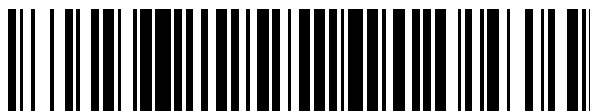


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 727 481**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/7125 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.11.2012 PCT/US2012/067475**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.06.2013 WO13082551**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.11.2012 E 12812432 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2019 EP 2785840**

54 Título: **Inclusión inducida de exón en atrofia muscular espinal**

30 Prioridad:

30.11.2011 US 201161565499 P

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

16.10.2019

73 Titular/es:

**SAREPTA THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
215 First Street
Cambridge, MA 02142, US**

72 Inventor/es:

**LINSLEY, PETER y
LEPPERT, BRIAN JAMES**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 727 481 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

Inclusión inducida de exón en atrofia muscular espinal

5 Campo de la invención

La invención se refiere al uso de un compuesto antisentido para inducir la inclusión de exón como un tratamiento para la atrofia muscular espinal (AME). Más particularmente se refiere a inducir la inclusión del exón 7 para restaurar los niveles de la proteína de supervivencia de la neurona motora (SMN) por el gen de supervivencia de la neurona motora (SMN).

10

Antecedentes

15

El corte y empalme alternativo incrementa el potencial codificante del genoma humano al producir proteínas múltiples de un gen único. También está asociado con un número creciente de enfermedades humanas.

20

AME es un trastorno genético con frecuencia mortal que resulta de la pérdida de la proteína de SMN codificada por el gen de la supervivencia de la neurona motora SMN. Los genes de SMN, SMN1 y SMN2, están localizados en el cromosoma 5 y AME está causada por la pérdida de SMN1 de ambos cromosomas. SMN2, aunque es casi idéntico a SMN1, es menos eficaz en producir la proteína de SMN. La gravedad de AME está afectada por la eficacia a la que SMN2, de la cual hay varias copias, produce la proteína de SMN.

25

SMN1 codifica una proteína de SMN de 38 KDa expresada de manera ubicua que es necesaria para el ensamblaje de RNPpn, un proceso imprescindible para la supervivencia celular. Una copia casi idéntica del gen, SMN2, falla en compensar la pérdida de SMN1 debido a la omisión del exón 7, produciendo una proteína truncada inestable, SMNΔ7. SMN1 y SMN2 difieren por una sustitución de C a T crítica en la posición 6 del exón 7 (C6U en el transcrito de SMN2). C6U no cambia la secuencia codificante, pero es suficiente para causar la omisión del exón 7 en SMN2.

30

El tratamiento actual para AME consiste en la prevención y el tratamiento del efecto secundario de la pérdida de la unidad motora crónica. Actualmente, No hay terapias con fármacos disponibles para el tratamiento o la prevención de AME.

35

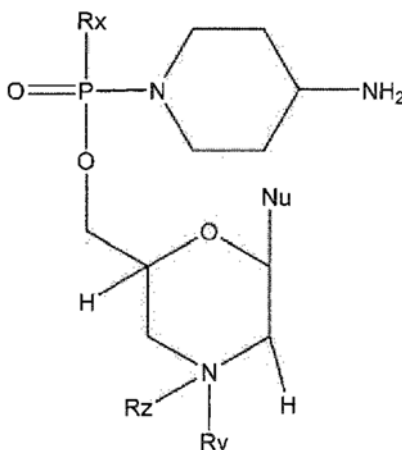
La tecnología antisentido, usada en su mayoría para la regulación a la baja de ARN, recientemente se ha adaptado para alterar los procesos de corte y empalme. Es probable que sean útiles terapéuticamente agentes eficaces que pueden alterar el corte y empalme de los pre-ARNm de SMN2. El documento WO 2007/002390, describe oligonucleótidos antisentido para la modulación del corte y empalme del ARNm de SMN2 en una célula.

Compendio de la invención

40

La presente solicitud se refiere a un oligonucleótido antisentido que comprende una secuencia de 14 a 21 nucleótidos, de 15 a 25 nucleótidos, o de 20 a 30 nucleótidos de longitud, que específicamente hibrida con una región dentro del pre-ARNm de SMN2 seleccionado de dentro del exón 7, el intrón 7, el exón 8, o una porción del intrón 7 y el exón 8 del pre-ARNm de SMN2, de modo que se aumenta el nivel de ARNm de SMN2 que contiene el exón 7 en relación al ARNm de SMN2 con delección de exón en la célula, en donde el oligonucleótido antisentido es un oligonucleótido de morfolino que comprende al menos un nucleótido que comprende un enlace internucleósido que está cargado positivamente a pH fisiológico, en donde el al menos un nucleótido es de fórmula:

45



en donde Nu es una nucleobase;

R_x se selecciona del grupo que consiste en HO-, un nucleótido, un resto de péptido de penetración celular, y piperazinilo;

5 R_y se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, un alquilo C₁-C₆, un nucleótido, un resto peptídico, un aminoácido, un resto de formamidinilo, y acilo; y,

10 R_z se selecciona del grupo que consiste en nada, hidrógeno, un alquilo C₁-C₆, y acilo; y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

en donde la secuencia se selecciona de

15 ATT CAC TTT CAT AAT GCT GG;
 ATT CAC TTT CAT AAT GCT GG;
 ATT CAC TTT CAT AAT GCT GG;
 ATT CAC TTT CAT AAT GCT GG;
 ATT CAC TTT CAT AAT GCT GG;
 ATT CAC TTT CAT AAT GCT GG;
 20 ATT CAC TTT CAT AAT GCT GG;
 ATT CAC TTT CAT AAT GCT GG;
 CAC TTT CAT AAT GCT GG;
 CAC TTT CAT AAT GCT GG;
 CAC TTT CAT AAT GCT GG;
 CAC TTT CAT AAT GCT GG;
 25 CAC TTT CAT AAT GCT GG;
 CAC TTT CAT AAT GCT GG;
 CAC TTT CAT AAT GCT GG;
 CAC TTT CAT AAT GCT GG;
 CAC TTT CAT AAT GCT GG;
 CAC TTT CAT AAT GCT GG;
 30 TTT CAT AAT GCT GG;
 TTT CAT AAT GCT GG;
 TTT CAT AAT GCT GG;
 TTT CAT AAT GCT GG;
 TTT CAT AAT GCT GG;
 35 TTT CAT AAT GCT GG;
 C TAG TAT TTC CTG CAA ATG AG;
 C TAG TAT TTC CTG CAA ATG AG;
 C TAG TAT TTC CTG CAA ATG AG;
 C TAG TAT TTC CTG CAA ATG AG;
 40 C TAG TAT TTC CTG CAA ATG AG;
 C TAG TAT TTC CTG CAA ATG AG;
 C TAG TAT TTC CTG CAA ATG AG;
 C TAG TAT TTC CTG CAA ATG AG;
 C TAG TAT TTC CTG CAA ATG AG;
 45 C TAG TAT TTC CTG CAA ATG AG;
 C TAG TAT TTC CTG CAA ATG AG;
 C CAG CAT TTC CTG CAA ATG AG;
 C CAG CAT TTC CTG CAA ATG AG;
 C CAG CAT TTC CTG CAA ATG AG;
 C CAG CAT TTC CTG CAA ATG AG;
 C CAG CAT TTC CTG CAA ATG AG;
 50 C CAG CAT TTC CTG CAA ATG AG;
 C CAG CAT TTC CTG CAA ATG AG;
 C CAG CAT TTC CTG CAA ATG AG;
 A TGC CAG CAT TTC CTG CAA ATG AGA;
 55 A TGC CAG CAT TTC CTG CAA ATG AGA;
 A TGC CAG CAT TTC CTG CAA ATG AGA;
 A TGC CAG CAT TTC CTG CAA ATG AGA;
 A TGC CAG CAT TTC CTG CAA ATG AGA;
 A TGC CAG CAT TTC CTG CAA ATG AGA;
 60 A TGC CAG CAT TTC CTG CAA ATG AGA;
 GCT CTA TGC CAG CAT TTC CTG CAA A;
 GCT CTA TGC CAG CAT TTC CTG CAA A;
 GCT CTA TGC CAG CAT TTC CTG CAA A;
 GCT CTA TGC CAG CAT TTC CTG CAA A;
 65 GCT CTA TGC CAG CAT TTC CTG CAA A;
 GCT CTA TGC CAG CAT TTC CTG CAA A;

GCT CTA TGC CAG CAT TTC CTG CAA A;
 GCT CTA TGC CAG CAT TTC CTG CAA A; y
 GCT CTA TGC CAG CAT TTC CTG CAA A,

5 en donde A representa la nucleobase adenina, T representa la nucleobase timina, C representa la nucleobase citosina, y G representa la nucleobase guanina, y cuando la nucleobase en la secuencia está en negrita indica el al menos un nucleótido.

10 En otra realización, se ha proporcionado un oligonucleótido antisentido para su uso en el tratamiento de una enfermedad, comprendiendo el uso aumentar el nivel de ARNm de SMN2 que contiene el exón 7 en relación al ARNm de SMN2 con delección de exón en una célula, comprendiendo además el uso poner en contacto la célula con el oligonucleótido antisentido que comprende una secuencia de 14 a 21 nucleótidos, de 15 a 25 nucleótidos, o de 20 a 30 nucleótidos de longitud, que específicamente hibrida con una región dentro del pre-ARNm de SMN2 seleccionado de dentro del exón 7, el intrón 7, o el exón 8 o una porción del intrón 7 y el exón 8 del pre-ARNm de SMN2, en donde el oligonucleótido antisentido es tal como se define en el presente documento.

15 Un oligonucleótido antisentido tal como se define en las reivindicaciones para su uso en el tratamiento de la atrofia muscular espinal (AME) en un paciente también está dentro del alcance de la invención.

20 Breve descripción de las figuras

Figuras 1 y 2: Preparación del soporte sólido para la síntesis de oligómeros de morfolino.

Figuras 3 y 4: La síntesis en fase sólida de oligómeros de morfolino.

25 Figura 5: Secuencias ensayadas de atrofia muscular espinal (AME). Los oligonucleótidos que contienen las secuencias anteriormente descritas y ensayadas en la Figura 6 contienen una cadena principal de PMO con una modificación de APN en las bases T coloreadas en rojo en negrita y subrayadas (4 modificaciones totales para cada oligo que contiene APN).

30 Figura 6: Curvas de respuesta a la dosis de fibroblastos de paciente con atrofia muscular espinal tratada con oligonucleótido.

35 La intensidad de las bandas del gel que representan la inclusión o exclusión del exón 7 en SMN2 en fibroblastos GM03813 (Coriell) se cuantificaron con ImageQuant (GE). La inclusión del exón 7 se presenta como un porcentaje calculado de la relación de las intensidades de la banda con exón 7 incluido dividido por la suma de las intensidades de las bandas con exón 7 incluido y excluido. Cada mancha representa la desviación típica media +/- 1 de dos réplicas en cada concentración. Se combinaron tres experimentos independientes para producir el anterior conjunto de datos. El análisis de inclusión en porcentaje se realizó en Microsoft Excel. Los puntos de datos y las curvas se trazaron en Graphpad Prism. Los datos muestran que las modificaciones de APN a un oligonucleótido aumenta la potencia del compuesto en comparación con PMO no modificado que contiene la misma secuencia.

40 Figura 7: RT-PCR de SMN2. El ARN de fibroblastos GM03813 sometidos a nucleofección con el oligonucleótido modificado por E8/4b APN en las concentraciones indicadas se amplificaron por RT-PCR tal como se describe en los Métodos. Los geles que contienen las reacciones resultantes se analizaron tal como se describe en los Métodos y en la Figura 6.

45 Figura 8: Tal como se muestra en la Figura 7, la invención proporciona un oligonucleótido antisentido para su uso en el tratamiento de una enfermedad, comprendiendo el uso aumentar el nivel de ARNm de SMN2 que contiene el exón 7 en relación al ARNm de SMN2 con delección de exón en una célula. Esto se muestra esquemáticamente en esta figura. La banda más grande sobre el gel en la Figura 7 corresponde a un ADNc que contiene los exones 6, 7, el intrón-7 y el exón 8. La banda media contiene un producto de transcripción inversa que contiene los exones 6, 7 y el exón 8. La banda más baja corresponde a los exones 6 y 8. Por lo tanto, el tratamiento de las células con el oligonucleótido APN incrementa las bandas de peso molecular mayor correspondientes a la inclusión del exón 7 en el ADNc. Puesto que el exón 7 incluye un codón de parada el producto proteico de ambos ADNc de alto peso molecular será el mismo.

50 Figura 9: Estructuras ilustrativas de modificaciones catiónicas relacionadas con APN y plus. Se muestran especies ilustrativas de modificaciones catiónicas relacionadas con APN y plus. Las modificaciones relacionadas con APN incluyen APN y mapT, y las modificaciones relacionadas con plus incluyen plusT, medaT, y etpipT. Aunque las modificaciones ilustradas se refieren a timina, cualquier base (por ejemplo, timina, citosina, guanina, adenina) se puede modificar con las modificaciones catiónicas relacionadas con APN y relacionadas con plus.

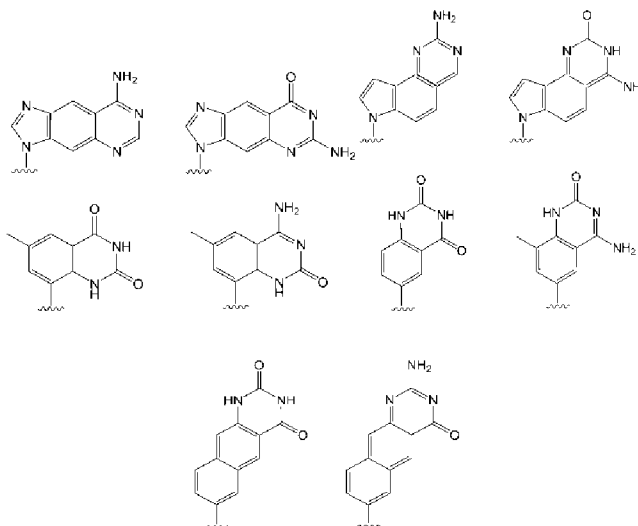
55 Descripción detallada

60 Tal como se usa en el presente documento, "nucleobase" (Nu), "resto de emparejamiento de bases" o "base" se usan de manera intercambiable para referirse a una base de purina o pirimidina encontrada en ADN o ARN nativo (uracilo,

timina, adenina, citosina y guanina), así como análogos de las purinas y pirimidinas de origen natural, que confieren propiedades mejoradas, tales como afinidad de unión al oligonucleótido. Análogos ilustrativos incluyen hipoxantina (el componente base del nucleósido inosina); 5-metil citosina; pirimidinas C5-propinil modificadas, 9-(aminoetoxi)fenoxazina (G-clamp) y similares.

