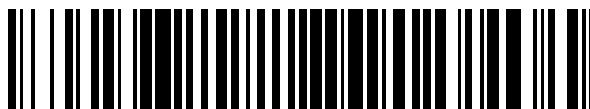


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 702 531**

51 Int. Cl.:

A61K 31/70 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.06.2006 E 17185196 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.10.2018 EP 3308788**

54 Título: **Composiciones y procedimientos para modulación de splicing de SMN2**

30 Prioridad:

23.06.2005 US 693542 P

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

01.03.2019

73 Titular/es:

BIOGEN MA INC. (50.0%)

225 Binney Street

Cambridge, MA 02142, US y

COLD SPRING HARBOR LABORATORY (50.0%)

72 Inventor/es:

BAKER, BRENDA F.;

KRAINER, ADRIAN R. y

HUA, YIMIN

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 702 531 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones y procedimientos para modulación de splicing de SMN2

5 Antecedentes de la invención

Las moléculas de ARNm eucariota recién sintetizadas, también conocidas como transcritos primarios o pre-ARNm, producidas en el núcleo, son procesadas antes o durante el transporte al citoplasma para la traducción. El procesamiento de los pre-ARNm incluye la adición de una caperuza 5' metilada y una cola de poli(A) de aproximadamente 200-250 bases al extremo 3' del transcrito.

La siguiente etapa en el procesamiento de ARNm es el splicing del pre-ARNm, que se produce en la maduración del 90-95 % de los ARNm de mamíferos. Los intrones (o secuencias interventoras) son regiones de un transcrito primario (o el ADN que lo codifica) que no están incluidas en la secuencia codificante del ARNm maduro. Los exones son regiones de un transcrito primario que permanecen en el ARNm maduro cuando llega al citoplasma. Los exones se someten a splicing juntos para formar la secuencia de ARNm maduro. Las uniones de splicing también se denominan sitios de splicing y el lado 5' de la unión a menudo se denomina el «sitio de splicing 5'» o «el sitio donante de splicing» y el lado 3' se denomina el «sitio de splicing 3'» o «sitio aceptor de splicing». En el splicing, el extremo 3' de un exón cadena arriba se une al extremo 5' del exón cadena abajo. Por lo tanto, el ARN no sometido a splicing (o pre-ARN) tiene una unión exón/intrón en el extremo 5' de un intrón y una unión intrón/exón en el extremo 3' de un intrón. Después de eliminar el intrón, los exones quedan contiguos en lo que a veces se denomina la unión o límite exón/exón en el ARNm maduro. Los sitios de splicing crípticos son aquellos que se utilizan menos frecuentemente pero que se pueden utilizar cuando el sitio de splicing habitual está bloqueado o no disponible. El splicing alternativo, definido como el splicing de unión de distintas combinaciones de exones, a menudo produce múltiples transcritos de ARNm a partir de un gen único.

Hasta un 50 % de las enfermedades genéticas humanas resultantes de una mutación puntual son producidas por splicing aberrante. Dichas mutaciones puntuales pueden o bien alterar un sitio de splicing actual o crear un nuevo sitio de splicing, lo cual produce transcritos de ARNm compuestos por una combinación diferente de exones o con eliminaciones en exones. Las mutaciones puntuales también pueden producir la activación de un sitio de splicing críptico o alterar elementos reguladores en cis (es decir, potenciadores o silenciadores de splicing) (Cartegni et al., Nat. Rev. Genet., 2002, 3, 285-298; Drawczak et al., Hum. Genet., 1992, 90, 41-54).

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

Los compuestos antisentido también se han utilizado para alterar la proporción entre las formas larga y corta de pre-ARNm de Bcl-x (patente de EE.UU. 6.172.216; patente de EE.UU. 6.214.986; Taylor et al., Nat. Biotechnol. 1999, 17, 1097-1100) o para forzar la omisión de exones específicos que contienen codones de terminación prematura (Wilton et al., Neuromuscul. Disord., 1999, 9, 330-338). La patente de EE.UU. 5.627.274 y la publicación internacional WO 94/26887 describen composiciones y procedimientos para combatir splicing aberrante en una molécula de pre-ARNm que contiene una mutación utilizando oligonucleótidos antisentido que no activan RNasa H.

La atrofia muscular espinal (AME) proximal es un trastorno neurodegenerativo genético caracterizado por la pérdida de neuronas motoras espinales. La AME es una enfermedad recesiva autosómica de inicio temprano y actualmente es la principal causa de muerte en niños. La gravedad de la AME varía según el paciente y, por lo tanto, ha sido clasificada en tres tipos. La AME de tipo I es la forma más grave con inicio al nacer o dentro de los primeros 6 meses de edad y normalmente produce la muerte en un periodo de 2 años. Los niños con AME de tipo I no pueden sentarse ni andar. La AME de tipo II es la forma intermedia y los pacientes pueden sentarse, pero no se pueden poner de pie ni andar. Los pacientes con AME de tipo III, una forma crónica de la enfermedad, normalmente desarrollan AME después de los 18 meses de edad (Lefebvre et al., Hum. Mol. Genet., 1998, 7, 1531-1536).

La AME se produce por la pérdida de ambas copias del gen de la supervivencia de la neurona motora 1 (SMN1), una

proteína que forma parte de un complejo multiproteína que se considera implicado en la biogénesis y reciclaje de RNPpn. Un gen casi idéntico, SMN2, existe en una región duplicada en el cromosoma 5q13. Si bien SMN1 y SMN2 tienen el potencial de codificar para la misma proteína, SMN2 contiene una mutación traducionalmente silenciosa en la posición +6 del exón 7, lo cual produce una inclusión ineficaz del exón 7 en los transcritos de SMN2. Por lo tanto, la forma predominante de SMN2 es una versión truncada, que carece del exón 7, que es inestable e inactiva (Cartegni y Krainer, Nat. Genet., 2002, 30, 377-384).

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

La tecnología antisentido es un medio eficaz para modular la expresión de uno o más productos génicos específicos, incluyendo productos de splicing alternativos, y, en especial, es útil para diversas aplicaciones terapéuticas, de diagnóstico e investigación. El principio que existe detrás de la tecnología antisentido es que un compuesto antisentido, que se hibrida a un ácido nucleico diana, modula actividades de expresión génica tales como transcripción, splicing o traducción a través de uno de varios mecanismos antisentido. La especificidad de secuencia de los compuestos antisentido los hace extremadamente atractivos como herramientas útiles para validación de dianas y funcionalización génica, así como terapéutica para modular de manera selectiva la expresión de genes implicados en la enfermedad.

En el presente documento se describen compuestos antisentido útiles para modular la expresión génica y vías asociadas mediante mecanismos antisentido, que pueden incluir mecanismos antisentido basados en la ocupación de diana. En el presente documento se proporcionan compuestos que se dirigen a SMN2 para uso en la modulación de splicing de SMN2. Un experto en la técnica, con la presente descripción, será capaz, sin excesiva experimentación, de identificar, preparar y explotar compuestos antisentido para esos usos.

Singh et al, (2006) Molecular and Cellular Biology, vol. 26, N.º 4, páginas 1333-1346, presenta compuestos antisentido concebidos para promover la inclusión del exón 7 en el ARNm de SMN2.

Resumen de la invención

Por consiguiente, la presente invención proporciona una composición farmacéutica en forma de dosificación unitaria que comprende un oligonucleótido antisentido y un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable, donde el oligonucleótido antisentido está dirigido al intrón 7 de una molécula de ácido nucleico que codifica SMN2, donde el oligonucleótido tiene 15, 16, 17, 18, 19 o 20 nucleótidos de longitud y comprende una modificación de azúcar 2'-O-metoxietilo en cada posición, y donde el primer número de nucleótido más 5' al cual se une el oligonucleótido es el nucleótido 122, 123, 124, 125, 126, 127 o 128 de la SEQ ID NO: 1. En las reivindicaciones del presente documento se exponen aspectos adicionales de la composición farmacéutica de la invención. La invención también proporciona la composición farmacéutica de las reivindicaciones del presente documento para uso en terapias, y la composición farmacéutica de dichas reivindicaciones para uso en el tratamiento de atrofia muscular espinal, así como el uso de la composición farmacéutica de las mencionadas reivindicaciones para la preparación de un medicamento para el tratamiento de atrofia muscular espinal.

Resumen de la descripción

La presente descripción se refiere a compuestos antisentido dirigidos e hibridables a una molécula de ácido nucleico que codifica SMN2. Se describen compuestos antisentido dirigidos al intrón 6, exón 7 o intrón 7 de SMN2 que modulan el splicing de pre-ARNm de SMN2. En una parte de la descripción, la modulación del splicing produce un aumento en la inclusión del exón 7. En otra parte de la descripción, la modulación del splicing produce una disminución en la inclusión del exón 7. En el presente documento se contemplan y se describen compuestos antisentido de 12 a 20 nucleótidos de longitud dirigidos al intrón 6, exón 7 o intrón 7 de SMN2, donde los compuestos comprenden modificaciones de azúcar 2'-O-metoxietilo.

En un aspecto de la descripción, los compuestos antisentido están dirigidos a elementos reguladores de splicing en cis. Los elementos reguladores incluyen potenciadores de splicing exónicos, silenciadores de splicing exónicos, potenciadores de splicing intrónicos y silenciadores de splicing intrónicos. Los silenciadores de splicing exónicos e intrónicos son dianas preferidas.

En una parte de la descripción, los compuestos antisentido comprenden al menos una porción de 8 nucleobases de uno de los compuestos ejemplares descritos en el presente documento.

También se describen procedimientos para modular splicing de ARNm de SMN2 en una célula, tejido u órgano

utilizando uno o más de los compuestos de la descripción. En una parte de la descripción, la modulación del splicing consiste en la inclusión del exón. En otra parte de la descripción, la modulación del splicing consiste en la omisión del exón. En un aspecto, el compuesto está dirigido a un elemento silenciador de splicing intrónico. En otro aspecto, el compuesto está dirigido a un elemento silenciador de splicing exónico.

- 5 Asimismo se describen compuestos antisentido de 10 a 50, 12 a 30 o 12 a 20 nucleótidos de longitud dirigidos al intrón 6, exón 7 o intrón 7 de SMN2 con modificaciones de azúcar 2'-O-metoxietilo para uso en terapias. También se describen composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más de los compuestos de la descripción. También se describe el uso de un oligonucleótido antisentido descrito en el presente documento para la preparación de un medicamento para modular el splicing de un pre-ARNm de SMN2. En un aspecto, la modulación del splicing produce un aumento en la inclusión del exón 7. También se describe el uso de un oligonucleótido antisentido descrito en el presente documento para la preparación de un medicamento para tratar atrofia muscular espinal.

Descripción detallada

- 15 La tecnología antisentido es un medio eficaz para modular la expresión de uno o más productos génicos específicos y, en especial, es útil para diversas aplicaciones terapéuticas, y de diagnóstico e investigación. En el presente documento se describen compuestos antisentido útiles para modular la expresión génica mediante mecanismos de acción antisentido, que incluyen mecanismos antisentido basados en la ocupación de diana. En un aspecto, los compuestos antisentido descritos en el presente documento modulan el splicing de un gen diana. Dicha modulación incluye promover o inhibir la inclusión del exón. Se describen adicionalmente compuestos antisentido dirigidos a elementos reguladores de splicing en cis presentes en moléculas de pre-ARNm, incluyendo potenciadores de splicing exónicos, silenciadores de splicing exónicos, potenciadores de splicing intrónicos y silenciadores de splicing intrónicos. Se cree que la alteración de los elementos reguladores de splicing en cis altera a su vez la selección del sitio de splicing, lo cual puede producir una alteración en la composición de los productos de splicing.

- El procesamiento de pre-ARNm eucariotas es un proceso complejo que requiere una multitud de señales y factores proteicos para conseguir splicing de ARNm apropiado. La definición del exón por parte del espliceosoma requiere más que las señales de splicing canónicas que definen los límites intrón-exón. Una de dichas señales adicionales es proporcionada por el potenciador regulador que actúa en cis y secuencias de silenciadores. Se han identificado potenciadores de splicing exónicos (ESE, por su sigla en inglés), silenciadores de splicing exónicos (ESS, por su sigla en inglés), potenciadores de splicing intrónicos (ISE, por su sigla en inglés) y silenciadores de splicing intrónicos (ISS, por su sigla en inglés) que o bien reprimen o potencian el uso de sitios donantes de splicing o sitios aceptores de splicing, según su sitio y modo de acción (Yeo et al. 2004, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101(44):15700-15705). La unión de proteínas específicas (factores trans) a estas secuencias reguladoras dirige el proceso de splicing, ya sea promoviendo o inhibiendo el uso de sitios de splicing particulares y de este modo modulando la proporción de productos de splicing (Scamborova et al. 2004, Mol. Cell. Biol. 24(5):1855-1869; Hovhannisyan y Carstens, 2005, Mol. Cell. Biol. 25(1):250-263; Minovitsky et al. 2005, Nucleic Acids Res. 33(2):714-724). Poco se sabe sobre los factores trans que interactúan con elementos de splicing intrónicos; no obstante, diversos estudios han proporcionado información sobre elementos de splicing exónicos. Por ejemplo, los ESE son conocidos por estar implicados en splicing tanto alternativo como constitutivo actuando como sitios de unión para miembros de la familia de proteínas SR. Las proteínas SR se unen a elementos de splicing mediante su dominio de unión a ARN y promueven el splicing reclutando componentes de espliceosoma con interacciones entre proteínas mediadas por su dominio RS, que está compuesto por distintos dipéptidos Arg-Ser (Cartegni y Krainer, 2003, Nat. Struct. Biol. 10(2):120-125; Wang et al. 2005, Nucleic Acids Res. 33(16):5053-5062). Se ha descubierto que los ESE están enriquecidos en regiones de exones que están próximas a sitios de splicing, en particular 80 a 120 bases desde los extremos de los sitios aceptores de splicing (Wu et al. 2005, Genomics 86:329-336). Las secuencias de consenso se han determinado para cuatro miembros de la familia de proteínas SR, SF2/ASF, SC35, SRp40 y SRp55 (Cartegni et al. 2003, Nucleic Acids Res. 31(13):3568-3571).
- 50 Si bien los factores trans que unen los elementos reguladores de splicing intrónicos no se han estudiado en profundidad, se ha sugerido que las proteínas SR y las ribonucleoproteínas heterogéneas (RNPhn) interactúan con estos elementos (Yeo et al. 2004, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101(44):15700-15705). Se han identificado dos elementos potenciadores de splicing intrónicos (ISE) en SMN2, uno en el intrón 6 y el otro en el intrón 7 (Miyajima et al. 2002, J. Biol. Chem. 277:23271-23277). Los ensayos de cambio en gel que utilizan el ISE en el intrón 7 mostraron formación de complejos de ARN-proteína, lo cual sugiere que estas proteínas trans pueden ser importantes para la regulación del splicing (Miyaso et al. 2003, J. Biol. Chem. 278(18):15825-15831).

