farmacéuticamente aceptables de dichos profármacos, y otros bioequivalentes.

El término "profármaco" indica un agente terapéutico que se prepara en una forma inactiva o menos activa que se convierte en una forma activa (es decir, el fármaco) dentro del cuerpo o las células del mismo por acción de enzimas endógenas u otros productos químicos y/o condiciones. En particular, las versiones profármaco de los oligonucleótidos de la invención se preparan como derivados SATE ((S-acetil-2-tioetil)fosfato de acuerdo con los procedimientos divulgados en el documento WO 93/24510 o el documento WO 94/26764. Los profármacos también pueden incluir compuestos antisentido en los que uno o ambos extremos comprenden bases nucleotídicas que se

escinden (p. ej., incorporando enlaces fosfodiéster en el esqueleto en los extremos) para producir el compuesto activo.

5 La expresión "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales fisiológica y farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la invención: es decir, sales que conservan la actividad biológica deseada del compuesto parental y que no producen efectos toxicológicos indeseados en el mismo. Las sales de sodio de los oligonucleótidos antisentido son útiles y bien aceptadas para administración terapéutica a seres humanos. En otra realización, también se proporcionan las sales de sodio de los compuestos de ARNs.

10 **Formulaciones**

Los compuestos antisentido de la invención también se pueden mezclar, encapsular, conjugar o, de otro modo, asociar con otras moléculas, estructuras moleculares o mezclas de compuestos.

15 La presente invención también incluye composiciones farmacéuticas y formulaciones que incluyen los compuestos antisentido de la invención. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar de una serie de modos dependiendo de si se desea tratamiento local o sistémico y del área que se va a tratar. En una realización preferida, la administración es tópica en la superficie del tracto respiratorio, particularmente pulmonar, por ejemplo mediante nebulización, inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, por boca y/o nariz.

20 Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención, que se pueden presentar de forma conveniente en forma de monodosis, se pueden preparar de acuerdo con técnicas convencionales bien conocidas en la industria farmacéutica. Dichas técnicas incluyen la etapa de poner en contacto los ingredientes activos con el(los) transportador(es) farmacéutico(s) o excipiente(s). En general, las formulaciones se preparan poniendo en contacto de forma uniforme y estrecha los ingredientes activos con transportadores líquidos o transportadores sólidos finamente divididos o con ambos y, después, en caso necesario, dando forma al producto en la formulación deseada (p. ej., en un tamaño de partícula específico para liberación). En una realización preferida, las formulaciones farmacéuticas de la presente invención se preparan para administración pulmonar en un disolvente adecuado, por ejemplo agua o solución salina normal, posiblemente en una formulación estéril, con transportadores u otros agentes para permitir la formación de gotas del diámetro deseado para liberación usando inhaladores, dispositivos de liberación nasal, nebulizadores y otros dispositivos para liberación pulmonar. Como alternativa, las formulaciones farmacéuticas de la presente invención se pueden formular como polvos secos para usar en inhaladores de polvo seco.

35 Un "transportador farmacéutico" o "excipiente" puede ser un disolvente farmacéuticamente aceptable, agente de suspensión o cualquier otro vehículo farmacológicamente inerte para liberar uno o más ácidos nucleicos a un animal y se conocen en la técnica. El excipiente puede ser líquido o sólido y se selecciona, con el modo de administración previsto en mente, de modo que proporcione el volumen y la consistencia etc. deseados cuando se combina con un ácido nucleico y los otros componentes de una composición farmacéutica dada.

40 **Combinaciones**

45 Las composiciones de la invención pueden contener dos o más compuestos antisentido. En otra realización relacionada, las composiciones de la presente invención pueden contener uno o más compuestos antisentido, particularmente oligonucleótidos, dirigidos a un primer ácido nucleico y uno o más compuestos antisentido dirigidos a un segundo ácido nucleico diana. Como alternativa, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden contener dos o más compuestos antisentido dirigidos a diferentes regiones del mismo ácido nucleico diana. Dos o más compuestos combinados se pueden usar juntos o de forma secuencial. Las composiciones de la presente invención pueden también combinarse con otros agentes terapéuticos que no son el compuesto antisentido.

50 **Divulgación no limitante**

55 Aunque se han descrito ciertos compuestos, composiciones y procedimientos de la presente invención con especificidad de acuerdo con ciertas realizaciones, los ejemplos siguientes sólo sirven para ilustrar los compuestos de la invención y no se pretende que limiten la misma.

Ejemplo 1

60 **Diseño de compuestos antisentido modificados dirigidos a SMN2**

65 De acuerdo con la presente divulgación, los compuestos antisentido se diseñaron para ser dirigidos al intrón 6, el exón 7 o el intrón 7 de SMN2 (SEC ID N° 1). En referencia a la SEC ID N° 1, los nucleótidos 61 – 114 representan al exón 7, mientras que los nucleótidos 1 – 60 y 115 – 174 representan porciones del intrón 6 y del intrón 7, respectivamente. Los compuestos indicados en la Tabla 1 tienen una longitud de 12, 15, 16 o 18

nucleótidos y están compuestos por 2'-O-metoxietilnucleótidos, también conocidos como nucleótidos 2'-MOE. Los enlaces internucleosídicos (esqueleto) son fosfodiéster a lo largo del oligonucleótido. Todos los residuos de citidina son 5-metilcitidinas. El sitio diana indica el primer número de nucleótido (más en 5') de la secuencia diana (SEC ID N° 1) a la que se une el oligonucleótido.

5

Tabla 1

Compuestos 2'-MOE dirigidos a SMN2					
N° ISIS	Sitio diana	Región diana	Longitud	Secuencia (5' a 3')	SEC ID N°
390645	1	Intrón 6	15	TAGATAGCTATATAT	2
393593	2	Intrón 6	15	ATAGATAGCTATATA	3
393592	3	Intrón 6	15	TATAGATAGCTATAT	4
393591	4	Intrón 6	15	ATATAGATAGCTATA	5
393590	5	Intrón 6	15	GATATAGATAGCTAT	6
393602	5	Intrón 6	12	ATAGATAGCTAT	7
390644	6	Intrón 6	15	AGATATAGATAGCTA	8
393601	6	Intrón 6	12	TATAGATAGCTA	9
393589	7	Intrón 6	15	TAGATATAGATAGCT	10
393600	7	Intrón 6	12	ATATAGATAGCT	11
393588	8	Intrón 6	15	ATAGATATAGATAGC	12
393599	8	Intrón 6	12	GATATAGATAGC	13
393587	9	Intrón 6	15	TATAGATATAGATAG	14
393598	9	Intrón 6	12	AGATATAGATAG	15
393586	10	Intrón 6	15	ATATAGATATAGATA	16
393597	10	Intrón 6	12	TAGATATAGATA	17
390643	11	Intrón 6	15	TATATAGATATAGAT	18
393596	11	Intrón 6	12	ATAGATATAGAT	19
393595	12	Intrón 6	12	TATAGATATAGA	20
393594	13	Intrón 6	12	ATATAGATATAG	21
390642	16	Intrón 6	15	ATAGCTATATAGATA	22
390641	21	Intrón 6	15	AAAAAATAGCTATAT	23
390640	26	Intrón 6	15	GTTAAAAAATAGC	24
390639	31	Intrón 6	15	AGGAAGTTAAAAAAA	25
390638	36	Intrón 6	15	AATAAAGGAAGTTAA	26
390637	41	Intrón 6	15	AGGAAAATAAAGGAA	27
390636	46	Intrón 6	15	CTGTAAGGAAAATAA	28
372641	61	Exón 7	15	ATTTTGTCTAAAACC	29
385909	62	Exón 7	15	GATTTTGTCTAAAAC	30
383497	63	Exón 7	12	TTTTGTCTAAA	31
385908	63	Exón 7	15	TGATTTTGTCTAAA	32
383496	64	Exón 7	12	ATTTTGTCTAAA	33
385907	64	Exón 7	15	TTGATTTTGTCTAAA	34
383495	65	Exón 7	12	GATTTTGTCTAA	35
385906	65	Exón 7	15	TTTGATTTTGTCTAA	36
385910	65	Exón 7	16	TTTTGATTTTGTCTAA	37
372642	66	Exón 7	15	TTTTGATTTTGTCTA	38
383494	66	Exón 7	12	TGATTTTGTCTA	39
383493	67	Exón 7	12	TTGATTTTGTCT	40
385905	67	Exón 7	15	TTTTGATTTTGTCT	41
383492	68	Exón 7	12	TTTGATTTTGTCT	42
385904	68	Exón 7	15	CTTTTGTCTTTTGTCT	43
383491	69	Exón 7	12	TTTTGATTTTGT	44
383490	70	Exón 7	12	TTTTGATTTTGT	45
372643	71	Exón 7	15	CTTCTTTTGTCTTTT	46
383489	71	Exón 7	12	CTTTTGTCTTTT	47
383488	72	Exón 7	12	TCTTTTGTCTTTT	48
372644	76	Exón 7	15	CCTTCCTTCTTTTGT	49
372645	81	Exón 7	15	GAGCACCTTCCTTCT	50
372646	86	Exón 7	15	AATGTGAGCACCTTC	51
372647	91	Exón 7	15	TAAGGAATGTGAGCA	52
383470	92	Exón 7	18	AATTTAAGGAATGTGAGC	53