Ejemplos adicionales de restos de emparejamiento de bases incluyen, pero sin limitación, uracilo, timina, adenina, citosina, y guanina que tienen sus respectivos grupos amino protegidos por grupos protectores de acilo, 2-fluorouracilo, 2-fluorocitosina, 5-bromouracilo, 5-yodouracilo, 2,6-diaminopurina, azactosina, análogos de pirimidina tales como pseudoisocitosina y pseudouracilo y otras nucleobases modificadas tales como purinas 8-sustituidas, xantina, o hipoxantina (siendo las dos últimas los productos de degradación natural). Las nucleobases modificadas descritas en Chiu and Rana, *RNA*, 2003, 9, 1034-1048, Limbach y col. *Nucleic Acids Research*, 1994, 22, 2183-2196 y Revankar and Rao, *Comprehensive Natural Products Chemistry*, vol. 7, 313, también se contemplan.

Ejemplos adicionales de restos de emparejamiento de bases incluyen, pero sin limitación, nucleobases de tamaño expandido en las que se han añadido uno o más anillos de benceno. Las sustituciones de base nucleica descritas en el "Glen Research catalog" (www.glenresearch.com); Krueger AT y col., *Acc. Chem. Res.*, 2007, 40: 141-150; Kool, ET, *Acc. Chem. Res.*, 2002, 35: 936-943; Benner S.A., y col., *Nat. Rev. Genet.*, 2005, 6: 553-543; Romesberg, F.E., y col., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2003, 7: 723-733; Hirao, I., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2006, 10, 622-627, se contemplan como útiles para la síntesis de los oligómeros descritos en el presente documento. A continuación, se muestran algunos ejemplos de estas nucleobases de tamaño expandido:



Una nucleobase covalentemente unida a una ribosa, análogo de azúcar o morfolino comprende un nucleósido. Los "nucleótidos" están compuestos de un nucleósido junto con un grupo fosfato. Los grupos fosfato covalentemente unen nucleótidos adyacentes con otro para formar un oligonucleótido. Tal como se usa en el presente documento, un "oligonucleótido" es una secuencia lineal de nucleótidos, o análogos de nucleótido, que permite que la nucleobase se hibride con una secuencia diana en un ARN por emparejamiento de bases de Watson-Crick, para formar un heteroduplex oligonucleótido:ARN dentro de la secuencia diana. Los términos "oligonucleótido antisentido", "oligómero antisentido", "oligómero" y "compuesto" se pueden usar de manera intercambiable para referirse a un oligonucleótido.

Un "oligómero de morfolino" o "PMO" se refiere a un oligonucleótido que tiene una cadena principal que soporta una nucleobase capaz de unirse por puente de hidrógeno con los polinucleótidos típicos, en donde el polímero carece de un resto de cadena principal de azúcar pentosa, pero en su lugar contiene un anillo de morfolino. Por lo tanto, en un PMO una estructura de anillo de morfolino soporta un resto de emparejamiento de bases, para formar una secuencia de restos de emparejamiento de bases que se diseña normalmente para hibridar con una diana antisentido seleccionada en una célula o en un sujeto a tratar. Un oligómero de "morfolino" ilustrativo comprende estructuras de subunidad de morfolino juntadas por enlaces de fosforamidato o fosforodiamidato, juntando el nitrógeno de morfolino de una subunidad con el carbono 4' exocíclico de una subunidad adyacente, comprendiendo cada subunidad una nucleobase de purina o piridimina eficaz para unirse, por puente de hidrógeno específico a base, a una base en un polinucleótido. Los oligómeros de morfolino (incluyendo los oligómeros antisentido) se detallan, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos n.º 5.698.685; 5.217.866; 5.142.047; 5.034.506; 5.166.315; 5.185.444; 5.521.063; 5.506.337 y en las solicitudes de patente de Estados Unidos US 2009/0131632, US 2009/0131624; y la publicación PCT n.º WO/2009/064471.

Dentro de la estructura de oligonucleótido, los grupos fosfato son comúnmente referidos como formadores de los "enlaces internucleósido" del oligonucleótido. El enlace internucleósido de origen natural de ARN y ADN es un enlace

fosfodiéster 3' a 5'. Un grupo "fosforamidato" comprende fósforo que tiene tres átomos de oxígeno unidos y un átomo de nitrógeno unido, mientras que un grupo "fosforodiamidato" comprende fósforo que tiene dos átomos de oxígeno unidos y dos átomos de nitrógeno unidos. En los enlaces intersubunidad no cargados o los catiónicos de los oligómeros PMO y/o PMOX descritos en el presente documento, un nitrógeno es siempre colgante de la cadena principal. El segundo nitrógeno, en un enlace de fosforodiamidato, es normalmente el nitrógeno del anillo en una estructura de anillo de morfolino.

"PMOX" se refiere a oligómeros de morfolino fosporodiamidato que tienen un átomo de fósforo con (i) un enlace covalente al átomo de nitrógeno de un anillo de morfolino y (ii) un segundo enlace covalente al nitrógeno del anillo de un 4-aminopiperidin-1-ilo (es decir, APN) o un derivado de 4-aminopiperidin-1-ilo. Oligómeros PMOX se describen en la solicitud PCT n.º PCT/US11/38459 (publicada como el documento WO/2011/150408). "PMOapn" o "APN" se refiere a un oligómero PMOX en donde un átomo de fósforo está unido a un grupo morfolino y al nitrógeno del anillo de un 4-aminopiperidin-1-ilo (es decir, APN).

Tal como se usa en el presente documento, LNA se refiere a oligonucleótidos de ácido nucleico cerrados. "LNA" son un miembro de una clase de modificaciones denominadas ácido nucleico con puente (BNA). BNA se caracteriza por un enlace covalente que cierra la conformación del anillo de ribosa en un pliegue de azúcar C30-endo (northern). Para LNA, el puente está compuesto de un metileno entre el 2'-O y las posiciones 4'-C. LNA aumenta la preorganización de la cadena principal y el apilamiento de bases para incrementar la hibridación y la estabilidad térmica.

Un oligonucleótido "hibrida específicamente" con un polinucleótido diana si el oligómero hibrida con la diana bajo las condiciones fisiológicas, con una Tm básicamente mayor que 45 °C, Preferentemente al menos 50 °C, y normalmente 60 °C-80 °C o mayor. Tal hibridación preferentemente corresponde a condiciones de hibridación estrictas. A una fuerza iónica dada y pH, la Tm es la temperatura a la que el 50 % de una secuencia diana hibrida con un polinucleótido complementario. Tal hibridación se puede dar con complementariedad "cercana" o "sustancial" del oligómero antisentido a la secuencia diana, así como con complementariedad exacta.

Una secuencia dirigida puede tener complementariedad "cercana" o "sustancial" a la secuencia diana y todavía función para el fin de la presente invención, es decir, todavía ser "complementaria". Preferentemente, los compuestos análogos de oligonucleótido empleados en la presente invención tienen como mucho un desemparejamiento con la secuencia diana de 10 nucleótidos, y preferentemente como mucho un desemparejamiento de 20. Como alternativa, los oligómeros antisentido empleados tienen al menos 90 % de homología de secuencia, y preferentemente al menos 95 % de homología de secuencia, con las secuencias dirigidas ilustrativas tal como se diseñan en el presente documento.

"Un par de electrones" se refiere a un par de valencia de electrones que no están unidos a o compartidos con otros átomos.

Los términos "péptido de penetración celular" (CPP) o "un resto peptídico que aumenta la absorción celular" se usan de manera intercambiable y se refieren a péptidos de penetración celular catiónicos, también denominados "péptidos de transporte", "péptidos portadores", o "dominios de traducción de péptido". Los péptidos, tal como se muestra en el presente documento, tienen la capacidad de inducir la penetración celular dentro del 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % de células de una población de cultivo celular dado. Incluyendo todos los números enteros intermedios, y permiten la translocación macromolecular dentro de los tejidos múltiples *in vivo* tras la administración sistémica. En una realización, el péptido de penetración celular puede ser un transportador peptídico rico en arginina. En otra realización, el péptido de penetración celular puede ser Pentratina o el péptido Tat. Estos péptidos son bien conocidos en la técnica y están descritos, por ejemplo en la publicación de Estados Unidos n.º 2010-0016215 A1. Un planteamiento particularmente preferido a la conjugación de péptidos con oligonucleótidos antisentido se puede encontrar en la publicación PCT W02012/150960. Una realización preferida de un oligo conjugado con péptido utiliza glicina como el enlazador entre el CPP y el oligonucleótido antisentido. Por ejemplo, los oligonucleótidos antisentido de la invención se pueden acoplar a un péptido rico en arginina, tal como (Arg)₆Gly (6 arginina y 1 glicina unido a un oligonucleótido); por ejemplo, un PMO conjugado con péptido preferido consiste en R6-G-PMO.

Por "aislado" se quiere decir material que está sustancialmente o básicamente libre de componentes que normalmente lo acompañan en su estado nativo. Por ejemplo, un "polinucleótido aislado" o "oligonucleótido aislado", tal como se usa en el presente documento, puede referirse a un polinucleótido que se ha purificado o separado de las secuencias que lo flanquean en un estado de origen natural, por ejemplo, un fragmento de ADN que se separa de las secuencias que están adyacentes al fragmento en el genoma. El término "aislamiento" cuando se refiere a células se refiere a la purificación de células (por ejemplo, fibroblastos, linfoblastos) a partir de un sujeto fuente (por ejemplo, un sujeto con una enfermedad de repetición de polinucleótido). En el contexto de ARNm o proteína, "aislamiento" se refiere a la recuperación de ARNm o proteína de una fuente, por ejemplo, células.

Tal como se usa en el presente documento, "longitud suficiente" se refiere a un oligonucleótido antisentido que es complementario a al menos 8, más normalmente 8-40, nucleobases contiguas en el ARN. Un oligonucleótido antisentido de longitud suficiente tiene al menos un número mínimo de nucleótidos que son capaces de específicamente hibridar con el ARN. Preferentemente un oligonucleótido de longitud suficiente es de 10 a 40 nucleótidos de longitud, incluyendo los oligonucleótidos de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23,

24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31,32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 y 40 nucleótidos. En una realización, un oligonucleótido de longitud suficiente es de 10 a aproximadamente 30 nucleótidos de longitud. En otra realización, un oligonucleótido de longitud suficiente es de 15 a 25 nucleótidos de longitud. En otra realización más, un oligonucleótido de longitud suficiente es de 20 a aproximadamente 30 nucleótidos de longitud.

Tal como se usa en el presente documento, los términos "poner en contacto una célula", "introducir" o "administrar" se refiere a la administración de los oligonucleótidos de la invención dentro de una célula por métodos de rutina en la técnica, por ejemplo, transfección (por ejemplo, liposoma, fosfato de calcio, polietilenimina), electroporación (por ejemplo, nucleofección), microinyección).

Tal como se usa en el presente documento, el término "cuantificar", "cuantificación" u otras palabras relacionadas se refieren a determinar la cantidad, la masa o la concentración en un volumen unitario, de un ácido nucleico, polinucleótido, oligonucleótido, péptido, polipéptido o proteína.

Tal como se usa en el presente documento, "tratamiento" de un sujeto (por ejemplo, un mamífero, tal como un ser humano) o una célula es cualquier tipo de intervención usada en un intento de alterar el curso natural del individuo o la célula. El tratamiento incluye, pero sin limitación, la administración de una composición farmacéutica, y se puede realizar o bien profilácticamente o posteriormente a la iniciación de un episodio patológico o contacto con un agente etiológico.

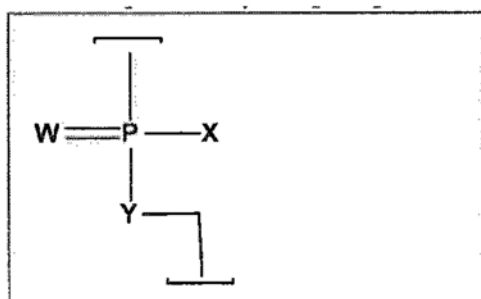
Características estructurales de los oligonucleótidos

Tal como se ha señalado anteriormente, se puede modificar el oligonucleótido no sustancialmente cargado, de acuerdo con un aspecto de la invención, para incluir al menos un nucleótido que comprenda un enlace internucleósido que esta cargado positivamente a pH fisiológico, por ejemplo, hasta aproximadamente 1 por cada 2-5 enlaces no cargados, tal como aproximadamente 4-5 por cada 10 enlaces no cargados. En determinadas realizaciones, la mejora óptima en la actividad antisentido se puede ver cuando aproximadamente el 25 % de los enlaces de la cadena principal son catiónicos. En determinadas realizaciones, el aumento se puede ver con un número pequeño, por ejemplo, 10-20 % de enlaces catiónicos, o cuando el número de enlaces catiónicos están en el intervalo de 50-80 %, tal como aproximadamente el 60 %.

En determinadas realizaciones, los compuestos antisentido se pueden preparar por síntesis en fase sólida paso a paso, empleando los métodos detallados en las referencias anteriormente citadas, y a continuación con respecto a la síntesis de oligonucleótidos que tienen una mezcla o enlaces de la cadena principal no cargados y catiónicos. En algunos casos, puede ser deseable añadir más restos químicos al compuesto antisentido, por ejemplo, para aumentar las farmacocinéticas o para facilitar la captura o detección del compuesto. Tal resto puede estar unido covalentemente, de acuerdo con los métodos de síntesis convencionales. Por ejemplo, la adición de un resto de polietilenglicol u otro polímero hidrófilo, por ejemplo, uno que tiene 1-100 subunidades monoméricas, puede ser útil en el aumento de la solubilidad.