- La función de SMN2 en enfermedades tales como atrofia muscular espinal (AME) lo convierte en una importante diana terapéutica. La AME es un trastorno genético caracterizado por una degeneración de las neuronas motoras de la médula espinal. La AME es producida por la pérdida de las dos copias funcionales de SMN1. No obstante, SMN2 tiene

- el potencial de codificar para la misma proteína que SMN1 y, por ende, superar el defecto genético de los pacientes con AME. El SMN2 contiene una mutación traducionalmente silenciosa (C→T) en la posición +6 del exón 7 (nucleótido 66 de la SEQ ID NO: 1), que da como resultado una inclusión ineficaz del exón 7 en transcritos de SMN2. Por lo tanto, la forma predominante de SMN2, que carece del exón 7, es inestable e inactiva. En consecuencia, los compuestos terapéuticos capaces de modular splicing de SMN2 de forma tal que el porcentaje de transcritos de SMN2 que contienen el exón 7 aumente, resultarían útiles para el tratamiento de AME.

Descripción general

- En el presente documento se describen compuestos oligoméricos, incluyendo oligonucleótidos antisentido y otros compuestos antisentido para uso en la modulación de la expresión de moléculas de ácido nucleico que codifican SMN2. Esto se consigue proporcionando compuestos oligoméricos que se hibridan a una o más moléculas de ácido nucleico diana que codifican SMN2. Tal como se usa en el presente documento, las expresiones «ácido nucleico diana» y «molécula de ácido nucleico que codifica SMN2» se han utilizado por conveniencia para englobar ADN que codifica SMN2, ARN (que incluye pre-ARNm y ARNm o porciones de estos) transcrito a partir de dicho ADN, y también ADNc derivado de dicho ARN.

- En el presente documento se describen compuestos antisentido para uso en la modulación de splicing de pre-ARNm de SMN2. En una parte de la descripción, los compuestos antisentido descritos están dirigidos al exón 7 de SMN2 de modo que se module el splicing de ARNm de SMN. En otra parte de la descripción, los compuestos antisentido están dirigidos al intrón 6 de SMN2. En otra parte de la descripción, los compuestos antisentido están dirigidos al intrón 7 de SMN2. La modulación del splicing puede resultar en la inclusión del exón 7 o en la omisión del exón 7.

- También se describen compuestos antisentido dirigidos a elementos reguladores en cis. En una parte de la descripción, el elemento regulador es un exón. En otra parte de la descripción, el elemento regulador es un intrón.

Modulación de splicing

- Como se utiliza en el presente documento, la modulación de splicing se refiere al procesamiento de un transcrito de pre-ARNm de modo que la molécula de ARNm sometida a splicing contenga o bien una combinación diferente de exones como resultado de la omisión del exón o la inclusión del exón, una eliminación en uno o más exones, o secuencia adicional normalmente no encontrada en el ARNm sometido a splicing (p. ej., secuencia de intrones). En el contexto de la presente descripción, la modulación de splicing se refiere a alterar el splicing de pre-ARNm de SMN2 para conseguir la omisión del exón o la inclusión del exón. En una parte de la descripción, la omisión del exón produce un transcrito de ARNm de SMN2 que carece del exón 7 y la inclusión del exón produce un transcrito de ARNm de SMN2 que contiene el exón 7.

- Como se utiliza en el presente documento, el splicing alternativo se define como el splicing de unión de distintas combinaciones de exones, el cual puede producir múltiples transcritos de ARNm a partir de un gen único. En el contexto de la presente descripción, un transcrito de ARNm de SMN2 que contiene el exón 7 y un transcrito de ARNm de SMN2 que carece del exón 7 son dos productos de splicing alternativo.

Compuestos

- El término «compuesto oligomérico» se refiere a una estructura polimérica capaz de hibridarse a una región de una molécula de ácido nucleico. Este término incluye oligonucleótidos, oligonucleósidos, análogos de oligonucleótidos, miméticos de oligonucleótidos y combinaciones químicas de estos. Un «compuesto antisentido» o «compuesto oligomérico antisentido» se refiere a un compuesto oligomérico que es al menos parcialmente complementario a la región de una molécula de ácido nucleico a la cual se hibrida y que modula su expresión. En consecuencia, si bien se puede decir que todos los compuestos antisentido son compuestos oligoméricos, no todos los compuestos oligoméricos son compuestos antisentido. Un «oligonucleótido antisentido» es un compuesto antisentido que es un oligómero con base de ácido nucleico. Un oligonucleótido antisentido puede modificarse químicamente. Los ejemplos no restrictivos de compuestos oligoméricos incluyen cebadores, sondas, compuestos antisentido, oligonucleótidos antisentido, oligonucleótidos de secuencia guía externa (EGS), agentes de splicing alternos y ARNip. Como tales, estos compuestos se pueden introducir con forma monocatenaria, bicatenaria, circular, ramificada o de horquilla y pueden contener elementos estructurales tales como protuberancias o bucles internos o terminales. Los compuestos oligoméricos bicatenarios pueden ser dos cadenas hibridadas para formar compuestos bicatenarios o una única cadena con autocomplementariedad suficiente para permitir la hibridación y formación de un compuesto completa o parcialmente bicatenario.

Los compuestos oligoméricos de acuerdo con esta descripción pueden comprender un compuesto oligomérico complementario de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 nucleobases (es decir, de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 nucleósidos enlazados). Un experto habitual en la materia apreciará que esto comprende compuestos antisentido de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, o 50 nucleobases.

En una parte de la descripción, los compuestos antisentido de la descripción son de 12 a 30 nucleobases. Un experto habitual en la materia apreciará que esto comprende compuestos antisentido de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleobases.

En una parte de la descripción los compuestos antisentido de la descripción son de 12 a 20 nucleobases. Un experto habitual en la materia apreciará que esto comprende compuestos antisentido de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 nucleobases.

En una parte de la descripción, los compuestos antisentido de la descripción tienen porciones antisentido de 20 nucleobases.

En una parte de la descripción, los compuestos antisentido de la descripción tienen porciones antisentido de 18 nucleobases.

En una parte de la descripción, los compuestos antisentido de la descripción tienen porciones antisentido de 15 nucleobases.

En una parte de la descripción, los compuestos antisentido de la descripción tienen porciones antisentido de 12 nucleobases.

Los compuestos antisentido de 10-50 nucleobases de longitud que comprenden un tramo de al menos ocho (8) nucleobases consecutivas seleccionadas de dentro de los compuestos antisentido ilustrativos también son considerados compuestos antisentido adecuados.

Los compuestos de la descripción incluyen secuencias de oligonucleótidos que comprenden al menos las 8 nucleobases consecutivas desde el extremo 5' de uno de los compuestos antisentido ilustrativos (siendo las nucleobases restantes un tramo consecutivo de nucleobases que continúa cadena arriba del extremo 5' del compuesto antisentido hasta que el oligonucleótido contiene aproximadamente 10 a aproximadamente 50 nucleobases). Otros compuestos son representados por secuencias de oligonucleótidos que comprenden al menos las 8 nucleobases consecutivas desde el extremo 3' de uno de los compuestos antisentido ilustrativos (siendo las nucleobases restantes un tramo consecutivo de nucleobases que continúa cadena abajo del extremo 3' del compuesto antisentido y que continúa hasta que el oligonucleótido contiene aproximadamente 10 a aproximadamente 50 nucleobases). También se entiende que los compuestos se pueden representar por secuencias de oligonucleótidos que comprenden al menos 8 nucleobases consecutivas desde una porción interna de la secuencia de un compuesto ilustrativo, y se pueden extender en cualquier dirección o en ambas direcciones hasta que el oligonucleótido contiene aproximadamente 10 a aproximadamente 50 nucleobases. Los compuestos descritos en el presente documento son específicamente hibridables al ácido nucleico diana.

Un experto en la materia que disponga de los compuestos antisentido ilustrados en el presente documento será capaz, sin excesiva experimentación, de identificar compuestos antisentido adicionales.

Hibridación

Como se utiliza en el presente documento, «hibridación» significa el apareamiento de cadenas complementarias de compuestos antisentido con su secuencia diana. Sin ánimo de limitarse a ningún mecanismo en particular, el mecanismo de apareamiento más común implica formación de puentes de hidrógeno, que puede ser formación de puentes de hidrógeno de tipo Watson-Crick, Hoogsteen o Hoogsteen inverso, entre bases de nucleósidos o nucleótidos complementarios (nucleobases). Por ejemplo, la base natural adenina se complementa con las nucleobases naturales timidina y uracilo que se aparean a través de la formación de puentes de hidrógeno. La base natural guanina se complementa con las bases naturales citosina y 5-metil citosina. La hibridación puede producirse en distintas circunstancias.

Un compuesto antisentido es específicamente hibridable cuando existe un grado de complementariedad suficiente para evitar unión inespecífica del compuesto antisentido a secuencias de ácidos nucleicos no diana en condiciones

en las que se desea unión específica, es decir, en condiciones fisiológicas en el caso de ensayos *in vivo* o tratamiento terapéutico, y en condiciones en las que se realizan ensayos en el caso de ensayos *in vitro*.

Tal como se usa en el presente documento, las expresiones «condiciones de hibridación astringentes» o «condiciones astringentes» se refieren a condiciones en las que un compuesto antisentido se hibridará a su secuencia diana, pero a una cantidad mínima de otras secuencias. Las condiciones astringentes son dependientes de la secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias, y las «condiciones astringentes» en las que los compuestos antisentido se hibridan a una secuencia diana se determinan mediante la naturaleza y la composición de los compuestos antisentido y los ensayos en los que están siendo investigados.

Complementariedad

El término «complementariedad», como se utiliza en el presente documento, se refiere a la capacidad que tienen dos nucleobases para aparearse de manera precisa en o bien dos cadenas de compuesto oligomérico o un compuesto antisentido con su ácido nucleico diana. Por ejemplo, si una nucleobase en cierta posición de un compuesto antisentido es capaz de formar puentes de hidrógeno con una nucleobase en cierta posición de un ácido nucleico diana, entonces la posición de los puentes de hidrógeno entre el oligonucleótido y el ácido nucleico diana se considera una posición complementaria.

El término «complementariedad» también puede considerarse en el contexto de un compuesto antisentido y su diana, en vez de base por base. El compuesto antisentido y el ADN o ARN adicional son complementarios entre sí cuando un número suficiente de posiciones complementarias en cada molécula están ocupadas por nucleobases que pueden formar puentes de hidrógeno entre sí. De este modo, «específicamente hibridable» y «complementariedad» son términos que se usan para indicar un grado suficiente de apareamiento preciso o complementariedad para un número suficiente de nucleobases de modo que se produzca unión estable y específica entre el compuesto antisentido y un ácido nucleico diana. Un experto en la materia reconoce que la inclusión de desapareamientos es posible sin eliminar la actividad del compuesto antisentido. Por lo tanto, la descripción está dirigida a aquellos compuestos antisentido que puedan contener hasta aproximadamente 20 % de nucleótidos que alteren el apareamiento de bases del compuesto antisentido con la diana. Preferentemente los compuestos contienen no más de 15 %, más preferentemente no más de aproximadamente 10 %, más preferentemente no más de 5 % de desapareamientos o ningún desapareamiento. Los nucleótidos restantes no alteran la hibridación (por ejemplo., bases universales).

Se entiende en la técnica que la incorporación de modificaciones de afinidad de nucleótidos puede permitir una mayor cantidad de desapareamientos en comparación con un compuesto no modificado. De manera similar, ciertas secuencias de oligonucleótidos pueden ser más tolerantes a los desapareamientos que otras secuencias de oligonucleótidos. Un experto en la materia es capaz de determinar una cantidad apropiada de desapareamientos entre oligonucleótidos, o entre un oligonucleótido y un ácido nucleico diana, como, por ejemplo, determinando la temperatura de fusión.

Identidad

Los compuestos antisentido, o una porción de estos, pueden tener un porcentaje de identidad definido respecto de una SEQ ID NO, o un compuesto que tiene un número Isis específico. Como se utiliza en el presente documento, una secuencia es idéntica a la secuencia aquí descrita si tiene la misma capacidad de apareamiento de nucleobases. Por ejemplo, un ARN que contiene uracilo en lugar de timidina en las secuencias descritas de la presente descripción se consideraría idéntico puesto que ambos se aparean con adenina. Esta identidad puede darse en la longitud entera del compuesto oligomérico, o en una porción del compuesto antisentido (por ejemplo., las nucleobases 1-20 de un 27-mero se pueden comparar con un 20-mero para determinar el porcentaje de identidad del compuesto oligomérico con la SEQ ID NO.). Los expertos en la materia comprenden que un compuesto antisentido puede no tener una secuencia idéntica a las descritas en el presente documento para funcionar de manera similar al compuesto antisentido aquí descrito. Las versiones acortadas del compuesto antisentido descrito en el presente documento o las versiones no idénticas del compuesto antisentido descrito en el presente documento están comprendidas dentro del alcance de la descripción. Las versiones no idénticas son aquellas donde cada base no tiene la misma actividad de apareamiento que los compuestos antisentido descritos en el presente documento. Las bases no tienen la misma actividad de apareamiento por ser más cortas o tener al menos un sitio abásico. De manera alternativa, una versión no idéntica puede incluir al menos una base sustituida por una base diferente con una actividad de apareamiento diferente (p. ej., G puede ser sustituida por C, A o T). El porcentaje de identidad se calcula según la cantidad de bases que tienen apareamiento de bases idéntico correspondiente a la SEQ ID NO o compuesto antisentido con el cual se hace la comparación. Las bases no idénticas pueden estar ubicadas adyacentes entre sí, estar dispersadas en todo el oligonucleótido, o pueden darse ambas circunstancias.