65

(continuación)

Compuestos 2'-MOE dirigidos a SMN2						
Nº ISIS	Sitio diana	Región diana	Longitud	Secuencia (5' a 3')	SEC ID Nº	
5	383477	92	Exón 7	15	TTAAGGAATGTGAGC	54
	383469	93	Exón 7	18	TAATTTAAGGAATGTGAG	55
	383476	93	Exón 7	15	TTTAAGGAATGTGAG	56
	383487	93	Exón 7	12	AAGGAATGTGAG	57
10	383468	94	Exón 7	18	TTAATTTAAGGAATGTGA	58
	383475	94	Exón 7	15	ATTTAAGGAATGTGA	59
	383486	94	Exón 7	12	TAAGGAATGTGA	60
	383467	95	Exón 7	18	CCTAATTTAAGGAATGTG	61
	383474	95	Exón 7	15	AATTTAAGGAATGTG	62
15	383485	95	Exón 7	12	TTAAGGAATGTG	63
	372648	96	Exón 7	15	TAATTTAAGGAATGT	64
	383466	96	Exón 7	18	CCTAATTTAAGGAATGT	65
	383484	96	Exón 7	12	TTTAAGGAATGT	66
	383473	97	Exón 7	15	TTAATTTAAGGAATG	67
20	383483	97	Exón 7	12	ATTTAAGGAATG	68
	383472	98	Exón 7	15	CCTAATTTAAGGAAT	69
	383482	98	Exón 7	12	AATTTAAGGAAT	70
	383471	99	Exón 7	15	CCTAATTTAAGGAA	71
	383481	99	Exón 7	12	TAATTRAAGGAA	72
25	372649	100	Exón 7	15	TCCTAATTTAAGGA	73
	383480	100	Exón 7	12	TTAATTTAAGGA	74
	383479	101	Exón 7	12	CCTAATTTAAGG	75
	383478	102	Exón 7	12	CCTAATTTAAG	76
30	390646	115	Intrón 7	15	TGCTGGCAGACTTAC	77
	390647	120	Intrón 7	15	CATAATGCTGGCAGA	78
	393610	121	Intrón 7	15	TCATAATGCTGGCAG	79
	393609	122	Intrón 7	15	TTCATAATGCTGGCA	80
	393608	123	Intrón 7	15	TTTCATAATGCTGGC	81
35	387949	124	Intrón 7	20	ATTCACTTTCATAATGCTGG	82
	393607	124	Intrón 7	15	CCTTCATAATGCTGG	83
	393619	124	Intrón 7	12	TCATAATGCTGG	84
	390648	125	Intrón 7	15	ACTTTCATAATGCTG	85
	393618	125	Intrón 7	12	TTCATAATGCTG	86
40	393606	126	Intrón 7	15	CACCTTCATAATGCT	87
	393617	126	Intrón 7	12	TTTCATAATGCT	88
	393605	127	Intrón 7	15	TCACTTTCATAATGC	89
	393616	127	Intrón 7	12	CCTTCATAATGC	90
	393604	128	Intrón 7	15	TTCACTTTCATAATG	91
45	393615	128	Intrón 7	12	ACTTTCATAATG	92
	393603	129	Intrón 7	15	ATTCACTTTCATAAT	93
	393614	129	Intrón 7	12	CACCTTCATAAT	94
	390649	130	Intrón 7	15	GATTCACTTTCATAA	95
50	393613	130	Intrón 7	12	TCACTTTCATAA	96
	393612	131	Intrón 7	12	TTCACTTTCATA	97
	393611	132	Intrón 7	12	ATTCACTTTCAT	98
	390650	135	Intrón 7	15	AGTAAGATTCACTTT	99
	390651	140	Intrón 7	15	ACAAAAGTAAGATTC	100
55	390652	145	Intrón 7	15	GTTTTACAAAAGTAA	101
	390653	150	Intrón 7	15	ATAAAGTTTTACAAA	102
	390654	155	Intrón 7	15	AAACCATAAAGTTTT	103
	390655	160	Intrón 7	15	TCCACAAACCATAAA	104

60 Otras secuencias de ácido nucleico para los genes de SMN están disponibles públicamente y son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, los números de acceso en Genbank: NM_000344, NM_022874, NM_022875, U43883, AC140134, AC139778, AC010237, AC022119 y AC004999 proporcionan secuencias de nucleótidos de SMN1 o SMN2.

65 Ejemplo 2

Tratamiento con compuestos oligoméricos

Cuando las células alcanzan la confluencia adecuada, fueron tratadas con oligonucleótido usando un método de transfección tal como se ha descrito.

LIPOFECTIN™

Cuando las células alcanzan una confluencia del 65 - 75% fueron tratadas con oligonucleótido. El oligonucleótido se mezcló con LIPOFECTIN™ (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) en medio Opti-MEM™ con reducción de suero (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) para alcanzar la concentración deseada del oligonucleótido y una concentración de LIPOFECTIN™ de 2,5 o 3 µg/ml por oligonucleótido 100 nM. Esta mezcla de transfección se incubó a temperatura ambiente durante aproximadamente 0,5 horas. Para las células cultivadas en placas de 96 pocillos, las células se lavaron una vez con 100 µl de OPTI-MEM®-1 y después se trataron con 130 µl de la mezcla de transfección. Las células cultivadas en placas de 24 pocillos u otras placas de cultivo tisular estándar se trataron de forma similar, usando volúmenes adecuados de medio y de oligonucleótido. Las células fueron tratadas y los datos se obtuvieron por duplicado o por triplicado. Tras aproximadamente 4-7 horas de tratamiento a 37 °C, el medio que contenía la mezcla de transfección se reemplazó con medio de cultivo fresco.

Electroporación

Cuando las células alcanzaron una confluencia del 80% fueron tratadas con oligonucleótido mediante electroporación. Las concentraciones de oligonucleótidos usadas en los experimentos de electroporación varían de 0,1 a 40 µM. Las células se recogen mediante tripsinización rutinaria para producir una única suspensión celular. Tras el recuento celular usando un hemocitómetro y sedimentar mediante centrifugación, las células se resuspenden en medio de suero reducido OPTI-MEM™-1 (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) para alcanzar una densidad de 1×10^7 células/ml. Las células se mezclan con la concentración deseada del oligonucleótido y se transfieren a una cubeta de electroporación de 0,1 cm (BTX Molecular Delivery Systems, Hollister, MA). Las células se someten a un único pulso usando un aparato de electroporación (por ejemplo, el BTX Electro Square Porator T820 o the BTX HT300, BTX Molecular Delivery Systems, Hollister, MA), diluido en medio de cultivo y sembrado en placas de 24 pocillos. Las células se trataron y los datos se obtuvieron por duplicado o por triplicado.