Un resto indicador, tal como fluoresceína o un grupo radiomarcado, puede estar unido con fines de detección. Como alternativa, el marcador indicador unido al oligómero puede ser un ligando, tal como un antígeno o biotina, capaz de unirse a un anticuerpo marcado o estreptavidina. En la selección de un resto para la unión o modificación de un compuesto antisentido, por supuesto es en general deseable seleccionar compuestos químicos de grupos que son biocompatibles y probables de ser tolerados por un sujeto sin efectos secundarios indeseables.

Tal como se ha señalado anteriormente, los compuestos antisentido se pueden construir para contener un número seleccionado de enlaces catiónicos intercalados con enlaces no cargados del tipo anteriormente descrito a condición de que al menos un enlace sea catiónico a pH fisiológico. Los enlaces intersubunidad, tanto no cargados como catiónicos, preferentemente son enlaces que contienen fósforo, que tienen la estructura:

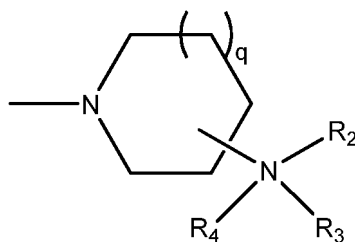


en donde

W es S u O, y es preferentemente O,
 X = R₁, NR¹¹R¹² u OR¹⁶,
 Y = O o NR¹⁷,

y cada dicho enlace en el oligómero se selecciona de:

- 5 (a) enlace no cargado (a), en donde cada uno de R¹¹, R¹², R¹⁶ y R¹⁷ se selecciona independientemente entre hidrógeno y alquilo C₁-C₆; o
 (b1) enlace catiónico (b1), en donde R₁ es un resto de la fórmula

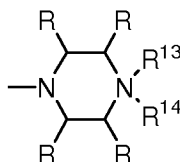


- 10 q es 0, 1, 2, 3 o 4;
 R₂ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₅, y un resto de formamidinilo, y R₃ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C₁-C₅, o

15 R₂ y R₃ se juntan para formar un anillo heterocíclico de 5-7 miembros que contiene opcionalmente un heteroátomo de oxígeno, en donde el anillo puede estar opcionalmente sustituido con un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en alquilo C₁-C₅, fenilo, halógeno, y aralquilo;

20 R₄ se selecciona del grupo que consiste en nada, hidrógeno, alquilo C₁-C₆ y aralquilo;

- (b2) enlace catiónico (b2), en donde X = NR¹¹R¹² y Y = O, y NR¹¹R¹² representa un grupo de piperazino
 25 opcionalmente sustituido de la fórmula



en donde

- 30 cada R es independientemente H o -CH₃,
 R¹⁴ es H, CH₃, o nada, y
 R¹³ se selecciona entre H, alquilo C₁-C₆, arilo sustituido o no sustituido de 5-7 miembros, anillo de heteroarilo
 35 o heterocíclico que contiene hasta 2 heteroátomos seleccionados de los grupos que consisten en N y O,
 C(=NH)NH₂, Z-L-NRR, Z-L-NHC(=NH)NH₂, Z-L-COOH, Z-L-SH, Z-L-PPh₃, Z-L-R²¹-R²², colato, y
 [C(O)CHR'NH]_mH, en donde: Z es C(O) o un enlace directo, L es un enlazador opcional de hasta 18 átomos
 40 de longitud, preferentemente hasta 12 átomos, y más preferentemente hasta 8 átomos de longitud, que
 tiene enlaces seleccionados de alquilo, alcoxi, y alquilamino, R' es una cadena lateral de un aminoácido de
 origen natural o un homólogo de uno o dos carbonos del mismo, m es 1 a 6, preferentemente de 1 a 4; R²¹
 es un anillo de arilo de 5-7 miembros, y R²² es un anillo de heteroarilo de 5-7 miembros que contiene hasta
 4 heteroátomos seleccionados de los grupos que consisten en N y O;

- (b3) enlace catiónico (b3), en donde X = NR¹¹R¹² y Y = O, R¹¹ = H o CH₃, y R¹² = LNR¹³R¹⁴R¹⁵, en donde L, R¹³
 y R¹⁴ son tal como se han definido anteriormente, y R¹⁵ es H, alquilo C₁-C₆ o (alcoxi)alquilo C₁-C₆; y
 45 (b4) enlace catiónico (b4), en donde Y = NR¹⁷ y X = OR¹⁶, y R¹⁷ = LNR¹³R¹⁴R¹⁵, en donde L, R¹³, R¹⁴ y R¹⁵ son
 tal como se han definido anteriormente, y R¹⁶ es H o alquilo C₁-C₆;

y al menos uno de dicho enlace se selecciona de enlaces catiónicos (b1), (b2), (b3) y (b4).

50 En determinadas realizaciones, un oligómero puede incluir al menos dos enlaces consecutivos de tipo (a) (es decir, enlaces no cargados). En realizaciones adicionales, al menos el 5 % de los enlaces en el oligómero son enlaces

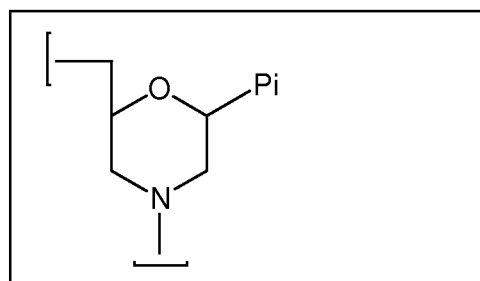
catiónicos (es decir, tipo (b1), (b2), (b3) o (b4)); por ejemplo, 10 % a 60 %, y preferentemente 20-50 % de los enlaces pueden ser enlaces catiónicos.

En una realización, al menos un enlace es del tipo (b1), en donde, q es 1, R₂ y R₃ son hidrógeno y R₄ es nada.

En una realización, al menos un enlace es del tipo (b2), en donde, preferentemente, cada R es H, R¹⁴ es H, CH₃, o nada, y R¹³ se selecciona entre H, alquilo C₁-C₆, C(=NH)NH₂ y C(O)-L-NHC(=NH)NH₂. Las dos últimas realizaciones de R¹³ proporcionan un resto de guanidinilo, o bien unido directamente al anillo de piperazina, o colgante a un grupo enlazador L, respectivamente. Para facilitar la síntesis, la variable Z en R¹³ es preferentemente C(O) (carbonilo), tal como se muestra.

El grupo enlazador L, tal como se ha señalado anteriormente, contiene enlaces en su cadena principal seleccionados entre alquilo (por ejemplo, -CH₂-CH₂-), alcoxi (-C-O-), y alquilamino (por ejemplo, -CH₂-NH-), a condición de que los átomos terminales en L (por ejemplo, aquellos adyacentes a carbonilo o nitrógeno) sean átomos de carbono. Aunque los enlaces ramificados (por ejemplo, -CH₂-CHCH₃-) son posibles, el enlazador es preferentemente no ramificado. En una realización, el enlazador es un enlazador de hidrocarburo. Tal enlazador puede tener la estructura -(CH₂)_n-, en donde n es 1-12, preferentemente 2-8 y, más preferentemente de 2-6.

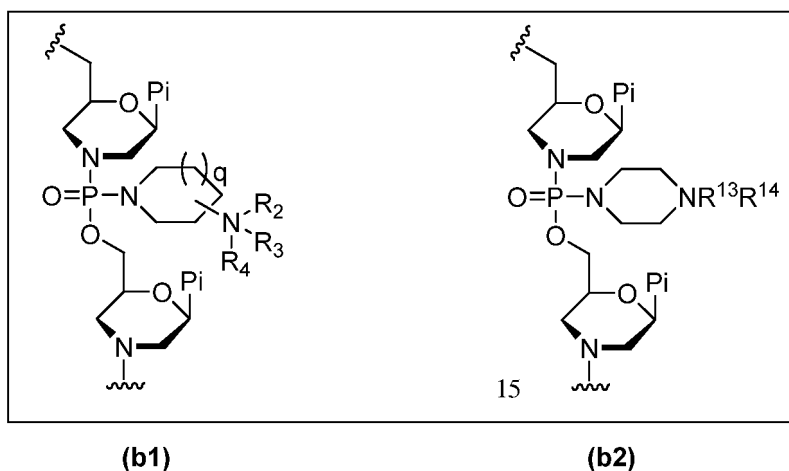
Las subunidades de morfolino (nucleótido) tienen la estructura:



(i)

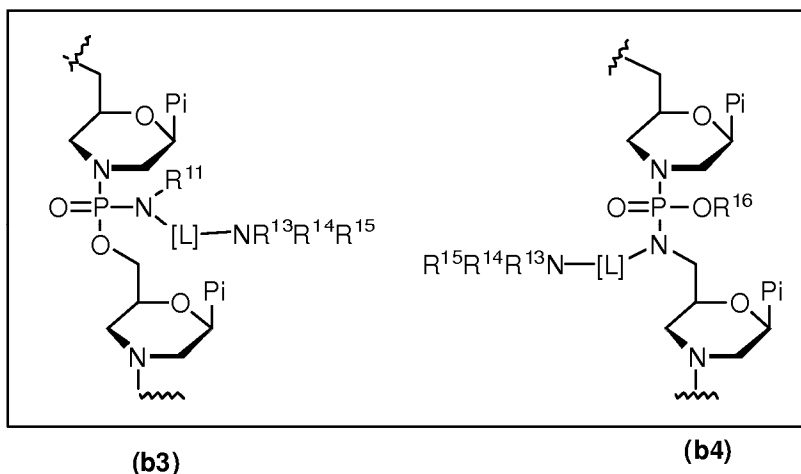
en donde Pi es un resto de emparejamiento de bases, y los enlaces anteriormente representados conectan el átomo de nitrógeno de (i) con el carbono 5' de una subunidad adyacente. Los restos de emparejamiento de bases Pi pueden ser los mismos o diferentes, y en general están diseñados para proporcionar una secuencia que se une a un ácido nucleico diana.

El uso de las realizaciones de los anteriores tipos de enlace (b1), (b2) (b3) y (b4) para unir subunidades de morfolino se puede ilustrar gráficamente como sigue:



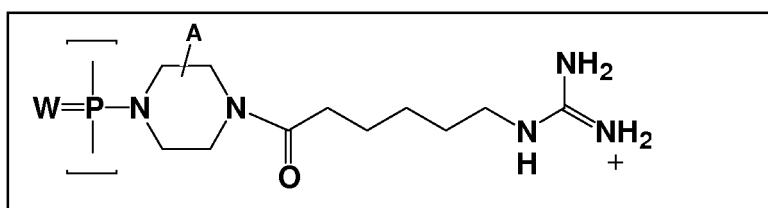
(b1)

(b2)



Preferentemente, pero no necesariamente, todos los enlaces catiónicos en el oligómero son del mismo tipo; es decir, todos del tipo (b1), todos del tipo (b2), todos del tipo (b3) o todos del tipo (b4).

5 En realizaciones adicionales, los enlaces catiónicos se seleccionan de enlaces (b2') y (b2'') tal como se muestra a continuación, en donde (b2') es referido en el presente documento como un enlace "Pip" y (b2'') es referido en el presente documento como un enlace "GuX":



(b2'')

10 En las estructuras anteriores, W es S u O, y es preferentemente O; cada uno de R¹¹ y R¹² se selecciona independientemente entre hidrógeno y alquilo C₁-C₆, y es preferentemente metilo o etilo; y A representa hidrógeno o alquilo C₁-C₆ sobre uno o más átomos de carbono en (b2') y (b2''). Preferentemente, los carbonos del anillo en el anillo de piperazina son no sustituidos; sin embargo, pueden incluir sustituyentes de no interferencia, tal como metilo. Preferentemente, como mucho uno o dos átomos de carbono están así sustituidos. En realizaciones adicionales, al menos el 10 % de los enlaces son del tipo (b2') o (b2''); por ejemplo, el 10 %-60 % y preferentemente el 20 % a 50 %, de los enlaces puede ser de tipo (b2') o (b2'').

20 En determinadas realizaciones, el oligómero no contiene enlaces del tipo (b2') anterior. Como alternativa, el oligómero no contiene enlaces del tipo (b2) en donde cada R es H, R¹³ es H o CH₃, y R¹⁴ es H, CH₃ o nada.

25 Las subunidades de morfolino también pueden estar unidas por enlaces intersubunidad basados en no fósforo, Tal como se describe adicionalmente a continuación, en donde al menos un enlace está modificado con un grupo catiónico colgante tal como se ha descrito anteriormente.

Se podrían usar otros enlaces análogos de oligonucleótido que son no cargados en su estado no modificado pero que también podrían portar un sustituyente de amina colgante. Por ejemplo, se podría emplear un átomo de 5'-nitrogeno

sobre un anillo de morfolino en un enlace de sulfamida o un enlace de urea (en donde el fósforo está sustituido por carbono o azufre, respectivamente) y modificado de una manera análoga al átomo de 5'-nitrógeno en la estructura (b4) anterior.

5 Se proporcionan oligómeros que tienen cualquier número de enlaces catiónicos, incluyendo oligómeros enlazados completamente catiónicos. Preferentemente, sin embargo, los oligómeros se cargan parcialmente, teniendo, por ejemplo, 10 %-80 %. En las realizaciones preferidas, aproximadamente el 10 % a 60 % y preferentemente el 20 % a 50 % de los enlaces son catiónicos.

10 En una realización, los enlaces catiónicos están intercalados a lo largo de la cadena principal. Los oligómeros parcialmente cargados preferentemente contienen al menos dos enlaces no cargados consecutivos; es decir, el oligómero preferentemente no tiene un patrón estrictamente alternante a lo largo de su longitud completa.