Por ejemplo, un 16-mero que tiene la misma secuencia que las nucleobases 2-17 de un 20-mero es 80 % idéntico al 20-mero. Como alternativa, un 20-mero que contiene cuatro nucleobases no idénticas al 20-mero también es 80 % idéntico al 20-mero. Un 14-mero que tiene la misma secuencia que las nucleobases 1-14 de un 18-mero es 78 % idéntico al 18-mero. Dichos cálculos están comprendidos dentro de la capacidad de los expertos en la materia.

El porcentaje de identidad se basa en el porcentaje de nucleobases en la secuencia original presentes en una porción de la secuencia modificada. Por lo tanto, un compuesto antisentido de 30 nucleobases que comprende la secuencia completa del complemento de un segmento diana activo de 20 nucleobases tendría una porción 100 % idéntica al complemento del segmento diana activo de 20 nucleobases, aunque comprende una porción de 10 nucleobases adicionales. En el contexto de la descripción, el complemento de un segmento diana activo puede constituir una porción única. En una parte preferida de la descripción, los oligonucleótidos de la presente descripción son al menos 80 %, más preferentemente al menos alrededor de 85 %, incluso más preferentemente al menos alrededor de 90 %, más preferentemente al menos 95 % idénticos a al menos una porción del complemento de los segmentos diana activos presentados en este documento.

Los expertos en la materia saben que es posible aumentar o disminuir la longitud de un compuesto antisentido y/o introducir bases de desapareamiento sin eliminar actividad. Por ejemplo, en Woolf et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7305-7309, 1992), una serie de OAS de 13-25 nucleobases de longitud se analizaron para determinar su capacidad para inducir escisión de un ARN diana. Los OAS de 25 nucleobases de longitud con 8 u 11 bases desapareadas cerca de los extremos de los OAS fueron capaces de dirigir escisión específica del ARNm diana, aunque en menor grado que los OAS que no contenían desapareamientos. De manera similar, la escisión específica de diana se consiguió utilizando OAS de 13 nucleobases, incluyendo los que tenían 1 o 3 desapareamientos. Maher y Dolnick (Nuc. Acid. Res. 16:3341-3358, 1988) analizaron una serie de OAS de 14 nucleobases en tándem, y OAS de 28 y 42 nucleobases compuestos por la secuencia de dos o tres de los OAS en tándem, respectivamente, para determinar su capacidad de detener la traducción de DHFR humana en un ensayo de reticulocitos de conejo. Cada uno de los tres OAS de 14 nucleobases solo era capaz de inhibir la traducción, aunque a un nivel más moderado que los OAS de 28 o 42 nucleobases. Se entiende que los compuestos antisentido de la presente descripción pueden variar en longitud y porcentaje de complementariedad respecto de la diana siempre que mantengan la actividad deseada. Los procedimientos para determinar la actividad deseada se describen en el presente documento y son bien conocidos para los expertos en la materia.

Ácidos nucleicos diana

Como se utilizan en el presente documento, los términos «dirigir» o «dirigido/a» se refieren al proceso de diseñar un compuesto oligomérico de modo que el compuesto se hibride de manera específica a una molécula de ácido nucleico seleccionada.

«Dirigir» un compuesto oligomérico a una molécula de ácido nucleico diana particular puede ser un proceso multietapa. El proceso normalmente empieza con la identificación de un ácido nucleico diana cuya expresión se ha de modular. Tal como se usa en el presente documento, las expresiones «ácido nucleico diana» y «ácido nucleico que codifica SMN2» engloban ADN que codifica SMN2, ARN (incluyendo pre-ARNm y ARNm) transcrito a partir de dicho ADN, y también ADNc derivado de dicho ARN. El ácido nucleico diana puede ser, por ejemplo, un gen celular (o ARNm transcrito a partir del gen) cuya expresión está asociada a un trastorno o estado de enfermedad particular, o una molécula de ácido nucleico de un agente infeccioso. Como se describe en el presente documento, el ácido nucleico diana codifica SMN2. En una parte preferida de la descripción, el ácido nucleico diana es pre-ARNm de SMN2.

Regiones diana, segmentos y sitios

El proceso de direccionamiento normalmente también incluye la determinación de al menos una región diana, segmento, o sitio dentro del ácido nucleico diana para que la interacción antisentido se lleve a cabo de forma que se produzca el efecto deseado (por ejemplo., modulación de splicing). El término «región» se define como una porción del ácido nucleico diana que tiene al menos una estructura, función o característica identificable. Las regiones diana pueden incluir un exón o un intrón. Dentro de las regiones de ácidos nucleicos diana hay segmentos. El término «segmentos» se define como porciones más pequeñas o subporciones de regiones dentro de un ácido nucleico diana. El término «sitios», tal como se usa en la presente descripción, se define como posiciones de nucleobase únicas dentro de un ácido nucleico diana.

Kits, reactivos de investigación y diagnóstico

Los compuestos antisentido de la presente descripción se pueden utilizar para diagnóstico, y como reactivos de investigación y kits. Además, los compuestos antisentido, que son capaces de inhibir la expresión génica o modular la expresión génica (p. ej., modulación de splicing) con especificidad, son usados frecuentemente por los expertos en la técnica para aclarar la función de genes particulares o para distinguir entre funciones de diversos miembros de una vía biológica.

Para su uso en kits y diagnóstico, los compuestos antisentido de la presente descripción, tanto solos como en combinación con otros compuestos o terapéuticos, se pueden utilizar como herramientas en análisis diferenciales y/o combinatorios para aclarar patrones de expresión de una porción o de todo el complemento de genes expresados dentro de células y tejidos. Los procedimientos de análisis de expresión génica son bien conocidos para los expertos en la materia.

Compuestos terapéuticos

Los compuestos antisentido de la descripción se pueden utilizar para modular la expresión de SMN2 en un animal, como ser un ser humano. En una parte no restrictiva de la descripción, los procedimientos comprenden la etapa de administrar a dicho animal que necesita una terapia para una enfermedad o afección asociada con SMN2 una cantidad efectiva de un compuesto antisentido que modula la expresión de SMN2 (p. ej., modula splicing de SMN2). Una enfermedad o afección asociada con SMN2 incluye, sin carácter restrictivo, atrofia muscular espinal. En una parte de la descripción, los compuestos antisentido de la presente descripción modulan de manera eficaz el splicing de SMN2, lo cual produce un aumento en la inclusión del exón 7. Los compuestos antisentido de la presente descripción que modulan de manera eficaz la expresión de ARN de SMN2 o productos proteicos de expresión son considerados compuestos antisentido activos.

Por ejemplo, la modulación de la expresión de SMN2 se puede medir en un fluido corporal, que puede o no contener células, tejido u órgano del animal. Los procedimientos para obtener muestras para análisis, tales como fluidos corporales (p. ej., esputo, suero), tejidos (p. ej., biopsia), u órganos, y los procedimientos para la preparación de las muestras que permitan el análisis son bien conocidos para los expertos en la materia. Los procedimientos para analizar ARN y niveles de proteína fueron descritos más arriba y son bien conocidos para los expertos en la materia. Los efectos del tratamiento se pueden evaluar mediante la medición de biomarcadores asociados con la expresión del gen diana en los fluidos, tejidos u órganos antes mencionados, recogidos de un animal al que se puso en contacto con uno o más compuestos de la descripción, mediante los procedimientos clínicos rutinarios conocidos en la técnica. Estos biomarcadores incluyen, sin carácter restrictivo, transaminasas hepáticas, bilirrubina, albúmina, nitrógeno ureico en sangre, creatina y otros marcadores de función renal y hepática; interleucinas, factores de necrosis tumoral, moléculas de adhesión intracelular, proteína C reactiva, quimiocinas, citocinas y otros marcadores de inflamación.

Los compuestos antisentido de la presente descripción pueden utilizarse en composiciones farmacéuticas añadiendo una cantidad eficaz de un compuesto a un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable y adecuado. Los vehículos y diluyentes aceptables son bien conocidos para los expertos en la materia. La elección de un diluyente o vehículo se basa en varios factores, incluyendo, sin carácter restrictivo, la solubilidad del compuesto y la vía de administración. Dichas consideraciones son bien comprendidas por los expertos en la materia. En un aspecto, los compuestos antisentido de la presente descripción modulan el splicing de SMN2. Los compuestos de la descripción también se pueden utilizar para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades y trastornos relacionados con SMN2.

También se contemplan los procedimientos mediante los cuales los fluidos corporales, órganos o tejidos se ponen en contacto con una cantidad efectiva de uno o más de los compuestos antisentido o composiciones de la descripción. Los fluidos corporales, órganos o tejidos se pueden poner en contacto con uno o más de los compuestos de la descripción produciendo la modulación de la expresión de SMN2 en las células de los fluidos corporales, órganos o tejidos. Una cantidad efectiva se puede determinar monitorizando el efecto modulador del compuesto o compuestos antisentido o composiciones en los ácidos nucleicos diana o sus productos mediante procedimientos rutinarios para el experto en la materia.

Por lo tanto, en el presente documento se describe el uso de un compuesto antisentido aislado dirigido a SMN2 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o trastorno mediante el procedimiento descrito más arriba. En una parte de la descripción, el compuesto antisentido está dirigido al exón 7 de SMN2. En otra parte de la descripción, el compuesto antisentido está dirigido al intrón 6 de SMN2. Incluso en otra parte de la descripción, el compuesto antisentido está dirigido al intrón 7 de SMN2.

Modificaciones químicas

Como se conoce en la técnica, un nucleósido es una combinación base-azúcar. La porción de base del nucleósido normalmente es una base heterocíclica (a veces denominada «nucleobase» o simplemente «base»). Las dos clases más comunes de dichas bases heterocíclicas son las purinas y las pirimidinas. Los nucleótidos son nucleósidos que además incluyen un grupo fosfato unido de forma covalente a la porción de azúcar del nucleósido. Para aquellos nucleósidos que incluyen un azúcar pentofuranosilo, el grupo fosfato puede estar unido al resto hidroxilo 2', 3' o 5' del azúcar. Al formar los oligonucleótidos, los grupos fosfato unen de manera covalente nucleósidos adyacentes entre sí para formar un compuesto polimérico lineal. Dentro de los oligonucleótidos, los grupos fosfato son comúnmente denominados como formadores del esqueleto internucleosídico del oligonucleótido. El enlace normal o esqueleto de ARN y ADN es un enlace fosfodiéster de 3' a 5'. A menudo es preferible incluir modificaciones químicas en los oligonucleótidos para alterar su actividad. Las modificaciones químicas pueden alterar la actividad de los oligonucleótidos, por ejemplo, aumentando la afinidad de un oligonucleótido antisentido por su ARN diana, aumentando la resistencia a nucleasas, y/o alterando la farmacocinética del oligonucleótido. El uso de sustancias químicas que aumentan la afinidad de un oligonucleótido por su diana puede permitir utilizar compuestos de oligonucleótidos más cortos.

Los términos «nucleobase» o «resto de base heterocíclica», como se utilizan en el presente documento, se refieren a la porción de base heterocíclica de un nucleósido. En general, una nucleobase es cualquier grupo que contiene uno o más átomos o grupos de átomos capaces de formar puentes de hidrógeno con una base de otro ácido nucleico. Además de las nucleobases «no modificadas» o «naturales» tales como las nucleobases púricas adenina (A) y guanina (G), y las nucleobases pirimidínicas timina (T), citosina (C) y uracilo (U), muchas nucleobases modificadas o miméticas de nucleobases conocidos para los expertos en la materia responden a la presente descripción. Los términos nucleobase modificada y mimético de nucleobase pueden superponerse en su significado pero, por lo general, una nucleobase modificada se refiere a una nucleobase que es bastante similar en estructura a la nucleobase parental, tal como por ejemplo una 7-deaza purina, una 5-metil citosina, o una pinza G, mientras que un mimético de nucleobase incluiría estructuras más complicadas, tales como, por ejemplo, un mimético de nucleobase de fenoxacina tricíclica. Los procedimientos para la preparación de las nucleobases modificadas antes mencionadas son bien conocidos para los expertos en la materia.

Los compuestos antisentido de la presente descripción también pueden contener uno o más nucleósidos que tienen restos de azúcar modificados. El anillo de azúcar furanosilo de un nucleósido se puede modificar de diversas formas incluyendo, sin carácter restrictivo, la adición de un grupo sustituyente, la formación de un puente entre dos átomos de anillo no germinal para formar un ácido nucleico bicíclico (BNA) y la sustitución de un átomo o grupo tal como -S-, -N(R)- o -C(R₁)(R₂) por el oxígeno del anillo en la posición 4'. Los restos de azúcar modificados son bien conocidos y se pueden utilizar para alterar, normalmente aumentar, la afinidad del compuesto antisentido por su diana y/o aumentar la resistencia a nucleasas. Un listado representativo de azúcares modificados preferidos incluye, sin carácter restrictivo, azúcares modificados bicíclicos (BNA), incluyendo LNA y ENA (puente 4'-(CH₂)₂-O-2'); y azúcares sustituidos, especialmente azúcares sustituidos en 2' que tienen un grupo sustituyente 2'-F, 2'-OCH₂ o 2'-O(CH₂)₂-OCH₃. Los azúcares también se pueden reemplazar por grupos de miméticos de azúcar entre otros. Los procedimientos para las preparaciones de los azúcares modificados son bien conocidos para los expertos en la materia.