Ejemplo 3**Minigenes para los estudios de corte y empalme de SMN2**

Todos los constructos de SMN son derivados de pCITel (Lorson and Androphy, Hum. Mol. Genet., 2000, 9, 259-265). Los cebadores usados para generar cada constructor de SMN2 se muestran en la Tabla 2. usando un kit de Quickchange (Stratagene, La Jolla, CA), se insertó un sitio *XbaI* mediante mutagénesis dirigida a sitio en el nucleótido 7170 (en el intrón 7) para generar pCI-SMNx-wt. Para los estudios de transcripción in vitro, el intrón 6 se acortó mediante PCR de solapamiento-extensión para generar pCISMNxΔ6-wt, delecionando 5.570 nucleótidos de la posición 1235 al sitio *BclI* en el nucleótido 6805. Se realizaron dos grupos de PCR con la polimerasa Pfu y pCISMNx-wt como molde. La primera PCR se realizó con los cebadores CIF1 y Δ6-bclR, la segunda con los cebadores smnΔ6vrlp y CIR. Los productos de la PCR se purificaron, se combinaron y se reamplificaron con los cebadores externos (CIF1 y CIR). El producto final se digirió con *XhoI* y *NotI* y se subclonó en volvió a insertar en pCISMNx-wt digerido con las mismas enzimas. Todos los constructos se verificaron mediante secuenciación directa. Los moldes se generaron para la transcripción in Vitro mediante amplificación por PCR de pCISMNxΔ6-wt usando los cebadores CIF2 y smn8-75+5R. Los productos finales contenían un promotor T7, el exón 6 (124 nt), un intrón 6 más corto (200 nt), el exón 7 (54 nt), el intrón 7 (444 nt) y 75 nt del exón 8, seguido de un sitio consenso de corte y empalme en 5' (GTAAGTACTT; SEC ID N° 22) (Cartegni y Krainer, Nature Genet., 2002, 30, 377-384; documento WO 02/38738).

Tabla 2

Cebadores usados para generar minigenes y moldes de SMN2			
Constructo	Nombre del cebador	Secuencia del cebador	SEC ID N°
pCI-SMNx-wt	smnI7xbaF	AGATAAAAGGTTAATCTAGATCCCTACTAGAATTCTC	106
pCI-SMNx-wt	smnI7xbaR	GAGAATTCTAGTAGGGATCTAGATTAACCTTTTATCT	107
pCISMNxΔ6-wt	CIF1	AATTGCTAACGCAGTCAGTGCTTC	108
pCISMNxΔ6-wt	Å6-bclR	AATATGATCAGCAAACAAGTCACATAACTAC	109
pCISMNxΔ6-wt	smnÅ6-vrlp	GTGACTTTGTTTTGCTGATCATATTTGTTGAATAAAATAAG	110
pCISMNxΔ6-wt	CIR	AATGTATCTTATCATGTCTGCTCG	111
Moldes in vitro	CIF2	AATGTATCTTATCATGTCTGCTCG	112
Moldes in vitro	Smn8-75+5'R	AAGTACTTACCTGTAACGCTTCACATTCCAGATCTGTC	113

Ejemplo 4

Efecto de los compuestos antisentido sobre el corte y empalme de SMN2 en extractos acelulares

Los compuestos antisentido de 2'-MOE diseñados para apuntar al exón 7 de SMN2 se evaluaron por su efecto sobre el corte y empalme de SMN2. Los moldes para los estudios de corte y empalme de SMN2 in Vitro se generaron como se describe en el Ejemplo 3'. Transcritos de desplazamiento de T7 con capuchón en 5' de productos purificados por PCR se marcaron de forma uniforme con [α - 32 P]-UTP y se purificaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante. Los transcritos marcados in vitro se sometieron a corte y empalme en extractos nucleares de He o de extractos S 100 Mayeda y Krainer, Methods Mol. Biol., 1999, 118, 315-321; Mayeda y Krainer, Methods Mol. Biol., 1999, 118, 309-314) incubando 10 fmol del transcrito en 12,5 μ l de reacciones de corte y empalme estándar que contienen 3 μ l de extracto nuclear o 2 μ l de extracto S100. Los extractos no contenían oligonucleótido antisentido o se complementaban con , 5, 10, 25, 50, 100, 200 o 400 nM of ISIS 372641, ISIS 372642, ISIS 372643, ISIS 372644, ISIS 372645, ISIS 372646, ISIS 372647, ISIS 372648 o ISIS 372649. En este estudio también se usó el oligonucleótido control ISIS 372693 (TTGTATTCTATGTTT; SEC ID N° 114). La concentración de MgCl₂ de la mezcla de corte y empalme fue 1,6 mM. Tras la incubación a 30 °C durante 4 horas se extrajo el ARN y se analizó en geles de poliacrilamida desnaturalizante al 8 %, seguido de autorradiografía y análisis de fosforoimager. La inclusión del exón se calculó como un porcentaje de la cantidad total del ARNm sometido a corte y empalme (incluido el ARNm x 100/(incluido el ARNm + ARNm sorteado).

Los resultados mostraron los diversos oligonucleótidos antisentido de SMN2 alteraban el corte y empalme del exón 7 de SMN2, mientras que el oligonucleótido control ISIS 372693 no tuvo ningún efecto. ISIS 372641 estimuló el sorteo del exón 7 de SMN2 de un modo dependiente de la dosis. El exón 7 se incluyó en únicamente el 2 % de los transcritos de SMN2 sometidos a corte y empalme con 400 nM de ISIS 372641, en comparación con el 26 % de los transcritos incubados sin oligonucleótido. De un modo similar, ISIS 372646 inhibió la inclusión del exón 7 de un modo dependiente de la dosis con un 16 % de los transcritos de SMN2 sometidos a corte y empalme que contienen el exón 7, en comparación con un 32 % de los transcritos incubados sin oligonucleótido. En contraste con esto, ISIS 372642 inhibió el sorteo del exón 7 de un modo dependiente de la dosis. El porcentaje de los transcritos de SMN2 sometidos a corte y empalme que contenían el exón 7 aumentó del 28 % cuando se incubó con oligonucleótido a un 40 % cuando se incubó con 400 nM de ISIS 372642. ISIS 372648 también aumentó la inclusión del exón 7 con 69 % de los transcritos de SMN2 que contienen el exón 7 cuando se incubó con la concentración más alta de oligonucleótido en comparación con el 42 % de los transcritos cuando se incubó sin oligonucleótido. Los extractos que contenían ISIS 372643 también mostraron un ligero incremento en la inclusión del exón 7 a las concentraciones de oligonucleótidos más altas. En conjunto, estos resultados ilustran que los oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 7 de SMN2 son capaces de alterar el corte y empalme de los transcritos para estimular o inhibir la inclusión del exón 7.

Ejemplo 5

Efecto de los compuestos antisentido sobre el corte y empalme de SMN2 en células HEK293

Los compuestos antisentido dirigidos al exón 7 de SMN2 se evaluaron para determinar sus efectos sobre el corte y empalme de SMN2 en células cultivadas. Las células HEK293 se sometieron a electroporación con 10 μ g de SMN2 minigen y 10 μ M del oligonucleótido antisentido de SMN2 ISIS 372641, ISIS 372642, ISIS 372643, ISIS 372644, ISIS 372645, ISIS 372646, ISIS 372647, ISIS 372648 o ISIS 372649, o el oligonucleótido control ISIS 372693. Sesenta horas tras la transfección se aisló el ARN total usando reactivo Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Un μ g del ARN total tratado con DNasa se usó para generar secuencias

de ADNc de la primera hebra con oligo(dT) y transcriptasa inversa Superscript II (Invitrogen) y el ADNc se amplificó de forma semicuantitativa mediante 16 ciclos de PCR (94 °C durante 30 s, 57,5 °C durante 30 s, 72 °C durante 90 s) en presencia de [α - 32 P]dCTP (Lorson and Androphy, Hum. Mol. Genet., 2000, 9, 259-265). Los productos de la PCR se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturizante al 6 %, seguido de autorradiografía y análisis con fosforimager. La inclusión del exón se calculó como un porcentaje de la cantidad total del ARNm sometido a corte y empalme (incluido el ARNm x 100/(incluido el ARNm + ARNm sorteado). El porcentaje de transcritos de SMN2 sometidos a corte y empalme que contienen el exón 7 (% de inclusión) se muestra en la Tabla 3. El sitio diana de cada oligonucleótido relativo a la SEC ID N° 1 también está indicado.