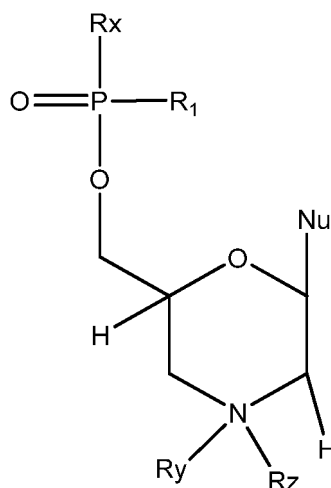
15 También se considera que los oligómeros que tienen bloques de enlaces catiónicos y bloques de enlaces no cargados; por ejemplo, un bloque central de enlaces no cargados pueden estar flanqueado por bloques de enlaces catiónicos, o viceversa. En una realización, el oligómero tiene aproximadamente regiones 5', 3' y centrales de igual longitud, y el porcentaje de enlaces catiónicos en la región central es mayor de aproximadamente el 50 %, preferentemente, mayor de aproximadamente el 70 %.

20 Los oligómeros para su uso en las aplicaciones antisentido en general oscilan en la longitud de aproximadamente 10 a aproximadamente 40 subunidades, más preferentemente de aproximadamente 10 a 30 subunidades y en general de aproximadamente 15-25 bases. Por ejemplo, un oligómero de la invención que tiene 19-20 subunidades, una longitud útil para un compuesto antisentido, puede tener idealmente dos a diez, por ejemplo, cuatro a ocho, enlaces catiónicos, y los enlaces no cargados restantes. Un oligómero que tiene 14-15 subunidades puede tener idealmente
25 dos a siete, *por ejemplo*, 3, 4 o 5, enlaces catiónicos y los enlaces no cargados restantes.

Cada estructura de anillo de morfolino soporta un resto de emparejamiento de bases, para formar una secuencia de restos de emparejamiento de bases que se diseña normalmente para hibridar con una diana antisentido seleccionada en una célula o en un sujeto a tratar. El resto de emparejamiento de bases puede ser una purina o pirimidina encontrada en ADN o ARN nativo (por ejemplo, A, G, C, T o U) o un análogo, tal como hipoxantina (el componente base del nucleósido inosina) o 5-metil citosina.

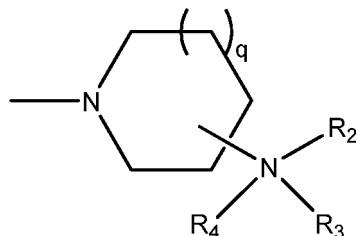
35 Tal como se ha señalado anteriormente, determinadas realizaciones se dirigen a oligómeros que comprenden novedosos enlaces intersubunidad, incluyendo oligómeros PMO-X y aquellos que tienen grupos terminales modificados. En algunas realizaciones, estos oligómeros tienen mayor afinidad para ADN y ARN que los correspondientes oligómeros no modificados y demuestran administración celular mejorada, potencia, y/o propiedades de distribución tisular en comparación con oligómeros que tienen enlaces intersubunidad. En una realización, los oligómeros comprenden al menos un enlace intersubunidad de tipo (B) tal como se ha definido en el presente documento. Los oligómeros también pueden comprender uno o más enlaces intersubunidad de tipo (A) tal como se
40 ha definido en el presente documento. Las características y propiedades estructurales de los diversos tipos de enlace y oligómeros se describen a mayor detalle en la siguiente discusión. La síntesis de estos y oligómeros relacionados se describe en la solicitud de Estados Unidos del mismo propietario que la presente US 2012/0065169.

45 En las realizaciones preferidas, la invención proporciona un oligonucleótido que tiene una secuencia complementaria a la secuencia diana que está asociada con una enfermedad humana, y comprende una secuencia de nucleótidos que tiene la fórmula:



en donde Nu es una nucleobase;

R₁ se selecciona del grupo que consiste en R₁' y R₁" en donde R₁' es dimetilamino y R₁" es un resto de la fórmula



5

en donde al menos uno de R₁ es R₁"; q es 0, 1, 2, 3 o 4;

10

R₂ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₅, y un resto de formamidinilo, y

R₃ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C₁-C₅, o

15

R₂ y R₃ se juntan para formar un anillo heterocíclico de 5-7 miembros que contiene opcionalmente un heteroátomo de oxígeno, en donde el anillo puede estar opcionalmente sustituido con un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en alquilo C₁-C₅, fenilo, halógeno, y aralquilo;

R₄ se selecciona del grupo que consiste en nada, hidrógeno, un alquilo C₁-C₆ y aralquilo;

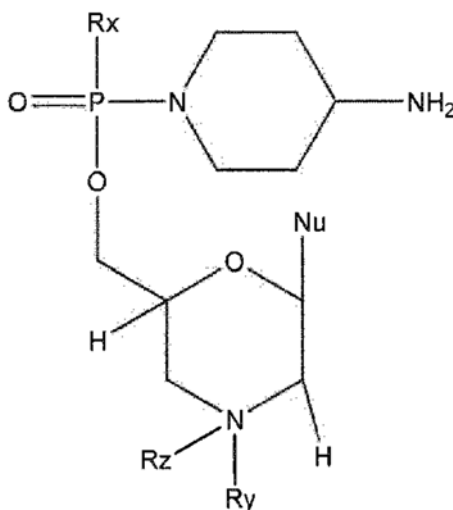
20

R_x se selecciona entre el grupo que consiste en HO-, un nucleótido, un resto de péptido de penetración celular, y piperazinilo;

R_y se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, un alquilo C₁-C₆, un nucleótido, un resto peptídico, un aminoácido, un resto de formamidinilo, y acilo; y,

25

R_z se selecciona del grupo que consiste en nada, hidrógeno, un alquilo C₁-C₆, y acilo; y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, siempre que al menos un nucleótido del oligonucleótido tenga la fórmula:



30

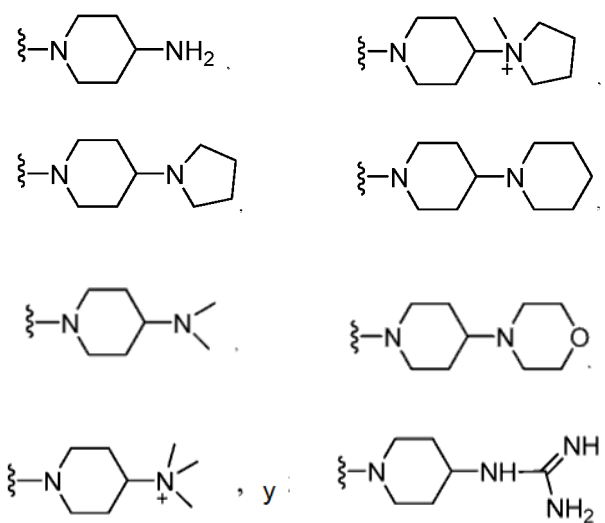
en donde Rx, Ry, Rz, y Nu son tal como se han señalado anteriormente.

Nu se puede seleccionar del grupo que consiste en adenina, guanina, timina, uracilo, citosina y hipoxantina. Más preferentemente Nu es timina o uracilo.

35

Aproximadamente el 50-90 % de los grupos R₁ son dimetilamino (es decir, R₁'). Como mucho, preferentemente aproximadamente el 66 % (dos tercios) de los grupos R₁ son dimetilamino.

R₁ se pueden seleccionar del grupo que consiste en



5 Lo más preferentemente, Nu es timina o uracilo.

Aunque la timina (T) es el resto de emparejamiento de bases preferido (Nu o Pi) que contiene las modificaciones químicas anteriormente descritas, se puede usar cualquier subunidad de base conocida por el experto en la técnica como resto de emparejamiento de bases.

10 Oligonucleótidos antisentido

La invención proporciona un oligonucleótido antisentido que comprende una secuencia seleccionada de las anteriormente enumeradas. Preferentemente, el oligonucleótido antisentido comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en 14-mero-APN, E-8/4a-APN y E8/4b-APN.

La invención además se refiere a los oligonucleótidos antisentido expuestos en la Tabla 1 que tienen una modificación de APN o derivado de APN. Los oligonucleótidos antisentido particulares útiles en los usos descritos en el presente documento incluyen 14-mero-APN, E-8/4a-APN y E8/4b-APN.

20 Tal como se usa en el presente documento, el término "oligonucleótidos antisentido" se refiere a un ácido nucleico (en realizaciones preferidas, un ARN) (o análogo del mismo), que tiene suficiente complementariedad de secuencia a un ARN diana (es decir, el ARN para el que se modula la selección del sitio de corte y empalme) para bloquear una región de un ARN diana (por ejemplo, pre-ARNm) de una manera eficaz. En realizaciones ilustrativas de la presente invención, dicho bloqueo de pre-ARNm de SMN2 sirve para modular el corte y empalme, o bien enmascarando un sitio de unión para una proteína nativa que de otro modo modularía el corte y empalme y/o alterando la estructura del ARN dirigido. En las realizaciones preferidas de la presente invención, el ARN diana es pre-ARNm diana (por ejemplo, pre-ARNm de SMN2). Un oligonucleótido antisentido que tiene una suficiente complementariedad de secuencia a una secuencia de ARN diana para modular el corte y empalme del ARN diana significa que el agente antisentido tiene una secuencia suficiente para desencadenar el enmascaramiento de un sitio de unión para una proteína nativa que de otro modo modularía el corte y empalme y/o altera la estructura tridimensional del ARN dirigido. Asimismo, un reactivo oligonucleotídico que tiene una suficiente complementariedad de secuencia a una secuencia de ARN diana para modular el corte y empalme del ARN diana significa que el reactivo oligonucleotídico tiene una secuencia suficiente para desencadenar el enmascaramiento de un sitio de unión para una proteína que de otro modo modularía el corte y empalme y/o altera la estructura tridimensional del ARN dirigido.

En algunas realizaciones, el oligonucleótido antisentido es no cargado. En realizaciones adicionales, el oligonucleótido antisentido es cargado.

40 El oligonucleótido antisentido puede ser un "oligómero de morfolino", "PMO", "PMOX", "PPMO", o "PMO+". Además, el oligonucleótido antisentido, por ejemplo, PMO, se puede modificar de cualquier manera conocida en la técnica. Se pueden modificar uno o más enlaces internucleótido en el oligonucleótido antisentido. Por ejemplo, uno o más enlaces internucleótido en el oligonucleótido antisentido pueden tener una modificación catiónica. La modificación catiónica puede ser una modificación de APN. Preferentemente, los enlaces internucleótido modificados están derivados de una subunidad T, C o A. Por ejemplo, en una realización, el PMO puede comprender una modificación catiónica. El PMO puede ser un PMO modificado por APN, el cual puede ser referido como "PMOapn" o "APN".

Tal como se usa en el presente documento, el término "AME" se refiere a atrofia muscular espinal, una enfermedad recesiva autosómica humana que con frecuencia se caracteriza por poca expresión de proteína de SMN en individuos afectados.

5 Tal como se usa en el presente documento, el término "diana" se refiere a una región de ARN, y específicamente, a una región identificada por el gen de SMN2. En una realización particular la región diana es una región del ARNm de la región del intrón 7 de SMN2 que es responsable de la delección del exón 7 y está asociada con SMN. En otra realización la región diana es una región del ARNm del exón 8 de SMN2.

10 El término "secuencia diana" se refiere a una porción del ARN diana frente al cual se dirige el análogo de oligonucleótido, es decir, la secuencia con la cual el análogo de oligonucleótido hibridará por el emparejamiento de bases de Watson-Crick de una secuencia complementaria.

15 El término "secuencia dirigida" es la secuencia en el análogo de oligonucleótido que es complementaria (significando, además, sustancialmente complementaria) a la secuencia diana en el genoma de ARN. La secuencia completa, o solamente una porción, del oligonucleótido antisentido puede ser complementaria a la secuencia diana. Por ejemplo, en un oligonucleótido antisentido que tiene 20 bases, solamente 12-14 pueden ser secuencias dirigidas. Normalmente, la secuencia dirigida está formada de bases contiguas en el oligonucleótido, pero alternativamente puede estar formada de secuencias no contiguas que cuando se colocan juntas, por ejemplo, de extremos opuestos del oligonucleótido, constituyen secuencia que abarca la secuencia diana.

20 En general, se prefieren reactivos oligonucleotídicos que contienen secuencias de nucleótidos perfectamente complementarias a una porción del ARN diana para el bloqueo del ARN diana. Sin embargo, no es necesaria una identidad de secuencia del 100 % entre el reactivo oligonucleotídico y el ARN diana para poner en práctica la presente invención. Por lo tanto, la invención puede tolerar las variaciones de secuencia que se podrían esperar debido a la mutación genética, polimorfismos de cepa o divergencia evolutiva. Por ejemplo, las secuencias de reactivo oligonucleotídico con inserciones, delecciones y mutaciones puntuales únicas relativas a la secuencia diana también son eficaces para la inhibición. Como alternativa, pueden ser eficaces secuencias de reactivo oligonucleotídico con sustituciones o inserciones análogas de nucleótido para el bloqueo.

25 Mayor del 70 % de identidad de secuencia (o complementariedad), por ejemplo, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o incluso 100 % de identidad de secuencia, entre el reactivo oligonucleotídico y el ARN diana, por ejemplo, pre-ARNm diana, es preferido. Además, se pueden usar variantes de las secuencias de oligonucleótidos expuestas en la Tabla 1 que conservan la función de la mismas en los usos de la invención. Por ejemplo, se puede ensayar la capacidad de inhibir el corte y empalme alternativo de una serie de mutantes. En una realización, tales secuencias variantes son al menos aproximadamente el 95 % de identidad en secuencia a una secuencia expuesta en la Tabla 1 por la longitud completa de la misma. En otra realización, tales secuencias variantes son al menos aproximadamente el 90 % de identidad en la secuencia por la longitud completa de la misma.