La presente descripción incluye grupos de enlace internucleosídico que unen los nucleósidos o las unidades monoméricas modificadas de otra manera entre sí formando, de este modo, un compuesto antisentido. Las dos clases principales de grupos de enlace internucleosídico se definen por la presencia o ausencia de un átomo de fósforo. Los enlaces internucleosídicos representativos que contienen fósforo incluyen, sin carácter restrictivo, fosfodiésteres, fosfotriésteres, metilfosfonatos, fosforamidatos, y fosforotioatos. Los grupos de enlace internucleosídico representativos que no contienen fósforo incluyen, sin carácter restrictivo, metilenmetilimino (-CH₂-N(CH₃)-O-CH₂-), tiodiéster (-O-C(O)-S-), tionocarbamato (-O-C(O)(NH)-S-); siloxano (-O-Si(H)₂-O-); y N,N'-dimetilhidrazina (-CH₂-N(CH₃)-N(CH₃)-). Los compuestos antisentido que tienen grupos de enlace internucleosídico sin fósforo se denominan oligonucleósidos. Los enlaces internucleosídicos modificados, en comparación con los enlaces fosfodiéster naturales, se pueden utilizar para alterar, aumentar normalmente, la resistencia a nucleasas del compuesto antisentido. Los enlaces internucleosídicos que tienen un átomo quiral se pueden preparar con forma racémica, quiral o como una mezcla. Los enlaces internucleosídicos quirales representativos incluyen, sin carácter restrictivo, alquilfosfonatos y fosforotioatos. Los procedimientos para la preparación de enlaces que contienen fósforo y que no contienen fósforo son bien conocidos para los expertos en la materia.

Como se utiliza en el presente documento, el término «mimético» se refiere a grupos que son sustituidos por un azúcar, una nucleobase, y/o un enlace internucleosídico. En general, un mimético se utiliza en lugar del azúcar o combinación de enlace internucleosídico-azúcar, y la nucleobase se mantiene para hibridación a una diana seleccionada. Los

ejemplos representativos de un mimético de azúcar incluyen, sin carácter restrictivo, ciclohexenilo o morfolino. Los ejemplos representativos de un mimético para una combinación de enlace internucleosídico-azúcar incluyen, sin carácter restrictivo, ácidos peptidonucleicos (APN) y grupos morfolino unidos por enlaces aquirales sin carga. En algunos casos, se utiliza un mimético en lugar de una nucleobase. Los miméticos de nucleobase representativos son bien conocidos en la técnica e incluyen, sin carácter restrictivo, análogos de fenoxacina tricíclica y bases universales (Berger et al., Nuc Acid Res. 2000, 28:2911-14). Los procedimientos de síntesis de azúcar, y miméticos de nucleósidos y nucleobases son bien conocidos para los expertos en la materia.

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

En el contexto de esta descripción, el término «oligonucleótido» se refiere a un compuesto oligomérico que es un oligómero o polímero de ácido ribonucleico (ARN) o ácido desoxirribonucleico (ADN). Este término incluye oligonucleótidos compuestos por nucleobases de origen natural y no de origen natural, azúcares y enlaces internucleosídicos covalentes, que posiblemente además incluyen conjugados no de ácido nucleico.

La presente descripción proporciona compuestos que tienen grupos de fósforo reactivo útiles para formar enlaces internucleosídicos que incluyen, por ejemplo, fosfodiéster y enlaces internucleosídicos de fosforotioato. Los procedimientos para la preparación y/o purificación de precursores o compuestos antisentido de la presente descripción no constituyen una limitación de las composiciones o procedimientos de la descripción. Los procedimientos para síntesis y purificación de ADN, ARN y los compuestos antisentido de la presente descripción son bien conocidos para los expertos en la materia.

Como se utiliza en el presente documento, el término «compuesto antisentido quimérico» se refiere a un compuesto antisentido que tiene al menos un azúcar, nucleobase y/o enlace internucleosídico que está diferencialmente modificado en comparación con los otros azúcares, nucleobases y enlaces internucleosídicos dentro del mismo compuesto oligomérico. Los azúcares, nucleobases y enlaces internucleosídicos restantes pueden estar independientemente modificados o no modificados. En general un compuesto oligomérico quimérico tendrá nucleósidos modificados que pueden estar en posiciones aisladas o agrupados en conjunto en regiones que definirán un motivo particular. Cualquier combinación de modificaciones y o grupos de miméticos puede comprender un compuesto oligomérico quimérico de la presente descripción.

Los compuestos oligoméricos quiméricos normalmente contienen al menos una región modificada de forma que ofrezcan mayor resistencia a degradación de nucleasas, mayor captación celular y/o mayor afinidad de unión por el ácido nucleico diana. Una región adicional del compuesto oligomérico puede servir como sustrato para enzimas capaces de escindir híbridos ARN:ADN o ARN:ARN. A modo de ejemplo, la RNasa H es una endonucleasa celular que escinde la cadena de ARN de un dúplex ARN:ADN. Por lo tanto, la activación de RNasa H produce la escisión de la diana de ARN, potenciando así enormemente la eficiencia de la inhibición de la expresión génica. Por consiguiente, a menudo se pueden obtener resultados comparables con compuestos oligoméricos más cortos cuando se usan quimeras, en comparación con, por ejemplo, desoxioligonucleótidos de fosforotioato que se hibridan a la misma región diana. La escisión de la diana de ARN puede detectarse rutinariamente por electroforesis en gel y, si fuera necesario, mediante técnicas de hibridación de ácidos nucleicos asociadas conocidas en la técnica.

Como se utiliza en la presente descripción el término «motivo completamente modificado» se refiere a un compuesto antisentido que comprende una secuencia contigua de nucleósidos donde esencialmente cada nucleósido es un nucleósido modificado por azúcar que tiene modificación uniforme.

Los compuestos descritos en el presente documento contienen uno o más centros asimétricos y, por lo tanto, producen enantiómeros, diastereómeros, y otras configuraciones estereoisoméricas que se pueden definir en términos de estereoquímica absoluta, como (R) o (S), α o β , o como (D) o (L) tal como para aminoácidos y otros. La presente descripción pretende incluir la totalidad de dichos posibles isómeros, así como sus formas racémicas y ópticamente puras.

En un aspecto de la presente descripción los compuestos antisentido son modificados por unión covalente de uno o más grupos conjugados. Los grupos conjugados se pueden unir mediante uniones reversibles o irreversibles. Los grupos conjugados se pueden unir directamente a compuestos antisentido o a través de un enlazador. Los enlazadores pueden ser enlazadores mono o bifuncionales. Dichos procedimientos de unión y enlazadores son bien conocidos para los expertos en la materia. En general, los grupos conjugados están unidos a compuestos antisentido para modificar una o más propiedades. Dichas consideraciones son bien conocidas por los expertos en la materia.

Síntesis de oligómeros

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

Los compuestos antisentido de la presente descripción se pueden fabricar cómoda y rutinariamente mediante la técnica muy conocida de síntesis en fase sólida. Los equipos para dicha síntesis son comercializados por varios proveedores que incluyen, por ejemplo, Applied Biosystems (Foster City, CA). Adicionalmente o como alternativa se puede emplear cualquier otro medio para dicha síntesis conocido en la técnica. También es muy conocido usar técnicas similares para preparar oligonucleótidos tales como los fosforotioatos y derivados alquilados. La descripción no está limitada por el procedimiento de síntesis de compuestos antisentido.

15 Purificación y análisis de oligómeros

Los procedimientos de purificación y análisis de oligonucleótidos son conocidos para los expertos en la materia. Los procedimientos de análisis incluyen electroforesis capilar (EC) y espectroscopía de masas por electronebulización. Dichos procedimientos de síntesis y análisis se pueden llevar a cabo en placas con múltiples pocillos. El procedimiento de la descripción no está limitado por el procedimiento de purificación de oligómeros.

Sales, profármacos y bioequivalentes

Los compuestos antisentido de la presente descripción comprenden cualquier sal, éster o sal de dichos ésteres farmacéuticamente aceptable, o cualquier otro equivalente químico funcional que, tras la administración a un animal, que incluye un ser humano, es capaz de proporcionar (directa o indirectamente) el metabolito biológicamente activo o residuo del mismo. Por consiguiente, por ejemplo, la descripción también se dirige a profármacos y sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos antisentido de la presente descripción, sales farmacéuticamente aceptables de dichos profármacos y otros bioequivalentes.

El término «profármaco» indica un agente terapéutico que está preparado en una forma inactiva o menos activa que se convierte a una forma activa (es decir, fármaco) dentro del cuerpo o células del mismo mediante la acción de enzimas endógenas, productos químicos y/o condiciones. En particular, las versiones de profármaco de los oligonucleótidos de la descripción se preparan como derivados de SATE ((S-acetil-2-tioetil) fosfato) de acuerdo con los procedimientos descritos en las publicaciones internacionales WO 93/24510 o WO 94/26764. Los profármacos también pueden incluir compuestos antisentido donde uno o ambos extremos comprenden nucleobases que se escinden (p. ej., mediante la incorporación de enlaces de esqueleto de fosfodiéster en los extremos) para producir el compuesto activo.

La expresión «sales farmacéuticamente aceptables» se refiere a sales fisiológicamente y farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la descripción: es decir, sales que retienen la actividad biológica deseada del compuesto parental y no confieren efectos toxicológicos no deseados al mismo. Las sales de sodio de los oligonucleótidos antisentido son útiles y bien aceptadas para administración terapéutica a humanos. En otra parte de la descripción, también se describen sales de sodio de compuestos de ARNdc.

Formulaciones

Los compuestos antisentido de la descripción también pueden mezclarse, encapsularse, conjugarse o asociarse de otro modo con otras moléculas, estructuras de molécula o mezclas de compuestos.

La presente descripción también incluye composiciones y formulaciones farmacéuticas que incluyen los compuestos antisentido de la descripción. Las composiciones farmacéuticas de la presente descripción pueden administrarse en varias formas que dependen de si se desea tratamiento local o sistémico y del área que va a tratarse. En una parte preferida de la descripción, la administración es tópica en la superficie del tracto respiratorio, particularmente pulmonar, por ejemplo, mediante nebulización, inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, por la boca y/o la nariz.

Las formulaciones farmacéuticas de la presente descripción, que pueden presentarse en forma de dosificación unitaria, pueden prepararse de acuerdo con técnicas convencionales muy conocidas en la industria farmacéutica. Dichas técnicas incluyen la etapa de poner en asociación los principios activos con el (los) vehículo(s) farmacéutico(s) o excipiente(s). En general, las formulaciones se preparan poniendo en asociación uniforme y de manera estrecha los

principios activos con vehículos líquidos, vehículos sólidos finamente divididos, o ambos, y luego, si fuera necesario, moldeando el producto (p. ej., con un tamaño de partícula específico para administración). En una parte preferida de la descripción, las formulaciones farmacéuticas de la presente descripción se preparan para administración pulmonar en un disolvente apropiado, por ejemplo, agua o solución salina normal, posiblemente en una formulación estéril, con

- 5 vehículos u otros agentes para permitir la formación de gotas del diámetro deseado para administración mediante inhaladores, dispositivos de administración nasal, nebulizadores y otros dispositivos para administración pulmonar. Como alternativa, las formulaciones farmacéuticas de la presente descripción se pueden formular como polvos secos para uso en inhaladores de polvo seco.
- 10 Un «vehículo farmacéutico» o «excipiente» puede ser un disolvente farmacéuticamente aceptable, agente de suspensión o cualquier otro vehículo farmacológicamente inerte para administrar uno o más ácidos nucleicos a un animal y son conocidos en la técnica. El excipiente puede ser líquido o sólido y se selecciona, teniendo en cuenta la forma de administración planificada, para proporcionar la cantidad, consistencia, etc. deseada, cuando se combina con un ácido nucleico y los otros componentes de una composición farmacéutica determinada.

15

Combinaciones

Las composiciones de la descripción pueden contener dos o más compuestos antisentido. En otro aspecto relacionado, las composiciones de la presente descripción pueden contener uno o más compuestos antisentido, particularmente oligonucleótidos, dirigidos a un primer ácido nucleico y uno o más compuestos antisentido adicionales dirigidos a una segunda diana de ácido nucleico. Como alternativa, las composiciones de la presente descripción pueden contener dos o más compuestos antisentido dirigidos a diferentes regiones de la misma diana de ácido nucleico. Pueden usarse dos o más compuestos combinados juntos o secuencialmente. Las composiciones de la presente descripción también se pueden combinar con otros agentes terapéuticos de compuestos no antisentido.

25

Descripción no restrictiva e incorporación por referencia

Si bien ciertos compuestos, composiciones y procedimientos se han descrito con especificidad de acuerdo con determinadas partes de la descripción, los siguientes ejemplos únicamente sirven para ilustrar los compuestos de la descripción y no pretenden limitarla.

30

Ejemplo 1

Diseño de compuestos antisentido modificados dirigidos a SMN2

35

De acuerdo con la presente descripción, se diseñaron compuestos antisentido para dirigirse al intrón 6, exón 7 o intrón 7 de SMN2 (SEQ ID NO: 1). Con referencia a la SEQ ID NO:1, los nucleótidos 61-114 representan el exón 7, mientras que los nucleótidos 1-60 y 115-174 representan porciones del intrón 6 e intrón 7, respectivamente. Los compuestos, incluidos en la Tabla 1, tienen o bien 12, 15, 16 o bien 18 nucleótidos de longitud y están compuestos por 2'-O-metoxietil-nucleótidos, también conocidos como nucleótidos 2'-MOE. Los enlaces internucleosídicos (esqueleto) son fosfodiéster en todo el oligonucleótido. Todos los residuos de citidina son 5-metilcitidinas. El sitio diana indica el primer número de nucleótido (el más 5') de la secuencia diana (SEQ ID NO: 1) al cual se une el oligonucleótido.