Tabla 3

Efecto de los compuestos antisentido de SMN2 en la inclusión del exón 7		
Nº ISIS	Sitio diana	% de inclusión
372641	61	6,4
372642	66	67,4
372643	71	34,9
372644	76	12,9
372645	81	7,8
372646	86	11,8
372647	91	9,5
372648	96	75,2
372649	100	55,1
372693	Control	57,7

En comparación con el oligonucleótido control, la transfección con ISIS 372642 o 372648 tuvo como resultado un mayor porcentaje de transcritos de SMN2 con el exón 7 incluido, lo que es consistente con los resultados obtenidos de ensayos in vitro. El tratamiento con ISIS 372641, ISIS 372644, ISIS 372645, ISIS 372646 and ISIS 372647 tuvo como resultado el incremento más significativo en el sorteo del exón 7.

Los oligonucleótidos antisentido de SMN2 se evaluaron adicionalmente para determinar sus efectos sobre el corte y empalme del pre-ARNm de SMN1 y SMN2 en células cultivadas. Las células HEK293 se sometieron a electroporación con 10 μ g de oligonucleótido antisentido de SMN2 ISIS 372641, ISIS 372642, ISIS 372643, ISIS 372644, ISIS 372645, ISIS 372646, ISIS 372647, ISIS 372648 o ISIS 372649, o el oligonucleótido control ISIS 372693. Sesenta horas tras la transfección se aisló el ARN y se realizó RT-PCR como se ha descrito anteriormente para examinar los cambios en el corte y empalme de los pre-ARNm de SMN1 y SMN2. Los productos de la PCR se digirieron con *Ddel* para distinguir entre SMN1 y SMN2, se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturizante al 6 % y se analizaron mediante autorradiografía. El porcentaje de transcritos de SMN1 y SMN2 sometidos a corte y empalme que contienen el exón 7 (% de inclusión se muestra en la Tabla 4).

Tabla 4

Efecto de los oligonucleótidos antisentido de SMN2 sobre el corte y empalme de los pre-ARNm de SMN1 y SMN2		
Nº ISIS	% de inclusión en SMN1	% de inclusión en SMN2
372641	82,5	11,1
372642	96,2	69,5
372643	94,1	28,8
372644	68,5	23,8
372645	47,3	15,2
372646	57,7	20,2
372647	58,8	12,8
372648	93,1	52,2
372649	94,8	49,3
372693	95,1	50,1

De acuerdo con resultados anteriores, la transfección con ISIS 372642 y ISIS 372648 condujo al mayor nivel de inclusión del exón 7 en los transcritos de pre-ARNm de SMN2. ISIS 372641, ISIS 372644, ISIS 372645, ISIS 372646 y ISIS 372647 redujeron significativamente el porcentaje de transcritos de SMN1 que contienen el exón 7, Estos oligonucleótidos, junto con ISIS 372643, también redujeron la inclusión del exón 7 en los ARNm de SMN2.

Los oligonucleótidos antisentido adicionales dirigidos al extremo 3' del exón 7 de SMN2 (véase la Tabla 1) se evaluaron para determinar sus efectos sobre el corte y empalme del pre-ARNm de SMN2. Las células HEK293 se sometieron a electroporación con 10 μ M de los oligonucleótidos antisentido de SMN2 ISIS 383466, ISIS 383467, ISIS 383468, ISIS 383469, ISIS 383470, ISIS 383471, ISIS 383472, ISIS 383473, ISIS 383474, ISIS 383475, ISIS 383476, ISIS 383477 o ISIS 372648, o con un oligonucleótido control. Cincuenta horas tras la transfección se aisló el

ARN y se realizó la RT-PCR como se ha descrito con anterioridad para analizar los cambios de corte y empalme del pre-ARNm de SMN2. Los productos de la PCR se digirieron con *Ddel* para distinguir entre SMN1 y SMN2, se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturizante al 6% y se analizaron mediante autorradiografía. El porcentaje de transcritos de SMN2 sometidos a corte y empalme que contienen el exón 7 (% de inclusión) se muestra en la Tabla 5. También se indican la longitud y el sitio diana de cada oligonucleótido relativos a la SEC ID N° 1.

Tabla 5

Efecto de los oligonucleótidos antisentido de SMN2 sobre el corte y empalme de los pre-ARNm de SMN2			
Nº ISIS	Sitio diana	Longitud	% de inclusión
383470	92	18	4,9
383477	92	15	5,3
383469	93	18	18,9
383476	93	15	32,8
383468	94	18	18,7
383475	94	15	84,8
383467	95	18	8,1
383474	95	15	77,0
372648	96	15	59,6
383466	96	18	37,5
383473	97	15	42,2
383472	98	15	45,0
383471	99	15	37,1
Control	N/A	N/A	41,3
Vehículo	N/A	N/A	41,4

Los resultados demuestran que una serie de oligonucleótidos antisentido de SMN2 pueden alterar el corte y empalme de los pre-ARNm de SMN2. ISIS 383467, ISIS 383468, ISIS 383469, ISIS 383470, ISIS 383476 e ISIS 383477 inhibieron la inclusión del exón 7; ISIS 383474, ISIS 383475 e ISIS 372648 aumentaron significativamente la inclusión del exón 7; e ISIS 383466, ISIS 383471, ISIS 383472 e ISIS 383473 parecía que tenían muy poco efecto sobre el corte y empalme de SMND respecto al oligonucleótido y a los vehículos control. Estos resultados sugieren que los oligonucleótidos de SMN2 con un sitio diana entre los nucleótidos 94 . 96 son particularmente eficaces en la consecución de la inclusión del exón 7 durante el corte y empalme del pre-ARNm de SMN2 y también sugiere que los oligonucleótidos de 15 nucleótidos de longitud son más eficaces que los de 18 nucleótidos de longitud.

Ejemplo 6

Efecto de los compuestos antisentido sobre el corte y empalme de SMN2 en células fibroblastos de SMA

De acuerdo con la presente divulgación, los oligonucleótidos antisentido de SMN2 se analizaron en células fibroblastos procedentes de un paciente con SMA de tipo I (línea celular 3813; Coover y col., Human Mol. Genet., 1997, 6, 1205-1214). Los fibroblastos de SMA contienen SMN2, pero no expresan SMN1. Los fibroblastos de SMA se sometieron a lipofección con 200 nM de los oligonucleótidos antisentido de SMN2 ISIS 372641, ISIS 372642, ISIS 372643, ISIS 372644, ISIS 372645, ISIS 372646, ISIS 372647, ISIS 372648 o ISIS 372649, o el oligonucleótido control ISIS 72693. Setenta horas tras la transfección se aisló el ARN y se realizó RT-PCR como se ha descrito anteriormente para examinar los cambios en el corte y empalme de los pre-ARNm de SMN2 endógena. Los productos de la PCR se separaron mediante electroforesis y se analizaron mediante autorradiografía. El porcentaje de transcritos de SMN2 sometidos a corte y empalme que contienen el exón 7 (% de inclusión) se muestra en la Tabla 6. El sitio diana de cada oligonucleótido relativo a la SEC ID N° 1 también está indicado.

Tabla 6

Efecto de los oligonucleótidos antisentido de SMN2 en la inclusión del exón 7 en fibroblastos de SMA		
Nº ISIS	Sitio diana	% de inclusión
372641	61	41,8
372642	66	55,2
372643	71	40,9
372644	76	43,4
372645	81	43,7
372646	86	38,8
372647	91	43,6
372648	96	49,8
372649	100	48,8
372693	Control	48,7
PBS	N/A	48,8

De acuerdo con hallazgos anteriores, el tratamiento con ISIS 372642 e ISIS 372648 generó un mayor porcentaje de productos de corte y empalme de SMN2 que contienen el exón 7.

