

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 699 891**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/113** (2010.01)

**C07H 21/00** (2006.01)

**A61K 31/7088** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.06.2009** **E 15155831 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.09.2018** **EP 2937358**

54 Título: **Métodos para tratar la esclerosis múltiple usando oligonucleótidos antisentido**

30 Prioridad:

**23.06.2008 US 132973 P**

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

**13.02.2019**

73 Titular/es:

**ANTISENSE THERAPEUTICS LTD (100.0%)**  
**6 Wallace Avenue**  
**Toorak VIC 3142, AU**

72 Inventor/es:

**KLINGER, ETY;**  
**TESSLER, SHOSHI;**  
**HALLAK, HUSSEIN;**  
**TACHAS, GEORGE y**  
**DIAMOND, MARK PAUL**

74 Agente/Representante:

**DEL VALLE VALIENTE, Sonia**

ES 2 699 891 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Métodos para tratar la esclerosis múltiple usando oligonucleótidos antisentido

5 Es solicitud reivindicada el beneficio de la solicitud de patente provisional estadounidense con n.º de serie 61/132.973 presentada el 23 de junio de 2008.

10 A lo largo de esta solicitud, se hace referencia a diversas publicaciones mediante números arábigos entre paréntesis. La cita completa de la referencia correspondiente aparece al final de la memoria descriptiva y antes de las reivindicaciones.

**Campo y antecedentes de la invención**

15 La presente invención se refiere a métodos de tratamiento de la esclerosis múltiple, particularmente formas recurrentes de esclerosis múltiple.

Esclerosis múltiple

20 La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad neurológica común que afecta a más de un millón de personas en todo el mundo. Su tasa de prevalencia varía entre razas y latitud geográfica, oscilando entre más de 100 por cada 100.000 en Europa del Norte y Central y 50 por cada 100.000 en el sur de Europa. La EM es la causa más común de discapacidad neurológica en adultos jóvenes y de mediana edad. Normalmente, la enfermedad se vuelve evidente antes de los 30 años de edad en aproximadamente el 50% de los pacientes; en el 25% de los pacientes el inicio de la enfermedad está entre los 30 y 40 años de edad, y en el 25% la enfermedad aparece entre los 40 y 50 años de edad. La razón de mujeres con respecto a hombres es de 2:1(4).

30 La EM y el daño neurológico resultante tienen un gran impacto físico, psicológico, social y financiero en los pacientes y en sus familias. Los síntomas clínicos más comunes de EM son paresia, parestesia, deficiencia visual, disfunción sexual, intestinal y urinaria, espasticidad y descoordinación. Del 40 al 50% de los pacientes padecen disfunciones cognitivas. El grado de déficit neurológico, la tasa de progresión y la frecuencia de recaídas son muy variables entre los individuos afectados (2-3).

35 La mayoría de pacientes con EM tienen una vida normal marcada por numerosos años de discapacidad progresiva grave. Las causas de muerte en pacientes con EM son infecciones de las vías respiratorias o urinarias en vez de la propia enfermedad. Hay varios tipos diferentes de EM: esclerosis múltiple recurrente-remite (EMRR), que se caracteriza por episodios agudos impredecibles de disfunción neurológica (recaídas), seguido por recuperación variable y periodos de estabilidad clínica. Del 80% al 85% de los pacientes con EM son diagnosticados con EMRR. Más del 50% de los pacientes que tienen EMRR desarrollan deterioro mantenido con o sin recaídas superpuestas; esta forma se denomina EM secundaria progresiva (EMSP). Algunos pacientes con EM que desarrollan un deterioro progresivo desde el inicio, también pueden desarrollar recaídas más adelante; esta forma poco común se denomina esclerosis múltiple primaria progresiva-recurrente (2-3).

45 Aproximadamente el 15% de los pacientes generales con EM desarrollan un deterioro mantenido de su función neurológica desde el inicio. Esta forma se conoce como EM primaria progresiva o EMPP. El diagnóstico es actualmente según los criterios de McDonald (1). El resultado de una evaluación de diagnóstico es o bien "esclerosis múltiple", "posible EM" (para aquellos en riesgo de EM, pero para los que la evaluación de diagnóstico es equívoca) o bien "no EM" (1). Finalmente, el término síndrome clínicamente aislado (SCA) se aplica a aquellos pacientes que han sufrido un primer ataque clínico pero que no cumplen con los criterios de diagnóstico clásicos para EM segura. Hoy en día, la presencia de nuevas lesiones en una segunda IRM realizada al menos con tres meses de diferencia, es un criterio aceptado para un diagnóstico de EM en estos pacientes. El 10%-20% de pacientes con un síndrome aislado no desarrollará EM.

55 La EM es una enfermedad inflamatoria que daña la mielina en el sistema nervioso central (SNC) provocando deterioro neurológico y, frecuentemente, discapacidad grave. La etiología de EM sigue siendo principalmente desconocida. Se asume generalmente que la EM está desencadenada por una combinación de autoinmunidad, infección y predisposición genética (2-3). La respuesta autoinmunitaria contra componentes de mielina a través de la activación de linfocitos T CD4+, pérdida de regulación adecuada de linfocitos Th1/Th2, producción de anticuerpos anti-mielina por linfocitos B, y posiblemente, inhibición de linfocitos T citotóxicos/supresores CD8+ subyacen la patogénesis de la EM.

60 La EM se caracteriza por regiones dispersas de inflamación dentro la sustancia blanca del SNC, cerebro y médula espinal. Los eventos inflamatorios focales conducen finalmente a desmielinización de las vainas axónicas, degradación de tejido nervioso, y finalmente, a daño neurológico irreversible. Aunque el mecanismo exacto por el cual se inicia el proceso de EM sigue siendo enormemente desconocido, se cree que los antígenos diana de la respuesta autoinmunitaria en EM son parte de la mielina del SNC.

65

No está claro si los diferentes transcurso de esclerosis múltiple descritos se deben a los mismos o diferentes procesos patofisiológicos. Las recaídas se consideran la expresión clínica de lesiones focales inflamatorias agudas mientras que la progresión se considera que refleja la aparición de desmielinización, pérdida axónica y gliosis. La esclerosis múltiple recurrente-remitente y la esclerosis múltiple secundaria progresiva son probablemente diferentes estadios de la misma enfermedad mientras que esclerosis múltiple primaria progresiva puede implicar diferentes procesos.

La proteína básica de la mielina (MBP) y proteína proteolípida (PLP) son los componentes más comunes de la mielina. Además, también se conocen constituyentes menos abundantes de la mielina, tal como glicoproteínas asociadas a la mielina (MAG), glicoproteínas de oligodendrocitos de la mielina (MOG), y  $\alpha$ -B cristalina. Hay un debate en curso sobre la verdadera naturaleza del/de los antígeno(s) diana en la esclerosis múltiple. En general, parece que la implicación de diferentes antígenos conduce a determinadas diferencias en los transcurso de la enfermedad (5-12).

#### 15 Criterios de diagnóstico de esclerosis basados en IRM

Todos los criterios de diagnóstico para establecer el diagnóstico de EM propuestos en los últimos 50 años se basan en tres principios fundamentales: (1) demostración de lesiones desmielinizantes diseminadas en el espacio (DIS); (2) demostración de lesiones desmielinizantes diseminadas en el tiempo (DIT); y (3) exclusión razonable de explicaciones alternativas para la presentación clínica (13).

##### *IRM convencional*

Las técnicas de IRM convencional (cIRM), tal como secuencias ponderadas en T2 y secuencias ponderadas en T1 realizadas con gadolinio, son muy sensibles para detectar placas de EM y pueden proporcionar una evaluación cuantitativa de actividad inflamatoria y carga de lesión.

Los estudios de IRM en pacientes con esclerosis múltiple recurrente-remitente (EMRR) y esclerosis múltiple secundaria progresiva (EMSP), que usan gadolinio-ácido dietiltri-aminopentaacético (Gd-DTPA) como agente de contraste, lo que indica perturbación de la barrera hematoencefálica, han revelado que la actividad de la enfermedad (definida como la presencia de lesiones realizadas con Gd en IRM ponderada en T1) es de 5 a 10 veces más frecuente de lo que es aparente a partir de criterios clínicos solos (14).

##### *IRM no convencional*

La obtención de imágenes ponderadas en T1 no realizada, las mediciones de atrofia del sistema nervioso central, la obtención de imágenes por transferencia de magnetización, la espectroscopía de resonancia magnética de protones, la obtención de imágenes ponderadas por difusión y la obtención de imágenes por resonancia magnética funcional, proporcionan una mejor aproximación del sustrato patológico de las placas de esclerosis múltiple, han aumentado la comprensión de la patogénesis de la enfermedad, y han demostrado ser útiles para estudiar la historia natural de esclerosis múltiple y monitorizar los efectos de nuevos tratamientos (13).

#### Enfoques terapéuticos actuales

La gran mayoría de tratamientos para la esclerosis múltiple son de naturaleza o bien inmunosupresora o bien inmunomoduladora.

##### *Corticosteroides:*

Los corticosteroides acortan la duración de una recaída pero no afectan generalmente al grado de recuperación. Tienen efectos inmunomoduladores y antiinflamatorios inespecíficos que reducen la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE), reducen el edema y mejoran la conducción axónica. Los corticosteroides se usan a menudo para tratar recaídas clínicamente significativas para una recuperación más rápida. Tienen una actividad antiinflamatoria aguda que es a corto plazo y no tienen un efecto sobre el transcurso de la enfermedad a largo plazo.

##### *Interferón beta:*

Se han aprobado dos formas de interferón beta recombinante, beta-1a y beta-1b, para el tratamiento de pacientes con EMRR. El mecanismo de su acción en EM incluye efectos antiproliferativos en linfocitos T; expresión reducida de antígenos de clase II del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), y otras propiedades inmunorreguladoras. El interferón-beta reduce la tasa de recaída en aproximadamente el 30% de pacientes con EMRR con discapacidad de leve a moderada. Pudo demostrarse una reducción principal en lesiones realizadas con Gd en exploraciones de IRM con interferón beta-1b, así como reducción de la progresión de EDSS. El interferón beta se administra como inyección subcutánea (s.c.) o intramuscular (i.m.) una vez o tres veces a la semana, según su tipo. Se asocia con diversos acontecimientos adversos, incluyendo síntomas similares a la gripe, reacciones en el sitio de inyección, elevación de la aminotransferasa en suero y depresión. Se han notificado anticuerpos

neutralizantes en del 5% al 40% de pacientes tratados durante tres años y pueden conducir a eficacia reducida.

*Acetato de glatiramer:*

5 El acetato de glatiramer es un complejo de péptidos sintéticos que se asemejan a la proteína básica de mielina, que ha mostrado una tasa de recaídas anual del 30% en pacientes con EMRR. El acetato de glatiramer se proporciona diariamente mediante inyección s.c.. El efecto secundario más común es reacción en el sitio de inyección, que se ha notificado en hasta el 90% de los pacientes. Otro acontecimiento adverso poco común es un complejo de reacciones tras la inyección inmediatas (IPIR) que incluyen eritema, opresión en el pecho, falta de aliento, palpitaciones y ansiedad.

*Natalizumab:*

15 El natalizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado contra la molécula de adhesión celular  $\alpha$ 4-integrina. El natalizumab se usa en el tratamiento de la esclerosis múltiple y enfermedad de Crohn. Está comercializado conjuntamente por Biogen Idec y Élan como Tysabri, y se nombró previamente Antegren. El natalizumab se administra mediante infusión intravenosa cada 28 días. Se cree que el fármaco actúa reduciendo la capacidad de células inmunitarias inflamatorias para unirse y pasar a través de las capas celulares que revisten los intestinos y la barrera hematoencefálica. Se ha demostrado que el natalizumab es eficaz en el tratamiento de los síntomas de ambas enfermedades, prevención de recaídas, pérdida de visión, empeoramiento cognitivo y mejorar significativamente la calidad de vida en personas con esclerosis múltiple, así como aumentar las tasas de remisión y prevenir recaídas en la enfermedad de Crohn. En 2004, la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos aprobó el natalizumab. Posteriormente, su fabricante lo retiró del mercado tras haberse vinculado con tres casos del estado neurológico poco común leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP) cuando se administra en combinación con interferón beta-1a, otro fármaco inmunosupresor usado a menudo en el tratamiento de la esclerosis múltiple. Tras una revisión de la información de seguridad y sin fallecimientos adicionales, el fármaco volvió al mercado estadounidense en 2006 bajo un programa especial de prescripción. En la Unión Europea, se ha aprobado únicamente para el tratamiento de la esclerosis múltiple.

30 Teoría antisentido

Los oligonucleótidos antisentido (AS-ON) son tramos cortos de nucleótidos o derivados de nucleótido que son complementarios a una región de ARN seleccionado como diana y pueden suprimir específicamente la expresión y otros aspectos tales como procesamiento de este transcrito particular. El/los mecanismo(s) exacto(s) de la acción de AS-ON sigue sin estar claro, pero se sabe que es diferente según el tipo de AS-ON. Generalmente, estas moléculas bloquean la expresión génica mediante hibridación con el ARNm diana, dando como resultado la posterior formación de doble hélice. Este proceso puede ocurrir en cualquier punto, tal como transcripción, inicio de la traducción o durante la traducción. Algunos de los posibles mecanismos son perturbación del corte y empalme, transporte dañado de ARNm, perturbación de la traducción de los transcritos así como estabilidad reducida del transcrito de ARNm. En el caso de muchos oligodeoxirribonucleótidos antisentido (AS-ODN), la ARNasa celular H puede unirse al dúplex ADN-ARN e hidrolizar el ARN, dando como resultado números de transcritos reducidos y producción de proteínas disminuida. Las modificaciones en el resto desoxi en la posición del azúcar 2' prohíben habitualmente el reclutamiento de ARNasa H y la acción en esa región de un AS-ODN (16).

45 Los AS-ON modificados o análogos de AS-ON se emplean a menudo para aplicaciones antisentido *in vivo* debido a su estabilidad aumentada y resistencia a nucleasa. Una semivida sérica más larga garantiza que el AS-ON tiene tiempo suficiente para alcanzar e interactuar con su ARN diana en el tejido. Los AS-ODN con estructuras principales de fosforotioato se usan ampliamente debido a su semivida sérica más larga y al hecho de que son un sustrato de ARNasa H adecuado. Sin embargo, los fosforotioatos presentan alta afinidad por diversas proteínas celulares, que pueden dar como resultado efectos inespecíficos de secuencia. Muchos AS-ON con modificaciones en 2' del azúcar con grupos tales como O-metilo, fluoro, O-propilo, O-alilo, o muchos otros presentan mayor estabilidad de dúplex con su ARNm diana y mayor especificidad pero efectos antisentido en esa región modificada en 2' son habitualmente independientes de ARNasa H. Estas modificaciones crean volumen en la posición 2', haciendo que el impedimento estérico desempeñe un papel significativo en el aumento de la resistencia a nucleasa. Los análogos de nucleótido, tales como ácidos nucleicos peptídicos, son generalmente también resistentes a nucleasa y a menudo demuestran propiedades de hibridación superiores debido a una carga de estructura principal modificada, aunque habitualmente no son sustratos aceptables para ARNasa H (16).

60 El objetivo tradicional del enfoque antisentido con respecto a productos terapéuticos es reducir el nivel de proteínas clave en la patogénesis de la enfermedad. El uso de oligonucleótidos antisentido como productos terapéuticos tiene la posible ventaja de una especificidad mucho mayor en comparación con fármacos de molécula pequeña convencionales. La mayoría de fármacos que se usan actualmente modulan la actividad de proteínas específicas mediante o bien la unión directamente a la proteína de interés o bien mediante la unión a otras proteínas, tales como receptores de la superficie celular, que entonces modulan la proteína diana. Debido al gran número de proteínas relacionadas, clases de actividad y familias de proteína que realizan la misma o una función muy similar, los fármacos de molécula pequeña se unen a menudo a, y afectan a la actividad de, más de una proteína diana. En

cambio, la efectividad de AS-ON se basa en el apareamiento de bases altamente específico entre el oligonucleótido y el ARN diana. Por tanto, la tecnología antisentido permite la selección como diana de un único miembro de una familia de proteínas estrechamente relacionada y el diseño de agentes terapéuticos que presentan menos efectos tóxicos inespecíficos que otros agentes menos selectivos (17-21).

5

#### VLA-4 integrina

Las integrinas son moléculas de adhesión heterodiméricas que desempeñan papeles clave en la activación, tráfico y señalización de leucocitos. La VLA-4 integrina consiste en una cadena  $\alpha 4$  unida de manera no covalente a la subunidad  $\beta 1$ . Se expresa en la mayoría de leucocitos, tanto si se producen en la sangre periférica, tejido linfóide o en sitios de inflamación en diversos órganos.  $\alpha 4\beta 1$  se une a VCAM-1 en el endotelio activado y al segmento CS1 de fibronectina encontrado en la matriz extracelular. Estas interacciones son críticas para la migración de leucocitos a través del endotelio y en tejido inflamados. La unión al ligando mediante integrinas  $\alpha 4$  tiene diversas consecuencias biológicas. El papel mejor conocido de  $\alpha 4$  es su función como molécula de adhesión que guía a los leucocitos a través del endotelio vascular y en sitios de inflamación. Se reclutan leucocitos de la sangre y en tejidos mediante un proceso de múltiples etapas que implica un rodamiento transitorio inicial de células a lo largo del endotelio vascular seguido por adhesión firme y posterior migración transendotelial. La integrina  $\alpha 4$  es única entre las moléculas de adhesión porque puede soportar tanto las etapas de rodamiento como de adhesión (22).