30 Las formas de corte y empalme y los niveles de expresión de los ARN y proteínas contempladas se pueden valorar por cualquiera de una amplia variedad de métodos bien conocidos para detectar las formas de corte y empalme y/o la expresión de un ácido nucleico transcrito o proteína. Ejemplos no limitantes de tales métodos incluyen RT-PCR de formas sometidas a corte y empalme de ARN seguido por separación por tamaño de los productos de PCR, métodos de hibridación de ácido nucleico, por ejemplo, transferencias Northern y/o el uso de matrices de ácido nucleico; métodos de amplificación de ácido nucleico; métodos inmunológicos para la detección de proteínas; métodos de purificación de proteína; y ensayos de la función o actividad proteica. Los niveles de expresión de ARN se pueden valorar preparando ARNm/ADNc (es decir, un polinucleótido transcrito) a partir de una célula, tejido u organismo, e hibridando el ARNm/ADNc con un polinucleótido de referencia que es un complemento del ácido nucleico ensayado, o un fragmento del mismo. El ADNc se puede, opcionalmente, amplificar usando cualquiera de una diversidad métodos de reacción en cadena de la polimerasa o de transcripción *in vitro* antes de la hibridación con el polinucleótido complementario; preferentemente, no se amplifica. La expresión de uno o más transcritos también se puede detectar usando PCR cuantitativa para valorar el nivel de expresión del(de los) transcrito(s).

35 40 45 50 55 Aplicaciones de la invención

En un aspecto, la invención proporciona un oligonucleótido antisentido tal como se define en las reivindicaciones para su uso en el tratamiento de una enfermedad, comprendiendo el uso aumentar el nivel de ARNm de SMN2 que contiene el exón 7 en relación al ARNm de SMN2 con delección de exón en una célula, comprendiendo además el uso poner en contacto la célula con el oligonucleótido antisentido en donde el oligonucleótido antisentido comprende una secuencia de 14 a 21 nucleótidos, de 15 a 25 nucleótidos o de 20 a 30 nucleótidos de longitud, que específicamente hibrida con una región dentro del pre-ARNm de SMN2 seleccionado de dentro del exón 7, el intrón 7, el exón 8, o una porción del intrón 7 y el exón 8, o una porción del intrón 7 y el exón 8 del pre-ARNm de SMN2, en donde el oligonucleótido antisentido es un oligonucleótido de morfolino que comprende al menos un nucleótido que comprende un enlace internucleósido que está cargado positivamente a pH fisiológico, en donde en al menos un nucleótido es tal como se ha descrito anteriormente.

Opcionalmente, el oligonucleótido antisentido puede tener un enlace internucleósido con tanto un nitrógeno básico como un grupo alquilo, arilo o aralquilo. El oligonucleótido antisentido comprende un morfolino.

5 Además, la invención proporciona que el oligonucleótido antisentido tenga al menos un enlace internucleósido que está cargado positivamente a pH fisiológico. La invención también proporciona que el oligonucleótido antisentido tenga al menos un enlace internucleósido que presenta un pKa entre 5,5 y 12.

10 Sin desear quedar ligado a la teoría, se cree que el grupo APN positivamente cargado o los derivados de APN, en el oligómero PMOX facilita la unión a fosfatos negativamente cargados en el nucleótido diana. Por lo tanto, la formación de un heteroduplex entre ARN mutante y el oligómero PMOX se puede mantener junta por una fuerza atractiva iónica, así como por emparejamiento de bases de Watson-Crick.

15 La administración eficaz del oligómero antisentido al ácido nucleico diana es un aspecto importante del tratamiento. Las vías de administración de oligómero antisentido incluyen, pero sin limitación, diversas vías sistémicas, incluyendo las vías orales y parenterales, por ejemplo, intravenosa, subcutánea, intraperitoneal e intramuscular, así como inhalación, administración transdérmica y tópica. Un experto en la técnica puede determinar la vía apropiada, como apropiada para la condición del sujeto bajo tratamiento. La circulación vascular o extravascular, el sistema sanguíneo o linfático, y el fluido cerebroespinal son algunos de los sitios no limitantes en donde se puede introducir el ARN.

20 Los oligonucleótidos antisentido de la invención se pueden administrar al sistema nervioso de un sujeto por cualquier método reconocido por la técnica. Por ejemplo, se puede usar inyección sanguínea periférica de los oligonucleótidos antisentido de la invención para administrar dichos reactivos a neuronas periféricas por medios difusivos y/o activos. En una realización, los oligonucleótidos antisentido se pueden administrar al cerebro del sujeto. Por ejemplo, los oligonucleótidos antisentido se pueden administrar por inyección intracerebroventricular (ICV). Como alternativa, los oligonucleótidos antisentido de la invención se pueden modificar para fomentar el cruce de la barrera hematoencefálica (BHE) para conseguir la administración de dichos reactivos a células neuronales del sistema nervioso central (SNC). Los recientes avances específicos en la tecnología de oligonucleótido antisentido y estrategias de administración han ampliado el alcance del uso del oligonucleótido antisentido para trastornos neuronales (Forte, A., y col 2005. *Curr. Drug Targets* 6:21-29; Jaeger, L. B., and W. A. Banks. 2005. *Methods Mol. Med.* 106:237-251; Vinogradov, S. V., y col 2004. *Bioconjug. Chem.* 5:50-60. Por ejemplo, los oligonucleótidos antisentido de la invención se pueden generar como compuestos de ácido peptidonucleico (PNA). Los reactivos de PNA se han identificado cada uno para cruzar la BHE (Jaeger, L. B., and W. A. Banks. 2005. *Methods Mol. Med.* 106: 237-251). El tratamiento de un sujeto con, por ejemplo, un agente vasoactivo, también se ha descrito para fomentar el transporte a través de la BHE (*Id*). También se puede usar como un mecanismo de administración el anclaje de los oligonucleótidos antisentido de la invención a agentes que se transportan activamente a través de la BHE.

40 En determinadas realizaciones, los oligonucleótidos antisentido de la invención se pueden administrar por métodos transdérmicos (por ejemplo, por incorporación de los oligonucleótidos antisentido dentro de, por ejemplo, emulsiones, con tales oligonucleótidos antisentido opcionalmente empaquetados dentro de los liposomas). Tales métodos transdérmicos y mediados por emulsión/liposoma de administración se describen para la administración de oligonucleótidos antisentido en la técnica, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos. n.º 6.965.025.

45 Los oligonucleótidos antisentido de la invención también se pueden administrar por un dispositivo implantable. El diseño de tal dispositivo es un proceso reconocido en la técnica, con, por ejemplo, el diseño de implante sintético descrito en, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos n.º 6.969.400.

50 Los oligonucleótidos antisentido se pueden introducir en las células usando técnicas reconocidas en la técnica (por ejemplo, transfección, electroporación, fusión, liposomas, partículas poliméricas coloidales y vectores víricos y no víricos así como otros medios conocidos en la técnica). El método de administración seleccionado dependerá al menos de las células a tratar y la localización de las células y estará claro para el experto en la técnica. Por ejemplo, la localización se puede conseguir por liposomas con marcadores específicos sobre la superficie para dirigir el liposoma, inyección directa dentro del tejido que contiene las células diana, absorción mediada por receptor específico, vectores víricos o similares.

55 Los métodos físicos de introducción de ácidos nucleicos incluyen inyección de una solución que contiene el ARN, bombardeo por partículas cubiertas por el ARN, remojo de la célula u organismo en una solución del ARN, o electroporación de las membranas celulares en presencia del ARN. Una construcción vírica empaquetada en una partícula vírica efectuaría tanto introducción eficiente de una construcción de expresión dentro de la célula y transcripción de ARN codificado por la construcción de expresión. Se pueden usar otros métodos conocidos en la técnica para introducir ácidos nucleicos a las células, tales como transporte de potador mediado por lípido, transporte mediado por producto químico, tal como fosfato de calcio y similares. Por lo tanto, el ARN se puede introducir junto con componentes que realizan una o más de las siguientes actividades: aumentar la absorción de ARN por la célula, inhibir el apareamiento de hebras sencillas, estabilizar las hebras sencillas, o de otro modo incrementar la expresión del gen diana.

65

Tal como se conoce en la técnica, los oligonucleótidos antisentido se pueden administrar usando, por ejemplo, métodos que implican absorción mediada por liposoma, conjugados lipídicos, absorción mediada por polilisina, absorción mediada por nanopartícula, y endocitosis mediada por receptor, así como modos no endocíticos adicionales de administración, tales como microinyección, permeabilización (por ejemplo, permeabilización de estreptolisina-O, permeabilización de péptido aniónico), electroporación, y diversos métodos no endocíticos no invasivos de administración que son conocidos en la técnica (referencia a Dokka and Rojanasakul, *Advanced Drug Delivery Reviews* 44, 35-49).

Los oligonucleótidos antisentido se pueden administrar en cualquier vehículo o portador conveniente que es fisiológicamente y/o farmacéuticamente aceptable. Tal composición puede incluir cualquiera de una diversidad de portadores farmacéuticamente aceptables convencionales empleados por los expertos en la técnica. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, solución salina, solución salina tamponada con fosfato (PBS), agua, etanol acuoso, emulsiones, tales como emulsiones de aceite/agua, o emulsiones de triglicéridos, comprimidos y cápsulas. La elección del portador fisiológicamente aceptable variará dependiendo del modo elegido de administración. "Portador farmacéuticamente aceptable" pretende incluir cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes retardantes de la absorción e isotónicos, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce en la técnica. Excepto en el caso de que cualquier agente o medio convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso de los mismos en las composiciones. También pueden incorporarse compuestos activos complementarios en las composiciones.

Los compuestos (por ejemplo, oligonucleótidos antisentido) de la presente invención se pueden utilizar, en general, como el ácido libre o base libre. Como alternativa, los compuestos de esta invención se pueden usar en forma de sales de adición de ácido o base. Las sales de adición de ácido de los compuestos amino libres de la presente invención se pueden preparar mediante métodos bien conocidos en la técnica, y se pueden formar a partir de ácidos orgánicos e inorgánicos. Los ácidos orgánicos adecuados incluyen ácidos maleico, fumárico, benzoico, ascórbico, succínico, metanosulfónico, acético, trifluoroacético, oxálico, propiónico, tartárico, salicílico, cítrico, glucónico, láctico, mandélico, cinámico, aspártico, esteárico, palmítico, glicólico, glutámico y bencenosulfónico.

Los ácidos inorgánicos adecuados incluyen ácido clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, fosfórico y nítrico. Las sales de adición de base incluyen aquellas sales que se forman con el anión carboxilato e incluyen sales formadas con cationes orgánicos e inorgánicos tales como los escogidos entre los metales alcalinos y alcalinotérreos (por ejemplo, litio, sodio, potasio, magnesio, bario y calcio), así como el ion amonio y sus derivados sustituidos (por ejemplo, dibencilamonio, bencilamonio, 2-hidroxietilamonio, y similares). Por lo tanto, el término "sal farmacéuticamente aceptable" pretende abarcar cualquiera y todas las formas de sal aceptables.

En algunos casos, se pueden emplear liposomas para facilitar la absorción del oligonucleótido antisentido dentro de las células. (Véase, por ejemplo, Williams, S.A., *Leukemia* 10(12):1980-1989 1996; Lappalainen y col., *Antiviral Res.* 23:119, 1994; Uhlmann y col., "antisense oligonucleotides: a new therapeutic principle", *Chemical Reviews*, Volumen 90, n.º 4, 25 páginas 544-584, 1990; Gregoriadis, G., Capítulo 14, "Liposomes, Drug Carriers in Biology and Medicine", páginas. 287-341, Academic Press, 1979). También se pueden usar hidrogeles como vehículos para la administración de oligómero antisentido, por ejemplo, tal como se describe en el documento WO 93/01286. Como alternativa, los oligonucleótidos se pueden administrar en microesferas o micropartículas. (Véase, por ejemplo, Wu, G.Y. and Wu, C.H., *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432, 30 1987). Como alternativa, el uso de microburbujas rellenas de gas en complejo con los oligómeros antisentido puede aumentar la administración a tejidos diana, tal como se describe en la patente de Estados Unidos n.º 6.245.747. También se pueden usar composiciones de liberación sostenida. Estas pueden incluir matrices poliméricas semipermeables en la forma de artículos con forma tales como películas o microcápsulas.

En una realización, el oligonucleótido antisentido se administra a un sujeto mamífero, por ejemplo, un ser humano o animal doméstico, que presenta los síntomas de un trastorno de repetición de polinucleótido, en un portador farmacéutico adecuado. En un aspecto del método, el sujeto es un sujeto humano, por ejemplo, un paciente diagnosticado que tienen AME. La afección del paciente también puede dictar la administración profiláctica de un oligonucleótido antisentido de la invención, por ejemplo, en el caso de un paciente que (1) está inmunocomprometido; (2) es una víctima de quemadura; (3) tiene un catéter permanente; o (4) está a punto de someterse o se ha sometido recientemente a cirugía. En una realización preferida, el oligonucleótido antisentido está contenido en un portador farmacéuticamente aceptable, y se administra oralmente. En otra realización preferida, el oligonucleótido antisentido está contenido en un portador farmacéuticamente aceptable, y se administra intravenosamente (i.v.).

En una realización, el compuesto antisentido se administra en una cantidad y de una manera eficaz para dar como resultado una concentración en sangre pico de al menos 200-400 nM de oligonucleótido antisentido. Normalmente, se administran una o más dosis del oligómero antisentido, en general a intervalos regulares, durante un periodo de aproximadamente una a dos semanas. Las dosis preferidas para la administración oral son de aproximadamente 1-1.000 mg de oligómero por 70 kg. En algunos casos, pueden ser necesarias dosis de más de 1.000 mg de oligómero/paciente. Para la administración i.v., las dosis preferidas son de aproximadamente 0,5 mg a 1.000 mg de oligómero por 70 kg. El oligómero antisentido se puede administrar a intervalos regulares durante un corto periodo de tiempo, por ejemplo, diariamente durante dos semanas o menos; una vez cada dos días; una vez cada tres días; una

vez cada 3 a 7 días; una vez cada 3 a 10 días; una vez cada 7 a 10 días; una vez cada dos semanas; una vez al mes. Sin embargo, en algunos casos el oligómero se administra intermitentemente durante un periodo mayor de tiempo, por ejemplo, durante varias semanas, meses o años. Por ejemplo, el oligómero antisentido se puede administrar uno de cada dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once o doce meses. Además, el oligómero antisentido se puede administrar uno de cada uno, dos, tres, cuatro o cinco años. La administración puede ser seguida por, o simultánea con, la administración de un antibiótico u otro tratamiento terapéutico. El régimen de tratamiento se puede ajustar (dosis, frecuencia, vía, etc.) como se indica, basándose en los resultados de los inmunoensayos, otros ensayos bioquímicos y examen fisiológico del sujeto bajo tratamiento.