Se realizó un segundo experimento para evaluar ISIS 372642 e ISIS 383475 en fibroblastos de SMA. Los fibroblastos de SMA se sometieron a lipofección con 200 nM de ISIS 372642, 200 nM de ISIS 383475, o 100 nM de ISIS 372642 en combinación con 100 nM de ISIS 383475. ISIS 372693 (200 nM) y vehículo de forma individual también se usaron como controles. Cincuenta horas tras la transfección se aisló el ARN y se realizó la RT-PCR. Los productos de la PCR se separaron mediante electroforesis y se analizaron mediante autorradiografía. El porcentaje de transcritos de SMN2 sometidos a corte y empalme que contienen el exón 7 (% de inclusión) se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7

Efecto de ISIS 372642 e ISIS 383475 sobre la inclusión del exón 7 en fibroblastos de SMA	
Tratamiento (Nº ISIS)	% de inclusión
372642	47,8
383475	53,9
372642 y 383475	49,2
372693	36,3
Vehículo	35,0

Los resultados demuestran que el tratamiento con ISIS 372642 o ISIS 383475, solos o combinados, conduce a una mayor inclusión del exón 7 en los transcritos de SMA.

Ejemplo 7

Microcamino de los sitios diana de ISIS 372642 e ISIS 372648

Los estudios mostrados anteriormente demostraron que tanto ISIS 372642 como ISIS 372648 eran eficaces en la estimulación de la inclusión del exón 7 en SMN2. Para evaluar adicionalmente los sitios diana que rodean a estos compuestos se diseñaron compuestos adicionales como 1 microcamino del nucleótido alrededor de cada sitio (véanse en la Tabla 1 las secuencias y los sitios diana). Para cada microcamino se diseñaron diez compuestos de 12 nucleótidos de longitud. Se diseñaron siete compuestos adicionales de 15 o 16 nucleótidos de longitud dirigidos a la región de ISIS 372642. Los compuestos antisentido dirigidos al extremo 3' del exón 7 (ISIS 383466-382477), descritos anteriormente en el Ejemplo 5 se incluyeron para comparar con los compuestos del microcamino de ISIS 372648. Cada compuesto se evaluó en el ensayo de corte y empalme del minigen de SMN2 y el ensayo de corte y empalme de SMN1/SMN2 en células HEK293. Ambos ensayos se describen en los ejemplos anteriores en el presente documento. Los resultados se muestran en las Tablas 8 y 9.

Tabla 8

Compuestos del microcamino de ISIS 372642: Efecto sobre la inclusión del exón 7

Nº ISIS	Sitio diana	Longitud	% de inclusión en minigen de SMN2	% de inclusión de SMN2 endógena	% de inclusión de SMN1 endógena
385909	62	15	44	43	81
383497	63	12	55	51	86
385908	63	15	49	53	85
383496	64	12	32	36	81
385907	64	15	56	54	86
383495	65	12	54	49	85
385906	65	15	56	57	87
385910	65	16	60	66	89
372642	66	15	66	74	89
383494	66	12	57	51	86
383493	67	12	57	52	85
385905	67	15	74	85	89
383492	68	12	60	56	85
385904	68	15	9	6	19
383491	69	12	38	41	81
383490	70	12	51	49	84
383489	71	12	13	27	76
383488	72	12	24	38	82
Control	N/A	N/A	52	51	86
Control	N/A	N/A	53	50	86

Tabla 9

Compuestos del microcamino de ISIS 372648: Efecto sobre la inclusión del exón 7

Nº ISIS	Sitio diana	Longitud	% de inclusión en minigen de SMN2 Minigene	% de inclusión de SMN2 endógena	% de inclusión de SMN1 endógena
383470	92	18	8	12	63
383477	92	15	6	7	38
383469	93	18	29	26	89
383476	93	15	36	31	87
383487	93	12	11	16	79
383468	94	18	31	26	88
383475	94	15	85	88	96
383486	94	12	44	41	91
383467	95	18	14	13	82
383474	95	15	79	71	94
383485	95	12	63	60	93
372648	96	15	70	57	93
383466	96	18	38	43	92
383484	96	12	65	56	92
383473	97	15	62	53	94
383483	97	12	63	56	94

(continuación)

Compuestos del microcamino de ISIS 372648: Efecto sobre la inclusión del exón 7					
Nº ISIS	Sitio diana	Longitud	% de inclusión en minigen de SMN2 Minigene	% de inclusión de SMN2 endógena	% de inclusión de SMN1 endógena
383472	98	15	41	46	93
383482	98	12	59	45	94
383471	99	15	38	47	92
383481	99	12	42	46	92
383480	100	12	39	48	91
383479	101	12	44	44	92
383478	102	12	47	41	93
Control	N/A	N/A	41	44	93
Control	N/A	N/A	44	48	92

De acuerdo con los resultados anteriores, el tratamiento con ISIS 372642, ISIS 372648 o ISIS 383475 condujo a un incremento significativo de la inclusión del exón 7. Además se identificó que , ISIS 385905 era un compuesto particularmente eficaz en la estimulación de la inclusión del exón 7. Para evaluar adicionalmente ISIS 385905 e ISIS 383475, se realizaron estudios de dosis-respuesta y duración de la acción. Para determinar el efecto de la dosis del oligonucleótido, las células HEK293 se sometieron a electroporación con 385905 o ISIS 383475 a una concentración de 0, 0,2, 0,5, 1, 2, 5, 10 o 20 μM . Sesenta horas después de la electroporación se aisló el ARN y se realizó la RT-PCR como se ha descrito anteriormente para determinar la extensión de la inclusión del exón 7. Los resultados expresados como el % de inclusión del exón 7 se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10

Dosis-respuesta de of ISIS 385905 e ISIS 383475								
Nº ISIS	0 μM	0,2 μM	0,5 μM	1,0 μM	2,0 μM	5,0 μM	10 μM	20 μM
385905	50	53	61	65	74	78	82	87
383475	51	57	65	72	77	83	87	89

Los resultados muestran un incremento dependiente de la dosis de la inclusión del exón 7 tras tratamiento con cualquier compuesto. Para evaluar la duración de la acción, las células HEK293 se sometieron a electroporación con 10 μM de cualquier compuesto y se aisló el ARN y se sometió a RT-PCR los días 0, 1, 2, 3, 4 y 5. Los resultados, expresados como el % de inclusión del exón 7, se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11

Duración de la acción de ISIS 385905 e ISIS 383475						
Nº ISIS	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
385905	49	80	83	82	85	79
383475	48	84	89	88	89	83

Estos resultados demuestran un incremento significativo de la inclusión del exón 7 tras el tratamiento con cualquiera de los compuestos y también muestran que los compuestos son eficaces durante al menos cinco días.

En conjunto, los resultados de los experimentos detallados anteriormente demuestran que los compuestos antisentido que tienen un sitio diana (nucleótido más en 5' al que se une el compuesto) de los nucleótidos 64-68 o 94-97 de SEC ID Nº 1 son más eficaces en la estimulación de la inclusión del exón 7 en los transcritos de SMN2. Los sitios diana de estos compuestos solapan con los elementos ESS (silenciador del corte y empalme exónico) previstos, sin tener un solapamiento significativo con los elementos ESE (potenciador del corte y empalme exónico) previstos. Por tanto, los compuestos antisentido descritos en el presente documento pueden funcionar bloqueando la unión de los factores de corte y empalme trans a determinados elementos reguladores en cis, de modo que influye sobre la selección del sitio de corte y empalme y, específicamente, sobre la inclusión o exclusión del exón 7 de los ARNm de SMN2.