40

Tabla 1

Compuestos 2'-MOE dirigidos a SMN2					
# ISIS	Sitio diana	Región diana	Longitud	Secuencia (5' a 3')	SEQ ID NO
390645	1	Intrón 6	15	TAGATAGCTATATAT	2
393593	2	Intrón 6	15	ATAGATAGCTATATA	3
393592	3	Intrón 6	15	TATAGATAGCTATAT	4
393591	4	Intrón 6	15	ATATAGATAGCTATA	5
393590	5	Intrón 6	15	GATATAGATAGCTAT	6
393602	5	Intrón 6	12	ATAGATAGCTAT	7
390644	6	Intrón 6	15	AGATATAGATAGCTA	8

ES 2 702 531 T3

393601	6	Intrón 6	12	TATAGATAGCTA	9
393589	7	Intrón 6	15	TAGATATAGATAGCT	10
393600	7	Intrón 6	12	ATATAGATAGCT	11
393588	8	Intrón 6	15	ATAGATATAGATAGC	12
393599	8	Intrón 6	12	GATATAGATAGC	13
393587	9	Intrón 6	15	TATAGATATAGATAG	14
393598	9	Intrón 6	12	AGATATAGATAG	15
393586	10	Intrón 6	15	ATATAGATATAGATA	16
393597	10	Intrón 6	12	TAGATATAGATA	17
390643	11	Intrón 6	15	TATATAGATATAGAT	18
393596	11	Intrón 6	12	ATAGATATAGAT	19
393595	12	Intrón 6	12	TATAGATATAGA	20
393594	13	Intrón 6	12	ATATAGATATAG	21
390642	16	Intrón 6	15	ATAGCTATATAGATA	22
390641	21	Intrón 6	15	AAAAAATAGCTATAT	23
390640	26	Intrón 6	15	GTTAAAAAAAATAGC	24
390639	31	Intrón 6	15	AGGAAGTTAAAAAAA	25
390638	36	Intrón 6	15	AATAAAGGAAGTTAA	26
390637	41	Intrón 6	15	AGGAAAATAAAGGAA	27
390636	46	Intrón 6	15	CTGTAAGGAAAATAA	28
372641	61	Exón 7	15	ATTTTGTCTAAAACC	29
385909	62	Exón 7	15	GATTTTGTCTAAAAC	30
383497	63	Exón 7	12	TTTTGTCTAAAA	31
385908	63	Exón 7	15	TGATTTTGTCTAAAA	32
383496	64	Exón 7	12	ATTTTGTCTAAA	33
385907	64	Exón 7	15	TTGATTTTGTCTAAA	34
383495	65	Exón 7	12	GATTTTGTCTAA	35
385906	65	Exón 7	15	TTTGATTTTGTCTAA	36
385910	65	Exón 7	16	TTTTGATTTTGTCTAA	37
372642	66	Exón 7	15	TTTTGATTTTGTCTA	38
383494	66	Exón 7	12	TGATTTTGTCTA	39
383493	67	Exón 7	12	TTGATTTTGTCT	40
385905	67	Exón 7	15	TTTTTGATTTTGTCT	41
383492	68	Exón 7	12	TTTGATTTTGTCT	42
385904	68	Exón 7	15	CTTTTGTATTTTGTCT	43
383491	69	Exón 7	12	TTTTGATTTTGT	44

ES 2 702 531 T3

383490	70	Exón 7	12	TTTTTGATTTTG	45
372643	71	Exón 7	15	CTTCTTTTGGATTTT	46
383489	71	Exón 7	12	CTTTTGGATTTT	47
383488	72	Exón 7	12	TCTTTTGGATTT	48
372644	76	Exón 7	15	CCTTCCTTCTTTTGG	49
372645	81	Exón 7	15	GAGCACCTTCCTTCT	50
372646	86	Exón 7	15	AATGTGAGCACCTTC	51
372647	91	Exón 7	15	TAAGGAATGTGAGCA	52
383470	92	Exón 7	18	AATTTAAGGAATGTGAGC	53
383477	92	Exón 7	15	TTAAGGAATGTGAGC	54
383469	93	Exón 7	18	TAATTTAAGGAATGTGAG	55
383476	93	Exón 7	15	TTTAAGGAATGTGAG	56
383487	93	Exón 7	12	AAGGAATGTGAG	57
383468	94	Exón 7	18	TTAATTTAAGGAATGTGA	58
383475	94	Exón 7	15	ATTTAAGGAATGTGA	59
383486	94	Exón 7	12	TAAGGAATGTGA	60
383467	95	Exón 7	18	CTTAATTTAAGGAATGTG	61
383474	95	Exón 7	15	AATTTAAGGAATGTG	62
383485	95	Exón 7	12	TTAAGGAATGTG	63
372648	96	Exón 7	15	TAATTTAAGGAATGT	64
383466	96	Exón 7	18	CCTTAATTTAAGGAATGT	65
383484	96	Exón 7	12	TTTAAGGAATGT	66
383473	97	Exón 7	15	TTAATTTAAGGAATG	67
383483	97	Exón 7	12	ATTTAAGGAATG	68
383472	98	Exón 7	15	CTTAATTTAAGGAAT	69
383482	98	Exón 7	12	AATTTAAGGAAT	70
383471	99	Exón 7	15	CCTTAATTTAAGGAA	71
383481	99	Exón 7	12	TAATTTAAGGAA	72
372649	100	Exón 7	15	TCCTTAATTTAAGGA	73
383480	100	Exón 7	12	TTAATTTAAGGA	74
383479	101	Exón 7	12	CTTAATTTAAGG	75
383478	102	Exón 7	12	CCTTAATTTAAG	76
390646	115	Intrón 7	15	TGCTGGCAGACTTAC	77
390647	120	Intrón 7	15	CATAATGCTGGCAGA	78
393610	121	Intrón 7	15	TCATAATGCTGGCAG	79
393609	122	Intrón 7	15	TTCATAATGCTGGCA	80

393608	123	Intrón 7	15	TTTCATAATGCTGGC	81
387949	124	Intrón 7	20	ATTCACCTTTCATAATGCTGG	82
393607	124	Intrón 7	15	CTTTCATAATGCTGG	83
393619	124	Intrón 7	12	TCATAATGCTGG	84
390648	125	Intrón 7	15	ACTTTCATAATGCTG	85
393618	125	Intrón 7	12	TTCATAATGCTG	86
393606	126	Intrón 7	15	CACTTTCATAATGCT	87
393617	126	Intrón 7	12	TTTCATAATGCT	88
393605	127	Intrón 7	15	TCACCTTTCATAATGC	89
393616	127	Intrón 7	12	CTTTCATAATGC	90
393604	128	Intrón 7	15	TTCACCTTTCATAATG	91
393615	128	Intrón 7	12	ACTTTCATAATG	92
393603	129	Intrón 7	15	ATTCACCTTTCATAAT	93
393614	129	Intrón 7	12	CACTTTCATAAT	94
390649	130	Intrón 7	15	GATTCACCTTTCATAA	95
393613	130	Intrón 7	12	TCACCTTTCATAA	96
393612	131	Intrón 7	12	TTCACCTTTCATA	97
393611	132	Intrón 7	12	ATTCACCTTTCAT	98
390650	135	Intrón 7	15	AGTAAGATTCACTTT	99
390651	140	Intrón 7	15	ACAAAAGTAAGATTC	100
390652	145	Intrón 7	15	GTTTTACAAAAGTAA	101
390653	150	Intrón 7	15	ATAAAGTTTTACAAA	102
390654	155	Intrón 7	15	AAACCATAAAGTTTT	103
390655	160	Intrón 7	15	TCCACAAACCATAAA	104

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

Ejemplo 2

Tratamiento con compuestos oligoméricos

10

Cuando las células alcanzan una confluencia apropiada, se tratan con oligonucleótido utilizando el procedimiento de transfección descrito.

LIPOFECTIN™

15

Cuando las células alcanzan 65-75 % de confluencia, se tratan con oligonucleótido. El oligonucleótido se mezcla con LIPOFECTIN™; Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) en medio sérico reducido Opti-MEM™-1 (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) para conseguir la concentración deseada de oligonucleótido y LIPOFECTIN™; concentración de 2,5 o 3 µg/mL cada 100 nM de oligonucleótido. Esta mezcla de transfección se incuba a temperatura ambiente durante aproximadamente 0,5 horas. Para células cultivadas en placas de 96 pocillos, los pocillos se lavan

20

una vez con 100 µL de OPTI-MEM™-1 y a continuación se tratan con 130 µL de la mezcla de transfección. Las células cultivadas en placas de 24 pocillos u otras placas de cultivo de tejido estándar se tratan de manera similar, utilizando volúmenes apropiados de medio y oligonucleótido. Las células se tratan y los datos se obtienen por duplicado o triplicado. Después de aproximadamente 4-7 horas de tratamiento a 37 °C, el medio que contiene la mezcla de transfección se reemplaza por medio de cultivo nuevo.

Electroporación

Cuando las células alcanzan aproximadamente 80 % de confluencia, se introduce el oligonucleótido por electroporación. Las concentraciones de oligonucleótido utilizadas en experimentos de electroporación oscilan entre 0,1 y 40 µM. Las células se recogen mediante tripsinización de rutina para producir una suspensión monocelular. Después del recuento celular utilizando un hemocitómetro y de la sedimentación por centrifugación, las células se volvieron a colocar en suspensión en medio sérico reducido OPTI-MEM™-1 (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) para conseguir una densidad de 1×10^7 células/mL. Las células se mezclan con la concentración deseada de oligonucleótido y se transfieren a una cubeta de electroporación de 0,1 cm (BTX Molecular Delivery Systems, Hollister, MA). Las células se someten a un pulso único utilizando un aparato de electroporación (por ejemplo, el BTX Electro Square Porator T820 o el BTX HT300, BTX Molecular Delivery Systems, Hollister, MA), diluido en medio de cultivo y colocado en placas de 24 pocillos. Las células se tratan y los datos se obtuvieron por duplicado o triplicado.

20 Ejemplo 3

Minigenes para estudios de splicing de SMN2

Todos los constructos de SMN son derivados de pCITel (Lorson y Androphy, Hum. Mol. Genet., 2000, 9, 259-265). Los cebadores utilizados para generar cada constructo de SMN2 se muestran en la Tabla 2. Utilizando un kit Quickchange (Stratagene, La Jolla, CA), se insertó un sitio XbaI mediante mutagénesis dirigida a sitio en el nucleótido 7170 (en el intrón 7) para generar pCI-SMNx-wt. Para estudios de transcripción in vitro, el intrón 6 se acortó por PCR de superposición-extensión para generar pCISMNxΔ6-wt, eliminando 5.570 nt de la posición 1235 al sitio BclI en nt 6805. Se llevaron a cabo dos PCR con polimerasa Pfu y pCISMNx-wt como plantilla. El primer PCR se llevó a cabo con cebadores CIF1 y Δ6-bclR, el segundo con cebadores smnΔ6-vrlp y CIR. Los productos de PCR fueron purificados, combinados y reamplificados con los cebadores exteriores (CIF1 y CIR). El producto final se digirió con XhoI y NotI y se subclonó en pCISMNx-wt digerido con las mismas enzimas. Todos los constructos se verificaron por secuenciación directa. Se generaron plantillas para transcripción in vitro mediante amplificación por PCR de pCISMNxΔ6-wt utilizando los cebadores CIF2 y smn8-75+5'R. Los productos finales contenían un promotor T7, el exón 6 (124 nt), un intrón 6 acortado (200 nt), el exón 7 (54 nt), el intrón 7 (444 nt), y 75 nt del exón 8 seguido por un sitio de splicing 5' de consenso (GTAAGTACTT; SEQ ID NO: 22) (Cartegni y Krainer, Nature Genet., 2002, 30, 377-384; WO 02/38738).

Tabla 2

Cebadores utilizados para generar minigenes de SMN2 y plantillas			
Constructo	Nombre del cebador	Secuencia del cebador	SEQ ID NO
pCI-SMNx-wt	smn17xbaF	AGATAAAAGGTTAATCTAGATCCCTACTAGAATTCTC	106
pCI-SMNx-wt	smn17xbaR	GAGAATTCTAGTAGGGATCTAGATTAACCTTTTATCT	107
pCISMNxΔ 6-wt	CIF1	AATTGCTAACGCAGTCAGTGCTTC	108
pCISMNxΔ 6-wt	Δ 6-bclR	AATATGATCAGCAAAACAAAGTCACATAACTAC	109
pCISMNxΔ 6-wt	smnΔ 6-vrlp	GTGACTTTGTTTGCTGATCATATTTTGTGAATAAAATAA G	110
pCISMNxΔ 6-wt	CIR	AATGTATCTTATCATGTCTGCTCG	111
Plantillas in vitro	CIF2	AATGTATCTTATCATGTCTGCTCG	112
Plantillas in vitro	Smn8-75+5'R	AAGTACTTACCTGTAACGCTTCACATTCCAGATCTGTC	113

40 Ejemplo 4

Efecto de compuestos antisentido en splicing de SMN2 en extractos libres de células

Los compuestos antisentido 2'-MOE diseñados para dirigirse al exón 7 de SMN2 se evaluaron para determinar su efecto en el splicing de SMN2. Las plantillas para estudios de splicing de SMN2 in vitro se generaron como se describe en el Ejemplo 3. Los transcritos de separación de T7 con 5' tapado a partir de productos de PCR se marcaron con [α -³²P]-UTP y se purificaron mediante electroforesis con gel de poliacrilamida desnaturalizante. Los transcritos in vitro marcados se sometieron a splicing en extractos nucleares de células HeLa o S100 (Mayeda y Krainer, *Methods Mol. Biol.*, 1999, 118, 315-321; Mayeda y Krainer, *Methods Mol. Biol.*, 1999, 118, 309-314) incubando 10 fmol de transcrito en 12,5 μ l de reacciones de splicing estándar que contenían 3 μ l de extracto nuclear o 2 μ l de extracto S100. Los extractos o bien no contenían ningún oligonucleótido antisentido o se complementaban con 1, 5, 10, 25, 50, 100, 200 o 400 nM de ISIS 372641, ISIS 372642, ISIS 372643, ISIS 372644, ISIS 372645, ISIS 372646, ISIS 372647, ISIS 372648 o ISIS 372649. El oligonucleótido de control ISIS 372693 también se utilizó en este estudio (TTGTATTCTATGTTT; SEQ ID NO: 114). La concentración de MgCl₂ de la mezcla de splicing fue 1,6 mM. Después de la incubación a 30 °C durante 4 horas, se extrajo ARN y se analizó con geles de poliacrilamida desnaturalizantes al 8 %, seguido de autoradiografía y análisis con lector de placa de fósforo fotoestimulable (PhosphorImager). La inclusión del exón se calculó como un porcentaje de la cantidad total de ARNm sometido a splicing (ARNm incluido x 100/(ARNm incluido + ARNm omitido)).