Godfrey, J. *et al.*, Drug Discovery Today, vol. 1, n.º 2, 2004, 85-91 comentan los principales desafíos que se encuentran hoy en día en la validación de diana. El debate se centra en la revolución genómica en curso que está generando un número sin precedentes de dianas potenciales. Las tecnologías existentes, tales como inactivaciones de ratones, tienen problemas para proporcionar el rendimiento ahora requerido. Las herramientas de ácido nucleico incluyen antisentido, interferencia de ARN, ribozimas y aptámeros ofrecen un medio de rendimiento potencialmente superior de manipular la expresión génica y, por tanto, validar dianas en los sistemas biológicos complejos tales como el sistema nervioso central.

Rayburn, E. R. *et al.*, Drug Discover Today, vol. 13, n.º 11-12, 2008, 513-521 comentan oligonucleótidos antisentido que pueden regular la expresión génica en células vivas. Como tal, regulan la función y división celular, y pueden modular respuestas celulares frente a estrés y estímulos internos y externos. Aunque se han obtenido resultados prometedores de estudios preclínicos y clínicos y se ha realizado un progreso significativo en el desarrollo de estos agentes como fármacos, aún no se reconocen como productos terapéuticos eficaces. Todavía quedan por superar varios obstáculos principales, incluyendo problemas con la eficacia, efectos inespecíficos, administración y efectos secundarios. Las lecciones aprendidas del desarrollo de fármacos antisentido pueden ayudar en el desarrollo de otros productos terapéuticos a base de oligonucleótidos tales como oligonucleótidos CpG, iARN y miARN.

Corey, D. R., Nature Chemical biology, vol. 3, n.º 1, 2007, 8-11 comentan sobre la interferencia de ARN que proporciona herramientas potentes para controlar la expresión génica en células cultivadas. Se desconoce si iARN proporcionará fármacos similarmente potentes. Los autores comentan que las lecciones del desarrollo de fármacos de oligonucleótidos antisentido pueden proporcionar algunas pistas.

Tafech, A. *et al.*, Current Medicinal Chemistry, vol. 13, n.º 8, 2006, 863-881 comentan la capacidad para seleccionar como diana ARN, ARNm y ARN viral en particular, ya que la degradación es un enfoque potente en biología molecular y farmacología. Tales enfoques pueden usarse en el estudio de la función génica como en genómica funcional, en la identificación de genes asociados a enfermedad, y para el tratamiento de enfermedades humanas. Esta revisión proporciona una visión actualizada integral de todas las tecnologías disponibles actualmente usadas para la destrucción de ARN, con un enfoque en su potencial terapéutico. Esto incluye enfoques que usan la actividad de proteína ribonucleasas tales como oligonucleótido antisentido, ARN pequeño de interferencia, secuencia de guía externa asociada a ARNasa P, onconasa y ARNasa seminal bovina. Los enfoques específicos de secuencia que no utilizan actividad de proteína ribonucleasas, tales como ribozima y desoxirribozima, también se revisan y comentan. Esta revisión proporciona un contexto de partida útil para los investigadores interesados en usar las metodologías de destrucción de ARN en laboratorio y en la clínica, y sirve como estímulo para desarrollo adicional de tecnologías de degradación de ARN novedosas y más potentes.

Coisne, C. *et al.*, Inflammation and allergy drug targets, vol. 6, n.º 4, 2007, 210-222 comentan el sistema nervioso central (SNC) que sugiere que se ha considerado desde hace tiempo como un órgano inmunitario privilegiado que implica que el sistema inmunitario evita el SNC para no alterar la homeostasis, que es crítica para la función adecuada de las neuronas. Sugieren que está aceptado que las células inmunitarias ganan, en efecto, acceso al SNC y que las respuestas inmunitarias se enmarcan dentro de este tejido. Sin embargo, sugieren que microentorno único del SNC controla estrictamente estas reacciones inmunitarias empezando con la entrada de células inmunitarias de regulación estrecha al tejido. La barrera hematoencefálica endotelial (BHE) y la barrera de líquido cefalorraquídeo sanguíneo epitelial (LCR) controlan la entrada de células inmunitarias en el SNC lo que es raro en estados fisiológicos. Durante una variedad de estados patológicos del SNC tales como infecciones virales o bacterianas o durante enfermedades inflamatorias tales como esclerosis múltiple, sugieren que células inmunocompetentes atraviesan fácilmente la BHE y entran en el SNC.

65

Myers, K. J. *et. al.*, Journal of Neuroimmunology, vol. 160, n.º 1-2. 2005, 12-24 comentan el uso de un oligonucleótido antisentido (ASO) específico para ARNm de la cadena alfa (CD49d) de ratón VLA-4 para regular por disminución la expresión de VLA-4 y alterar la inflamación del sistema nervioso central (SNC). ISIS 17044 redujo de manera potente y específica CD49d ARNm y proteína en líneas celulares y en células T de ratón primarias tratadas *ex vivo*. Cuando se administró profiláctica o terapéuticamente, ISIS 17044 redujo la incidencia y gravedad de síntomas paralíticos en un modelo de encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE). Esto se logró mediante una disminución significativa en el número de células VLA-4+, células T CD4+, y macrófagos presentes en la materia blanca de la médula espinal de ratones con EAE. Se encontró que ISIS 17044 se acumulaba en el tejido linfóide de ratones, y también se detectó oligonucleótido en células endoteliales y células similares a macrófagos en el SNC, aparentemente debido a perturbación de la barrera hematoencefálica durante EAE. Sugieren que estos resultados demuestran la utilidad potencial de oligonucleótidos antisentido administrados por vía sistémica para el tratamiento de inflamación del sistema nervioso central.

15 **Sumario de la invención**

La invención proporciona composiciones farmacéuticas para su uso en un método de tratamiento de la esclerosis múltiple tal como se define en las reivindicaciones. La presente divulgación también establece ("proporciona") varios de otros aspectos y realizaciones tal como se comenta a continuación en el presente documento que pueden facilitar la comprensión de la presente invención, que está definida por las reivindicaciones.

Esta divulgación proporciona un método para tratar un sujeto humano que padece una forma de esclerosis múltiple, que comprende administrar periódicamente al sujeto humano una composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y una cantidad terapéuticamente eficaz de un oligonucleótido que tiene la estructura:



en la que

cada uno de los 19 enlaces internucleótidos del oligonucleótido es un diéster de fosforotioato unido a O,O;

los nucleótidos en las posiciones 1 a 3 del extremo 5' son ribonucleósidos modificados con 2'-O-(2-metoxietilo);

los nucleótidos en las posiciones 4 a 12 del extremo 5' son 2'-desoxirribonucleósidos;

los nucleótidos en las posiciones 13 a 20 del extremo 5' son ribonucleósidos modificados con 2'-O-(2-metoxietilo); y

todas las citosinas son 5-metilcitosinas (<sup>Me</sup>C), o una sal farmacéuticamente aceptable del oligonucleótido,

para tratar de ese modo al sujeto humano.

Esta divulgación también proporciona un método para inhibir la acumulación de nuevas lesiones cerebrales activas en un sujeto humano que padece una forma de esclerosis múltiple detectable mediante IRM, que comprende administrar periódicamente al sujeto humano una composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y una cantidad terapéuticamente eficaz de un oligonucleótido que tiene la estructura:



en la que

cada uno de los 19 enlaces internucleótidos del oligonucleótido es un diéster de fosforotioato unido a O,O;

los nucleótidos en las posiciones 1 a 3 del extremo 5' son ribonucleósidos modificados con 2'-O-(2-metoxietilo);

los nucleótidos en las posiciones 4 a 12 del extremo 5' son 2'-desoxirribonucleósidos;

los nucleótidos en las posiciones 13 a 20 del extremo 5' son ribonucleósidos modificados con 2'-O-(2-metoxietilo); y

todas las citosinas son 5-metilcitosinas (<sup>Me</sup>C), o una sal farmacéuticamente aceptable del oligonucleótido,

para inhibir de ese modo la acumulación de nuevas lesiones cerebrales activas en el sujeto humano detectables mediante IRM.

Esta divulgación proporciona además un método para inhibir un aumento en el volumen de lesiones cerebrales realizadas con gadolinio de un sujeto humano que padece una forma de esclerosis múltiple detectable mediante IRM,

que comprende administrar periódicamente al sujeto humano una composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y una cantidad terapéuticamente eficaz de un oligonucleótido que tiene la estructura:



en la que

- 10 cada uno de los 19 enlaces internucleótidos del oligonucleótido es un diéster de fosforotioato unido a O,O;  
 los nucleótidos en las posiciones 1 a 3 del extremo 5' son ribonucleósidos modificados con 2'-O-(2-metoxietilo);  
 los nucleótidos en las posiciones 4 a 12 del extremo 5' son 2'-desoxirribonucleósidos;  
 15 los nucleótidos en las posiciones 13 a 20 del extremo 5' son ribonucleósidos modificados con 2'-O-(2-metoxietilo); y  
 todas las citosinas son 5-metilcitosinas (<sup>Me</sup>C), o una sal farmacéuticamente aceptable del oligonucleótido,  
 para inhibir de ese modo un aumento en el volumen de lesiones cerebrales realizadas con gadolinio detectables  
 20 mediante imagen de IRM.

Esta divulgación proporciona además un método para reducir el nivel de VLA-4 en la sangre de un sujeto humano que padece una forma de esclerosis múltiple que comprende administrar periódicamente al sujeto humano una  
 25 composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y una cantidad terapéuticamente eficaz de un oligonucleótido que tiene la estructura:



en la que

- 30 cada uno de los 19 enlaces internucleótidos del oligonucleótido es un diéster de fosforotioato unido a O,O;  
 los nucleótidos en las posiciones 1 a 3 del extremo 5' son ribonucleósidos modificados con 2'-O-(2-metoxietilo);  
 35 los nucleótidos en las posiciones 4 a 12 del extremo 5' son 2'-desoxirribonucleósidos;  
 los nucleótidos en las posiciones 13 a 20 del extremo 5' son ribonucleósidos modificados con 2'-O-(2-metoxietilo); y  
 todas las citosinas son 5-metilcitosinas (<sup>Me</sup>C), o una sal farmacéuticamente aceptable del oligonucleótido,  
 40 para reducir de ese modo el nivel de VLA-4 en la sangre del sujeto humano que padece la forma de esclerosis múltiple.

Esta divulgación también proporciona un método para inhibir la progresión de discapacidad en un sujeto humano que padece una forma de esclerosis múltiple, que comprende administrar periódicamente a un sujeto humano que  
 45 padece esclerosis múltiple una composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y cantidad terapéuticamente eficaz de un oligonucleótido que tiene la estructura:



en la que

- cada uno de los 19 enlaces internucleótidos del oligonucleótido es un diéster de fosforotioato unido a O,O;  
 55 los nucleótidos en las posiciones 1 a 3 del extremo 5' son ribonucleósidos modificados con 2'-O-(2-metoxietilo);  
 los nucleótidos en las posiciones 4 a 12 del extremo 5' son 2'-desoxirribonucleósidos;  
 los nucleótidos en las posiciones 13 a 20 del extremo 5' son ribonucleósidos modificados con 2'-O-(2-metoxietilo); y  
 60 todas las citosinas son 5-metilcitosinas (<sup>Me</sup>C), o una sal farmacéuticamente aceptable del oligonucleótido,  
 para inhibir de ese modo la progresión de discapacidad en el sujeto humano.

Esta divulgación proporciona además un método para reducir la tasa de recaída en un sujeto humano que padece una forma recurrente de esclerosis múltiple, que comprende administrar periódicamente al sujeto humano una

composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y una cantidad terapéuticamente eficaz de un oligonucleótido que tiene la estructura:



5 en la que

cada uno de los 19 enlaces internucleótidos del oligonucleótido es un diéster de fosforotioato unido a *O,O*;

10 los nucleótidos en las posiciones 1 a 3 del extremo 5' son ribonucleósidos modificados con 2'-*O*-(2-metoxietilo);

los nucleótidos en las posiciones 4 a 12 del extremo 5' son 2'-desoxirribonucleósidos;

15 los nucleótidos en las posiciones 13 a 20 del extremo 5' son ribonucleósidos modificados con 2'-*O*-(2-metoxietilo); y

todas las citosinas (<sup>Me</sup>C) son 5-metilcitosinas, o una sal farmacéuticamente aceptable del oligonucleótido,

para reducir de ese modo la tasa de recaída en el sujeto humano que padece la forma recurrente de esclerosis múltiple.

20 Esta divulgación proporciona un método para inhibir la acumulación de nuevas lesiones cerebrales activas, reducir o inhibir un aumento en el volumen de lesiones cerebrales realizadas con gadolinio, y reducir la tasa de recaída en un sujeto humano que padece una forma recurrente de esclerosis múltiple, que comprende administrar periódicamente al sujeto humano una composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y una cantidad terapéuticamente eficaz de un oligonucleótido que tiene la estructura:



30 en la que

a) cada uno de los 19 enlaces internucleótidos del oligonucleótido es un diéster de fosforotioato unido a *O,O*;

b) los nucleótidos en las posiciones 1 a 3 del extremo 5' son ribonucleósidos modificados con 2'-*O*-(2-metoxietilo);

35 c) los nucleótidos en las posiciones 4 a 12 del extremo 5' son 2'-desoxirribonucleósidos;

d) los nucleótidos en las posiciones 13 a 20 del extremo 5' son ribonucleósidos modificados con 2'-*O*-(2-metoxietilo); y

40 e) todas las citosinas (<sup>Me</sup>C) son 5-metilcitosinas, o una sal farmacéuticamente aceptable del oligonucleótido,

para inhibir de ese modo la acumulación de nuevas lesiones cerebrales activas, reducir o inhibir un aumento en el volumen de lesiones cerebrales realizadas con gadolinio y reducir la tasa de recaída en un sujeto humano que padece la forma recurrente de esclerosis múltiple.

#### 45 Breve descripción de las figuras

Figura 1: (A, B y C) Ilustra el número acumulativo de nuevas lesiones activas medidas mediante la IRM en el cerebro de pacientes con EMRR en las semanas 4, 8 y 12, tratados con OLIGONUCLEÓTIDO 1 en comparación con placebo. (C) OLIGONUCLEÓTIDO 1 reduce el número de lesiones activas en un 54,4%,  $p=0,01$ .

Figura 2: (A y B) Ilustra el número acumulativo de nuevas lesiones activas medidas mediante la IRM en el cerebro de pacientes con EMRR en las semanas 8 y 12, tratados con OLIGONUCLEÓTIDO 1 en comparación con placebo.

55 Figura 3: (A, B y C) Ilustra el número acumulativo de lesiones en T1 realizadas con gadolinio medidas mediante la IRM en el cerebro de pacientes con EMRR en las semanas 4, 8 y 12, tratados con OLIGONUCLEÓTIDO 1 o que recibieron placebo. (C) OLIGONUCLEÓTIDO 1 reduce el número acumulativo de lesiones en T1 realizadas con gadolinio en un 66,7%,  $p=0,002$ .

60 Figura 4: (A y B) Ilustra el número acumulativo de lesiones en T1 realizadas con gadolinio medidas mediante la IRM en el cerebro de pacientes con EMRR en las semanas 8 y 12, tratados con OLIGONUCLEÓTIDO 1 o que recibieron placebo.

65 Figura 5: (A y B) Ilustra el número acumulativo de lesiones en T2 nuevas o recientemente crecientes medidas mediante el IRM en el cerebro de pacientes con EMRR en las semanas 4, 8 y 12, tratados con OLIGONUCLEÓTIDO 1 o que recibieron placebo.

Figura 6: (A y B) Ilustra la proporción de sujetos libres de lesiones realizadas con gadolinio en las semanas 8 y 12 entre pacientes con EMRR tratados con OLIGONUCLEÓTIDO 1 en comparación con placebo.

5 Figura 7: Ilustra la tendencia en la reducción del volumen acumulativo de lesiones realizadas con gadolinio en T1 en el cerebro de pacientes con EMRR a lo largo del tiempo en el grupo de tratamiento en comparación con placebo.

Figura 8: Ilustra el número de nuevas lesiones activas a lo largo del tiempo en el grupo de tratamiento en comparación con placebo.

10 Figura 9: Datos farmacocinéticos. La mediana de los perfiles de OLIGONUCLEÓTIDO 1 no muestran indicación de niveles de exposición plasmáticos totales o máximos acumulativos desde el día 1 hasta la semana 8.

**Descripción detallada de la invención**

15 Esta invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y una cantidad terapéuticamente eficaz de un oligonucleótido que tiene la estructura:



en la que

- a) cada uno de los 19 enlaces internucleótidos del oligonucleótido es un diéster de fosforotioato unido a O,O;
- 25 b) los nucleótidos en las posiciones 1 a 3 del extremo 5' son ribonucleósidos modificados con 2'-O-(2-metoxietilo);
- c) los nucleótidos en las posiciones 4 a 12 del extremo 5' son 2'-desoxirribonucleósidos;
- 30 d) los nucleótidos en las posiciones 13 a 20 del extremo 5' son ribonucleósidos modificados con 2'-O-(2-metoxietilo);
- y
- e) todas las citosinas (<sup>Me</sup>C) son 5-metilcitosinas, o una sal farmacéuticamente aceptable del oligonucleótido,

35 para su uso en un método de tratamiento de la esclerosis múltiple, comprendiendo dicho método reducir o inhibir la acumulación de nuevas lesiones cerebrales activas, y/o reducir o inhibir un aumento en el volumen de lesiones cerebrales realizadas con gadolinio,

40 en la que la composición farmacéutica va a administrarse periódicamente al sujeto humano para, de ese modo, reducir o inhibir la acumulación de nuevas lesiones cerebrales activas, y/o reducir o inhibir un aumento en el volumen de lesiones cerebrales realizadas con gadolinio, en un sujeto humano que padece esclerosis múltiple.

En una realización, la administración inhibe la progresión de discapacidad en el sujeto humano.