Ejemplo 8

Efecto de los compuestos dirigidos al exón 7 o al intrón 7 sobre la inclusión del exón 7

En ejemplos anteriores del presente documento se ha demostrado que los compuestos antisentido ISIS

372642, ISIS 385905 e ISIS 383475, cada uno de los cuales dirigidos al exón 7, aumentaban significativamente la inclusión del exón 7 de SMN2. Estos compuestos dirigidos al exón 7 y un compuesto dirigido al intrón 7 de SMN2 (ISIS 387949) se compararon en lo que respecta a su capacidad para estimular la inclusión del exón 7. Como se ha descrito en ejemplos anteriores del presente documento, las células HEK293 se sometieron a electroporación con 10 μ M de oligonucleótido y se realizó RT-PCR tras dos días para analizar los cambios del corte y empalme de SMN1 y SMN2 endógenas. En comparación con el oligonucleótido control, los compuestos dirigidos al exón 7 exhibían un incremento significativo de la inclusión del exón 7, como era de esperar. Además, el compuesto dirigido al intrón 7 condujo a la incorporación del exón 7 en casi todos los ARNm de SMN1 y SMN2. Estos Resultados sugieren que los compuestos antisentido dirigidos a las secuencias intrónicas también contribuyen a la incorporación del exón 7 de SMN2. Se sabe que las secuencias intrónicas contienen elementos reguladores del corte y empalme (es decir, potenciadores del corte y empalme intrónico y silenciadores del corte y empalme intrónico), lo que proporciona un posible mecanismo de acción para ISIS 387949.

Ejemplo 9

Mapeo sistemático de los silenciadores del corte y empalme intrónico (ISS)

Para investigar adicionalmente si los compuestos antisentido dirigidos a los intrones que flanquean al exón 7 de SMN2 podían alterar la inclusión del exón 7, por ejemplo interfiriendo con los silenciadores de corte y empalme intrónico, se diseñaron compuestos dirigidos a 60 nucleótidos del intrón 6 (nucleótidos 1-60 de SEC ID N° 1) o a los 60 nucleótidos del intrón 7 (nucleótidos 115-174 de SEC ID N° 1) inmediatamente adyacentes al exón 7. Los compuestos antisentido dirigidos al intrón 6 (ISIS 390636, ISIS 390637, ISIS 390638, ISIS 390639, ISIS 390640, ISIS 390641, ISIS 390642, ISIS 390643, ISIS 390644 e ISIS 390645) o al intrón 7 (ISIS 390646, ISIS 390647, ISIS 390648, ISIS 390649, ISIS 390650, ISIS 390651, ISIS 390652, ISIS 390653, ISIS 390654 e ISIS 390655) se muestran anteriormente en la Tabla 1. Cada compuesto se analizó en tres ensayos diferentes para evaluar su efecto sobre la inclusión del exón 7: Corte y empalme del minigen de SMN2 en extractos acelulares, corte y empalme del minigen de SMN2 en células HEK293 transfectadas y corte y empalme de SMN2 endógena en células HEK293. Los resultados obtenidos de los tres ensayos demostraron que varios compuestos antisentido podían aumentar la inclusión del exón 7, en concreto ISIS 390644 and ISIS 390648 fueron los más efectivos como compuestos dirigidos al intrón 6 y al intrón 7, respectivamente.

Para investigar adicionalmente las regiones dirigidas por ISIS 390644 e ISIS 390648, se diseñaron compuestos adicionales como microcaminos alrededor de estas secuencias diana (véase en la Tabla 1 las secuencias. Para estos experimentos, los compuestos de 12 y 15 nucleótidos de longitud se diseñaron y analizaron de acuerdo con los procedimientos detallados en los ejemplos anteriores del presente documento. Se analizaron los compuestos dirigidos a la región de ISIS 390644 (intrón 6) en el ensayo del minigen de SMN2 y el ensayo de SMN1/SMN2 endógenas en células HEK293. Los resultados se muestran en la tabla 12.

Tabla 12

Resultados del microcamino del compuesto ISIS 390644 del intrón 6				
Nº ISIS	Sitio diana	Longitud	% de inclusión en minigen de SMN2	% de inclusión en SMN2 endógena
393586	10	15	10	32
393587	9	15	18	44
393588	8	15	32	60
393589	7	15	59	79
390644	6	15	65	75
393590	5	15	49	67
393591	4	15	20	46
393592	3	15	22	44
393593	2	15	29	50
393594	13	12	20	44
393595	12	12	13	39
393596	11	12	15	44
393597	10	12	13	39
393598	9	12	17	48
393599	8	12	30	64
393600	7	12	28	62

(continuación)

Resultados del microcamino del compuesto ISIS 390644 del intrón 6				
Nº ISIS	Sitio diana	Longitud	% de inclusión en minigen de SMN2	% de inclusión en SMN2 endógena
393601	6	12	44	63
393602	5	12	29	46
Control	N/A	N/A	22	43

Como se muestra en la Tabla 12, los compuestos antisentido que tienen un sitio diana de los nucleótidos 5-8 (SEC ID Nº 2) tienen como resultado un mayor porcentaje de transcritos que contienen el exón 7. Estos hallazgos sugieren que esta región del intrón 6 contiene un silenciador de corte y empalme intrónico que normalmente funciona inhibiendo la inclusión del exón 7. Tras el bloqueo de este elemento regulador, la selección del sitio de corte y empalme se altera para estimular la inclusión del exón 7.

Se analizaron los compuestos dirigidos a la región 390648 (intrón 7) usando el ensayo del minigen de SMN2 in vitro y en células HEK293 transfectadas y se analizaron en el ensayo de corte y empalme de SMN2 endógena en células HEK293, Los resultados se muestran en la tabla 13.

Tabla 13

Resultados del microcamino del compuesto ISIS 390648 del intrón 7					
Nº ISIS	Sitio diana	Longitud	% de inclusión en minigen de SMN2 in vitro	% de inclusión en minigen de SMN2	% de inclusión de SMN2 endógena
393603	129	15	43	51	76
393604	128	15	46	75	97
393605	127	15	57	97	100
393606	126	15	56	97	100
390648	125	15	53	98	100
393607	124	15	67	100	100
393608	123	15	75	100	100
393609	122	15	60	97	100
393610	121	15	54	58	78
393611	132	12	41	17	40
393612	131	12	39	30	58
393613	130	12	42	43	64
393614	129	12	48	43	64
393615	128	12	38	36	44
393616	127	12	38	30	90
393617	126	12	36	30	92
393618	125	12	44	71	97
393619	124	12	69	92	97
Control	N/A	N/A	28	23	44

Aunque todos los compuestos condujeron a un incremento de la inclusión del exón 7, los compuestos con sitios diana entre los nucleótidos 121 y 129 (SEC ID Nº 1) fueron más eficaces.

Se evaluaron adicionalmente determinados compuestos dirigidos al intrón 7 sobre la inclusión del exón 7 de SMN2 tras la transfección a una dosis baja de oligonucleótido de 0,1 µM. Como se ha descrito anteriormente, las células HEK293 se sometieron a electroporación con ISIS 393605, ISIS 393606, ISIS 390648, ISIS 393607, ISIS 393608, ISIS 393609, ISIS 393617, ISIS 393618 o ISIS 393619 y se determinaron los niveles de los productos de corte y empalme de SMN2 endógena. Los resultados se muestran en la tabla 14.

Tabla 14

Efecto sobre la incorporación del exón 7 tras tratamiento con dosis baja			
Nº ISIS	Sitio diana	Longitud	% de inclusión en SMN2 endógena
393605	127	15	56
393606	126	15	58
390648	125	15	60
393607	124	15	60
393608	123	15	63
393609	122	15	53
393617	126	12	51
393618	125	12	51
393619	124	12	57
Control	N/A	N/A	49

5

10

15

20

Como se muestra en la Tabla 14, incluso a una dosis muy baja los compuestos antisentido dirigidos al intrón 7 son eficaces en la estimulación de la inclusión del exón 7. En conjunto, estos resultados sugieren que la región cerca del extremo 5' del intrón 7 (que abarca los nucleótidos 121-129 de la SEC ID Nº 1) contiene un silenciador de corte y empalme intrónico.