Los resultados mostraron que varios oligonucleótidos antisentido de SMN2 alteraron el splicing del exón 7 de SMN2, mientras que el oligonucleótido de control ISIS 372693 no produjo ningún efecto. El ISIS 372641 promovió la omisión del exón 7 de SMN2 de una manera dependiente de la dosis. El exón 7 se incluyó en únicamente 2 % de los transcritos sometidos a splicing de SMN2 incubados con 400 nM de ISIS 372641, en comparación con 26 % de los transcritos incubados con ningún oligonucleótido. De manera similar, el ISIS 372646 inhibió la inclusión del exón 7 de una manera dependiente de la dosis con 16 % de los transcritos sometidos a splicing de SMN2 que contenían el exón 7, en comparación con 32 % de los transcritos incubados sin oligonucleótido. Por el contrario el ISIS 372642 inhibió la omisión del exón 7 de una manera dependiente de la dosis. El porcentaje de transcritos sometidos a splicing de SMN2 que contenían el exón 7 aumentó de 28 % cuando se incubaron sin oligonucleótido a 40 % cuando se incubaron con 400 nM de ISIS 372642. El ISIS 372648 también aumentó la inclusión del exón 7 con 69 % de los transcritos de SMN2 que contenían el exón 7 cuando se incubaron con la mayor concentración de oligonucleótido, en comparación con 42 % de los transcritos cuando se incubaron sin oligonucleótido. Los extractos que contenían ISIS 372643 también mostraron un ligero aumento en la inclusión del exón 7 con las mayores concentraciones de oligonucleótido. En conjunto, estos resultados ilustran que los oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 7 de SMN2 son capaces de alterar el splicing de transcritos para ya sea promover o inhibir la inclusión del exón 7.

Ejemplo 5

35 Efecto de compuestos antisentido en splicing de SMN2 en células HEK293

Los compuestos antisentido dirigidos al exón 7 de SMN2 se evaluaron para determinar sus efectos en el splicing de SMN2 en células cultivadas. Las células HEK293 se sometieron a electroporación con 10 μ g de minigén de SMN2 y 10 μ M de o bien oligonucleótido antisentido de SMN2 ISIS 372641, ISIS 372642, ISIS 372643, ISIS 372644, ISIS 372645, ISIS 372646, ISIS 372647, ISIS 372648 o bien ISIS 372649, u oligonucleótido de control ISIS 372693. Sesenta horas después de la transfección, se aisló ARN total utilizando reactivo Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Un μ g de ARN total tratado con DNasa se utilizó para generar secuencias de primera cadena de ADNc con oligo(dT) y transcriptasa inversa Superscript II (Invitrogen), y el ADNc se amplificó semicuantitativamente a través de 16 ciclos de PCR (94 °C durante 30 s, 57,5 °C durante 30 s, 72 °C durante 90 s) en presencia de [α -³²P]dCTP (Lorson y Androphy, *Hum. Mol. Genet.*, 2000, 9, 259-265). Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis con geles de poliacrilamida desnaturalizantes al 6 %, y a continuación se llevó a cabo autoradiografía y análisis con lector de placa de fósforo fotoestimulable (PhosphorImager). La inclusión del exón se calculó como un porcentaje de la cantidad total de ARNm sometido a splicing (ARNm incluido x 100/(ARNm incluido + ARNm omitido)). El porcentaje de transcritos sometidos a splicing de SMN2 que contenían el exón 7 (% de inclusión) se muestra en la Tabla 3. También se indica el sitio diana de cada oligonucleótido respecto de la SEQ ID NO: 1.

Tabla 3

Efecto de compuestos antisentido de SMN2 en la inclusión del exón 7		
# ISIS	Sitio diana	% de inclusión
372641	61	6,4
372642	66	67,4

372643	71	34,9
372644	76	12,9
372645	81	7,8
372646	86	11,8
372647	91	9,5
372648	96	75,2
372649	100	55,1
372693	Control	57,7

En comparación con el oligonucleótido de control, la transfección con o bien ISIS 372642 o 372648 produjo un mayor porcentaje de transcritos de SMN2 con el exón 7 incluido, lo cual condice con los resultados obtenidos en los ensayos in vitro. El tratamiento con ISIS 372641, ISIS 372644, ISIS 372645, ISIS 372646 y ISIS 372647 produjo el aumento más significativo en la omisión del exón 7.

Los oligonucleótidos antisentido de SMN2 se evaluaron adicionalmente para determinar sus efectos en el splicing de pre-ARNm de SMN1 y SMN2 endógenos en células cultivadas. Las células HEK293 se sometieron a electroporación con 10 μ M de o bien oligonucleótido antisentido de SMN2 ISIS 372641, ISIS 372642, ISIS 372643, ISIS 372644, ISIS 372645, ISIS 372646, ISIS 372647, ISIS 372648 o ISIS 372649, u oligonucleótido de control ISIS 372693. Sesenta horas después de la transfección, se aisló ARN y se llevó a cabo RT-PCR como se describe más arriba para examinar cambios en los pre-ARNm de SMN1 y SMN2. Los productos de PCR se digirieron con Ddel para distinguir entre SMN1 y SMN2, se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes al 6 % y se analizaron por autoradiografía. El porcentaje de transcritos sometidos a splicing de SMN1 y SMN2 que contenían el exón 7 (% de inclusión) se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4

Efecto de oligonucleótidos antisentido de SMN2 en el splicing de pre-ARNm de SMN1 y SMN2		
# ISIS	% de inclusión SMN1	% de inclusión SMN2
372641	82,5	11,1
372642	96,2	69,5
372643	94,1	28,8
372644	68,5	23,8
372645	47,3	15,2
372646	57,7	20,2
372647	58,8	12,8
372648	93,1	52,2
372649	94,8	49,3
372693	95,1	50,1

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

Se evaluaron oligonucleótidos antisentido adicionales dirigidos al extremo 3' del exón 7 de SMN2 (véase Tabla 1) para determinar sus efectos en el splicing de pre-ARNm de SMN2. Las células HEK293 se sometieron a electroporación con 10 μ M de o bien oligonucleótido antisentido de SMN2 ISIS 383466, ISIS 383467, ISIS 383468, ISIS 383469, ISIS

383470, ISIS 383471, ISIS 383472, ISIS 383473, ISIS 383474, ISIS 383475, ISIS 383476, ISIS 383477 o ISIS 372648, o un oligonucleótido de control. Cincuenta horas después de la transfección, se aisló ARN y se llevó a cabo RT-PCR como se describe más arriba para examinar cambios en el splicing del pre-ARNm de SMN2. Los productos de PCR se digirieron con Ddel para distinguir entre SMN1 y SMN2, se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes al 6 % y se analizaron por autoradiografía. El porcentaje de transcritos sometidos a splicing de SMN2 que contenían el exón 7 (% de inclusión) se muestra en la Tabla 5. También se indica la longitud y el sitio diana de cada oligonucleótido respecto de la SEQ ID NO: 1.

Tabla 5

Efecto de oligonucleótidos antisentido de SMN2 en el splicing de pre-ARNm de SMN2			
# ISIS	Sitio diana	Longitud	% de inclusión
383470	92	18	4,9
383477	92	15	5,3
383469	93	18	18,9
383476	93	15	32,8
383468	94	18	18,7
383475	94	15	84,8
383467	95	18	8,1
383474	95	15	77,0
372648	96	15	59,6
383466	96	18	37,5
383473	97	15	42,2
383472	98	15	45,0
383471	99	15	37,1
Control	N/A	N/A	41,3
Vehículo	N/A	N/A	41,4

10

Los resultados demuestran que una cantidad de oligonucleótidos antisentido de SMN2 pueden alterar el splicing de pre-ARNm de SMN2. ISIS 383467, ISIS 383468, ISIS 383469, ISIS 383470, ISIS 383476 e ISIS 383477 inhibieron la inclusión del exón 7; ISIS 383474, ISIS 383475 e ISIS 372648 aumentaron significativamente la inclusión del exón 7; e ISIS 383466, ISIS 383471, ISIS 383472 e ISIS 383473 parecieron producir poco efecto en el splicing de SMN2, en comparación con los controles de oligonucleótido y vehículo. Estos resultados sugieren que los oligonucleótidos de SMN2 con un sitio diana entre los nucleótidos 94-96 son particularmente eficaces para conseguir la inclusión del exón 7 durante el splicing de pre-ARNm de SMN2, y además sugieren que los oligonucleótidos de 15 nucleótidos de longitud son más eficaces que los de 18 nucleótidos de longitud.

15

20 Ejemplo 6

Efecto de compuestos antisentido en el splicing de SMN2 en fibroblastos de AME

De acuerdo con la presente descripción, los oligonucleótidos antisentido de SMN2 se analizaron en fibroblastos derivados de un paciente con AME de tipo I (línea celular 3813; Coover et al., Human Mol. Genet., 1997, 6, 1205-1214). Los fibroblastos de AME contienen SMN2 pero no expresan SMN1. Los fibroblastos de AME se sometieron a lipofección con 200 nM de o bien oligonucleótido antisentido de SMN2 ISIS 372641, ISIS 372642, ISIS 372643, ISIS 372644, ISIS 372645, ISIS 372646, ISIS 372647, ISIS 372648 o ISIS 372649, u oligonucleótido de control ISIS 372693. Setenta horas después de la transfección, se aisló ARN y se llevó a cabo RT-PCR como se describe más arriba para examinar cambios en el splicing de los pre-ARNm de SMN2 endógeno. Los productos de PCR se separaron por electroforesis y se analizaron por autoradiografía. El porcentaje de transcritos sometidos a splicing de SMN2 que

30

contenían el exón 7 (% de inclusión) se muestra en la Tabla 6. También se indica el sitio diana de cada oligonucleótido respecto de la SEQ ID NO: 1.

Tabla 6

Efecto de oligonucleótidos antisentido de SMN2 en la inclusión del exón 7 en fibroblastos de AME		
# ISIS	Sitio diana	% de inclusión
372641	61	41,8
372642	66	55,2
372643	71	40,9
372644	76	43,4
372645	81	43,7
372646	86	38,8
372647	91	43,6
372648	96	49,8
372649	100	48,8
372693	Control	48,7
PBS	N/A	48,8

5

De acuerdo con los resultados previos, el tratamiento con ISIS 372642 e ISIS 372648 generó un porcentaje mayor de productos de splicing de SMN2 que contenían el exón 7.

Se llevó a cabo un segundo experimento para evaluar adicionalmente ISIS 372642 e ISIS 383475 en fibroblastos de AME. Los fibroblastos de AME se sometieron a lipofección con o bien ISIS 372642 200 nM, ISIS 383475 200 nM, o ISIS 372642 100 nM en combinación con ISIS 383475 100 nM. El ISIS 372693 (200 nM) y el vehículo solo también se utilizaron como controles. Cincuenta horas después de la transfección, se aisló ARN y se llevó a cabo RT-PCR. Los productos de PCR se separaron por electroforesis y se analizaron por autoradiografía. El porcentaje de transcritos sometidos a splicing de SMN2 que contenían el exón 7 (% de inclusión) se muestra en la Tabla 7.

15

Tabla 7

Efecto de ISIS 372642 e ISIS 383475 en la inclusión del exón 7 en fibroblastos de AME	
Tratamiento (# ISIS)	% de inclusión
372642	47,8
383475	53,9
372642 & 383475.	49,2
372693	36,3
Vehículo	35,0

Los resultados demuestran que el tratamiento con ISIS 372642 o ISIS 383475, ya sea solos o en combinación, produce una mayor inclusión del exón 7 en transcritos de AME.

20

Ejemplo 7

Microcamino de sitios diana de ISIS 372642 e ISIS 372648

25 Los estudios mencionados anteriormente demostraron que tanto ISIS 372642 como ISIS 372648 resultaron eficaces

para promover la inclusión del exón 7 de SMN2. Para evaluar adicionalmente los sitios diana que rodean a estos compuestos, se diseñaron compuestos adicionales como microcaminos de un nucleótido alrededor de cada sitio (véase Tabla 1 para las secuencias y sitios diana). Diez compuestos de 12 nucleótidos de longitud se diseñaron para cada microcamino. Se diseñaron siete compuestos adicionales de 15 o 16 nucleótidos de longitud para ser dirigidos a la región del ISIS 372642. Los compuestos antisentido dirigidos al extremo 3' del exón 7 (ISIS 383466-382477), descritos anteriormente en el Ejemplo 5, se incluyeron para compararlos con los compuestos del microcamino del ISIS 372648. Cada compuesto se evaluó en el ensayo de splicing del minigén de SMN2 y el ensayo de splicing de SMN1/SMN2 endógeno en células HEK293. Ambos ensayos se describen en ejemplos previos en el presente documento. Se muestran los resultados en las Tablas 8 y 9.