Un régimen de tratamiento *in vivo* eficaz que usa los oligonucleótidos antisentido de la invención pueden variar según la duración, la dosis, la frecuencia y la vía de administración, así como la condición del sujeto bajo tratamiento (es decir, la administración profiláctica frente a la administración en respuesta a la infección localizada o sistémica). Por consiguiente, tal terapia *in vivo* con frecuencia necesitará seguimiento por ensayos apropiados al tipo particular de trastorno bajo tratamiento, y ajustes correspondientes en la dosis o régimen de tratamiento, para conseguir un resultado terapéutico óptimo.

Se puede hacer un seguimiento del tratamiento, por ejemplo, por indicadores generales de enfermedad conocidos en la técnica. La eficacia de un oligonucleótidos antisentido administrado *in vivo* de la invención se puede determinar a partir de muestras biológicas (tejido, sangre, orina etc.) tomada de un sujeto antes de, durante y posterior a la administración del oligonucleótido antisentido. Los ensayos de tales muestras incluyen (1) hacer un seguimiento de la presencia o ausencia de la formación de heteroduplex con secuencias diana y no diana, usando procedimientos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, un ensayo de movilidad en gel electroferético; (2) hacer un seguimiento de la cantidad de un ARNm mutante en relación con un ARNm normal o proteína tal como se determina por técnicas convencionales tales como RT-PCR, transferencia Northern, ELISA o transferencia Western.

En algunas realizaciones, el oligonucleótido antisentido se absorbe activamente por las células mamíferas. En realizaciones adicionales, el oligonucleótido antisentido se puede conjugar con un resto transporte (por ejemplo, péptido transporte) tal como se describe en el presente documento para facilitar tal absorción.

Usos

La invención también se refiere a un oligonucleótido antisentido tal como se describe en el presente documento para su uso en el tratamiento de una enfermedad, comprendiendo el uso aumentar el nivel de ARNm de SMN2 que contiene el exón 7 en relación al ARNm de SMN2 con exón deletado en una célula (por ejemplo, tratando sujetos con AME). Por consiguiente, en una realización, la presente invención proporciona un oligonucleótido antisentido tal como se describe en el presente documento para su uso en el tratamiento de un individuo aquejado con AME.

En una realización, las células de un sujeto que tiene AME se ponen en contacto con un oligonucleótido antisentido de la invención para incrementar la expresión del ARNm de AME2 que contiene el exón 7. Secuencias antisentido y composiciones ilustrativas, tales como 14-mero-APN, E-8/4a-APN y E8/4b-APN, se describen en la Tabla 1.

En una realización, las células de un sujeto que tiene atrofia muscular espinal se ponen en contacto con un reactivo oligonucleotídico de la invención para presentar corte y empalme del exón 7 en SMN2. Los reactivos oligonucleotídicos ilustrativos incluyen complementariedad de secuencias a la secuencia del intrón 7 o la secuencia diana del exón 8 y variantes de las mismas (por ejemplo, tal como se muestra en el presente documento). En otra realización, las células de un sujeto que tiene otro trastorno que se beneficiará de la invención del corte y empalme alternativo están conectadas con un reactivo oligonucleotídico de la invención. Las secuencias diana relacionadas con las secuencias diana descritas en el presente documento están presentes en secuencias intrónicas humanas. Por ejemplo, hay una secuencia parcialmente homóloga a una secuencia de intrón 7 localizada en el intrón 10 de CFTR humana.

Tales agentes también se pueden usar en el tratamiento de enfermedades asociadas con alta susceptibilidad a estrés oxidativo tal como exposición a Paraquat y enfermedad de Parkinson inducido, así como esclerosis lateral amiotrófica (ELA), otra enfermedad neurológica caracterizada por niveles bajos de proteína de SMN (Veldink, J. H., y col. 2005, *Neurology* 65(6):820-5).

Los oligonucleótidos antisentido de la invención se pueden administrar a sujetos para tratar (profiláctica o terapéuticamente) AME. Junto con tal tratamiento, se pueden considerar los farmacogenómicos (es decir, el estudio de la relación entre el genotipo de un individuo y la respuesta de ese individuo a un compuesto extraño o fármaco). Las diferencias en el metabolismo de terapéuticos pueden conducir a toxicidad grave o fallo terapéutico alterando la relación entre la dosis y la concentración en sangre del fármaco farmacéuticamente activo. Por lo tanto, un médico o clínico puede considerar aplicar el conocimiento obtenido en estudios farmacogenómicos relevantes en la determinación de si administrar o no un agente terapéutico así como adaptar la dosis y/o el régimen terapéutico de tratamiento con un agente terapéutico.

Comparación de oligonucleótidos modificados por APN y oligonucleótidos no modificados

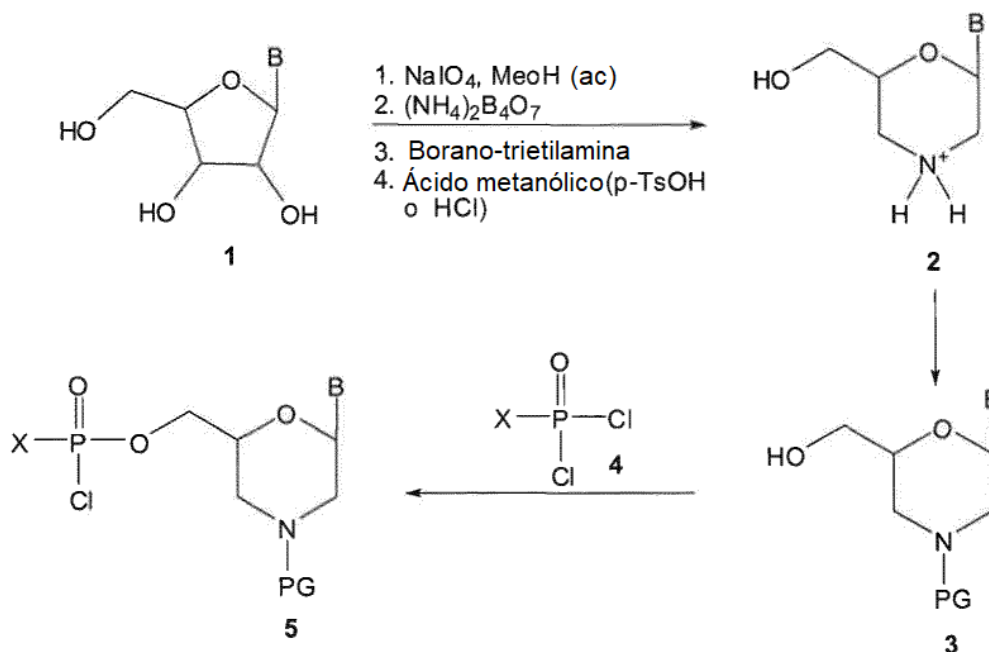
Los oligonucleótidos de algunas realizaciones de la invención se ensayaron para determinar si un oligonucleótido modificado por APN aumentaría la inclusión del exón 7 en SMN2 en comparación con el oligonucleótido no modificado. El oligómero modificado por APN referido como 14-mero-APN (T TTC ATA ATG CTG G) contiene modificaciones de APN en las bases T mostradas en negrita (SEQ ID NO:21). El N1 (A TTC ACT TTC ATA ATG CTG G) y el oligómero de 14mero (T TTC ATA ATG CTG G) no contienen modificaciones de APN (SEQ ID NO:1 y 19, respectivamente).
 5
 10

Se determinó que la adición de modificaciones de APN a un oligonucleótido aumenta la potencia del compuesto en comparación con PMO no modificado que contiene la misma secuencia (Véase 6). Específicamente, 14 mero (11/15) APN era aproximadamente un orden de magnitud más potente que 14 mero (11/15) sin el enlace de APN. Asimismo E8/4a-APN (11/15) y E8/4b-APN (11/15) eran más potentes que E8/4a (11/15) y E8/4b (11/15) respectivamente (Véase los Ejemplos 3 y 4 y las Figuras 6 y 7).

La preparación de PMO-X con enlazadores de internucleósido de nitrógeno básico

20 Las subunidades de morfolino, los enlaces intersubunidad modificados y los oligómeros que comprenden los mismos se pueden preparar tal como se describe en los ejemplos y en las patentes de Estados Unidos n.º 5.185.444 y 7.943.762. Las subunidades de morfolino se pueden preparar según el siguiente Esquema de reacción general I.

Esquema de reacción 1. Preparación de subunidad de morfolino



25 Con respecto al Esquema de reacción 1, en donde B representa un resto de emparejamiento de bases y PG representa un grupo protector, las subunidades de morfolino se pueden preparar del correspondiente ribonucleósido (1) tal como se muestra. La subunidad de morfolino (2) se puede proteger opcionalmente por reacción con un precursor del grupo protector adecuado, por ejemplo, cloruro de tritilo. El grupo protector 3' en general se separa durante la síntesis de oligómero en estado sólido tal como se describe a mayor detalle a continuación. El resto de emparejamiento de bases se puede proteger adecuadamente para la síntesis de oligómero en fase sólida. Los grupos protectores adecuados incluyen benzoilo para adenina y citosina, fenilacetilo para guanina, y pivaloiloximetilo para hipoxantina (I). El grupo pivaloiloximetilo se puede introducir en la posición N1 de la base heterocíclica de hipoxantina. Aunque una subunidad de hipoxantina no protegida, se puede emplear, los rendimientos en las reacciones de activación son muy superiores cuando la base está protegida. Otros grupos protectores adecuados incluyen aquellos descritos en la publicación de solicitud de Estados Unidos en trámite junto con la presente n.º 2009/0131624.

40 La reacción de 3 con el compuesto de fósforo activado 4, da como resultado subunidades de morfolino que tienen el resto de enlace deseado 5. Los compuestos de la estructura 4 se pueden preparar usando cualquier número de métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, tales compuestos se pueden preparar mediante la reacción de la correspondiente amina y oxidocloruro de fósforo. En este sentido, el material de partida amina se puede

preparar usando cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo aquellos métodos descritos en los Ejemplos y en la patente de Estados Unidos N.º 7.943.762.

Los compuestos de estructura 5 se pueden usar en la síntesis de oligómero automatizado en fase sólida para la preparación de oligómeros que comprenden los enlaces intersubunidad. Tales métodos son bien conocidos en la técnica. Brevemente, un compuesto de estructura 5 puede estar modificado en el extremo 5' para contener un enlazador a un soporte sólido. Por ejemplo, el compuesto 5 puede estar unido a un soporte sólido por un enlazador que comprende L¹¹ y L¹⁵. En las Figuras 1 y 2 se demuestra un método ilustrativo. Una vez soportado, el grupo protector (por ejemplo tritilo) se separa y la amina libre se hace reaccionar con un resto de fósforo activado de un segundo compuesto de estructura 5. Esta secuencia se repite hasta que se obtiene la longitud deseada de oligo. El grupo protector en el extremo 5' terminal se puede o bien separar o dejar si se desea una modificación 5'. El oligo se puede separar del soporte sólido usando cualquier número de métodos, por ejemplo, tratamiento con DTT seguido de hidróxido de amonio tal como se representa en las Figuras 3 y 4.

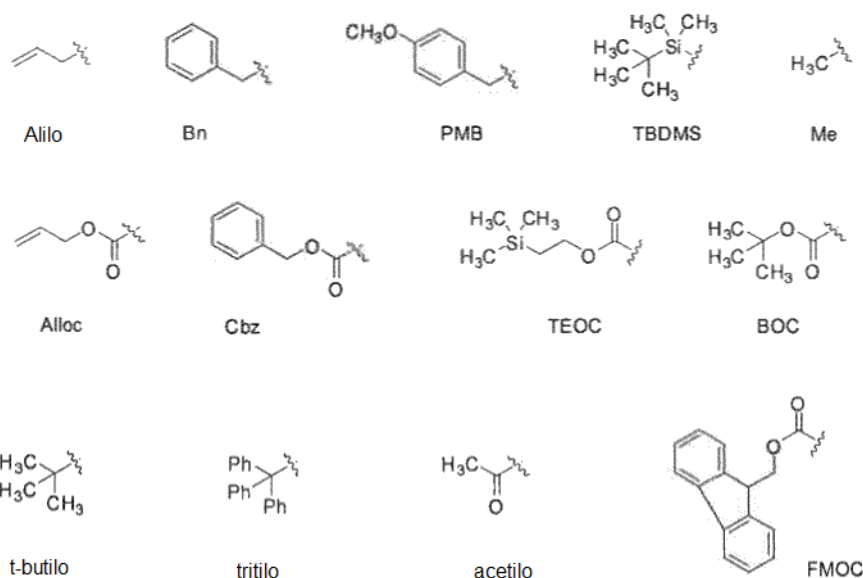
La preparación de subunidades de morfolino modificadas y oligómeros de morfolino se describen a mayor detalle en los Ejemplos. Los oligómeros de morfolino que contienen cualquier número de enlaces modificados se pueden preparar usando métodos descritos en el presente documento, métodos conocidos en la técnica y/o descritos en las referencias citadas en el presente documento. También se describen en los ejemplos modificaciones globales de oligómeros de morfolino preparados tal como se han descrito previamente (véase, por ejemplo, la publicación de PCT WO2008036127).