25

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Isis Pharmaceuticals, Inc SEQUENCE LISTING cold spring Harbor Laboratory Brenda F. Baker Adrian R. Krainer Yimin Hua

30

<120> COMPOSICIONES Y PROCEDIMIENTOS PARA MODULAR EL CORTE Y EMPALME DE SMN2

<130> CORE0058WO

35

<150> 60/693.542

<151> 23-06-2005

<160> 114

<170> FastSEQ para Windows versión 4.0

40

<210> 1

<211> 174

<212> ADN

<213> Homo sapiens

45

<400> 1

```

atatatagct atctatatct atatatagctat tttttttaac ttcctttatt ttccttacag 60
ggttttagac aaaatcaaaa agaaggaagg tgctcacatt ctttaaatta aggagtaagt 120
ctgccagcat tatgaagtg aatcttactt ttgtaaaact ttatgggttg tgga 174
    
```

50

<210> 2

<211> 15

<212> ADN

55

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Compuesto antisentido

60

<400> 2

tagatagcta tatat 15

<210> 3

<211> 15

<212> ADN

65

<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Compuesto antisentido

5 <400> 3
 atagatagct atata 15

<210> 4
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> Compuesto antisentido

15

<400> 4
 tatagatagc tatat 15

<210> 5
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> Compuesto antisentido

25

<400> 5
 atatagatag ctata 15

30

<210> 6
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> Compuesto antisentido

<400> 6
 gatatagata gctat 15

40

<210> 7
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <223> Compuesto antisentido

<400> 7
 atagatagct at 12

50

<210> 8
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55

<220>
 <223> Compuesto antisentido

<400> 8
 agatagat agcta 15

60

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

65

<220>
 <223> Compuesto antisentido
 5 <400> 9
 tatagatagc ta 12
 <210> 10
 <211> 15
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Compuesto antisentido
 15 <400> 10
 tagatataga tagct 15
 <210> 11
 <211> 12
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Compuesto antisentido
 25 <400> 11
 atatagatag ct 12
 <210> 12
 <211> 15
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Compuesto antisentido
 35 <400> 12
 atagatatag atagc 15
 <210>
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Compuesto antisentido
 <400> 13
 gatatagata gc 12
 <210> 14
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Compuesto antisentido
 50 <400> 14
 tatagatata gatag 15
 <210> 15
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> Compuesto antisentido
 60 <400> 14
 tatagatata gatag 15
 <210> 15
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65

<220>
 <223> Compuesto antisentido

5 <400> 15
 agatatagat ag 12

<210> 16
 <211> 15
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Compuesto antisentido

15 <400> 16
 atatagatata agata 15

<210> 17
 <211> 12
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Compuesto antisentido

25 <400> 17
 tagatataga ta 12

<210> 18
 <211> 15
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Compuesto antisentido

35 <400> 18
 tatatagata tagat 15

<210> 19
 <211> 12
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Compuesto antisentido

<400> 19
 50 atagatagat at 12

<210> 20
 <211> 12
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Compuesto antisentido

<400> 20
 60 tatagata ga 12

<210> 21
 <211> 12
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Compuesto antisentido

5 <400> 21
 atatagatat ag 12

<210> 22
 <211> 15
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Compuesto antisentido

15 <400> 22
 atagctatat agata 15

<210> 23
 <211> 15
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Compuesto antisentido

25 <400> 23
 iaaaaatagc tatat 15

<210> 24
 <211> 15
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Compuesto antisentido

35 <400> 24
 gttaaaaaaa atagc 15

<210> 25
 <211> 15
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Compuesto antisentido

<400> 25
 45 aggaagttaa aaaaa 15

<210> 26
 <211> 15
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Compuesto antisentido

<400> 26
 55 aataaaggaa gtaa 15

<210> 27
 <211> 15
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<210> 27
 <211> 15
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Compuesto antisentido
 5 <400> 27
 aggaaaataa aggaa 15
 <210> 28
 <211> 15
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Compuesto antisentido
 15 <400> 28
 ctgtaaggaa aataa 15
 <210> 29
 <211> 15
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Compuesto antisentido
 25 <400> 29
 atttgtcta aaacc 15
 <210> 30
 <211> 15
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Compuesto antisentido
 35 <400> 30
 gattttgtct aaaac 15
 <210> 31
 <211> 12
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Compuesto antisentido
 45 <400> 31
 tttgtctaa aa 12
 <210> 32
 <211> 15
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Compuesto antisentido
 55 <400> 32
 tgattttgtc taaaa 15
 <210> 33
 <211> 12
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65

<220>
 <223> Compuesto antisentido

5 <400> 33
 atttgtcta aa 12

<210> 34
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> Compuesto antisentido

15

<400> 34
 ttgatttgt ctaaa 15

<210> 35
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> Compuesto antisentido

25

<400> 35
 gatattgtct aa 12

30

<210> 36
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> Compuesto antisentido

<400> 36
 tttgatttg tctaa 15

40

<210> 37
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <223> Compuesto antisentido

<400> 37
 ttttgatttt gtctaa 16

50

<210> 38
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55

<220>
 <223> Compuesto antisentido

<400> 38
 ttttgatttt gtcta 15

60

<210> 39
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

65

<220>
 <223> Compuesto antisentido
 5 <400> 39
 tgattttgta ta 12
 <210> 40
 <211> 12
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Compuesto antisentido
 15 <400> 40
 ttgattttgt ct 12
 <210> 41
 <211> 15
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Compuesto antisentido
 25 <400> 41
 ttttgattt tgtct 15
 <210> 42
 <211> 12
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Compuesto antisentido
 35 <400> 42
 tttgattttg tc 12
 <210> 43
 <211> 15
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Compuesto antisentido
 45 <400> 43
 cttttgatt ttgta 15
 <210> 44
 <211> 12
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Compuesto antisentido
 55 <400> 44
 ttttgatttt gt 12
 <210> 45
 <211> 12
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65

<220>
 <223> Compuesto antisentido

5 <400> 45
 ttttgattt tg 12

<210> 46
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> Compuesto antisentido

15

<400> 46
 cttcttttg atttt 15

<210> 47
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> Compuesto antisentido

25

<400> 47
 ctttttgatt tt 12

30

<210> 48
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> Compuesto antisentido

<400> 48
 tcttttgat tt 12

40

<210> 49
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <223> Compuesto antisentido

<400> 49
 ccttcctct ttttg 15

50

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

55

<220>
 <223> Compuesto antisentido

<400> 50
 gacaccttc ctct 15

60

<210> 51
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

65

<220>
 <223> Compuesto antisentido

5 <400> 51
 aatgtgagca ccttc 15

<210> 52
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> Compuesto antisentido

15

<400> 52
 taaggaatgt gagca 15

<210> 53
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> Compuesto antisentido

25

<400> 53
 aathtaagga atgtgagc 18

30

<210> 54
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> Compuesto antisentido

<400> 54
 ttaaggaatg tgagc 15

40

<210> 55
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <223> Compuesto antisentido

<400> 55
 taathtaagg aatgtgag 18

50

<210> 56
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55

<220>
 <223> Compuesto antisentido

<400> 56
 ttaaggaat gtgag 15

60

<210> 57
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

65

<220>
 <223> Compuesto antisentido

5 <400> 57
 aaggaatgtg ag 12

<210> 58
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> Compuesto antisentido

15

<400> 58
 ttaatttaag gaatgtga 18

<210> 59
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> Compuesto antisentido

25

<400> 59
 atttaaggaa tgtga 15

30

<210> 60
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> Compuesto antisentido

<400> 60
 taaggaatgt ga 12

40

<210> 61
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <223> Compuesto antisentido