45 En otra realización la progresión de discapacidad se reduce en un 15-70% tal como se mide mediante la puntuación EDSS en relación con la progresión de discapacidad en sujetos humanos que padecen la forma de esclerosis múltiple no tratada de ese modo.

En una realización, la administración inhibe la acumulación de nuevas lesiones cerebrales activas en el sujeto humano detectables mediante IRM.

50 En una realización, el número de nuevas lesiones cerebrales activas detectables mediante IRM es menor en un 25-80% que el número de nuevas lesiones cerebrales activas detectables mediante IRM en un sujeto humano que padece la forma de esclerosis múltiple no tratada con la composición farmacéutica.

55 En una realización, el número de nuevas lesiones cerebrales activas detectables mediante IRM es menor en un 50%-65% después de 8 semanas de tratamiento que el número de nuevas lesiones cerebrales activas detectables mediante IRM en un sujeto humano que padece esclerosis múltiple no tratada de ese modo con la composición farmacéutica. En una realización, la administración periódica es de tres veces a la semana.

60 En una realización, la administración inhibe un aumento en el volumen de lesiones cerebrales realizadas con gadolinio del sujeto humano detectables mediante IRM.

En una realización adicional, la administración da como resultado una disminución en el volumen de lesiones cerebrales realizadas con gadolinio del sujeto humano detectables mediante IRM.

65 En otra realización, el volumen de lesiones cerebrales realizadas con gadolinio del sujeto humano que padece la

forma de esclerosis múltiple es el 25%-80% menos que el volumen de lesiones cerebrales realizadas con gadolinio de un sujeto humano que padece la forma de esclerosis múltiple no tratada con la composición farmacéutica, en la que las lesiones son detectables mediante IRM.

- 5 En una realización adicional, el método de IRM se selecciona del grupo que consiste en exploración ponderada en T2, exploración ponderada en T1 de contraste previo y exploración ponderada en T1 post-gadolinio.
- En una realización, la administración periódica es de dos veces a la semana.
- 10 En otra realización, la administración periódica es de una vez a la semana.
- En una realización adicional, la administración periódica es de una vez cada dos semanas.
- En una realización adicional, la administración periódica es de una vez cada tres semanas.
- 15 En otra realización, la administración periódica es de una vez cada cuatro semanas.
- En aún otra realización, la administración periódica es de una vez al mes.
- 20 En una realización adicional, la administración periódica es de una vez cada dos meses.
- En una realización de esta invención, la cantidad terapéuticamente eficaz es de 200, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400 o 1600 mg.
- 25 En una realización del método, la cantidad eficaz para tratar al sujeto humano es de 50-400 mg.
- En una realización adicional, la cantidad eficaz para tratar al sujeto humano es de 200 mg.
- En una realización para la administración periódica una vez a la semana, la cantidad eficaz para tratar al sujeto humano es de 200 mg.
- 30 En una realización para la administración periódica una vez cada dos semanas, la cantidad eficaz para tratar al sujeto humano es de 200 mg.
- En una realización para la administración periódica una vez cada cuatro semanas, la cantidad eficaz para tratar al sujeto humano es de 400 mg.
- 35 En una realización, el recuento de plaquetas promedio del sujeto humano está por encima de 50.000 plaquetas por microlitro de sangre durante el transcurso de la administración.
- 40 En una realización, el recuento de plaquetas promedio del sujeto humano está por encima de 100.000 plaquetas por microlitro de sangre durante el transcurso de la administración.
- En una realización, el recuento de plaquetas promedio del sujeto humano está por encima de 150.000 plaquetas por microlitro de sangre durante el transcurso de la administración.
- 45 En una realización adicional, la administración es eficaz para proporcionar una  $C_{\text{máx}}$  del oligonucleótido en el plasma del sujeto humano de 10.000-11.000 ng/ml.
- 50 En una realización, la composición farmacéutica se administra por vía subcutánea.
- En otra realización, el oligonucleótido está en forma de una sal de sodio.
- En una realización adicional, el oligonucleótido está en forma de una sal de potasio.
- 55 En aún otra realización, el portador farmacéutico es WFI (agua para inyección) y la composición farmacéutica se ajusta a pH 7,2-7,6. En una realización adicional, el portador farmacéutico es WFI (agua para inyección) y la composición farmacéutica se ajusta a pH 7,4.
- 60 En una realización, la forma de esclerosis múltiple es una forma recurrente de esclerosis múltiple.
- En una realización adicional, la forma de esclerosis múltiple es esclerosis múltiple recurrente-remitente.
- 65 En una realización adicional, la forma de esclerosis múltiple incluye, y OLIGONUCLEÓTIDO 1 trata, al menos uno de los siguientes síntomas: la acumulación de nuevas lesiones cerebrales activas, el aumento en el volumen de lesiones realizadas con gadolinio, discapacidad progresiva, un aumento en la tasa de recaída, neuritis ópticas, visión

borrosa, diplopia, movimiento ocular rápido involuntario, ceguera, pérdida de equilibrio, temblores, ataxia, vértigo, torpeza de una extremidad, falta de coordinación, debilidad de una o más extremidades, tono muscular alterado, rigidez muscular, espasmos, hormigueo, parestesia, sensaciones de quemazón, dolores musculares, dolor facial, neuralgia trigeminal, dolores punzantes y agudos, dolor por quemazón y hormigueo, retraso en el habla, dificultad para hablar, cambios en el ritmo del habla, disfagia, fatiga, problemas de la vejiga (incluyendo urgencia, frecuencia, vaciado incompleto e incontinencia), problemas intestinales (incluyendo estreñimiento y pérdida de control intestinal), impotencia, excitación sexual disminuida, pérdida de sensación, sensibilidad al calor, pérdida de la memoria a corto plazo, pérdida de concentración, o pérdida de juicio o razonamiento. En otra realización, la administración reduce la tasa de recaída en el sujeto humano.

Esta divulgación proporciona además un método para reducir la tasa de recaída en un sujeto humano que padece una forma recurrente de esclerosis múltiple, que comprende administrar periódicamente al sujeto humano una composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y una cantidad terapéuticamente eficaz de un oligonucleótido que tiene la estructura:



en la que

cada uno de los 19 enlaces internucleótidos del oligonucleótido es un diéster de fosforotioato unido a *O,O*;

los nucleótidos en las posiciones 1 a 3 del extremo 5' son ribonucleósidos modificados con 2'-*O*-(2-metoxietilo);

los nucleótidos en las posiciones 4 a 12 del extremo 5' son 2'-desoxirribonucleósidos;

los nucleótidos en las posiciones 13 a 20 del extremo 5' son ribonucleósidos modificados con 2'-*O*-(2-metoxietilo); y

todas las citosinas (<sup>Me</sup>C) son 5-metilcitosinas, o una sal farmacéuticamente aceptable del oligonucleótido,

para reducir de ese modo la tasa de recaída en el sujeto humano que padece la forma recurrente de esclerosis múltiple.

Esta divulgación proporciona además un método para inhibir la acumulación de nuevas lesiones cerebrales activas, reducir o inhibir un aumento en el volumen de lesiones cerebrales realizadas con gadolinio, y reducir la tasa de recaída en un sujeto humano que padece una forma recurrente de esclerosis múltiple, que comprende administrar periódicamente al sujeto humano una composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y una cantidad terapéuticamente eficaz de un oligonucleótido que tiene la estructura:



en la que

a) cada uno de los 19 enlaces internucleótidos del oligonucleótido es un diéster de fosforotioato unido a *O,O*;

b) los nucleótidos en las posiciones 1 a 3 del extremo 5' son ribonucleósidos modificados con 2'-*O*-(2-metoxietilo);

c) los nucleótidos en las posiciones 4 a 12 del extremo 5' son 2'-desoxirribonucleósidos;

d) los nucleótidos en las posiciones 13 a 20 del extremo 5' son ribonucleósidos modificados con 2'-*O*-(2-metoxietilo); y

e) todas las citosinas (<sup>Me</sup>C) son 5-metilcitosinas, o una sal farmacéuticamente aceptable del oligonucleótido,

para inhibir de ese modo la acumulación de nuevas lesiones cerebrales activas, reducir o inhibir un aumento en el volumen de lesiones cerebrales realizadas con gadolinio y reducir la tasa de recaída en un sujeto humano que padece la forma recurrente de esclerosis múltiple

En otra realización del método, el método comprende además inhibir la progresión de discapacidad en el sujeto humano.

En otra realización del método, la progresión de discapacidad se reduce en un 15-70% tal como se mide mediante la puntuación EDSS en relación con la progresión de discapacidad en sujetos humanos que padecen la forma de esclerosis múltiple no tratada de ese modo.

En una realización del método, la forma recurrente de esclerosis múltiple es esclerosis múltiple recurrente-remitente.

- En otra realización, la tasa de recaída se reduce en más del 30% en relación con la tasa de recaída de pacientes no tratados de ese modo.
- 5 En una realización del método, el número de nuevas lesiones cerebrales activas detectables mediante IRM es menor en un 25%-80% que el número de nuevas lesiones cerebrales activas detectables mediante IRM en un sujeto humano que padece la forma de esclerosis múltiple no tratada con la composición farmacéutica.
- 10 En una realización del método, el número de nuevas lesiones cerebrales activas detectables mediante IRM es menor en un 50%-65% después de 8 semanas de tratamiento que el número de nuevas lesiones cerebrales activas detectables mediante IRM en un sujeto humano que padece esclerosis múltiple no tratada de ese modo con la composición farmacéutica.
- 15 En otra realización, el volumen de lesiones cerebrales realizadas con gadolinio del sujeto humano que padece la forma de esclerosis múltiple es el 25%-80% menos que el volumen de lesiones cerebrales realizadas con gadolinio de un sujeto humano que padece la forma de esclerosis múltiple no tratada con la composición farmacéutica, en la que las lesiones son detectables mediante IRM.
- 20 En una realización adicional, el método de IRM se selecciona del grupo que consiste en exploración ponderada en T2, exploración ponderada en T1 de contraste previo y exploración ponderada en T1 post-gadolinio.
- En una realización, la administración periódica es de dos veces a la semana.
- En otra realización, la administración periódica es de una vez a la semana.
- 25 En una realización adicional, la administración periódica es de una vez cada dos semanas.
- En una realización adicional, la administración periódica es de una vez cada tres semanas.
- 30 En otra realización, la administración periódica es de una vez cada cuatro semanas.
- En aún otra realización, la administración periódica es de una vez al mes.
- En una realización adicional, la administración periódica es de una vez cada dos meses.
- 35 En una realización de esta divulgación, la cantidad terapéuticamente eficaz es de 200, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400 o 1600 mg.
- En una realización de esta divulgación, la cantidad eficaz para tratar al sujeto humano es de 50-400 mg.
- 40 En una realización adicional, la cantidad eficaz para tratar al sujeto humano es de 200 mg.
- En una realización del método para administración periódica una vez a la semana, la cantidad eficaz para tratar al sujeto humano es de 200 mg.
- 45 En una realización del método para administración periódica una vez cada dos semanas, la cantidad eficaz para tratar al sujeto humano es de 200 mg.
- En una realización del método para administración periódica una vez cada cuatro semanas, la cantidad eficaz para tratar al sujeto humano es de 400 mg.
- 50 En una realización del método, el recuento de plaquetas promedio del sujeto humano está por encima de 50.000 plaquetas por microlitro de sangre durante el transcurso de la administración.
- 55 En una realización del método, el recuento de plaquetas promedio del sujeto humano está por encima de 100.000 plaquetas por microlitro de sangre durante el transcurso de la administración.
- En una realización del método, el recuento de plaquetas promedio del sujeto humano está por encima de 150.000 plaquetas por microlitro de sangre durante el transcurso de la administración.
- 60 En una realización adicional del método, la administración es eficaz para proporcionar una  $C_{m\acute{a}x}$  del oligonucleótido en el plasma del sujeto humano de 10.000-11.000 ng/ml.
- En una realización del método, la composición farmacéutica se administra por vía subcutánea.
- 65 En otra realización, el oligonucleótido está en forma de una sal de sodio.

En una realización adicional, el oligonucleótido está en forma de una sal de potasio.

En aún otra realización, el portador farmacéutico es WFI (agua para inyección) y la composición farmacéutica se ajusta a pH 7,2-7,6. En una realización adicional, el portador farmacéutico es WFI (agua para inyección) y la composición farmacéutica se ajusta a pH 7,4.

En otra realización, la composición farmacéutica se administra como monoterapia.

En una realización adicional, la composición farmacéutica se administra simultánea o secuencialmente con al menos un agente terapéutico adicional.

En una realización, el agente terapéutico adicional es un corticosteroide, interferón beta-1a, interferón beta-1b, acetato de glatiramer o natalizumab.

En aún otra realización, el agente terapéutico adicional es un corticosteroide.

En una realización adicional, el agente terapéutico adicional es acetato de glatiramer.

Esta divulgación proporciona además un método para reducir el nivel de VLA-4 en la sangre de un sujeto humano que padece una forma de esclerosis múltiple que comprende administrar periódicamente al sujeto humano una composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y una cantidad terapéuticamente eficaz de un oligonucleótido que tiene la estructura:



en la que

cada uno de los 19 enlaces internucleótidos del oligonucleótido es un diéster de fosforotioato unido a *O,O*;

los nucleótidos en las posiciones 1 a 3 del extremo 5' son ribonucleósidos modificados con 2'-*O*-(2-metoxietilo);

los nucleótidos en las posiciones 4 a 12 del extremo 5' son 2'-desoxirribonucleósidos;

los nucleótidos en las posiciones 13 a 20 del extremo 5' son ribonucleósidos modificados con 2'-*O*-(2-metoxietilo); y

todas las citosinas son 5-metilcitosinas (<sup>Me</sup>C), o una sal farmacéuticamente aceptable del oligonucleótido,

para reducir de ese modo el nivel de VLA-4 en la sangre del sujeto humano que padece la forma de esclerosis múltiple.

En una realización del método, el nivel de VLA-4 en la sangre del sujeto humano se reduce en más del 15% en relación con un sujeto humano no tratado de ese modo. En una realización adicional el nivel de VLA-4 en la sangre del sujeto humano se reduce en un 10%-90% en relación con un sujeto humano no tratado de ese modo. El nivel de reducción de VLA-4 en estas realizaciones puede ser, por ejemplo, reducción de ARNm, proteína o VLA-4 de superficie celular. Además, este nivel de reducción puede estar en uno o unos pocos de los subconjuntos de leucocitos en la sangre.

En una realización de esta divulgación, la administración periódica es de tres veces a la semana.

En una realización, la administración periódica es de dos veces a la semana.

En otra realización, la administración periódica es de una vez a la semana.

En una realización adicional, la administración periódica es de una vez cada dos semanas.

En una realización adicional, la administración periódica es de una vez cada tres semanas.

En aún otra realización, la administración periódica es de una vez al mes.

En una realización adicional, la administración periódica es de una vez cada dos meses.

En una realización del método, la cantidad terapéuticamente eficaz es de 200, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400 o 1600 mg.

En una realización del método, la cantidad eficaz para tratar al sujeto humano es de 50-400 mg.

En una realización adicional, la cantidad eficaz para tratar al sujeto humano es de 200 mg.

En una realización del método para administración periódica una vez a la semana, la cantidad eficaz para tratar al sujeto humano es de 200 mg.

5 En una realización del método para administración periódica una vez cada dos semanas, la cantidad eficaz para tratar al sujeto humano es de 200 mg.

10 En una realización del método para administración periódica una vez cada cuatro semanas, la cantidad eficaz para tratar al sujeto humano es de 400 mg.

En una realización del método, el recuento de plaquetas promedio del sujeto humano está por encima de 50.000 plaquetas por microlitro de sangre durante el transcurso de la administración.

15 En una realización del método, el recuento de plaquetas promedio del sujeto humano está por encima de 100.000 plaquetas por microlitro de sangre durante el transcurso de la administración.

20 En una realización del método, el recuento de plaquetas promedio del sujeto humano está por encima de 150.000 plaquetas por microlitro de sangre durante el transcurso de la administración.

En una realización adicional del método, la administración es eficaz para proporcionar una  $C_{m\acute{a}x}$  del oligonucleótido en el plasma del sujeto humano de 10.000-11.000 ng/ml.

25 En una realización del método, la composición farmacéutica se administra por vía subcutánea.

En otra realización, el oligonucleótido está en forma de una sal de sodio.

En una realización adicional, el oligonucleótido está en forma de una sal de potasio.

30 En aún otra realización, el portador farmacéutico es WFI (agua para inyección) y la composición farmacéutica se ajusta a pH 7,2-7,6. En una realización adicional, el portador farmacéutico es WFI (agua para inyección) y la composición farmacéutica se ajusta a pH 7,4.

35 Esta divulgación también proporciona un método para inhibir la acumulación de nuevas lesiones cerebrales activas en un sujeto humano que padece una forma de esclerosis múltiple detectable mediante IRM, que comprende administrar periódicamente al sujeto humano una composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y una cantidad terapéuticamente eficaz de un oligonucleótido que tiene la estructura:



en la que

cada uno de los 19 enlaces internucleótidos del oligonucleótido es un diéster de fosforotioato unido a  $O,O$ ;

45 los nucleótidos en las posiciones 1 a 3 del extremo 5' son ribonucleósidos modificados con 2'- $O$ -(2-metoxietilo);

los nucleótidos en las posiciones 4 a 12 del extremo 5' son 2'-desoxirribonucleósidos;

50 los nucleótidos en las posiciones 13 a 20 del extremo 5' son ribonucleósidos modificados con 2'- $O$ -(2-metoxietilo); y

todas las citosinas son 5-metilcitosinas ( $^{Me}C$ ), o una sal farmacéuticamente aceptable del oligonucleótido,

para inhibir de ese modo la acumulación de nuevas lesiones cerebrales activas en el sujeto humano detectables mediante IRM.