El término "grupo protector" se refiere a restos químicos que bloquean algunos o todos los restos reactivos de un compuesto y previenen que tales restos participen en las reacciones químicas hasta que se separa el grupo protector, por ejemplo, aquellos restos enumerados y descritos en T.W. Greene, P.G.M. Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis", 3ª ed. John Wiley & Sons (1999). Puede ser ventajoso, cuando se emplean diferentes grupos protectores, que cada grupo protector (diferente) sea separable por un medio diferente. Los grupos protectores que se escinden bajo condiciones de reacción totalmente distintas permiten separación diferencial de tales grupos protectores. Por ejemplo, los grupos protectores se pueden separar por ácido, base e hidrogenólisis. Los grupos tales como tritilo, dimetoxitritilo, acetal y terc-butildimetilsililo son lábiles a ácidos y se pueden usar para proteger restos reactivos carboxi e hidroxí en presencia de grupos amino protegidos con grupos Cbz, que son retirables por hidrogenólisis, y grupos Fmoc, que son lábiles a bases. Los restos de ácido carboxílico se pueden bloquear con grupos lábiles a bases tales como, sin limitación, metilo, o etilo, y los restos reactivos hidroxí se pueden bloquear con grupos lábiles a bases tales como acetilo en presencia de aminas bloqueadas con grupos lábiles a ácidos tales como carbamato de terc-butilo o con carbamatos que son estables tanto en ácido como en base pero hidrolíticamente separables.

Los restos reactivos hidroxilo y ácido carboxílico también se pueden bloquear con grupos protectores hidrolíticamente separables tales como el grupo bencilo, mientras que los grupos de amina se pueden bloquear con grupos lábiles a bases tales como Fmoc. Un grupo protector de amina particularmente útil para la síntesis de compuestos de Fórmula (I) es la trifluoracetamida. Los restos reactivos de ácido carboxílico se pueden bloquear con grupos protectores oxidativamente separables tales como 2,4-dimetoxibencilo, mientras que los grupos amino coexistentes se pueden bloquear con carbamatos de sililo lábiles a fluoruro.

Los grupos bloqueantes son útiles en presencia de grupos protectores de ácido y base puesto que los anteriores son estables y se pueden separar posteriormente por catalizadores de metal o pi-ácidos. Por ejemplo, un ácido carboxílico bloqueado por alilo se puede desproteger con una reacción catalizada por paladio(O) en presencia de carbamato de t-butilo lábil a ácidos o grupos protectores de amina de acetato lábil a bases. Aún otra forma de grupo protector es una resina a la que se puede unir un compuesto o intermediario. Siempre y cuando el residuo se une a la resina, el grupo funcional se bloquea y no puede reaccionar. Una vez liberado de la resina, el grupo funcional está disponible para reaccionar.

En la técnica se conocen grupos protectores/bloqueantes e incluyen, pero sin limitación a los siguientes grupos:

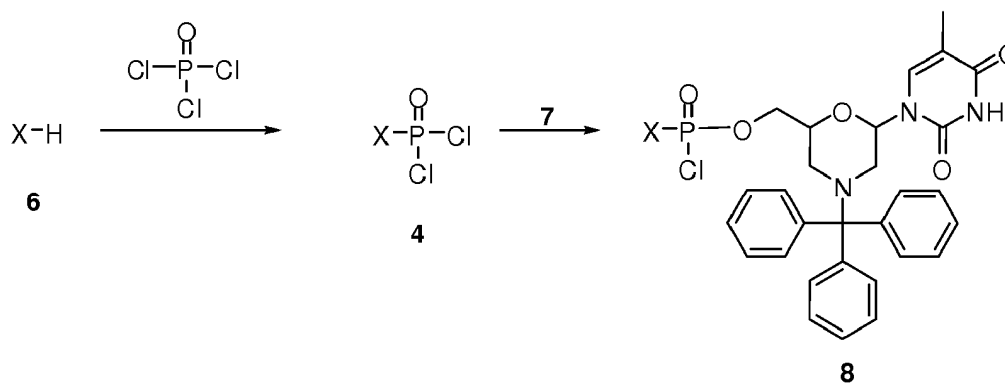


A menos que se indique lo contrario, todos los compuestos químicos se obtienen de Sigma-Aldrich-Fluka. La benzoil adenosina, benzoil citidina y la fenilacetil guanosina se obtuvieron de Carbosynth Limited, RU.

5 La síntesis de PMO, PMO+, PPMO y PMOX que contienen modificaciones de enlace adicionales tal como se han descrito en el presente documento se realizaron usando métodos conocidos en la técnica y descritos en las solicitudes de Estados Unidos n.º US 2009/0131632 y US 2009/0131624 y la publicación PCT número WO/2009/064471.

10 PMO con una modificación de 3' tritilo se sintetizan básicamente tal como se describe en la publicación PCT número WO/2009/064471 con la excepción de que se omite la etapa de destritolación.

Procedimiento A para la preparación de las subunidades activadas:



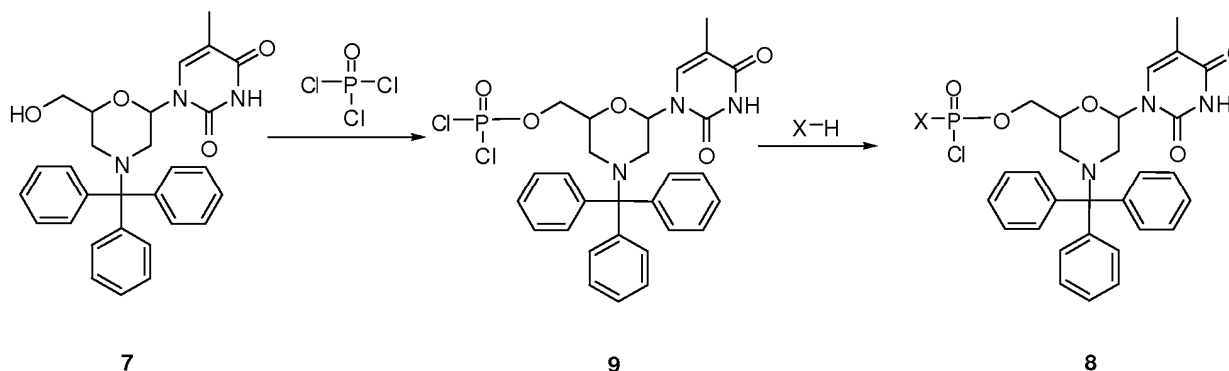
15 A una solución agitada de 6 (1 eq) en diclorometano se añadió POCl₃ (1,1 eq), seguido de diisopropiletilamina (3 eq) a 0 °C, enfriada por un baño de hielo. Después de 15 minutos, el baño de hielo se retiró y la solución se dejó calentar a temperatura ambiente durante una hora. Tras completarse la reacción, la solución de reacción se diluyó con diclorometano, se lavó con 10 % de ácido cítrico acuoso tres veces. Después de secarse sobre MgSO₄, la capa orgánica se pasó a través de un tapón de gel de sílice y se concentró *in vacuo*. El fosforoamidodicloruro resultante (4) se usó directamente para la siguiente etapa sin purificación adicional.

20

25 A una solución del fosforoamidodicloruro (4) (1 eq), 2,6-lutidina (1 eq) en diclorometano se añadió Mo(Tr)T (7) (0,5 eq)/solución de diclorometano, seguido por N-metilimidazol (0,2 eq.). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante una noche. Tras completarse la reacción, la solución de reacción se diluyó con diclorometano, y se lavó con 10 % de ácido cítrico acuoso tres veces. Después de secarse sobre MgSO₄, se filtró la capa orgánica, a continuación, se concentró. El producto (8) se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (eluyendo con un gradiente de acetato de etilo/hexanos) y, a continuación, se almacenó a -20 °C. La estructura se confirmó por análisis por LCMS.

30

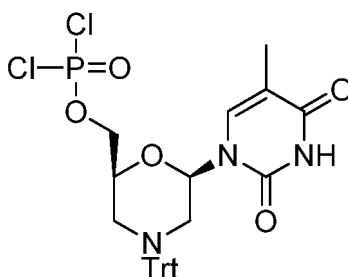
Procedimiento B para la preparación de las subunidades activadas:



5 A una solución de POCl_3 (1,1 eq) en diclorometano se añadió 2,6-lutidina (2 eq), seguido de adición gota a gota de Mo(Tr)T (7) (1 eq)/solución de diclorometano a 0°C . Después de 1 hora, la solución de reacción se diluyó con diclorometano, y rápidamente se lavó tres veces con ácido cítrico acuoso al 10 %. El fosfodicloridato deseado (9) se obtuvo después de secarse sobre MgSO_4 , y evaporación de disolvente.

10 A una solución del fosfodicloridato (1 eq) en diclorometano se añadió amina (1 eq)/diclorometano gota a gota a la disolución a 0°C . Después de 15 minutos, la mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente durante aproximadamente una hora. Tras completarse la reacción, el producto (8) se recogió como un sólido blanco por precipitación con la adición de hexanos, seguido de filtración. El producto se almacenó a -20°C después de secarse bajo vacío. La estructura se confirmó por análisis LCMS.

15 Ejemplo 1: fosfodicloridato de ((2S,6R)-6-(5-metil-2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-4-tritilmorfolin-2-il)metilo



20 A una solución de DCM (20 ml) enfriada (baño de hielo/agua) de oxocloruro de fósforo (2,12 ml, 22,7 mmol) se añadió gota a gota 2,6-lutidina (4,82 ml, 41,4 mmol), a continuación, se añadió gota a gota una solución de DCM (20 ml) Mo(Tr)T (2) (10,0 g, 20,7 mmol) durante 15 min (temperatura int. $0-10^\circ\text{C}$) después de que se retirara el baño continuó una agitación a temperatura ambiente durante 20 min. La reacción se lavó con solución de ácido cítrico (40 ml x 3, 10 % *a/vaq*), se secó (MgSO_4), se filtró y se concentró hasta una espuma blanca (9,79 g) usada, a continuación, directamente para el siguiente procedimiento.

Ejemplo 2: Preparación de oligómeros de morfolino

30 Preparación de fenil carbamato de tritil piperazina1b (véase la Figura 1): A una suspensión enfriada del compuesto la en diclorometano (6 ml/g 11) se añadió un solución de carbonato de potasio (3,2 eq) en agua (4 ml/g de carbonato de potasio). A esta mezcla de dos fases se añadió lentamente una solución de cloroformato de fenilo (1,03 eq) en diclorometano (2 g/g de cloroformato de fenilo). La mezcla de reacción se calentó a 20°C . Tras completarse la reacción (1-2 h), se separaron las capas. La capa orgánica se lavó con agua y se secó sobre carbonato de potasio anhidro. El producto 1b se aisló por cristalización de acetonitrilo. Rendimiento = 80 %.

35 Preparación de alcohol de carbamato 1c: Se suspendió hidruro de sodio (1,2 eq) en 1-metil-2-pirrolidinona (32 ml/g de hidruro de sodio). A esta suspensión se añadieron trietilenglicol (10,0 eq) y el compuesto 1b (1,0 eq). La suspensión resultante se calentó a 95°C . Tras completarse la reacción (1-2 h), la mezcla se enfrió a 20°C . A esta mezcla se añadió 30 % de diclorometano/metil terc-butil éter (v:v) y agua. La capa orgánica que contenía el producto se lavó con éxito con NaOH acuoso, ácido succínico acuoso y cloruro sódico acuoso saturado. El producto 1c se aisló por cristalización de diclorometano/metil terc-butil éter/heptano. Rendimiento = 90 %.

40

Preparación de ácido de Cola 1d: A una solución del compuesto 1c en tetrahidrofurano (7 ml/g 36) se añadió anhídrido succínico (2,0 eq) y DMAP (0,5 eq). La mezcla se calentó a 50 °C. Tras completarse la reacción (5 h), la mezcla se enfrió a 20 °C y se ajustó el pH 8,5 con NaHCO₃ acuoso. Se añadió metil terc-butil éter, y el producto se extrajo en la capa acuosa. Se añadió diclorometano, y la mezcla se ajustó a pH 3 con ácido cítrico acuoso. La capa orgánica que contenía el producto se lavó con una mezcla de tampón de citrato pH=3 y cloruro de sodio acuoso saturado. Esta solución de diclorometano de 1d se usó sin aislamiento en la preparación del compuesto 1e.

Preparación de 1e: A la solución del compuesto 1d se añadió imida de ácido N-hidroxi-5-norborneno-2,3-dicarboxílico (HONB) (1,02 eq), 4-dimetilaminopiridina (DMAP) (0,34 eq) y, a continuación, hidrocloreto de 1-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) (1,1 eq). La mezcla se calentó a 55 °C. Tras completarse la reacción (4-5 h), la mezcla se enfrió a 20 °C y se lavó con éxito con ácido cítrico 0,2 M/salmuera 1:1. La solución de diclorometano se sometió a intercambio de disolvente a acetona y, a continuación, a N,N-dimetilformamida, y el producto se aisló por precipitación a partir de acetona/N,N-dimetilformamida en cloruro de sodio acuoso saturado. El producto en bruto se suspendió de nuevo varias veces en agua para separar la N,N-dimetilformamida y las sales. Rendimiento = 70 % de 1e a partir del compuesto 1c. La introducción del la "Cola" activada sobre la resina anclaje de disulfuro se realizó en NMP mediante el procedimiento usado por la incorporación de las subunidades durante la síntesis en fase sólida.

Preparación del soporte sólido para la síntesis de oligómeros de morfolino (Véase la Figura 2): Este procedimiento se realizó en un recipiente de péptido encamisado, silanizado (producido a petición del cliente por ChemGlass, NJ, USA) con una frita de vidrio de porosidad gruesa (40-60 µm), agitador superior, y llave de paso de Teflón de 3 vías para permitir que N₂ borbote a través de la frita o una extracción en vacío. El control de temperatura se consiguió en el recipiente de reacción por un baño de agua circulante.

Las etapas de tratamiento/lavado de resina en el siguiente procedimiento consiste en dos operaciones básicas: fluidización de resina y extracción de disolvente/solución. Para la fluidización de resina, la llave de paso se colocó para permitir que N₂ fluyera hacia la frita y el lavado/tratamiento de resina especificado se añadió al reactor y se dejó que permeara y humedeciera completamente la resina. A continuación, se inició el mezclado y la suspensión de resina se mezcló durante el tiempo especificado. Para la extracción de disolvente/solución, se pararon el mezclado y el flujo de N₂ y la bomba de vacío se puso en marcha y, a continuación, la llave de paso se colocó para permitir que se desechara la evacuación del lavado/tratamiento de resina. Todos los volúmenes de tratamiento/lavado de resina eran de 15 ml/g de resina a menos que se señalara lo contrario.