10

Tabla 8

Compuestos del microcamino del ISIS 372642: Efecto en la inclusión del exón 7					
# ISIS	Sitio diana	Longitud	% de inclusión del minigén de SMN2	% de inclusión de SMN2 endógeno	% de inclusión de SMN1 endógeno
385909	62	15	44	43	81
383497	63	12	55	51	86
385908	63	15	49	53	85
383496	64	12	32	36	81
385907	64	15	56	54	86
383495	65	12	54	49	85
385906	65	15	56	57	87
385910	65	16	60	66	89
372642	66	15	66	74	89
383494	66	12	57	51	86
383493	67	12	57	52	85
385905	67	15	74	85	89
383492	68	12	60	56	85
385904	68	15	9	6	19
383491	69	12	38	41	81
383490	70	12	51	49	84
383489	71	12	13	27	76
383488	72	12	24	38	82
Control	N/A	N/A	52	51	86
Control	N/A	N/A	53	50	86

Tabla 9

Compuestos del microcamino del ISIS 372648 Efecto en la inclusión del exón 7					
# ISIS	Sitio diana	Longitud	% de inclusión del minigén de SMN2	% de inclusión de SMN2 endógeno	% de inclusión de SMN1 endógeno
383470	92	18	8	12	63
383477	92	15	6	7	38
383469	93	18	29	26	89

383476	93	15	36	31	87
383487	93	12	11	16	79
383468	94	18	31	26	88
383475	94	15	85	88	96
383486	94	12	44	41	91
383467	95	18	14	13	82
383474	95	15	79	71	94
383485	95	12	63	60	93
372648	96	15	70	57	93
383466	96	18	38	43	92
383484	96	12	65	56	92
383473	97	15	62	53	94
383483	97	12	63	56	94
383472	98	15	41	46	93
383482	98	12	59	45	94
383471	99	15	38	47	92
383481	99	12	42	46	92
383480	100	12	39	48	91
383479	101	12	44	44	92
383478	102	12	47	41	93
Control	N/A	N/A	41	44	93
Control	N/A	N/A	44	48	92

De acuerdo con los resultados previos, el tratamiento con ISIS 372642, ISIS 372648 o ISIS 383475 produjo un aumento significativo en la inclusión del exón 7. Asimismo, ISIS 385905 fue identificado como un compuesto particularmente eficaz para promover la inclusión del exón 7. Para evaluar adicionalmente ISIS 385905 e ISIS 383475, se llevaron a cabo estudios de respuesta a dosis y duración de acción. Para determinar el efecto de la dosis de oligonucleótido, se sometieron a electroporación células HEK293 con o bien ISIS 385905 o ISIS 383475 con una concentración de 0, 0,2, 0,5, 1, 2, 5, 10 o 20 μ M. Sesenta horas después de la electroporación, se aisló ARN y se llevó a cabo RT-PCR como se describe más arriba para determinar el alcance de la inclusión del exón 7. Los resultados, expresados como % de inclusión del exón 7, se muestran en la Tabla 10.

10

Tabla 10

Respuesta a dosis de ISIS 385905 e ISIS 383475								
# ISIS	0 μ M	0,2 μ M	0,5 μ M	1,0 μ M	2,0 μ M	5,0 μ M	10 μ M	20 μ M
385905	50	53	61	65	74	78	82	87
383475	51	57	65	72	77	83	87	89

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

Tabla 11

Duración de acción de ISIS 385905 e ISIS 383475						
# ISIS	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
385905	49	80	83	82	85	79
383475	48	84	89	88	89	83

10 Los resultados muestran un aumento significativo en la inclusión del exón 7 después del tratamiento de cualquier compuesto, y también muestran que los compuestos son eficaces durante al menos cinco días.

En conjunto, los resultados de los experimentos detallados más arriba demuestran que los compuestos antisentido que tienen un sitio diana (nucleótido más 5' al cual se une el compuesto) de los nucleótidos 64-68 o 94-97 de la SEQ ID NO: 1 son más eficaces para promover la inclusión del exón 7 en transcritos de SMN2. Los sitios diana de estos compuestos se superponen con elementos ESS (silenciador de splicing exónico), sin superponerse significativamente con elementos ESE (potenciador de splicing exónico) predichos. Por lo tanto, los compuestos antisentido descritos en el presente documento pueden funcionar bloqueando la unión de factores de splicing trans a elementos reguladores en cis particulares, influenciando de este modo la selección del sitio de splicing y específicamente la inclusión o exclusión del exón 7 de los ARNm de SMN2.

Ejemplo 8

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

25 En ejemplos previos del presente documento, se mostró que los compuestos antisentido ISIS 372642, ISIS 385905 e ISIS 383475, cada uno de los cuales se dirige al exón 7, aumentan significativamente la inclusión del exón 7 de SMN2. Estos compuestos dirigidos al exón 7 y un compuesto dirigido al intrón 7 de SMN2 (ISIS 387949) fueron comparados para determinar su capacidad para promover la inclusión del exón 7. Como se describe en los ejemplos previos del presente documento, las células HEK293 se sometieron a electroporación con 10 μ M de oligonucleótido y se llevó a cabo RT-PCR después de dos días para examinar los cambios en el splicing de SMN1 y SMN2 endógenos. En comparación con el oligonucleótido de control, los compuestos dirigidos al exón 7 mostraron un aumento significativo en la inclusión del exón 7, como era de esperar. Asimismo, el compuesto dirigido al intrón 7 produjo la incorporación del exón 7 en casi todos los ARNm de SMN1 y SMN2. Estos resultados sugieren que los compuestos antisentido dirigidos a secuencias intrónicas también contribuyen a la incorporación del exón 7 de SMN2. Las secuencias intrónicas también son conocidas por contener elementos reguladores de splicing (es decir, potenciadores de splicing intrónicos y silenciadores de splicing intrónicos), proporcionando un posible mecanismo de acción para ISIS 387949.

Ejemplo 9

Mapeo sistemático de silenciadores de splicing intrónicos (ISS)

Para investigar adicionalmente si los compuestos antisentido dirigidos a los intrones que rodean al exón 7 de SMN2 podrían alterar la inclusión del exón 7 como, por ejemplo, interfiriendo con los silenciadores de splicing intrónicos, los compuestos se diseñaron para dirigirse a los 60 nucleótidos del intrón 6 (nucleótidos 1-60 de la SEQ ID NO: 1) o a los 60 nucleótidos del intrón 7 (nucleótidos 115-174 de la SEQ ID NO: 1) inmediatamente adyacentes al exón 7. Los compuestos antisentido dirigidos al intrón 6 (ISIS 390636, ISIS 390637, ISIS 390638, ISIS 390639, ISIS 390640, ISIS

390641, ISIS 390642, ISIS 390643, ISIS 390644 e ISIS 390645) o al intrón 7 (ISIS 390646, ISIS 390647, ISIS 390648, ISIS 390649, ISIS 390650, ISIS 390651, ISIS 390652, ISIS 390653, ISIS 390654 e ISIS 390655) se mostraron anteriormente en la Tabla 1. Cada compuesto se analizó en tres ensayos diferentes para evaluar su efecto sobre la inclusión del exón 7: Splicing del minigén de SMN2 en extractos libres de células, splicing del minigén de SMN2 en células HEK293 transfectadas y splicing de SMN2 endógeno en células HEK293. Los resultados obtenidos de los tres ensayos demostraron que varios compuestos antisentido pudieron aumentar la inclusión del exón 7. En particular, ISIS 390644 e ISIS 390648 fueron los compuestos dirigidos al intrón 6 y al intrón 7 más eficaces, respectivamente.

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

15

Tabla 12

Resultados del microcamino del intrón 6 Compuesto ISIS 390644				
# ISIS	Sitio diana	Longitud	% de inclusión del minigén de SMN2	% de inclusión de SMN2 endógeno
393586	10	15	10	32
393587	9	15	18	44
393588	8	15	32	60
393589	7	15	59	79
390644	6	15	65	75
393590	5	15	49	67
393591	4	15	20	46
393592	3	15	22	44
393593	2	15	29	50
393594	13	12	20	44
393595	12	12	13	39
393596	11	12	15	44
393597	10	12	13	39
393598	9	12	17	48
393599	8	12	30	64
393600	7	12	28	62
393601	6	12	44	63
393602	5	12	29	46
Control	N/A	N/A	22	43

Como se muestra en la Tabla 12, los compuestos antisentido que tienen un sitio diana de nucleótidos 5-8 (SEQ ID NO: 1) producen el porcentaje más alto de transcritos que contienen el exón 7. Estos resultados sugieren que esta región del intrón 6 contiene un silenciador de splicing intrónico, que normalmente funciona para inhibir la inclusión del exón 7. Tras el bloqueo de este elemento regulador, la selección del sitio de splicing se altera para promover la inclusión del exón 7.

Los compuestos dirigidos a la región de 390648 (intrón 7) fueron analizados utilizando el minigén de SMN2 in vitro y en células HEK293 transfectadas y se analizaron en el ensayo de splicing de SMN2 endógeno en células HEK293.

Los resultados se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13 Resultados del microcamino del intrón 7 Compuesto ISIS 390648					
# ISIS	Sitio diana	Longitud	% de inclusión de minigén in vitro de SMN2	% de inclusión del minigén de SMN2	% de inclusión de SMN2 endógeno
393603	129	15	43	51	76
393604	128	15	46	75	97
393605	127	15	57	97	100
393606	126	15	56	97	100
390648	125	15	53	98	100
393607	124	15	67	100	100
393608	123	15	75	100	100
393609	122	15	60	97	100
393610	121	15	54	58	78
393611	132	12	41	17	40
393612	131	12	39	30	58
393613	130	12	42	43	64
393614	129	12	48	43	64
393615	128	12	38	36	44
393616	127	12	38	30	90
393617	126	12	36	30	92
393618	125	12	44	71	97
393619	124	12	69	92	97
Control	N/A	N/A	28	23	44

- 5 Si bien todos los compuestos produjeron un aumento en la inclusión del exón 7, los compuestos con sitios diana entre los nucleótidos 121 y 129 (SEQ ID NO: 1) fueron los más eficaces.

- Los compuestos seleccionados dirigidos al intrón 7 se evaluaron adicionalmente para determinar inclusión del exón 7 de SMN2 después de la transfección con una dosis de oligonucleótido baja de 0,1 μ M. Como se describió anteriormente en el presente documento, las células HEK293 se sometieron a electroporación con ISIS 393605, ISIS 393606, ISIS 390648, ISIS 393607, ISIS 393608, ISIS 393609, ISIS 393617, ISIS 393618 o ISIS 393619 y se determinaron los niveles de productos de splicing de SMN2 endógeno. Los resultados se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14 Efecto sobre incorporación del exón 7 de SMN2 después del tratamiento con dosis baja
--

# ISIS	Sitio diana	Longitud	% de inclusión de SMN2 endógeno
393605	127	15	56
393606	126	15	58
390648	125	15	60
393607	124	15	60
393608	123	15	63
393609	122	15	53
393617	126	12	51
393618	125	12	51
393619	124	12	57
Control	N/A	N/A	49

Como se muestra en la Tabla 14, incluso con una dosis muy baja, los compuestos antisentido dirigidos al intrón 7 son eficaces para promover la inclusión del exón 7. En conjunto, estos resultados sugieren que la región cercana al extremo 5' del intrón 7 (abarcando los nucleótidos 121-129 de la SEQ ID NO: 1) contiene un silenciador de splicing intrónico.

5

La descripción además incluye el tema de las reivindicaciones de la publicación internacional WO2007/002390 de la cual se deriva la presente solicitud, cuyo contenido se reproduce a continuación como párrafos numerados.

1. Un oligonucleótido antisentido dirigido al intrón 6, exón 7 o intrón 7 de una molécula de ácido nucleico que codifica SMN2, donde dicho oligonucleótido tiene una longitud de 12 a 20 nucleótidos y comprende una modificación de azúcar 2'-O-metoxietilo en cada posición.
2. El oligonucleótido del párrafo 1 que tiene 12 nucleótidos de longitud.
3. El oligonucleótido del párrafo 1 que tiene 15 nucleótidos de longitud.
4. El oligonucleótido del párrafo 1 que tiene 18 nucleótidos de longitud.
5. El oligonucleótido del párrafo 1 que se dirige a un elemento silenciador de splicing intrónico.
6. El oligonucleótido del párrafo 1 que se dirige a un elemento silenciador de splicing exónico.
7. El oligonucleótido del párrafo 1 que está dirigido al intrón 6.
8. El oligonucleótido del párrafo 7, donde el sitio diana de dicho oligonucleótido es el nucleótido 5, 6, 7 u 8 de la SEQ ID NO: 1.
9. El oligonucleótido del párrafo 7, donde la secuencia de nucleótidos de dicho oligonucleótido comprende al menos una porción de 8 nucleobases de la SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13.
10. El oligonucleótido del párrafo 1 que está dirigido al intrón 7.
11. El oligonucleótido del párrafo 10 donde el sitio diana de dicho oligonucleótido es el nucleótido 64, 65, 66, 67, 68, 94, 95, 96 o 97 de la SEQ ID NO: 1.
12. El oligonucleótido del párrafo 10, donde la secuencia de nucleótidos de dicho oligonucleótido comprende al menos una porción de 8 nucleobases de la SEQ ID NO: 37, 38, 41, 59, 62, 63, 64, 66, 67 o 68.
13. El oligonucleótido del párrafo 1 que está dirigido al intrón 7.
14. El oligonucleótido del párrafo 13 donde el sitio diana de dicho oligonucleótido es el nucleótido 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128 o 129 de la SEQ ID NO: 1.
15. El oligonucleótido del párrafo 13, donde la secuencia de nucleótidos de dicho oligonucleótido comprende al menos una porción de 8 nucleobases de la SEQ ID NO: 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 89, 91 o 93.
16. Un procedimiento para promover la inclusión del exón 7 en transcritos de SMN2 en una célula, tejido u órgano, que comprende poner en contacto dicha célula, tejido u órgano con el oligonucleótido antisentido del párrafo 1.
17. El procedimiento del párrafo 16 donde dicho oligonucleótido se dirige a un elemento silenciador de splicing intrónico.
18. El procedimiento del párrafo 16 donde dicho oligonucleótido se dirige a un elemento silenciador de splicing exónico.
19. Un oligonucleótido antisentido del párrafo 1 para uso en terapias.
20. El uso de un oligonucleótido antisentido del párrafo 1 para la preparación de un medicamento para modular el splicing de un pre-ARNm de SMN2.
21. El uso del párrafo 20 donde el splicing de modulación produce un aumento en la inclusión del exón 7.
22. El uso de un oligonucleótido antisentido del párrafo 1 para la preparación de un medicamento para el tratamiento

de atrofia muscular espinal.