55 Esta divulgación proporciona además un método para inhibir un aumento en el volumen de lesiones cerebrales realizadas con gadolinio de un sujeto humano que padece una forma de esclerosis múltiple detectable mediante IRM, que comprende administrar periódicamente al sujeto humano una composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y una cantidad terapéuticamente eficaz de un oligonucleótido que tiene la estructura:



en la que

65 cada uno de los 19 enlaces internucleótidos del oligonucleótido es un diéster de fosforotioato unido a  $O,O$ ;

los nucleótidos en las posiciones 1 a 3 del extremo 5' son ribonucleósidos modificados con 2'-O-(2-metoxietilo);

los nucleótidos en las posiciones 4 a 12 del extremo 5' son 2'-desoxirribonucleósidos;

los nucleótidos en las posiciones 13 a 20 del extremo 5' son ribonucleósidos modificados con 2'-O-(2-metoxietilo); y

todas las citosinas son 5-metilcitosinas (<sup>Me</sup>C), o una sal farmacéuticamente aceptable del oligonucleótido,

para inhibir de ese modo un aumento en el volumen de lesiones cerebrales realizadas con gadolinio detectables mediante imagen de IRM.

Esta divulgación también proporciona un método para inhibir la progresión de discapacidad en un sujeto humano que padece una forma de esclerosis múltiple, que comprende administrar periódicamente a un sujeto humano que padece esclerosis múltiple una composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y cantidad terapéuticamente eficaz de un oligonucleótido que tiene la estructura:



en la que

cada uno de los 19 enlaces internucleótidos del oligonucleótido es un diéster de fosforotioato unido a O,O;

los nucleótidos en las posiciones 1 a 3 del extremo 5' son ribonucleósidos modificados con 2'-O-(2-metoxietilo);

los nucleótidos en las posiciones 4 a 12 del extremo 5' son 2'-desoxirribonucleósidos;

los nucleótidos en las posiciones 13 a 20 del extremo 5' son ribonucleósidos modificados con 2'-O-(2-metoxietilo); y

todas las citosinas son 5-metilcitosinas (<sup>Me</sup>C), o una sal farmacéuticamente aceptable del oligonucleótido,

para inhibir de ese modo la progresión de discapacidad en el sujeto humano.

Tal como se usa en el presente documento, un "agente terapéutico adicional" es cualquier agente útil para tratar esclerosis múltiple distinto de OLIGONUCLEÓTIDO 1.

Dentro de cualquier intervalo enumerado en este documento, todos los números enteros, y decenas, incluyendo porcentajes de números enteros para porcentajes, se contemplan como realizaciones de esta invención. Por ejemplo, la invención proporciona que la cantidad eficaz para tratar al sujeto humano puede ser de 50-400 mg; mediante esta mención la invención contempla y da a conocer todas las decenas y cantidades en mg de números enteros tales como 51,1, 51,2 ... 399,8, 399,9; 51, 52 ... 398, 399 mg como realizaciones de esta invención. De manera similar, mediante otro ejemplo, la invención proporciona que el número de nuevas lesiones cerebrales activas detectables mediante imagen IRM es menor en un 25-80% que el número de nuevas lesiones cerebrales activas detectables mediante imagen IRM en un sujeto humano que padece esclerosis múltiple no tratado con la composición farmacéutica; mediante esta mención la invención contempla y da a conocer todas las cantidades en % de números enteros tales como el 26%, el 27%, el 28% ... el 78% y el 79% como realizaciones de esta invención. De manera análoga para cada intervalo dado a conocer en esta solicitud.

Una sal farmacéuticamente aceptable tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier forma de sal del gámpero de oligonucleótido 3-9-8 MOE dados a conocer en el presente documento que es apropiado para administrar a un sujeto humano. En particular, puede usarse una sal de potasio o una sal de sodio tal como se ejemplifica en el presente documento.

## Definiciones

### Escala de estado de discapacidad expandida (EDSS) de Kurtzke:

La escala de estado de discapacidad expandida (EDSS) de Kurtzke es un método de cuantificación de la discapacidad en esclerosis múltiple. La EDSS reemplazó a las escalas de estado de discapacidad previas que se usaban para agrupar a personas con EM en los niveles inferiores. La EDSS cuantifica la discapacidad en ocho sistemas funcionales (FS) y permite a los neurólogos asignar una puntuación de sistema funcional (FSS) en cada uno de estos. Los sistemas funcionales son: piramidal, cerebelar, tronco encefálico, sensorial, intestino y vejiga, visual y cerebral (según [www.mult-sclerosis.org/expandeddisabilitystatusscale](http://www.mult-sclerosis.org/expandeddisabilitystatusscale)).

### Escala compuesta funcional de esclerosis múltiple (MSFC):

La escala compuesta funcional de esclerosis múltiple (MSFC) es un instrumento de evaluación cuantitativa, estandarizada, de tres partes para su uso en estudios clínicos, particularmente ensayos clínicos, de EM (23). La MSFC se diseñó para satisfacer tres criterios: multidimensional para reflejar la expresión clínica variada de EM a través de los pacientes y a lo largo del tiempo, las dimensiones deben cambiar de manera relativamente independiente a lo largo del tiempo y un componente debe ser una medida de la función cognitiva. Los tres componentes de la MSFC miden la función de las piernas/ambulacion, función de brazos/manos y función cognitiva. La MSFC mide la discapacidad en pacientes con EM; y se usa en la evaluación de la eficacia de regímenes de tratamiento experimentales o nuevos. La MSFC consiste en diversos elementos diseñados para medir la discapacidad de brazos, piernas y cognitiva e incluye una caminata cronometrada de 25 pies (7,62 m) para medir la movilidad de las piernas, una prueba de clavijas con nueve orificios para medir la función de los brazos y una prueba de adición en serie auditiva estimulada para medir la función cognitiva. (según: [www.nationalmssociety.org/searchresults/index.aspx?pageindex=0&pagesize=20&keywords=msfc](http://www.nationalmssociety.org/searchresults/index.aspx?pageindex=0&pagesize=20&keywords=msfc)).

#### Contraste de imágenes en IRM:

Están implicadas constantes de tiempo en procesos de relajación que establecen un equilibrio tras la excitación por radiofrecuencias. A medida que los núcleos de alta energía se relajan y realinean, emiten energía a tasas que se registran para proporcionar información sobre el material en el que se encuentran. La realineación de los espines nucleares con el campo magnético se denomina *relajación longitudinal* y el tiempo requerido para que un determinado porcentaje de los núcleos del tejido se realineen se denomina "Tiempo 1" o T1 (tiempo de relajación de espín-red), que es normalmente de aproximadamente 1 segundo a 1,5 tesla de fuerza de campo principal. La obtención de imágenes ponderadas en T2 se basa en el desfase local de espines tras la aplicación del pulso de energía transversal; el tiempo de relajación *transversal* se denomina "Tiempo 2" o T2 (tiempo de relajación espín-espín), normalmente < 100 ms para tejido a 1,5 tesla de fuerza de campo principal.

El contraste de imágenes se crea usando una selección de parámetros de adquisición de imágenes que pondera la señal mediante T1 o T2. En el cerebro, la ponderación en T1 provoca que las conexiones nerviosas de la materia blanca aparezcan de color blanco, y las congregaciones de neuronas de la materia gris aparezcan de color gris, mientras que el líquido cefalorraquídeo aparece oscuro. El contraste de "materia blanca", "materia gris" y "líquido cefalorraquídeo" se revierte usando obtención de imágenes en T2.

Tal como se usa en el presente documento, el término IRM se refiere a IRM convencional o no convencional.

#### Lesiones realizadas con Gd:

El término "lesiones realizadas con Gd" se refiere a lesiones que resultan de una descomposición de la barrera hematoencefálica, que aparece en estudios de contraste usando agentes de contraste de gadolinio. El realce con gadolinio proporciona información en cuanto a la edad de una lesión, ya que las lesiones realizadas con Gd se producen normalmente en el plazo de un periodo de seis semanas de formación de la lesión.

#### Imagen IRM ponderada en T1:

El término "imagen IRM ponderada en T1" se refiere a una imagen de RM que enfatiza el contraste en T1 mediante el cual pueden visualizarse lesiones. Áreas anómalas en una imagen IRM ponderada en T1 son "hipointensas" y aparecen como puntos oscuros. Estos puntos son generalmente lesiones más antiguas.

#### Imagen IRM ponderada en T2:

El término "imagen IRM ponderada en T2" se refiere a una imagen de RM que enfatiza el contraste en T2 mediante el cual pueden visualizarse lesiones. Las lesiones T2 representan nueva actividad inflamatoria. La hiperintensidad en T2 refleja una gama de cambios patológicos desde inflamación aguda hasta pérdida axónica irreversible.

#### Recaídas:

Las recaídas se caracterizan por la aparición de síntomas de disfunción neurológica, que aparecen tras un periodo de 30 días de estabilidad o mejora y que duran durante más de 24 horas (sin infección, sin fiebre). El número de recaídas se analiza usando un modelo de regresión logística que controla el tratamiento y la edad.

La "tasa de recaídas" es el número de recaídas confirmadas por tiempo unitario. La "tasa de recaídas anualizada" es el valor medio del número de recaídas confirmadas para cada paciente multiplicado por 365 y dividido entre el número de días con el fármaco de estudio para cada paciente.

#### Progresión de discapacidad:

La progresión de discapacidad se evalúa por medio de escalas válidas, sensibles y fiables tales como EDSS y MSFC. La progresión de discapacidad se mide como el logro de un grado especificado de discapacidad o de un

empeoramiento sostenido de magnitud relevante (1 punto cuando las puntuaciones de EDSS  $\leq$  5,5; 0,5 puntos si la puntuación de nivel inicial es  $>$ 5,5). Alternativamente, puede medirse como el tiempo hasta alcanzar la progresión o la proporción de individuos que han mostrado progresión en un tiempo especificado previamente. Como parámetro de apoyo, la discapacidad también puede expresarse mediante medidas de resumen obtenidas a partir de medidas en serie en visitas programadas, que indican el grado de discapacidad experimentado por el paciente durante un periodo de tiempo, ignorando si está en relación con las recaídas o no.

#### OLIGONUCLEÓTIDO 1:

El OLIGONUCLEÓTIDO 1 es un gápmero de oligonucleótido quimérico modificado con 2'-MOE de estructura principal de fosforotioato de segunda generación diseñado para hibridarse con la región no traducida en 3' del ARNm del antígeno 4 de activación muy tardía humano (ARNm de VLA-4), también conocido como ARNm de CD49d, que codifica para la subunidad alfa-4 de VLA-4. VLA-4 también se conoce como integrina alfa-4 (alfa4 beta1). El OLIGONUCLEÓTIDO 1 inhibe selectivamente la expresión de VLA-4 tanto en células humanas primarias como en varias líneas celulares humanas mediante hibridación con ARNm que codifica para CD49, que es la subunidad  $\alpha$ 4 de VLA-4.

El OLIGONUCLEÓTIDO 1 es la sal de 19-sodio de un oligonucleótido de 3'→5' fosforotioato de 20 meros también denominado gápmero de 3-9-8 MOE que tiene un peso molecular de 7230 Daltons, en el que los nucleótidos en las posiciones 1 a 3 del extremo 5' son ribonucleósidos modificados con 2'-O-(2-metoxietilo) (2'-O-(2-metoxietilribosa); los nucleótidos en las posiciones 4 a 12 del extremo 5' son 2'-desoxirribonucleósidos de los cuales todas las citosinas son 5-metilcitosinas; los nucleótidos en las posiciones 13 a 20 del extremo 5' son ribonucleósidos modificados con 2'-O-(2-metoxietilo).

La secuencia del OLIGONUCLEÓTIDO 1 (SEQ ID: 1) es:

5'-<sup>Me</sup>C<sup>Me</sup>UG AGT <sup>Me</sup>CTG TTT <sup>Me</sup>U<sup>Me</sup>C<sup>Me</sup>C A<sup>Me</sup>U<sup>Me</sup>U<sup>Me</sup>C<sup>Me</sup>U-3'.

La fórmula empírica del OLIGONUCLEÓTIDO 1 es:

$C_{233}H_{327}N_{60}O_{129}P_{19}S_{19}Na_{19}$ .

El OLIGONUCLEÓTIDO 1 puede sintetizarse mediante un procedimiento de múltiples etapas que puede dividirse en dos operaciones distintas: síntesis en fase sólida y procesamiento aguas abajo. En la primera operación, se ensambla la secuencia de nucleótidos del OLIGONUCLEÓTIDO 1 a través de un sintetizador en fase sólida controlado por ordenador. El procesamiento aguas abajo posterior incluye etapas de desprotección, purificación cromatográfica en fase inversa (RP) preparativa, aislamiento y secado para producir la sustancia farmacológica de OLIGONUCLEÓTIDO 1. La síntesis química del OLIGONUCLEÓTIDO 1 utiliza química de acoplamiento de fosforamidita seguido por sulfurización oxidativa e implica el acoplamiento secuencial de monómeros activados a un oligómero en alargamiento, cuyo extremo 3' terminal está unido covalentemente al soporte sólido.

#### Destritilación (reacción a)

Cada ciclo de la síntesis en fase sólida comienza con la eliminación del grupo protector de 5'-O-4,4'-dimetoxitritilo (DMT) lábil a ácido del nucleósido 5' terminal del oligonucleótido unido al soporte. Esto se logra mediante tratamiento con una disolución de ácido (por ejemplo ácido dicloroacético (DCA) en tolueno). Tras la destritilación, se retira el reactivo en exceso del soporte lavando con acetonitrilo en la preparación para la siguiente reacción.

#### Acoplamiento (reacción b)

El alargamiento de la cadena se logra mediante la reacción del grupo 5'-hidroxilo del oligonucleótido unido al soporte con una disolución de la fosforamidita correspondiente a esa posición de base particular (por ejemplo para B<sub>2</sub>: MOE-<sup>Me</sup>C amidita) en presencia de un activador (por ejemplo, 1H-tetrazol). Esto da como resultado la formación de una unión fosfito-triéster entre el sintón de nucleótido entrante y la cadena de oligonucleótido unida al soporte. Tras la reacción de acoplamiento, se retira el reactivo en exceso del soporte lavando con acetonitrilo en la preparación para la siguiente reacción.

#### Sulfurización (reacción c)

La unión fosfito-triéster recién formada se convierte en el correspondiente triéster de fosforotioato de (O,O,O)-trialquilo mediante tratamiento con una disolución de un reactivo de transferencia de azufre (por ejemplo, disulfuro de fenilacetilo). Tras la sulfurización, se retira el reactivo en exceso del soporte lavando con acetonitrilo en la preparación para la siguiente reacción.

Ocupación de extremos (reacción d)

Una pequeña proporción de los grupos 5'-hidroxilo disponibles en cualquier ciclo dado no pueden extenderse. El acoplamiento de estos grupos en cualquiera de los ciclos posteriores daría como resultado la formación de impurezas relacionadas con el procedimiento ('(n-1)-meros con DMT') que son difíciles de separar del producto deseado. Para impedir la formación de estas impurezas y facilitar la purificación, se introduce un 'reactivo de ocupación de extremos' (por ejemplo anhídrido acético y *N*-metilimidazol/acetónitrilo/piridina) en el recipiente del reactor para dar secuencias con extremos ocupados. Las secuencias erróneas resultantes ('oligonucleótidos cortos sin DMT') se separan del producto deseado mediante purificación por HPLC en fase inversa. Tras la reacción de ocupación de extremos, se retira el reactivo en exceso del soporte lavando con acetónitrilo en la preparación de la siguiente reacción.

La reiteración de este ciclo de cuatro etapas básico usando la fosforamidita de nucleósido protegida apropiada permite el ensamblaje de toda la secuencia de OLIGONUCLEÓTIDO 1 protegido.

#### Desprotección de la estructura principal (reacción e)

Tras la finalización de la parte de ensamblaje del procedimiento, los grupos cianoetilo que protegen las uniones entre nucleótidos de triéster de fosforotioato de (*O,O,O*)-trialquilo se retiran mediante tratamiento con una disolución de trietilamina (TEA) en acetónitrilo. El reactivo y el acrilonitrilo generados durante esta etapa se retiran lavando la columna con acetónitrilo.

#### Escisión del soporte y desprotección de bases (reacción f)

La desprotección de los grupos amino exocíclicos y la escisión del producto en bruto del soporte se logra mediante incubación con hidróxido de amonio acuoso (reacción f). La purificación del producto protegido con 5'-*O*-DMT, en bruto se logra mediante cromatografía de líquidos de alta presión en fase inversa (RP-HPLC). La etapa de RP-HPLC retira las secuencias erróneas sin DMT. El perfil de elución se monitoriza mediante espectroscopía de absorción de UV. Se recogen las fracciones que contienen producto de OLIGONUCLEÓTIDO 1 con DMT y se analizan.

#### Desprotección ácida (reacción g)

Las fracciones de RP-HPLC que contienen OLIGONUCLEÓTIDO 1 protegido con 5'-*O*-DMT se agrupan y se transfieren a un tanque de precipitación. Los productos obtenidos de la purificación de varias síntesis se combinan en esta fase del procedimiento. El OLIGONUCLEÓTIDO 1 con DMT purificado se trata con ácido (por ejemplo, ácido acético) para eliminar el grupo DMT unido al extremo 5' terminal. Tras la exposición a ácido durante el tiempo prescrito y la neutralización, se aísla y se seca la sustancia farmacológica OLIGONUCLEÓTIDO 1.