<400> 61
 ctttaatttaa ggaatgtg 18

50

<210> 62
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55

<220>
 <223> Compuesto antisentido

<400> 62
 aatttaagga atgtg 15

60

<210> 63
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

65

<220>
 <223> Compuesto antisentido
 5 <400> 63
 ttaaggaatg tg 12
 <210> 64
 <211> 15
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Compuesto antisentido
 15 <400> 64
 taatttaagg aatgt 15
 <210> 65
 <211> 18
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Compuesto antisentido
 25 <400> 65
 ccttaatta aggaatgt 18
 <210> 66
 <211> 12
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Compuesto antisentido
 35 <400> 66
 ttaaggaat gt 12
 <210> 67
 <211> 15
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Compuesto antisentido
 45 <400> 67
 ttaatttaag gaatg 15
 <210> 68
 <211> 12
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Compuesto antisentido
 55 <400> 68
 atttaaggaa tg 12
 <210> 69
 <211> 15
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65

<220>
 <223> Compuesto antisentido

5 <400> 69
 cttaatttaa ggaat 15

<210> 70
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> Compuesto antisentido

15

<400> 70
 aatttaagga at 12

<210> 71
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> Compuesto antisentido

25

<400> 71
 ccttaatta agгаа 15

30

<210> 72
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> Compuesto antisentido

<400> 72
 taatttaagg aa 12

40

<210> 73
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <223> Compuesto antisentido

<400> 73
 tccttaattt aagga 15

50

<210> 74
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55

<220>
 <223> Compuesto antisentido

<400> 74
 ttaatttaag ga 12

60

<210> 75
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

65

<220>
 <223> Compuesto antisentido

5 <400> 75
 cttaatttaa gg 12

<210> 76
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> Compuesto antisentido

15

<400> 76
 ccttaatta ag 12

<210> 77
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> Compuesto antisentido

25

<400> 77
 tgctggcaga cttac 15

30

<210> 78
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> Compuesto antisentido

<400> 78
 cataatgctg gcaga 15

40

<210> 79
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <223> Compuesto antisentido

<400> 79
 tcataatgct ggcag 15

50

<210> 80
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55

<220>
 <223> Compuesto antisentido

<400> 80
 tcataatgc tggca 15

60

<210> 81
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

65

<220>
 <223> Compuesto antisentido
 5 <400> 81
 ttccataatg ctggc 15
 <210> 82
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Compuesto antisentido
 15 <400> 82
 attcacttc ataatgctgg 20
 <210> 83
 <211> 15
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Compuesto antisentido
 25 <400> 83
 cttccataat gctgg 15
 <210> 84
 <211> 12
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Compuesto antisentido
 35 <400> 84
 tcataatgct gg 12
 <210> 85
 <211> 15
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Compuesto antisentido
 45 <400> 85
 actttcataa tgctg 15
 <210> 86
 <211> 12
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Compuesto antisentido -
 55 <400> 86
 tcataatgc tg 12
 <210> 87
 <211> 15
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65

<220>
 <223> Compuesto antisentido

5 <400> 87
 cactttcata atgct 15

<210> 88
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> Compuesto antisentido

15

<400> 88
 tttcataatg ct 12

<210> 89
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> Compuesto antisentido

25

<400> 89
 tcactttcat aatgc 15

30

<210> 90
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> Compuesto antisentido

<400> 90
 ctttcataat gc 12

40

<210> 91
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <223> Compuesto antisentido

<400> 91
 ttcactttca taatg 15

50

<210> 92
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55

<220>
 <223> Compuesto antisentido

<400> 92
 actttcataa tg 12

60

<210> 93
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

65

<220>
 <223> Compuesto antisentido

5 <400> 93
 attcactttc ataat 15

<210> 94
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> Compuesto antisentido

15

<400> 94
 cactttcata at 12

<210> 95
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> Compuesto antisentido

25

<400> 95
 gattcacttt cataa 15

30

<210> 96
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> Compuesto antisentido

<400> 96
 tcactttcat aa 12

40

<210> 97
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <223> Compuesto antisentido

<400> 97
 ttcactttca ta 12

50

<210> 98
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55

<220>
 <223> Compuesto antisentido

<400> 98
 attcactttc at 12

60

<210> 99
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

65

<220>
 <223> Compuesto antisentido

5 <400> 99
 agtaagattc acttt 15

<210> 100
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> Compuesto antisentido

15

<400> 100
 acaaaagtaa gattc 15

<210> 101
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> Compuesto antisentido

25

<400> 101
 gttttacaaa agtaa 15

30

<210> 102
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> Compuesto antisentido

<400> 102
 ataaagtttt acaaa 15

40

<210> 103
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <223> Compuesto antisentido

<400> 103
 aaaccataaa gtttt 15

50

<210> 104
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55

<220>
 <223> Compuesto antisentido

<400> 104
 tccacaaacc ataaa 15

60

<210> 105
 <211> 10
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

65

<220>
 <223> Sitio de corte y empalme consenso

5 <400> 105
 gtaagtactt 10

<210> 106
 <211> 37
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador

15 <400> 106
 agataaaagg ttaatctaga tccctactag aattctc 37

<210> 107
 <211> 37
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador

25 <400> 107
 gagaattcta gtaggatct agattaacct ttatct 37

<210> 108
 <211> 24
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador

35 <400> 108
 aattgctaac gcagtcagtg cttc 24

<210> 109
 <211> 33
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Cebador

<400> 109
 50 aatatgatca gcaaaacaaa gtcacataac tac 33

<210> 110
 <211> 42
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador

60 <400> 110
 gtgactttgt tttgctgatc atattttgtt gaataaaata ag 42

<210> 111
 <211> 24
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador
 5 <400> 111
 aatgtatctt atcatgtctg ctcg 24
 <210> 112
 <211> 24
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 15 <400> 112
 aatgtatctt atcatgtctg ctcg 24
 <210> 113
 <211> 38
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 25 <400> 113
 aagtacttac ctgtaacgct tcacattcca gatctgtc 38
 30 <210> 114
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Compuesto antisentido
 <400> 114
 40 ttgtattcta tgttt 15
 45
 50
 55
 60
 65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un oligonucleótido antisentido dirigido al intrón 7 de una molécula de ácido nucleico que codifica SMN2, en el que dicho oligonucleótido tiene una longitud de hasta 20 nucleótidos y comprende una modificación 2'-O-metoxietilazúcar en cada posición, en el que la secuencia de nucleótidos de dicho oligonucleótido comprende la SEC ID N°: 83, SEC ID N°: 85, SEC ID N°: 87 o SEC ID N°: 89.
- 10 2. El oligonucleótido de la reivindicación 1, en el que el oligonucleótido comprende al menos una 5-metilcitosina, y opcionalmente todos los residuos de citosina son 5-metilcitosinas.
3. El oligonucleótido de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el oligonucleótido es una sal farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente una sal de sodio
- 15 4. El oligonucleótido de cualquier reivindicación anterior, en el que la secuencia de nucleótidos de dicho oligonucleótido:
- (a) comprende no más del 5% de discrepancias de emparejamiento de bases en relación con la SEC ID N° 1;
- o
- (b) no contiene discrepancias de emparejamiento de bases en relación a la SEC ID N° 1.
- 20 5. El oligonucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 que tiene 15 nucleótidos de longitud.
6. El oligonucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 que tiene 18 nucleótidos de longitud.
- 25 7. El oligonucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 que tiene 20 nucleótidos de longitud.
8. El oligonucleótido de cualquier reivindicación anterior, que comprende al menos un enlace internucleosídico modificado, y opcionalmente comprende al menos un enlace fosforotioato.
- 30 9. Un procedimiento de promover la inclusión de exón 7 en los transcritos de SMN2 en una célula, tejido u órgano, que comprende poner en contacto dicha célula, tejido u órgano *in vitro* con el oligonucleótido antisentido de cualquiera de las reivindicaciones 1-8.
- 35 10. Un oligonucleótido antisentido de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para su uso en terapia, y opcionalmente para su uso en el tratamiento de atrofia muscular espinal.
11. El uso de un oligonucleótido antisentido de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de atrofia muscular espinal.
- 40 12. Una composición farmacéutica que comprende el oligonucleótido antisentido de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 y un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

45

50

55

60

65