23. Una composición farmacéutica que comprende el oligonucleótido antisentido del párrafo 1.

5 CORE0058WO

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Isis Pharmaceuticals, Inc

10 Cold Spring Harbor Laboratory Brenda F. Baker
Adrian R. Krainer Yimin Hua

<120> Composiciones y procedimientos para modulación de splicing de SMN2

15 <130> CORE0058WO

<150> 60/693.542

<151> 23-06-2005

20 <160> 114

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1

25 <211> 174

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

30
atatatagct atctatatct atatagctat tttttttaac ttcctttatt ttccttacag 60
ggtttttagac aaaatcaaaa agaaggaagg tgctcacatt ccttaaatta aggagtaagt 120
ctgccagcat tatgaaagtg aatcttactt ttgtaaaact ttatggtttg tgga 174

<210> 2

<211> 15

35

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> Compuesto antisentido

<400> 2

tagatagcta tatat 15

45 <210> 3

<211> 15

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

50 <220>

<223> Compuesto antisentido

<400> 3

atagatagct atata 15

55

<210> 4

<211> 15

<212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Compuesto antisentido
 5 <400> 4
 tatagatagc tatat 15
 <210> 5
 10 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Compuesto antisentido
 <400> 5
 atatagatag ctata 15
 20 <210> 6
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Compuesto antisentido
 <400> 6
 gatatagata gctat 15
 30 <210> 7
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Compuesto antisentido
 <400> 7
 40 atagatagct at 12
 <210> 8
 <211> 15
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Compuesto antisentido
 50 <400> 8
 agatatagat agcta 15
 <210> 9
 <211> 12
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Compuesto antisentido
 60

<400> 9
 tatagatagc ta 12

 <210> 10
 5 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 10 <223> Compuesto antisentido

 <400> 10
 tagatataga tagct 15

 15 <210> 11
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 11
 atatatagatag ct 12
 25
 <210> 12
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 12
 35 atagatatag atagc 15

 <210> 13
 <211> 12
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 45 <400> 13
 gatatatagata gc 12

 <210> 14
 <211> 15
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido
 55
 <400> 14
 tatagatatata gatag 15

 <210> 15
 60 <211> 12

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Compuesto antisentido

 <400> 15
 agatatagat ag 12

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

 15 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 16
 atatagatat agata 15
 20
 <210> 17
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 17
 30 tagatataga ta 12

 <210> 18
 <211> 15
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 40 <400> 18
 tatatagata tagat 15

 <210> 19
 <211> 12
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido
 50
 <400> 19
 atagatatag at 12

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

 <220>
 60 <223> Compuesto antisentido

<400> 20
 tatagatata ga 12

5 <210> 21
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Compuesto antisentido

<400> 21
 atagatat ag 12

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

20 <220>
 <223> Compuesto antisentido

<400> 22
 25 atagctatat agata 15

<210> 23
 <211> 15
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Compuesto antisentido

35 <400> 23
 aaaaaatagc tatat 15

<210> 24
 40 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 45 <223> Compuesto antisentido

<400> 24
 gttaaaaaa atagc 15

50 <210> 25
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Compuesto antisentido

<400> 25
 60 aggaagtaa aaaaa 15

<210> 26
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 26
 10 aataaaggaa gtaa 15

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

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 20 <400> 27
 aggaaaataa aggaa 15

 <210> 28
 <211> 15
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 30 <223> Compuesto antisentido

 <400> 28
 ctgtaaggaa aataa 15

 35 <210> 29
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 40 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 29
 attttgtcta aaacc 15
 45
 <210> 30
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 30
 55 gattttgtct aaaac 15

 <210> 31
 <211> 12
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Compuesto antisentido

 5 <400> 31
 tttgtctaa aa 12

 <210> 32
 <211> 15
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido
 15
 <400> 32
 tgattttgtc taaaa 15

 <210> 33
 20 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 25 <223> Compuesto antisentido

 <400> 33

 attttgtcta aa 12
 30
 <210> 34
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 34
 40 ttgattttgt ctaaa 15

 <210> 35
 <211> 12
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 50 <400> 35
 gattttgtct aa 12

 <210> 36
 <211> 15
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido
 60

<400> 36
 ttgatttg tctaa 15

 <210> 37
 5 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 10 <223> Compuesto antisentido

 <400> 37
 tttgatttg gtctaa 16

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

 20 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 38
 tttgatttg gtcta 15
 25 <210> 39

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

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 35 <400> 39
 tgattttgct ta 12

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

 <220>
 <223> Compuesto antisentido
 45
 <400> 40
 ttgatttgc ct 12

 <210> 41
 50 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 55 <223> Compuesto antisentido

 <400> 41
 ttttgattt tgtct 15

 60 <210> 42

<211> 12
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Compuesto antisentido
 <400> 42
 ttgatttg tc 12
 10
 <210> 43
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Compuesto antisentido
 <400> 43
 20 cttttgatt ttgtc 15
 <210> 44
 <211> 12
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Compuesto antisentido
 30 <400> 44
 ttttgatttt gt 12
 <210> 45
 <211> 12
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial,
 <220>
 <223> Compuesto antisentido
 40
 <400> 45
 ttttgattt tg 12
 <210> 46
 45 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 50 <223> Compuesto antisentido
 <400> 46
 cttcttttg atttt 15
 55 <210> 47
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>

<223> Compuesto antisentido

<400> 47
cttttgatt tt 12

5 <210> 48
<211> 12
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Compuesto antisentido

<400> 48
15 tcttttgat tt 12

<210> 49
<211> 15
<212> ADN
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Compuesto antisentido

25 <400> 49
ccttccttct ttttg 15

<210> 50
<211> 15
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Compuesto antisentido

35 <400> 50
gagcaccttc cttct 15

<210> 51
40 <211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
45 <223> Compuesto antisentido

<400> 51
aatgtgagca ccttc 15

50 <210> 52
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Compuesto antisentido

<400> 52
60 taaggaatgt gagca 15

<210> 53
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 53
 10 aatttaagga atgtgagc 18

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

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 20 <400> 54
 ttaaggaatg tgagc 15

 <210> 55
 <211> 18
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido
 30
 <400> 55
 taatttaagg aatgtgag 18

 <210> 56
 35 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 40 <223> Compuesto antisentido

 <400> 56
 tttaaggaat gtgag 15

 45 <210> 57
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 50 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 57
 aaggaatgtg ag 12
 55
 <210> 58
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60

<220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 58
 5 ttaatttaag gaatgtga 18

 <210> 59
 <211> 15
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 15 <400> 59
 atttaaggaa tgtga 15

 <210> 60
 <211> 12
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 25 <223> Compuesto antisentido

 <400> 60
 taaggaaatgt ga 12

 30 <210> 61
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 35 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 61
 40 ctttaatttaa ggaatgtg 18
 <210> 62
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 62
 50 aatttaagga atgtg 15

 <210> 63
 <211> 12
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 60 <400> 63

ttaaggaatg tg 12

<210> 64
 <211> 15
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Compuesto antisentido

10 <400> 64
 taatttaagg aatgt 15

<210> 65
 15 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 20 <223> Compuesto antisentido

<400> 65
 ccttaattta aggaatgt 18

25 <210> 66
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Compuesto antisentido

<400> 66
 35 ttaaggaat gt 12

<210> 67
 <211> 15
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Compuesto antisentido

45 <400> 67
 ttaatttaag gaatg 15

<210> 68
 <211> 12
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Compuesto antisentido

55 <400> 68
 atttaaggaa tg 12

<210> 69
 60 <211> 15

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Compuesto antisentido

 <400> 69
 ctttaatttaa ggaat 15

 10 <210> 70
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 70

 20 aatttaagga at 12

 <210> 71
 <211> 15
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 30 <400> 71
 ccttaattta aggaa 15

 <210> 72
 <211> 12
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido
 40
 <400> 72
 taatttaagg aa 12

 <210> 73
 45 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 50 <223> Compuesto antisentido

 <400> 73
 tccttaattt aagga 15

 55 <210> 74
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 60 <220>

<223> Compuesto antisentido

<400> 74
ttaaattaag ga 12

5 <210> 75
<211> 12
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Compuesto antisentido

<400> 75
15 ctaaatttaa gg 12

<210> 76

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

<220>
<223> Compuesto antisentido

25 <400> 76
cctaattta ag 12

<210> 77
30 <211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> Compuesto antisentido

<400> 77
tgctggcaga ctac 15

40 <210> 78
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Compuesto antisentido

<400> 78
cataatgctg gcaga 15

50 <210> 79
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Compuesto antisentido

<400> 79
60 tcataatgct ggcag 15

<210> 80
 <211> 15
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 10 <400> 80
 ttcataatgc tggca 15

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

 <220>
 <223> Compuesto antisentido
 20
 <400> 81
 tttcataatg ctggc 15

 <210> 82
 25 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 30 <223> Compuesto antisentido

 <400> 82
 attcactttc ataatgctgg 20

 35 <210> 83
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 40 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 83
 ctttcataat gctgg 15
 45
 <210> 84
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 84
 55 tcataatgct gg 12

 <210> 85
 <211> 15
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Compuesto antisentido
 5 <400> 85
 actttcataa tgctg 15
 <210> 86
 <211> 12
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Compuesto antisentido
 15 <400> 86
 ttcataatgc tg 12
 <210> 87
 20 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Compuesto antisentido
 <400> 87
 cactttcata atgct 15
 30 <210> 88
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Compuesto antisentido
 <400> 88
 tttcataatg ct 12
 40 <210> 89
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Compuesto antisentido
 <400> 89
 50 tcactttcat aatgc 15
 <210> 90
 <211> 12
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Compuesto antisentido
 60 <400> 90

cttcataat gc 12

<210> 91
 <211> 15
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Compuesto antisentido

10 <400> 91
 ttcactttca taatg 15

<210> 92

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

20 <220>
 <223> Compuesto antisentido

<400> 92
 actttcataa tg 12

25 <210> 93
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Compuesto antisentido

<400> 93
 35 attcactttc ataata 15

<210> 94
 <211> 12
 <212> ADN

40 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Compuesto antisentido

45 <400> 94
 cactttcata at 12

<210> 95
 <211> 15

50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Compuesto antisentido

55 <400> 95
 gattcacttt cataa 15

<210> 96

60 <211> 12

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Compuesto antisentido

 <400> 96
 tcactttcat aa 12

 10 <210> 97
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15
 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 97
 20 ttactttca ta 12

 <210> 98
 <211> 12
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 30 <400> 98
 attcactttc at 12

 <210> 99
 <211> 15
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido
 40
 <400> 99
 agtaagattc acttt 15

 <210> 100
 45 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 50 <223> Compuesto antisentido

 <400> 100
 acaaaagtaa gattc 15

 55 <210> 101
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 60 <220>

<223> Compuesto antisentido

<400> 101
gttttacaaa agtaa 15

5 <210> 102
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Compuesto antisentido

15 <400> 102
ataaagtgtt acaaa 15

<210> 103
<211> 15
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Compuesto antisentido

25 <400> 103
aaaccataaa gtttt 15

<210> 104
30 <211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Compuesto antisentido

<400> 104
tccacaaacc ataaa 15

40 <210> 105
<211> 10
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>

<223> Sitio de splicing de consenso

<400> 105
gtaagtactt 10

50 <210> 106
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>

<223> Cebador

<400> 106
60 agataaaagg ttaatctaga tccctactag aattctc 37

<210> 107
 <211> 37
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador
 10 <400> 107

 gagaattcta gtagggatct agattaacct ttatct 37

 <210> 108
 15 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 20 <223> Cebador
 <400> 108
 aattgctaac gcagtcagtg cttc 24

 <210> 109
 25 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 30 <223> Cebador
 <400> 109
 aatatgatca gcaaaacaaa gtcacataac tac 33

 <210> 110
 35 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 40 <400> 110
 gtgactttgt ttgctgatc atattttgtt gaataaaata ag 42

 <210> 111
 <211> 24
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador

 50 <400> 111
 aatgtatctt atcatgtctg ctcg 24

 <210> 112
 <211> 24
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador

 60 <400> 112

aatgtatctt atcatgtctg ctcg 24
 <210> 113

<211> 38
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador

10
 <400> 113
 aagtacttac ctgtaacgct tcacattcca gatctgtc 38

<210> 114
 15 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 20 <223> Compuesto antisentido

<400> 114
 ttgtattcta tgttt 15

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica en forma de dosificación unitaria que comprende un oligonucleótido antisentido y un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable, donde el oligonucleótido antisentido está dirigido al intrón 7 de una molécula de ácido nucleico que codifica SMN2, donde el oligonucleótido tiene 15, 16, 17, 18, 19 o 20 nucleótidos de longitud y comprende una modificación de azúcar 2'-O-metoxietilo en cada posición, y donde el primer número de nucleótido (el más 5') al cual se une el oligonucleótido es el nucleótido 122, 123, 124, 125, 126, 127 o 128 de la SEQ ID NO: 1.
2. La composición farmacéutica de la reivindicación 1 donde el primer número de nucleótido (el más 5') al cual se une el oligonucleótido es el nucleótido 124 de la SEQ ID NO: 1.
3. La composición farmacéutica de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 donde el oligonucleótido antisentido comprende al menos una 5-metilcitosina.
4. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 donde el oligonucleótido antisentido comprende al menos un enlace internucleosídico modificado.
5. La composición farmacéutica de la reivindicación 4 donde el oligonucleótido antisentido comprende al menos un enlace internucleosídico de fosforotioato.
6. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el oligonucleótido antisentido es una sal farmacéuticamente aceptable.
7. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para su uso en terapias.
8. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para uso en el tratamiento de atrofia muscular espinal.
9. Uso de la composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para la preparación de un medicamento para tratar atrofia muscular espinal.