Tras la etapa de desprotección ácida final (*reacción g*), la disolución se neutraliza mediante la adición de hidróxido de sodio acuoso y la sustancia farmacológica OLIGONUCLEÓTIDO 1 se precipita de la disolución añadiendo etanol. Se permite que el material precipitado se asiente en el fondo del recipiente de reacción y se decante el sobrenadante etanólico. El material precipitado vuelve a disolverse en agua purificada y el pH de la disolución se ajusta a entre pH 7,2 y 7,3. La etapa de precipitación se repite. El material precipitado se disuelve en agua y la disolución se filtra a través de un filtro de 0,45 micrómetros y se transfiere a bandejas de polipropileno desechables que entonces se cargan en un liofilizador. Se enfría la disolución hasta -50°C. El secado primario se lleva a cabo a 25°C durante 37 h. La temperatura se aumenta hasta 30°C y se realiza una etapa de secado secundario durante 5,5 h. Tras la finalización del procedimiento de liofilización, se transfiere la sustancia farmacológica a botellas de polietileno de alta densidad y se almacena a -20°C.

#### Formas de esclerosis múltiple:

Hay cinco estadios y/o tipos de enfermedad distintos de EM:

- 1) esclerosis múltiple benigna;
- 2) esclerosis múltiple recurrente-remitente (EMRR);
- 3) esclerosis múltiple secundaria progresiva (EMSP);
- 4) esclerosis múltiple recurrente progresiva (EMRP); y
- 5) esclerosis múltiple primaria progresiva (EMPP)

La esclerosis múltiple benigna es un diagnóstico retrospectivo que se caracteriza por 1-2 exacerbaciones con recuperación completa, discapacidad no duradera y sin progresión de la enfermedad durante 10-15 años tras la aparición inicial. Sin embargo, la esclerosis múltiple benigna puede progresar a otras formas de esclerosis múltiple.

Los pacientes que padecen EMRR experimentan exacerbaciones o recaídas esporádicas, así como periodos de

remisión. Las lesiones y pruebas de pérdida axónica pueden ser o no visibles en la IRM para pacientes con EMRR.

La EMSP puede evolucionar a partir de la EMRR. Los pacientes que padecen EMSP tienen recaídas, un grado decreciente de recuperación durante las remisiones, remisiones menos frecuentes y déficits neurológicos más prolongados que pacientes con EMRR. Son visibles ventrículos agrandados, que son marcadores de atrofia del cuerpo calloso, línea media central y médula espinal en la IRM de pacientes con EMSP.

La EMPP se caracteriza por una progresión constante de déficits neurológicos crecientes sin ataques o remisiones claros. Son evidentes lesiones cerebrales, daño difuso en la médula espinal y pruebas de pérdida axónica en la IRM de pacientes con EMPP. La EMPP tiene periodos de exacerbaciones agudas al tiempo que prosigue con un transcurso de déficits neurológicos crecientes sin remisiones. Son evidentes lesiones en la IRM de pacientes que padecen PRMS (5).

Un síndrome clínicamente aislado (SCA) es un único ataque monosintomático compatible con EM, tal como neuritis óptica, síntomas del tronco encefálico y mielitis parcial. Los pacientes con SCA que experimentan un segundo ataque clínico se considera generalmente que tienen esclerosis múltiple clínicamente definida (EMCD). Más del 80 por ciento de los pacientes con un SCA y lesiones en IRM continúan desarrollando EM, mientras que aproximadamente el 20 por ciento tienen un proceso autolimitado (24, 25).

La esclerosis múltiple puede presentarse con neuritis óptica, visión borrosa, diplopia, movimiento ocular rápido involuntario, ceguera, pérdida de equilibrio, temblores, ataxia, vértigo, torpeza de una extremidad, falta de coordinación, debilidad de una o más extremidades, tono muscular alterado, rigidez muscular, espasmos, hormigueo, parestesia, sensaciones de quemazón, dolores musculares, dolor facial, neuralgia trigeminal, dolor agudo punzante, dolor por quemazón y hormigueo, ralentización del habla, retraso en el habla, cambios en el ritmo del habla, disfagia, fatiga, problemas de vejiga (incluyendo urgencia, frecuencia, vaciado incompleto e incontinencia), problemas del intestino (incluyendo estreñimiento y pérdida de control intestinal), impotencia, excitación sexual disminuida, pérdida de sensibilidad, sensibilidad al calor, pérdida de la memoria a corto plazo, pérdida de la concentración o pérdida del juicio o razonamiento.

#### Forma recurrente de esclerosis múltiple:

El término EM recurrente incluye:

1) pacientes con EMRR;

2) pacientes con EMSP y recaídas superpuestas; y

3) pacientes con SCA que muestran diseminación de lesiones en exploraciones de IRM posteriores según los criterios de McDonald.

Tal como se usa en el presente documento, las formas recurrentes de esclerosis múltiple incluyen: esclerosis múltiple recurrente-remitente (EMRR), caracterizada por episodios agudos impredecibles de disfunción neurológica (recaídas), seguido por recuperación variable y periodos de estabilidad clínica;

EM secundaria progresiva (EMSP), en la que pacientes que tienen EMRR desarrollan deterioro sostenido con o sin recaídas superpuestas; y

esclerosis múltiple primaria progresiva-recurrente (EMPPR) o esclerosis múltiple progresiva recurrente (EMPR), una forma poco común en la que los pacientes que desarrollan un deterioro progresivo desde el inicio también pueden desarrollar recaídas posteriormente.

Tal como se usa en el presente documento, "transcurso de administración" se refiere a todo el tratamiento desde la primera administración del compuesto y continuando hasta cualquier cese de la administración periódica. Por ejemplo, el compuesto puede administrarse una vez cada mes durante 2 meses, o durante 6 meses, o durante 12 meses, o durante 2 años, etc.

#### Trombocitopenia

La sangre humana contiene de aproximadamente 150.000 a 440.000 plaquetas por microlitro. Puede producirse hemorragia con un traumatismo relativamente menor cuando el recuento de plaquetas desciende por debajo de aproximadamente 50.000 plaquetas por microlitro de sangre. No se producen riesgos graves generalmente hasta que el recuento de plaqueta desciende por debajo de 10.000 a 20.000 plaquetas por microlitro, cuando puede producirse hemorragia sin ninguna lesión (26).

"C<sub>máx.</sub>" se refiere a la concentración máxima o "pico" de un fármaco observada tras su administración. C<sub>mín.</sub> se refiere a la concentración mínima o "valle" de un fármaco observada tras su administración y justo antes de la

administración de una dosis posterior.

### Ejemplos

5 El OLIGONUCLEÓTIDO 1 puede obtenerse mediante el procedimiento dado a conocer en las patentes estadounidenses n.ºs 5.968.826, 6.242.591 y 6.258.790.

#### Ejemplo 1:

10 Evaluación de la eficacia y seguridad de un régimen de tratamiento seleccionado de OLIGONUCLEÓTIDO 1 usando IRM en pacientes con EM recurrente-remitente (EMRR) en comparación con placebo.

15 Se realizó un ensayo de doble ciego, controlado por placebo, multicéntrico, aleatorizado con el fin de demostrar el concepto terapéutico y determinar el perfil farmacocinético del OLIGONUCLEÓTIDO 1 (oligonucleótido antisentido de VLA-4) mediante inyecciones subcutáneas, en 77 sujetos diagnosticados con EMRR (véase la tabla I).

#### Métodos

20 Con el fin de incluirse en el estudio, debe haberseles diagnosticado a hombres y mujeres de 18-55 años de edad esclerosis múltiple recurrente-remitente (EMRR).

- Los pacientes deben tener al menos 9 lesiones T2 o al menos 4 si una está realizada con gadolinio;
- los pacientes deben haber tenido al menos una recaída en el plazo de los últimos 12 meses;
- 25 • los pacientes no deben haber tenido ninguna recaída cuatro semanas antes del comienzo del estudio;
- los pacientes deben tener una puntuación de EDSS de 0-6,0;
- 30 • los pacientes deben poder proporcionar su consentimiento informado por escrito; y
- los pacientes que pueden tener hijos deben usar anticonceptivos fiables tales como esterilización quirúrgica, anticonceptivos orales.

35 Los criterios de exclusión fueron los siguientes:

- Uso de cualquier fármaco en investigación en el plazo de dos meses antes de la inclusión o en el plazo de cuatro meses si el fármaco en investigación es una nueva entidad química;
- 40 • pacientes con enfermedad progresiva;
- pacientes que tienen hallazgos clínicos relevantes concomitantes en IRM que pueden interferir con la evaluación del desenlace;
- 45 • pacientes que se habían tratado con anticuerpos frente a VLA-4, anticuerpos anti-CD4 u otros anticuerpos monoclonales;
- pacientes que se han sometido a irradiación linfóide total en cualquier momento;
- 50 • pacientes que han recibido fármacos inmunomoduladores en el plazo de dos meses o fármacos inmunosupresores en el plazo de seis meses antes de la inclusión;
- pacientes que son positivos para VIH;
- 55 • pacientes que tienen niveles detectables de virus JC en la sangre medidos mediante PCR cuantitativa;
- pacientes con insuficiencia renal que tienen creatinina sérica  $\geq 2,0$  mg/dl;
- 60 • pacientes que tienen antecedentes de enfermedad gastrointestinal, hepática, renal, endocrina, hematológica, metabólica, neurológica (distinta de EM) o psiquiátrica clínicamente relevante;
- pacientes con infecciones que tienen un recuento de linfocitos de  $>3000/\mu\text{l}$ ;
- 65 • pacientes que tienen antecedentes de cualquier hemorragia;
- pacientes que tienen antecedentes de anomalías de la coagulación;

- pacientes que reciben ácido acetilsalicílico (> 300 mg/día) y fenprocumón concomitantes;
- pacientes femeninos que están embarazadas o en lactancia;
- pacientes que tienen antecedentes de drogadicción o alcoholismo;
- pacientes que tienen anomalías clínicamente relevantes en hallazgos físicos en el examen de selección si interfieren con el objetivo del estudio; pacientes que tienen epilepsia;
- sujetos suicidas;
- pacientes que tienen antecedentes de alergia a fármacos y/o hipersensibilidad a fármacos conocida; pacientes que no pueden comunicarse o cooperar con el investigador debido a problemas del lenguaje;
- pacientes que tienen un escaso desarrollo mental o función cerebral alterada;
- pacientes que tienen cualquier estado médico que, a juicio del investigador, podría interferir con los objetivos del estudio;
- pacientes que tienen una participación repetida en el estudio;
- pacientes que tienen una contraindicación para la aplicación del fármaco de estudio;
- pacientes que se han tratado con corticosteroide en el plazo de seis semanas antes de la inclusión y durante el periodo de estudio; y
- los pacientes no deben tener criterios de exclusión para IRM tales como metal incorporado en el cuerpo (por ejemplo implantes), marcapasos cardíacos, válvulas, implantes cocleares, pinzas vasculares del SNC, alergia a medios de contraste (Gd-DTPA).

Tabla I

Poblaciones de pacientes			
Número de pacientes en poblaciones de análisis por grupo de tratamiento			
	Placebo	OLIGONUCLEÓTIDO 1	Total
Pacientes aleatorizados	41 (100%)	36 (100%)	77 (100%)
Población de seguridad (aleatorizados y tratados)	41 (100%)	36 (100%)	77 (100%)
Población de ITT (IRM válida en la selección al menos una IRM tras el nivel inicial)	39 (95,1%)	35 (97,2%)	74 (96,1%)

Tabla II

Características de nivel inicial de los pacientes			
Características de nivel inicial	Estadístico	Placebo N=41	OLIGONUCLEÓTIDO 1 N=36
Edad (años)	Media (DE)	38,0 (9,90)	39,6(8,78)
Género: femenino	n(%)	25 (61,0)	26 (72,2)
masculino	n(%)	16 (39,0)	10 (27,8)
Duración de la EM (años)	Media (DE)	3,76 (4,14)	5,67 (6,48)
Puntuación de EDSS	Media (DE)	2,83 (1,42)	2,49 (1,17)
Lesión T1	Media (DE)	1,1 (2,28)	1,2 (2,58)
Volumen de lesión T1 (mm <sup>3</sup> )	Media (DE)	121 (305,7)	151 (370,6)

*Administración del OLIGONUCLEÓTIDO 1*

36 pacientes elegibles recibieron el OLIGONUCLEÓTIDO 1 de la siguiente manera:

*I. Ciclo de inducción:*

Se les administraron a los pacientes tres dosis de 'inducción' subcutáneas de OLIGONUCLEÓTIDO 1, 200 mg/inyección cada una, los días 1, 4 y 7.

*II. Ciclo de mantenimiento:*

5 Siguió al ciclo de inducción y comprendía la administración subcutánea de 200 mg/inyección de OLIGONUCLEÓTIDO 1 dos veces a la semana (los días 4 y 7 de la semana); duró siete semanas.

*III. Ciclo de terminación del tratamiento:*

10 Siguió al ciclo de mantenimiento; duró ocho semanas.

41 pacientes elegibles recibieron placebo, de una manera similar a OLIGONUCLEÓTIDO 1. 77 pacientes habían completado el estudio.

*Producto de OLIGONUCLEÓTIDO 1*

15 La disolución subcutánea para inyección contenía sólo OLIGONUCLEÓTIDO 1, en WFI (agua para inyección) ajustada a pH 7,4 con ácido o base durante la composición. La disolución era transparente con un color amarillo claro. Estaba envasada en vial de vidrio Flint de tipo I, que se tapó con un cierre de caucho de bromobutilo que tenía un recubrimiento de Teflon® y se selló con un contrasello retirable de aluminio.

20 Los pacientes elegibles se asignaron aleatoriamente a uno de los de los siguientes grupos de tratamiento:

*Grupo de tratamiento A*

Tratamiento activo (OLIGONUCLEÓTIDO 1)	Dosis aplicada total
Inyección subcutánea que contiene OLIGONUCLEÓTIDO 1	3400 mg

25 *Grupo de tratamiento B:*

Tratamiento con placebo (placebo)	Dosis aplicada total
Inyección subcutánea que contiene cloruro de sodio y colorante sólo	3400 mg

30 Cada paciente recibió un envase de paciente que consistía en 34 viales (+ 2 viales de reserva) que contenían 100 mg de OLIGONUCLEÓTIDO 1 o 34 viales (+ 2 viales de reserva) que contenían disolución de placebo cada uno, y 36 jeringas adecuadas para inyección subcutánea. Una etiqueta arrancable estaba unida al envase de paciente.

• Se realizó la IRM de nivel inicial el día -7 del estudio;

35 • se realizó la IRM de la semana 4 tras la 9ª dosis;

• se realizó la IRM de la semana 8 tras la 17ª dosis; y

40 • se realizaron las evaluaciones de la escala de estado de discapacidad expandida (EDSS) de Kurtzke en las visitas 1, 5, 6 y 8 y también cuando se producía una recaída.

*Mediciones*

*Signos vitales:*

45 Se midieron los signos vitales en las visitas 1 y 6. Tras haber permanecido el paciente en posición decúbito supino durante 5 minutos, se midieron la frecuencia cardíaca y tensión arterial sistólica y diastólica en la posición decúbito supino y siempre en el mismo brazo del paciente.

50 *Electrocardiograma (ECG):*

Se realizó un ECG de 12 derivaciones en las visitas 1 y 6 tras haber permanecido el paciente en posición decúbito supino durante 5 minutos.

55 *Muestras de sangre:*

Se recogieron muestras de sangre para determinar parámetros de hematología, química clínica y coagulación de cada paciente para la determinación de los siguientes parámetros en la visita 1 y en las visitas 5, 6 y 8. Se llevó a cabo el análisis de muestras de sangre en laboratorios certificados locales. Se analizó el fragmento Bb del

complemento en Bioscientia en Ingelheim.

• Hematología:

5 Eritrocitos, leucocitos, neutrófilos, plaquetas, hematocrito, hemoglobina, WBC (total), linfocitos, monocitos.

• Química clínica:

10 Sodio, potasio, urea, fosfatasa alcalina, glucosa,  $\gamma$ -GT, SGOT, SGPT, bilirrubina total, proteína total, creatinina.

• Parámetros de coagulación:

Tiempo de tromboplastina parcial, PT, TT.

15 • Muestras de sangre para células CD8+ / CD4+:

Se recogieron en las visitas 2, 6, 7 y 8. Se llevaron a cabo ensayos de células CD8+ / CD4+ en la Universidad de Essen.

20 • Muestras de sangre para la monitorización del virus JC:

Se recogieron en las visitas 1, 5, 6, 7 y 8. Se realizó la monitorización del virus JC mediante análisis de qPCR de plasma en una base continuada y se habían almacenado congeladas células de la capa leucocítica para su posible análisis al final del ensayo. El ensayo lo llevó a cabo Bioscientia, Ingelheim.

25 • Muestras de sangre para el examen de VIH:

Se recogieron en la visita 1. El examen de VIH lo llevó a cabo Bioscientia, Ingelheim.

30 *Muestras de orina:*

Se recogieron muestras de orina para la monitorización del virus JC de cada paciente en las visitas 1, 5, 6, 7 y 8. La monitorización del virus JC la llevó a cabo Bioscientia, Ingelheim. Se realizó el análisis de orina en el laboratorio local.

35 *IRM:*

Se realizaron cinco exploraciones de IRM por paciente, tomándose para el parámetro de nivel inicial (día -7), en la semana 4 (tras 9 dosis), semana 8 (tras 17 dosis), semana 12 y semana 16. Se realizó una exploración de IRM adicional en el caso de recaída. Se realizó la evaluación de IRM mediante:

• imágenes ponderadas en T2;

45 • imágenes ponderadas en T1 de precontraste; y

• imágenes ponderadas en T1 post-gadolinio.

Las exploraciones de IRM las analizó el IAC (Image Analysis Centre, VU Medical Centre, Ámsterdam, Países bajos) mediante un lector experimentado ciego a la asignación de tratamiento.

50 Antes del inicio, se le pidió a cada centro que enviara una exploración ficticia para evaluar la calidad de imagen y los procedimientos de envío, y para evaluar la accesibilidad del portador de datos electrónico. Se usó esto para ajustar de manera fina las secuencias de IRM exactas, que eran específicas de proveedor. Sólo tras la aprobación final de la exploración ficticia se permitió a los sitios que iniciaran la exploración de pacientes, sin permitirse desviaciones del protocolo de exploración final para ese sitio particular. Una vez que los pacientes se habían incluido, para cada exploración realizada, se evaluó la calidad en el IAC y se notificó al sitio contribuyente, como parte de un procedimiento de garantía de calidad en curso. Una vez que los datos habían llegado al IAC, se registraron, copiaron y almacenaron. A ambos sitios y monitores se les informó debidamente por fax sobre la aceptación de las exploraciones. Un radiólogo ciego a la asignación de tratamiento e identificación de pacientes completa marcó las lesiones en las copias impresas.

*Adquisición de imágenes IRM:*

65 La posición del paciente se había normalizado poniendo la cabeza del paciente en la bobina de cabeza de un modo bien definido (por ejemplo el puente nasal en el centro). Se minimizó la rotación en el plano coronal centrando un haz de luz horizontal en el centro de la bobina así como a través de la cresta orbital. La cabeza del paciente se

había apoyado dentro de la bobina de cabeza con almohadillas de espuma para minimizar el movimiento del paciente. Rotación en el plano horizontal se había minimizado centrando un haz de luz vertical sobre la nariz. Una línea IV larga conectada a una infusión por goteo con solución salina se había insertado antes de mover el paciente al interior del escáner de modo que pudo inyectarse gadolinio durante la sesión sin mover la mesa (evitando así el movimiento de la cabeza de los pacientes entre secuencias).

Se realizaron todas las secuencias de MR usando cortes de 3 mm de grosor, con un campo de visión (FOV) de 25 cm, y una matriz cuadrada de 256 x 256 para producir píxeles de aproximadamente 1 por 1 mm. La exploración real comenzó con imágenes de localizador de eco de espín (SE) ponderadas en T1 sagitales. Se planearon todas las imágenes transaxiales desde la imagen sagital media, usando 2 x 23 secciones intercaladas con un grosor de 3 mm usando un hueco de 3 mm (100%). Esto dio como resultado en 46 cortes consecutivos con un intervalo Z de 13,8 cm, cubriendo así la cabeza desde el vértice hasta el agujero occipital; el corte del medio de la serie superior estaba alineado con el borde inferior del esplenio del cuerpo calloso.

Se usó un FOV rectangular (por ejemplo 3/4 o 75%). Permitió una reducción proporcional en el número de etapas de codificación de fase (por ejemplo 192 en lugar de 256), siempre que se obtuvieran píxeles cuadrados de 1 x 1 mm sin artefactos de desplegamiento (codificación de fase derecha a izquierda para las imágenes transaxiales). No se emplearon técnicas tales como "semitransformada de Fourier", "porcentaje de exploración reducido" (Philips Healthcare; Best, Países bajos) o "1/2 NEX" (General Electric Healthcare; Tirat Hacarmel, Israel), ya que reducen sustancialmente la razón de señal con respecto a ruido.

La primera secuencia transaxial (tras las exploraciones piloto) fue un eco de espín (SE) convencional ponderado en T1 de precontraste [TR 400-700 ms/TE 5-25 ms/2 excitaciones]. Después de eso, se administró gadolinio-DTPA a una dosis convencional de 0,1 mmol/kg, por medio de la línea IV larga. La segunda serie transaxial fue un eco SE doble [2000-3000 ms/TE1: 15-40 ms, TE2: 60-100 ms/1 excitación]. Cuando se usó SE turbo o rápido, el factor de turbo estaba limitado (por ejemplo 5-6). La tercera secuencia transaxial y final fue un SE convencional ponderado en T1 de postcontraste [400-700 ms/5-25 ms/2 excitaciones].

#### *Farmacocinética:*

##### • Oligonucleótido 1:

Se obtuvieron muestras de sangre (7 ml) en las visitas 2, 5, 6 y 8 para evaluar los niveles en plasma de oligonucleótido 1. En las visitas 2, 5 y 6 se realizó esto antes de y 1, 2, 3, 4 y 6 horas después de la inyección de OLIGONUCLEÓTIDO 1/placebo. En la visita 8 se obtuvo una única muestra. Se centrifugaron las muestras de sangre durante 10 min a 1.600 g y a una temperatura de 4°C 10 min tras la extracción. Se transfirió el sobrenadante a tubos de polipropileno marcados (2 tubos por muestra) mediante pipeteo y se transfirió además a un congelador para almacenar a una temperatura de -20°C (tolerancia +5°C) o inferior.

##### • Mediciones de VLA-4:

Se obtuvieron muestras de sangre en las visitas 2, 6, 7 y 8 para evaluar los niveles de VLA-4. Se necesitaban 36 ml de sangre completa para el ensayo de VLA-4 en linfocitos.

##### • Mediciones de CD8+ / CD4+:

Para la evaluación del recuento de células CD8+ / CD4+, se sometieron a ensayo muestras de sangre en las visitas 2, 6, 7 y 8 usando los 36 ml de muestras de sangre obtenidos para el ensayo de VLA-4.

## Resultados

### *Medida de desenlace primaria*

Los pacientes que habían estado recibiendo 200 mg de OLIGONUCLEÓTIDO 1 dos veces a la semana, mediante una vía de administración subcutánea durante el periodo de estudio, habían mostrado una reducción del 54,4% significativa ( $p=0,01$ ) en el número acumulado de nuevas lesiones activas en el cerebro, incluyendo todas las lesiones medidas en las semanas 4, 8 y 12 mediante la IRM, en comparación con pacientes que habían estado recibiendo placebo (figura 1). Además, los pacientes que se habían tratado con OLIGONUCLEÓTIDO 1 habían mostrado una reducción del 62% ( $p=0,0089$ ) en el número acumulado de nuevas lesiones en el cerebro, medidas en las semanas 8 y 12 mediante la IRM, en comparación con el grupo de placebo (figura 2) Además, los pacientes que se habían tratado con OLIGONUCLEÓTIDO 1 habían mostrado además una reducción del 65% ( $p=0,0053$ ) y una reducción del 74% ( $p=0,0026$ ) en el número acumulado de lesiones T1 realzadas con gadolinio en el cerebro, medidas en las semanas 4, 8 y 12 o en las semanas 8 y 12 mediante la IRM, en comparación con pacientes que habían estado recibiendo placebo respectivamente (figura 3-4). El número acumulado de lesiones T2 nuevas o recién agrandadas en el cerebro medidas mediante la IRM en las semanas 4, 8 y 12 se había reducido también mediante el tratamiento con OLIGONUCLEÓTIDO 1 (figura 5). El tratamiento con OLIGONUCLEÓTIDO 1 había

conducido a un aumento del 32% ( $p=0,0248$ ) en el número de sujetos libres de lesiones realizadas con gadolinio, medidas en las semanas 8 y 12 (figura 6). El efecto máximo de la administración de OLIGONUCLEÓTIDO 1 se había observado durante el ciclo de terminación del tratamiento, en la semana 12 (figura 8). Este hallazgo apunta a una alta estabilidad del OLIGONUCLEÓTIDO 1 y, por tanto, apoya adicionalmente la administración de dosificación menos frecuente y/o dosis inferiores de OLIGONUCLEÓTIDO 1.

*Conclusiones*

Se mostró que el OLIGONUCLEÓTIDO 1, en un ensayo controlado por placebo, de doble ciego era eficaz en la prevención de la acumulación de nuevas lesiones detectables mediante IRM en el cerebro ralentizando de ese modo la progresión de EMRR. Este agente es un primer ejemplo de un oligonucleótido antisentido que se ha demostrado que es eficaz y seguro en el tratamiento de EM.

*Medida de desenlace secundaria*

El criterio de valoración secundario del estudio muestra una disminución acumulada en el volumen de lesiones realizadas con gadolinio medidas mediante IRM (que incluyen todas las lesiones desde las semanas 4, 8 y 12), corregido para el volumen de lesiones realizadas con gadolinio en el nivel inicial, en el cerebro de pacientes que se habían tratado con 200 mg de OLIGONUCLEÓTIDO 1 dos veces a la semana mediante una vía de administración secundaria en un 84% en comparación con el grupo de placebo en la semana 12 (figura 7).

*Medidas adicionales*

*Trombocitopenia*

La trombocitopenia era uno de los problemas de seguridad principales. Se observó este fenómeno con los oligonucleótidos antisentido de la primera generación. Durante el estudio, se observó una disminución en el recuento de plaquetas en todos los pacientes tratados con oligonucleótido 1. 12 pacientes (33%) tuvieron una disminución por debajo de 150.000 en cualquier momento durante el tratamiento; 6 pacientes (17%) tuvieron una disminución clínicamente significativa por debajo de 100.000; 2 pacientes se habían retirado del estudio. Ninguno de los pacientes tuvo episodios hemorrágicos o cualquier otro síntoma clínico relacionado con trombocitopenia. Todos los sujetos presentaron recuperación cuando se retiró el fármaco, indicando que el efecto era rápidamente reversible. Se contempla que el cambio del régimen de tratamiento a una dosificación menos frecuente resuelva este problema al tiempo que mantenga los beneficios terapéuticos.

*Datos farmacocinéticos*

La media de los perfiles de OLIGONUCLEÓTIDO 1 no muestra indicación de acumulación de niveles de exposición en plasma totales o pico desde el día 1 hasta la semana 8 (figura 9 y tabla III).

El aumento en las concentraciones  $C_{min}$  durante la fase de tratamiento sugiere que el OLIGONUCLEÓTIDO 1 se acumula en el tejido con administraciones de múltiples dosis. La disminución en las concentraciones  $C_{min}$  durante la fase de seguimiento sugiere que el  $t_{1/2}$  de eliminación es de aproximadamente 3 semanas.

Tabla III

Parámetros de PK de OLIGONUCLEÓTIDO 1	
$C_{máx.}$	10157 - 10895 ng/ml (media)
$T_{máx.}$	3 h (mediana)
$AUC_{último}$	46587 - 48521 h·ng/ml (media)

Ejemplo 2:

Se realizó otro estudio clínico siguiendo sustancialmente el ejemplo 1 excepto porque la administración de OLIGONUCLEÓTIDO 1 se modifica a los siguientes tres grupos:

- 1) 200 mg por semana;
- 2) 200 mg cada 2 semanas; y
- 3) 400 mg cada 4 semanas.

En este ensayo clínico se obtienen a los del ejemplo 1 con respecto al número acumulado de nuevas lesiones activas y el volumen de lesiones realizadas con gadolinio. Además, se observó también una reducción en la tasa de recaídas e inhibición en la progresión de discapacidad. Además, usando los tres tipos de administración, se limita la trombocitopenia y no se retiran pacientes del ensayo debido a un recuento de plaquetas por debajo de 50.000 por

microlitro de sangre. La mayoría de los pacientes tienen un recuento de plaquetas por encima de 100.000 o 150.000 plaquetas por microlitro de sangre.

#### Bibliografía:

- 5
1. McDonald WI, Compston A, Edan G *et al.*, "Recommended Diagnostic Criteria for Multiple Sclerosis: Guidelines from the International Panel on the Diagnosis of Multiple Sclerosis", *Ann Neurol* 2001; 50:121-127.
  2. CPMP - Committee for Proprietary Medicinal Products. "Note for Guidance on Good Clinical Practice." Londres, enero de 1997; CPMP/ICH/135/95:1-58.
  3. CPMP - Committee for Proprietary Medicinal Products. "Note for Guidance on Clinical Investigation of Medicinal Products for the Treatment of Multiple Sclerosis." Londres, 28 de julio de 1999; CPMP/EWP/561/98:1-10.
  - 15 4. Medizinfo, Multiple Sklerose. Epidemiologie. Disponible de: URL: [www.medizinfo.de/kopfundseele/multiplesklerose/msept.htm](http://www.medizinfo.de/kopfundseele/multiplesklerose/msept.htm)
  5. Johnson D, Hafler DA, Fallis RJ, Lees MB, Brady RO, Quarles RH, Weiner HL., "Cell-mediated immunity to myelin-associated glycoprotein, proteolipid protein, and myelin basic protein in multiple sclerosis.", *J Neuroimmunol.* Noviembre de 1986; 13 (1):99-108.
  - 20 6. Chou YK, Bourdette DN, Offner H, Whitham R, Wang RY, Hashim GA, Vandenbark AA., "Frequency of T cells specific for myelin basic protein and myelin proteolipid protein in blood and cerebrospinal fluid in multiple sclerosis.", *J Neuroimmunol.* Mayo de 1992; 38(1-2):105-13.
  - 25 7. de Rosbo NK, Milo R, Lees MB, Burger D, Bernard CC, Ben-Nun A., "Reactivity to myelin antigens in multiple sclerosis. Peripheral blood lymphocytes respond predominantly to myelin oligodendrocyte glycoprotein.", *J Clin Invest.* Diciembre de 1993; 92(6):2602-8.
  - 30 8. de Rosbo NK, Ben-Nun A., "T-cell responses to myelin antigens in multiple sclerosis; relevance of the predominant autoimmune reactivity to myelin oligodendrocyte glycoprotein.", *J Autoimmun.* Agosto de 1998; 11(4):287-99.
  9. van Noort JM, van Sechel AC, Bajramovic JJ, el Ouagmiri M, Polman CH, Lassmann H, Ravid R., "The small heat-shock protein alpha B-crystallin as candidate autoantigen in multiple sclerosis.", *Nature* 29 de junio de 1995; 375(6534):798-801.
  - 35 10. Pelfrey CM, Tranquill LR, Vogt AB, McFarland HF., "T cell response to two immunodominant proteolipid protein (PLP) peptides in multiple sclerosis patients and healthy controls.", *Mult Scler.* Abril de 1996; 1(5):270-8.
  - 40 11. Diaz-Villoslada P, Shih A, Shao L, Genain CP, Hauser SL., "Autoreactivity to myelin antigens: myelin/oligodendrocyte glycoprotein is a prevalent autoantigen." *J Neuroimmunol.*, 1 de septiembre de 1999; 99(1):36-43.
  - 45 12. Pender MP, Csurhes PA, Greer JM, Mowat PD, Henderson RD, Cameron KD, Purdie DM, McCombe PA, Good MF., "Surges of increased T cell reactivity to an encephalitogenic region of myelin proteolipid protein occur more often in patients with multiple sclerosis than in healthy subjects.", *J Immunol.* 1 de noviembre de 2000; 165(9):5322-31.
  - 50 13. Rovira A', Leo'n A, "MR in the diagnosis and monitoring of multiple sclerosis: An overview.", *Eur J Radiol* (2008).
  14. Van Oosten BW, Lai M, Hodgkinson S, Barkhof F *et al.*, "Treatment of multiple sclerosis with the monoclonal anti-CD4 antibody cM-T412: results of a randomised, double-blind, placebo-controlled MR-monitored phase II trial.", *Neurology.* 1997; 49:351-357.
  - 55 15. Paty DW, Hashimoto SA, Ebers GC., "Management of Multiple Sclerosis and Interpretation of Clinical Trials.", *Multiple Sclerosis / editors, Paty. DW, Ebers GC, Filadelfia,* 1998:457.
  16. Kuang-Yu Jen & Alan M. Gewirtz, "Suppression of Gene Expression by Targeted Disruption of Messenger RNA.", *Stem Cells* 2000; 18:307-319.
  - 60 17. Helene, C. and J.J. Toulme, "Specific regulation of gene expression by antisense, sense and antigene nucleic acids.", *Biochim Biophys Acta,* 1990; 1049(2):99-125.
  - 65 18. Cohen, J.S., "Antisense oligodeoxynucleotides as antiviral agents.", *Antiviral Res,* 1991; 16(2):121-33.
  19. Calabretta, B., "Inhibition of protooncogene expression by antisense oligodeoxynucleotides: biological and

therapeutic implications.”, *Cancer Res*, 1991; 51(17):4505-10.

20. Crooke, S.T., “Progress toward oligonucleotide therapeutics: pharmacodynamic properties.”, *Faseb J*, 1993; 7(6):533-9.

5

21. Crooke, S.T., “Therapeutic applications of oligonucleotides.”, *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1992; 32:329-76.

22. Steinman, L., “Blocking adhesion molecules as therapy for multiple sclerosis: natalizumab.”, *Nature Reviews Drug Discovery* 4, 510-518 (junio de 2005).

10

23. Gary R. Cutter, Monika L. Baier, Richard A. Rudick, Diane L. Cookfair, Jill S. Fischer, John Petkau, Karl Syndulko, Brian G. Weinshenker, Jack P. Antel, Christian Confavreux, George W. Ellison, Fred Lublin, Aaron E. Miller, Stephen M. Rao, Stephen Reingold, Alan Thompson y Ernest Willoughby, “Development of a multiple sclerosis functional composite as a clinical trial outcome measure.”, *Brain* 122:871-882, 1999.

15

24. Brex PA *et al.*, “A longitudinal study of abnormalities on MRI and disability from multiple sclerosis”, *N Engl J Med* 17 de enero de 2002, 346(3):158-64.

25. Frohman EM *et al.*, “The utility of MRI in suspected MS: report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology”, *Neurology*, 9 de septiembre de 2003, 61(5):602-11.

20

26. The Merck Manual of Medical Information, Second Home Edition; Blood Disorders, Bleeding and Clotting Disorders. [www.merck.com/mmhe/print/sec14/ch173/ch173d.html](http://www.merck.com/mmhe/print/sec14/ch173/ch173d.html), última revisión completa mayo de 2006 por Joel L. Moake, MD.

25

27.

**Lista de secuencias**

- <110> Antisense Therapeutics Ltd
- 5 <120> Métodos para tratar esclerosis múltiple usando oligonucleótidos antisentido  
<130> SMK/FP7103443
- 10 <140> Documento EP  
<141> 23-06-2009  
  
<150> Documento EP 09798248.2  
<151> 23-06-2009
- 15 <150> Documento PCT/US2009/003760  
<151> 23-06-2009  
  
<150> Documento US 61/132.973  
<151> 23-06-2008
- 20 <160> 1  
  
<170> PatentIn versión 3.5
- 25 <210> 1  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> artificial
- 30 <220>  
<223> Sintetizado químicamente  
  
<220>  
<221> ribonucleósido modificado y citosina modificada
- 35 <222> (1)..(1)  
<223> 2'-O-(2-metoxietil)ribosa y 5-metilcitosina  
  
<220>  
<221> ribonucleósido modificado con 2'-O-(2-metoxietilo)
- 40 <222> (2)..(3)  
<223> 2'-O-(2-metoxietil)ribosa  
  
<220>  
<221> 2'-desoxirribonucleósido
- 45 <222> (4)..(6)  
<223> 2'-desoxirribonucleósidos  
  
<220>  
<221> 5-metilcitosina
- 50 <222> (7)..(7)  
<223> 5-metilcitosina  
  
<220>  
<221> 2'-desoxirribonucleósido
- 55 <222> (8)..(12)  
<223> 2'-desoxirribonucleósidos  
  
<220>  
<221> ribonucleósido modificado
- 60 <222> (13)..(13)  
<223> 2'-O-(2-metoxietil)ribosa  
  
<220>  
<221> ribonucleósido modificado y citosina modificada
- 65 <222> (14)..(15)  
<223> 2'-O-(2-metoxietil)ribosa y 5-metilcitosina

<220>  
<221> ribonucleósido modificado  
<222> (16)..(18)  
5 <223> 2'-O-(2-metoxietil)ribosa

<220>  
<221> ribonucleósido modificado y citosina modificada  
<222> (19)..(19)  
10 <223> 2'-O-(2-metoxietil)ribosa y 5-metilcitosina

<220>  
<221> ribonucleósido modificado  
<222> (20)..(20)  
15 <223> 2'-O-(2-metoxietil)ribosa

<400> 1  
cugagtctgt ttuccauucu 20

## REIVINDICACIONES

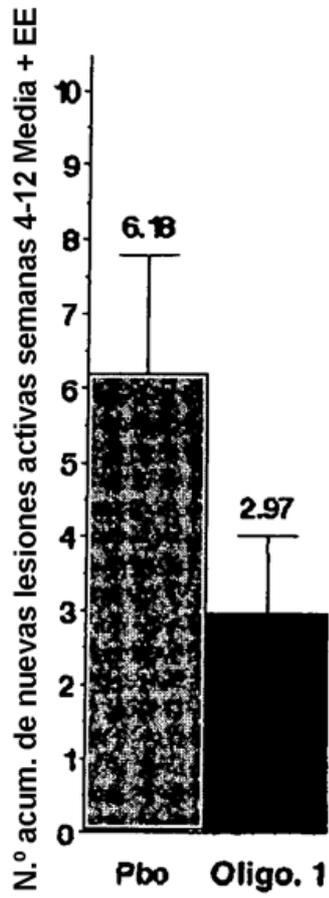
1. Composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y una cantidad terapéuticamente eficaz de un oligonucleótido que tiene la estructura:  
 5'-<sup>Me</sup>C<sup>Me</sup>UG AGT <sup>Me</sup>CTG TTT <sup>Me</sup>U<sup>Me</sup>C<sup>Me</sup>CA<sup>Me</sup>U<sup>Me</sup>U<sup>Me</sup>C<sup>Me</sup>U-3' (SEQ ID NO: 1)  
 en la que
- cada uno de los 19 enlaces internucleótidos del oligonucleótido es un diéster de fosforotioato unido a O,O;
  - los nucleótidos en las posiciones 1 a 3 del extremo 5' son ribonucleósidos modificados con 2'-O-(2-metoxietilo);
  - los nucleótidos en las posiciones 4 a 12 del extremo 5' son 2'-desoxirribonucleósidos;
  - los nucleótidos en las posiciones 13 a 20 del extremo 5' son ribonucleósidos modificados con 2'-O-(2-metoxietilo);
  - y
  - todas las citosinas (<sup>Me</sup>C) son 5-metilcitosinas,
- o una sal farmacéuticamente aceptable del oligonucleótido,  
 para su uso en un método de tratamiento de la esclerosis múltiple, comprendiendo dicho método reducir o inhibir la acumulación de nuevas lesiones cerebrales activas, y/o reducir o inhibir un aumento en el volumen de lesiones cerebrales realizadas con gadolinio,  
 en la que la composición farmacéutica va a administrarse periódicamente al sujeto humano para, de ese modo, reducir o inhibir la acumulación de nuevas lesiones cerebrales activas, y/o reducir o inhibir un aumento en el volumen de lesiones cerebrales realizadas con gadolinio, en un sujeto humano que padece esclerosis múltiple.
2. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, para su uso tal como se define en la reivindicación 1, en la que el número de nuevas lesiones cerebrales activas detectables mediante IRM es:
- el 25%-80% menor que el número de nuevas lesiones cerebrales activas detectables mediante IRM en un sujeto humano que padece esclerosis múltiple al que no se le ha administrado la composición farmacéutica, o
  - el 50%-65% menor después de 8 semanas de tratamiento que el número de nuevas lesiones cerebrales activas detectables mediante IRM en un sujeto humano que padece esclerosis múltiple al que no se le ha administrado la composición farmacéutica.
3. Composición farmacéutica según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, para su uso tal como se define en la reivindicación 1, en la que el volumen de lesiones cerebrales realizadas con gadolinio detectables mediante IRM es el 25%-80% menor que el volumen de lesiones cerebrales realizadas con gadolinio detectables mediante IRM en un sujeto humano que padece esclerosis múltiple al que no se le ha administrado la composición farmacéutica.
4. Composición farmacéutica según la reivindicación 2 o la reivindicación 3, para su uso tal como se define en la reivindicación 1, en la que el método de IRM se selecciona del grupo que consiste en exploración ponderada en T2, exploración ponderada en T1 de contraste previo y exploración ponderada en T1 post-gadolinio.
5. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para su uso tal como se define en la reivindicación 1, en la que la esclerosis múltiple es esclerosis múltiple primaria progresiva, o esclerosis múltiple secundaria progresiva.
6. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para su uso tal como se define en la reivindicación 1, que comprende además inhibir la progresión de discapacidad en el sujeto humano.
7. Composición farmacéutica según la reivindicación 6, para su uso tal como se define en la reivindicación 1, en la que la progresión de discapacidad se reduce en un 15-70% tal como se mide mediante la puntuación EDSS en relación con la progresión de discapacidad en un sujeto humano que padece la forma de esclerosis múltiple al que no se le ha administrado la composición farmacéutica.
8. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para su uso tal como se define en la reivindicación 1, en la que la administración periódica es:
- una vez a la semana,
  - dos veces a la semana,

- iii) una vez cada dos semanas,
- iv) una vez cada tres semanas,
- v) una vez cada cuatro semanas, o
- vi) una vez al mes.

- 5
9. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para su uso tal como se define en la reivindicación 1, en la que la cantidad eficaz para reducir o inhibir la acumulación de nuevas lesiones cerebrales activas, o reducir o inhibir el aumento en el volumen de lesiones cerebrales realizadas con gadolinio, o inhibir la progresión de discapacidad es de:
- 10
- i) 50-400 mg,
  - ii) 200 mg,
  - iii) 400 mg, o
  - iv) de 50 mg a menos de 400 mg.
- 15
10. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para su uso tal como se define en la reivindicación 1, en la que la cantidad eficaz para reducir o inhibir la acumulación de nuevas lesiones cerebrales activas, o reducir o inhibir el aumento en el volumen de lesiones cerebrales realizadas con gadolinio, o inhibir la progresión de discapacidad en el sujeto humano es de:
- 20
- i) 200 mg una vez a la semana,
  - ii) 200 mg una vez cada dos semanas, o
  - iii) 400 mg una vez cada cuatro semanas.
- 25
11. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para su uso tal como se define en la reivindicación 1, en la que el recuento de plaquetas promedio del sujeto humano está por encima de:
- 30
- i) 100.000 plaquetas por microlitro de sangre durante el transcurso de la administración, o
  - ii) 150.000 plaquetas por microlitro de sangre durante el transcurso de la administración.
- 35
12. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, para su uso tal como se define en la reivindicación 1, en la que la administración es eficaz para proporcionar una  $C_{\text{máx}}$  del oligonucleótido en el plasma del sujeto humano de 10.000-11.000 ng/ml.
- 40
13. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, para su uso tal como se define en la reivindicación 1, en la que la composición farmacéutica se administra por vía subcutánea.
- 40
14. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, para su uso tal como se define en la reivindicación 1, en la que el oligonucleótido está en forma de una sal de sodio o una sal de potasio, o en la que
- 45
- i) el portador farmacéutico es WFI (agua para inyección) y la composición farmacéutica se ajusta a pH 7,2-7,6, o
  - ii) el portador farmacéutico es WFI (agua para inyección) y la composición farmacéutica se ajusta a pH 7,4.

**Fig. 1**

A.



B.

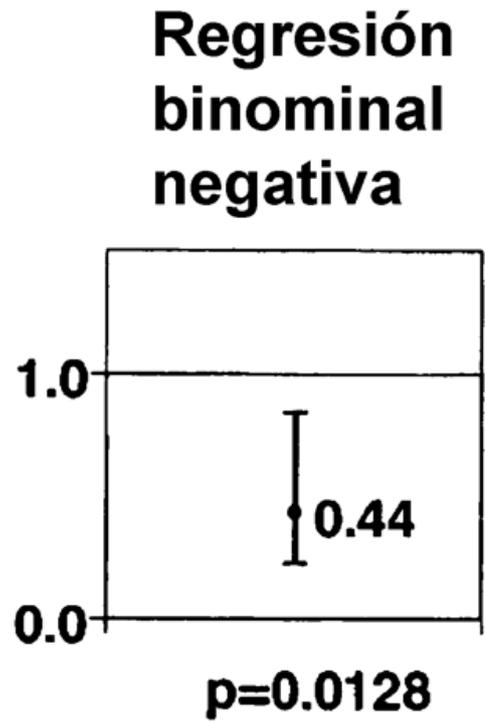
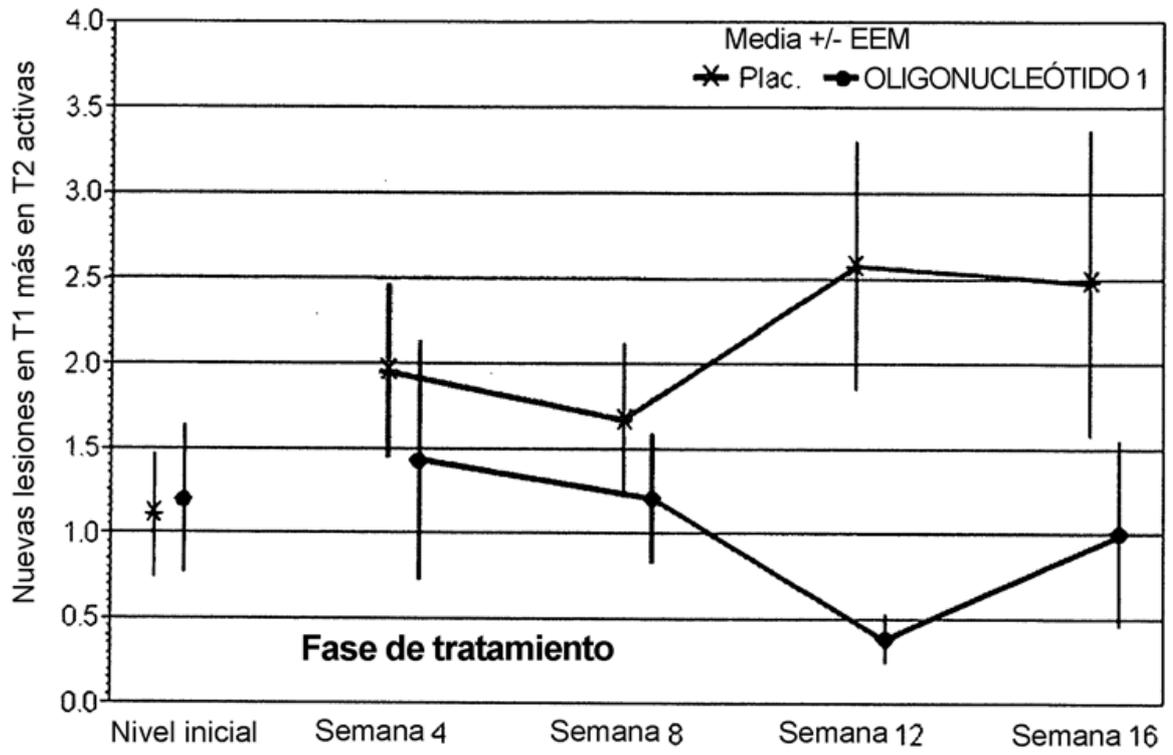


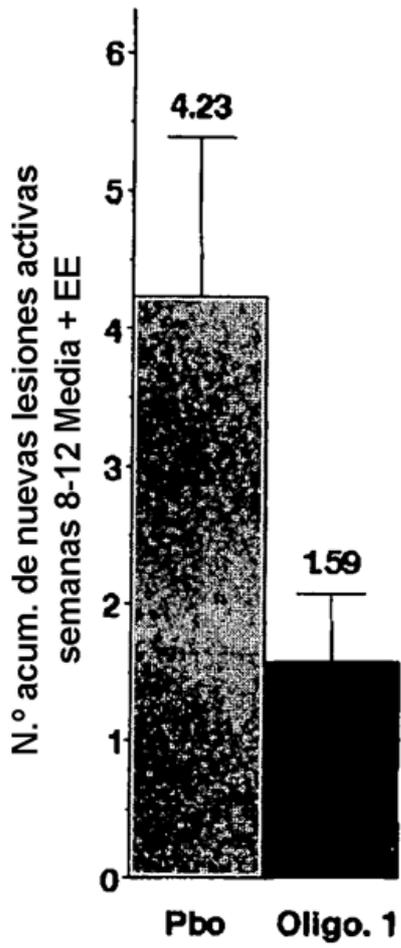
Fig 1.

C.

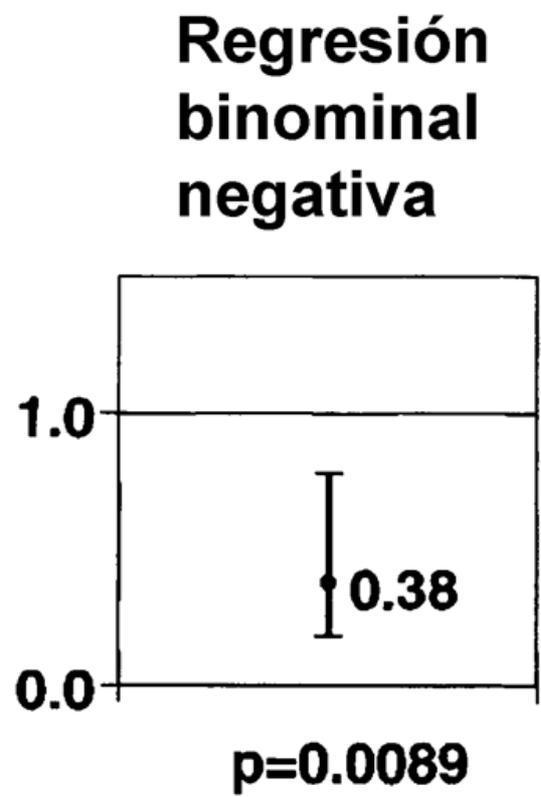


**Fig.2**

**A.**

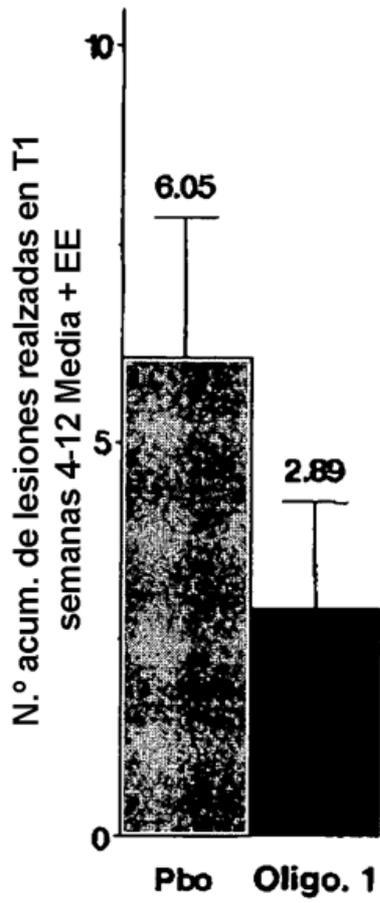


**B.**



**Fig.3**

A.



B.

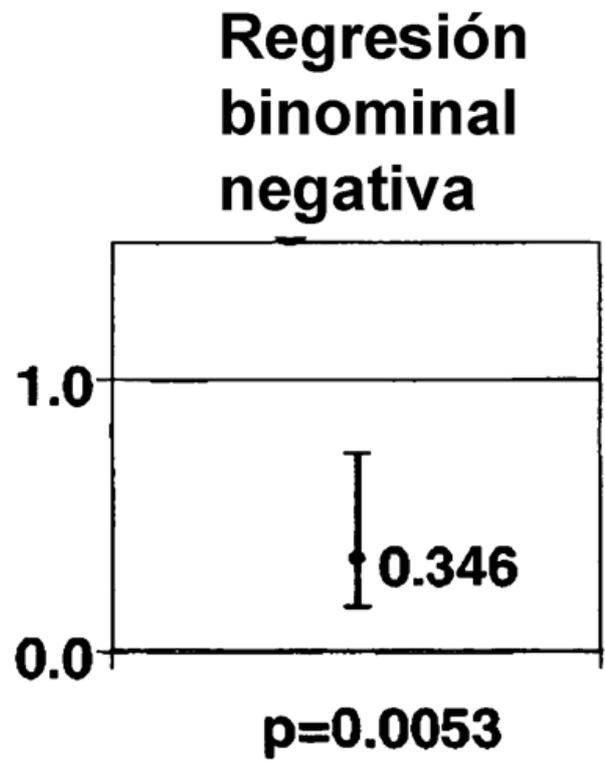
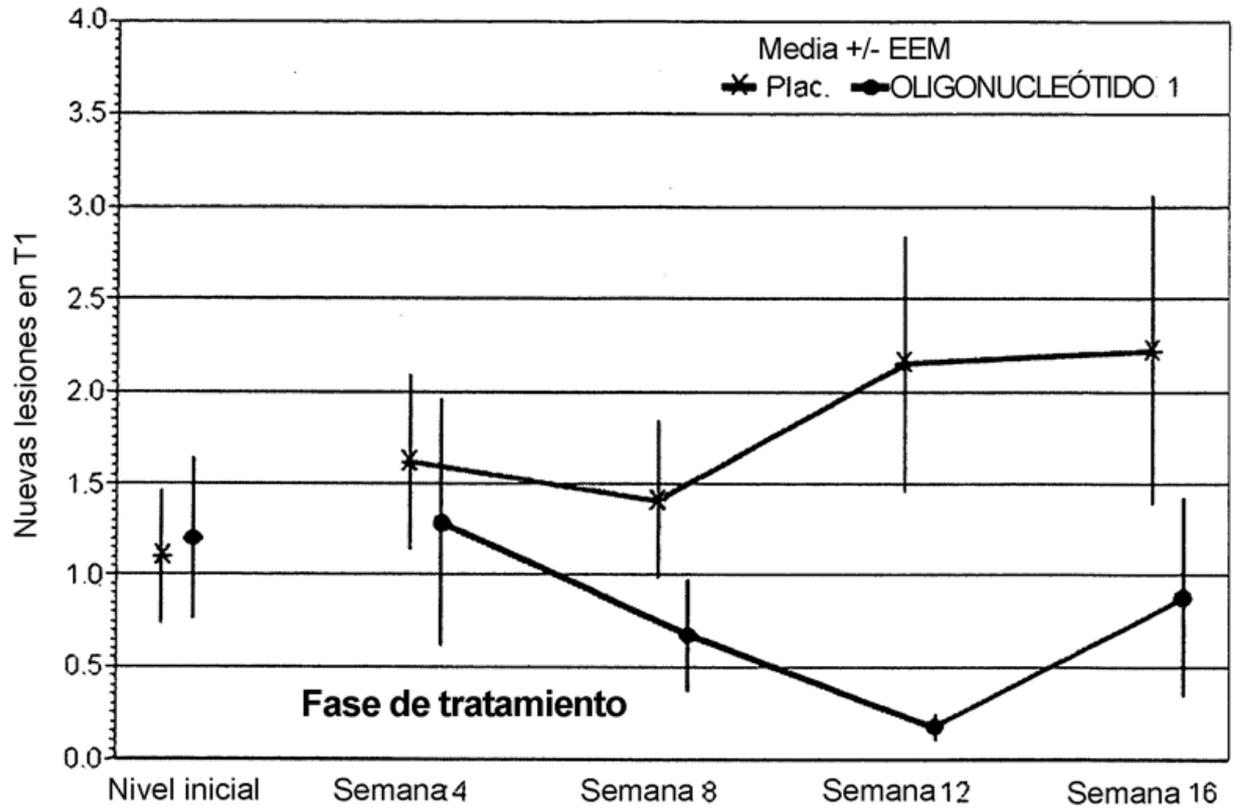


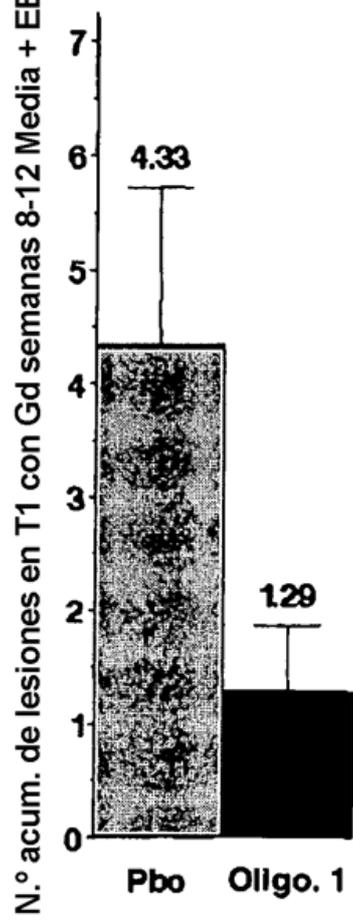
Fig. 3

C.

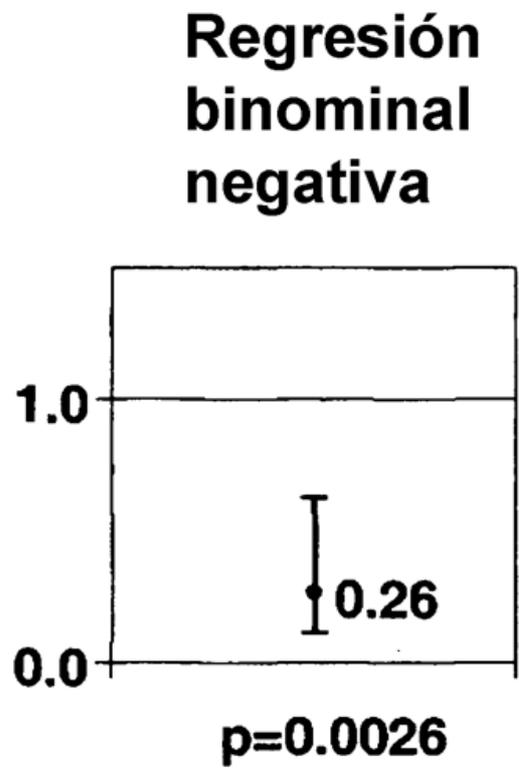


**Fig.4**

**A.**

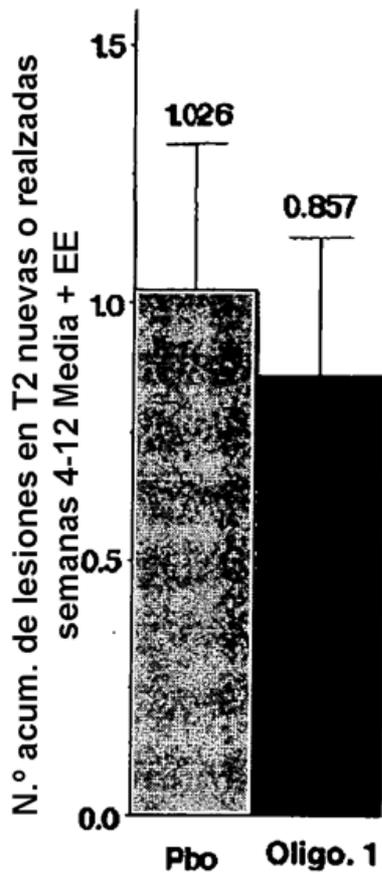


**B.**

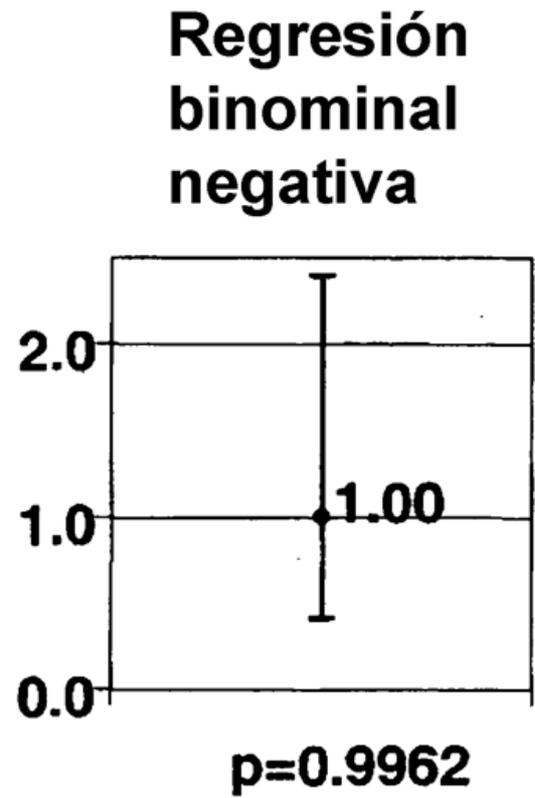


**Fig.5**

A.

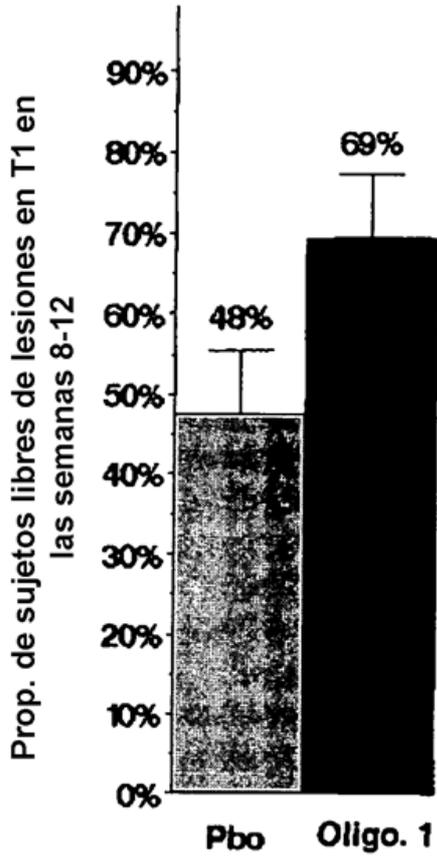


B.



**Fig. 6**

**A.**



**B.**

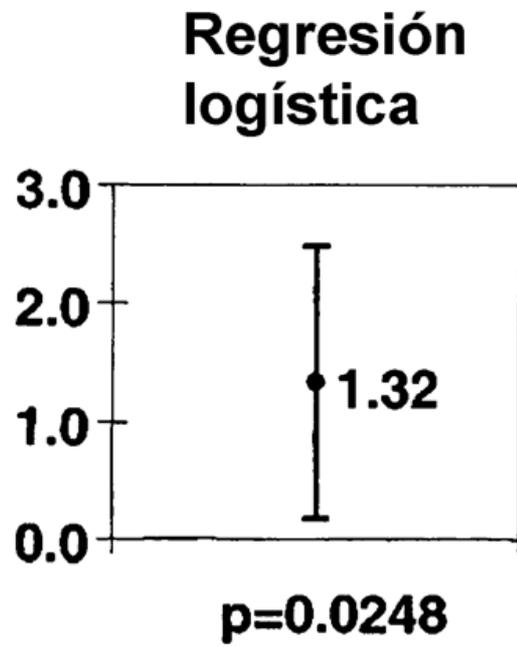


Fig. 7

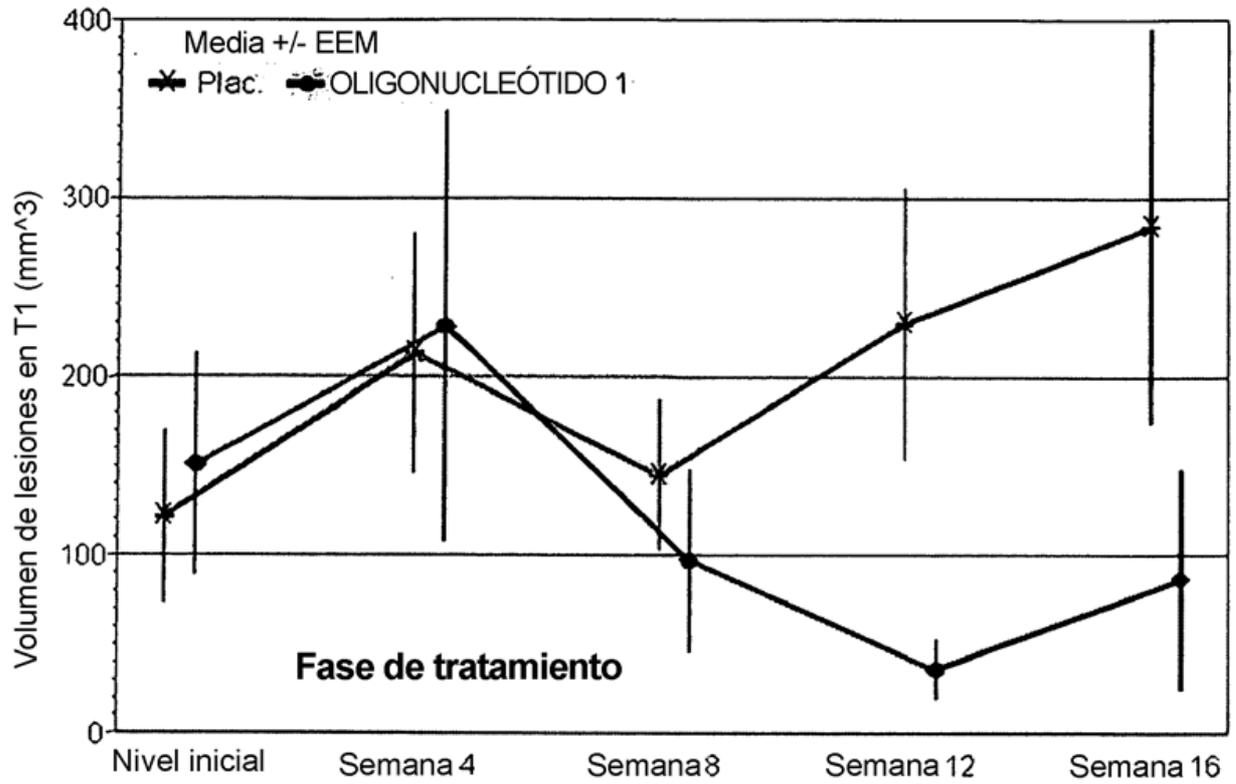


Fig. 8

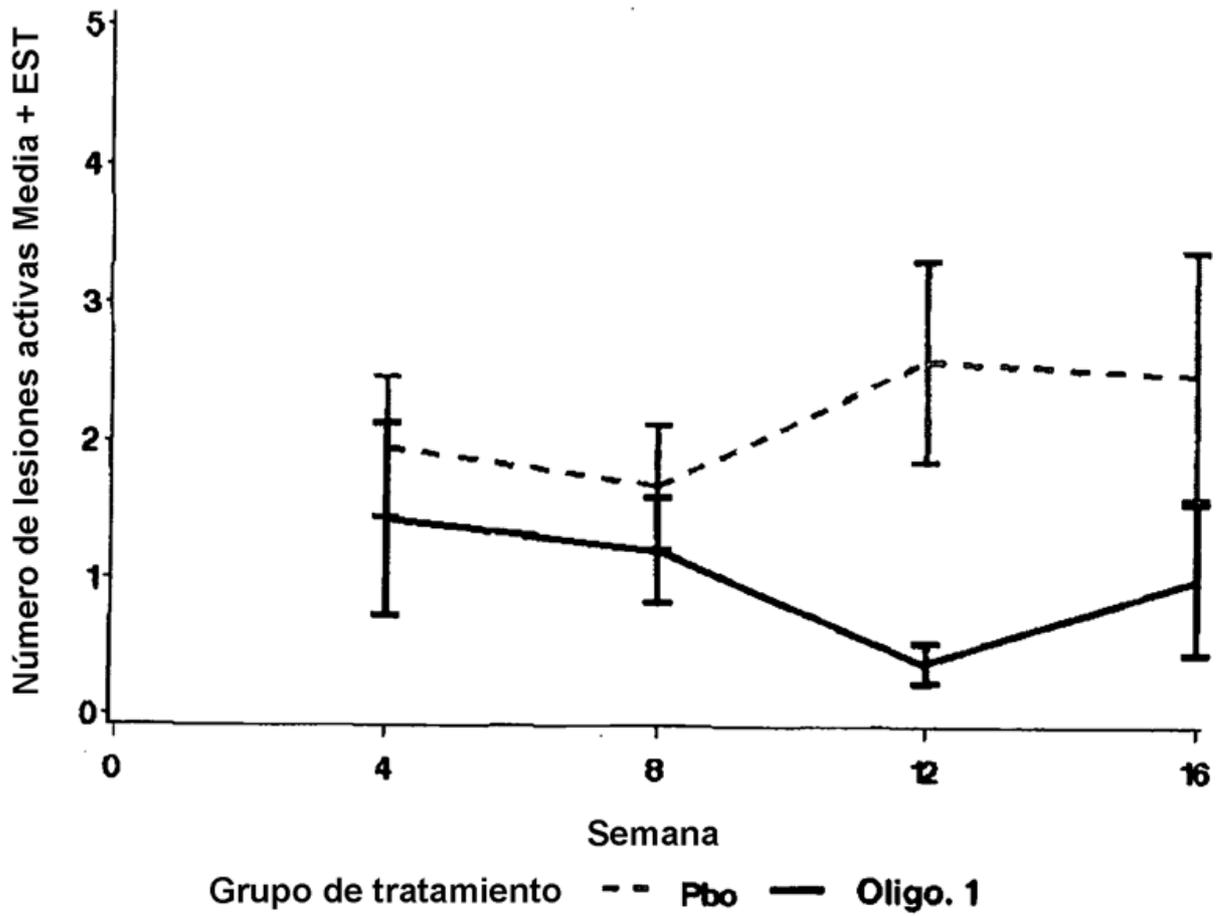


Fig. 9