A resina de aminometilpoliestireno (100-200 malla; aproximadamente 1,0 mmol/g de sustitución de N₂; 75 g, 1 eq, Polymer Labs, RU, parte n.º 1464-X799) en un recipiente de péptido encamisado, silanizado se añadió 1-metil-2-pirrolidinona (NMP; 20 ml/g de resina) y la resina se dejó que se hinchara con mezclado durante 1-2 h. Después de la evacuación del disolvente hinchado, la resina se lavó con diclorometano (2 x 1-2 min), 5 % de diisopropiletilamina en 25 % de isopropanol/diclorometano (2 x 3-4 min) y diclorometano (2 x 1-2 min). Después de la evacuación del lavado final, la resina se fluidizó con una solución de anclaje de disulfuro 2a en 1-metil-2-pirrolidona (0,17 M; 15 ml/g de resina, aproximadamente 2,5 eq) y la mezcla de resina/reactivo se calentó a 45 °C durante 60 h. En la conclusión de la reacción, el calentamiento era discontinuo y la solución de anclaje se evacuó y la resina se lavó con 1-metil-2-pirrolidinona (4 x 3-4 min) y diclorometano (6 x 1-2 min). La resina se trató con una solución de 10 % (v/v) de dicarbonato de dietilo en diclorometano (16 ml/g; 2 x 5-6 min) y, a continuación, se lavó con diclorometano (6 x 1-2 min). La resina 2b se secó bajo una corriente de N₂ durante 1-3 h y, a continuación, bajo vacío a peso constante (± 2 %). Rendimiento: 110-150 % del peso de resina original.

Determinación de la carga de resina de aminometilpoliestireno-disulfuro: La carga de la resina (número de sitios reactivos potencialmente disponibles) se determina mediante un ensayo espectrométrico para el número de grupos trifenilmetilo (trítilo) por gramo de resina.

Se transfiere un peso conocido de resina secada (25 ± 3 mg) a un matraz volumétrico de 25 ml silanizado y se añaden aproximadamente 5 ml de 2 % (v/v) de ácido trifluoroacético en diclorometano. Los contenidos se mezclan dando vueltas suavemente y, a continuación, se deja reposar durante 30 min. El volumen se aumenta a 25 ml con 2 % de ácido trifluoroacético (v/v) en diclorometano adicional y los contenidos se mezclan a fondo. Usando una pipeta de desplazamiento positivo, se transfiere una alícuota de la solución que contiene trítilo (500 µl) a un matraz volumétrico de 10 ml y el volumen aumenta a 10 ml con ácido metanosulfónico.

El contenido de catión trítilo en la solución final se mide por absorbancia UV a 431,7 nm y la carga de resina se calcula en grupos trítilo por gramo de resina (µmol/g) usando los volúmenes apropiados, diluciones, coeficiente de extinción (ε: 41 µmol⁻¹ cm⁻¹) y peso de resina. El ensayo se realizó por triplicado y se calculó una carga promedio.

El procedimiento de carga de resina en este ejemplo proporcionará resina con una carga de aproximadamente 500 µmol/g. Se obtuvo una carga de 300-400 en µmol/g si la etapa de incorporación del anclaje de disulfuro se realizaba durante 24 h a temperatura ambiente.

Carga de cola: Usando el mismo sistema y volúmenes que para la preparación de resina de aminometilpoliestireno-disulfuro, se puede introducir la Cola en la molécula. Para la etapa de acoplamiento, se usó una solución de 1e (0,2 M)

en NMP que contenía 4-etilmorfolina (NEM 0,4 M) en lugar de la solución anclaje de disulfuro. Después de 2 h a 45 °C, la resina 2b se lavó dos veces con 5 % de diisopropiletilamina en 25 % de isopropanol/diclorometano y una vez con DCM. A la resina se añadió una solución de anhídrido benzoico (0,4 M) y NEM (0,4 M). Después de 25 min, la camisa del reactor se enfrió a temperatura ambiente, y la resina se lavó dos veces con 5 % diisopropiletilamina en 25 % de isopropanol/diclorometano y ocho veces con DCM. La resina 2c se filtró y se secó a alto vacío. La carga para la resina 2c se define que es la carga de la resina de aminometilpoliestireno-disulfuro original 2b usada en la carga de Cola.

Síntesis en fase sólida: Se prepararon oligómeros de morfolino en un sintetizador de péptido automatizado Gilson AMS-422 en columnas de reacción de polipropileno Gilson de 2 ml (Parte N.º 3980270). Se colocó un bloque de aluminio con canales para el flujo de agua alrededor de las columnas cuando formaban parte del sintetizador. El AMS-422 añadirá alternativamente soluciones de reactivo/lavado, mantenidas durante un tiempo específico, y evacuará las columnas usando vacío.

Para los oligómeros en el intervalo hasta aproximadamente 25 subunidades de longitud, se prefiere la resina de aminometilpoliestireno-disulfuro con carga cerca de 500 µmol/g de resina. Para oligómeros mayores, se prefiere la resina de aminometilpoliestireno-disulfuro con carga de 300-400 µmol/g de resina. Si se desea una molécula con Cola 5', se elige la resina que se ha cargado con Cola con las mismas directrices de carga.

Se prepararon las siguientes soluciones de reactivo:

Solución de destritilación: 10 % de ácido cianoacético (p/v) en diclorometano/acetonitrilo 4:1; Solución de neutralización: 5 % de diisopropiletilamina en diclorometano/isopropanol 3:1; Solución de acoplamiento: 0,18 M (o 0,24 M para oligómeros que han crecido más de 20 subunidades) de subunidad de morfolino activada de la base deseada y el tipo de enlace y N-etilmorfolina 0,4 M, en 1,3-dimetilimidazolidinona. Se usó diclorometano (DCM) como un lavado transicional que separa los diferentes lavados de solución de reactivo.

En el sintetizador, con el bloque fijado a 42 °C, a cada columna que contenía 30 mg de resina de aminometilpoliestireno-disulfuro (o resina con Cola) se añadió 2 ml de 1-metil-2-pirrolidona y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 min. Después del lavado con 2 veces 2 ml de diclorometano, se empleó el siguiente ciclo de síntesis:

Etapa	Volumen	Administración	Tiempo de reposo
Destritilación	1,5 ml	Colector de escape	15 segundos
Destritilación	1,5 ml	Colector de escape	15 segundos
Destritilación	1,5 ml	Colector de escape	15 segundos
Destritilación	1,5 ml	Colector de escape	15 segundos
Destritilación	1,5 ml	Colector de escape	15 segundos
Destritilación	1,5 ml	Colector de escape	15 segundos
Destritilación	1,5 ml	Colector de escape	15 segundos
DCM	1,5 ml	Colector de escape	30 segundos
Neutralización	1,5 ml	Colector de escape	30 segundos
Neutralización	1,5 ml	Colector de escape	30 segundos
Neutralización	1,5 ml	Colector de escape	30 segundos
Neutralización	1,5 ml	Colector de escape	30 segundos
Neutralización	1,5 ml	Colector de escape	30 segundos
Neutralización	1,5 ml	Colector de escape	30 segundos
DCM	1,5 ml	Colector de escape	30 segundos
Acoplamiento	350 µl - 500 µl	Jeringa	40 minutos
DCM	1,5 ml	Colector de escape	30 segundos
Neutralización	1,5 ml	Colector de escape	30 segundos
Neutralización	1,5 ml	Colector de escape	30 segundos
DCM	1,5 ml	Colector de escape	30 segundos
DCM	1,5 ml	Colector de escape	30 segundos
DCM	1,5 ml	Colector de escape	30 segundos

Las secuencias de los oligómeros individuales se programaron dentro del sintetizador de modo que cada columna recibe la solución de acoplamiento apropiada (A,C,G,T,I) en la secuencia apropiada. Cuando el oligómero en una columna había completado la incorporación de su subunidad final, la columna se retiró del bloque y se realizó un ciclo final manualmente con una solución de acoplamiento comprendida de cloruro de 4-metoxitriphenilmetilo (0,32 M en DMI) que contenía 4-etilmorfolina 0,89 M.

- Escisión de la resina y retirada de bases y grupos protectores de la cadena principal: Después de la metoxitritilación, la resina se lavó 8 veces con 2 ml de 1-metil-2-pirrolidinona. Se añadió un ml de una solución de escisión que consistía en 1,4-ditiotreitol 0,1 M (DTT) y trietilamina 0,73 M en 1-metil-2-pirrolidinona, la columna se tapó, y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 min. Después de ese tiempo, la solución se drenó en un vial Wheaton de 12 ml. La resina muy reducida se lavó dos veces con 300 μ l de solución de escisión. A la solución se añadió 4,0 ml de amoniaco acuoso concentrado (almacenado a -20 °C), el vial firmemente tapado (con tapa de rosca de Teflón), y la mezcla se giró para mezclar la solución. El vial se colocó en un horno a 45 °C durante 16-24 h para efectuar escisión de base y grupos protectores de la cadena principal.
- Aislamiento de oligómero inicial: La solución de amonólisis en viales se retiró del horno y se dejó enfriar a temperatura ambiente. La solución se diluyó con 20 ml de amoniaco acuoso al 0,28 % y se pasó a través de una columna de 2,5x10 cm que contenía resina Macrorep HQ (Biorad). Un gradiente de sal (A: amoniaco al 0,28 % con B: cloruro de sodio 1 M en amoniaco al 0,28 %; 0-100 % B en 60 min) se usó para eluir el pico que contenía metoxitritilo. Las fracciones combinadas se agruparon y se procesaron más dependiente del producto deseado.
- Desmetoxitritilación de oligómeros de morfolino: Las fracciones agrupadas de la purificación Macrorep se trataron con H₃PO₄ 1 M para bajar el pH a 2,5. Después del mezclado inicial, las muestras se dejaron a temperatura ambiente durante 4 min, en dicho tiempo se neutralizan a pH 10-11 con 2,8 % amoniaco/agua. Los productos se purificaron mediante extracción en fase sólida (SPE).
- Amberchrome CG-300M (Rohm and Haas; Philadelphia, PA) (3 ml) se empaqueta dentro de columnas de fritada de 20 ml (columnas de cromatografía BioRad Econo-Pac (732-1011)) y la resina se aclara con 3 ml de lo siguiente: 0,28 % de NH₄OH/80 % de acetonitrilo; NaOH 0,5M /20 % de etanol; agua; H₃PO₄ 50 mM/80 % de acetonitrilo; agua; NaOH 0,5/20 % de etanol; agua; 0,28 % de NH₄OH.
- La solución de la desmetoxitritilación se cargó en la columna y la resina se aclaró tres veces con 3-6 ml de amoniaco acuoso al 0,28 %. Se colocó un vial Wheaton (12 ml) bajo la columna y el producto eluyó mediante dos lavados con 2 ml de 45 % de acetonitrilo en amoniaco acuoso al 0,28 %. Las soluciones se congelaron en hielo seco y los viales se colocaron en un liofilizador para producir un polvo blanco mullido. Las muestras se disolvieron en agua, se filtraron a través de un filtro de 0,22 micras (Pall Life Sciences, filtro de jeringa de 25 mm Acrodisc, con una membrana HT Tuffryn de 0,2 micras) usando una jeringa y la densidad óptica (DO) se midió en un espectrofotómetro de UV para determinar las unidades de DO de oligómero presente, así como dispensar muestra para el análisis. A continuación, las soluciones se colocaron en viales Wheaton para la liofilización.
- Análisis de oligómeros de morfolino: Se usó espectrometría de masas por MALDI-TOF para determinar la composición de fracciones en purificaciones así como proporcionar evidencia para la identidad (peso molecular) de los oligómeros. Las muestras se corrieron después de la dilución con solución de ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico (ácido sinapínico), ácido 3,4,5-trihidroxiacetofenona (THAP) o ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico (HCCA) como matrices.
- La HPLC de intercambio catiónico (SCX) se realizó usando una columna de 4x250 mm Dionex ProPac SCX-10 (Dionex Corporation; Sunnyvale, CA) usando acetato sódico pH=5 25 mM 25 % de acetonitrilo (Tampón A) y acetato de sodio 25 mM pH=5 25 % de acetonitrilo cloruro de potasio 1,5 M (tampón B) (Gradiente 10-100 % B en 15 min) o KH₂PO₄ 25 mM 25 % de acetonitrilo a pH=3,5 (tampón A) y KH₂PO₄ 25 mM 25 % de acetonitrilo a pH=3,5 con cloruro de potasio 1,5 M (tampón B) (Gradiente 0-35 % B en 15 min). El sistema anterior se usó para oligómeros cargados positivamente que no tienen un péptido unido, mientras que el último se usó para conjugados peptídicos.
- Purificación de oligómeros de morfolino por cromatografía de intercambio catiónico: La muestra se disuelve en acetato de sodio 20 mM, pH=4,5 (tampón A) y se aplica a una columna de resina de intercambio catiónico Source 30 (GE Healthcare) y se eluye con un gradiente de cloruro de sodio 0,5 M en acetato de sodio 20 mM y acetonitrilo al 40 %, pH = 4,5 (Tampón B). Las fracciones agrupadas que contienen producto se neutralizaron con amoniaco acuoso concentrado y se aplicaron a una columna de SPE Amberchrome. El producto se eluye, se congela y se liofiliza como anteriormente.
- Ejemplo 3: La modificación de oligonucleótido APN aumenta la inclusión del exón 7 en SMN2
- Se ensayaron oligonucleótidos que contenían las secuencias mostradas en la Figura 5 para determinar si el oligonucleótido APN aumentaría la inclusión del exón 7 en SMN2. Cada uno de los oligonucleótidos mostrados en la Tabla 1 se introdujeron en células usando el protocolo de nucleofección descrito a continuación. Los resultados se cuantificaron usando el protocolo de la transcriptasa inversa y se muestran en las Figuras 6 y 7. La intensidad de las bandas del gel que representan la inclusión o exclusión del exón 7 en SMN2 en fibroblastos GM03813 (Coriell) se cuantificaron con ImageQuant (GE). La inclusión del exón 7 se presenta como un porcentaje calculado de la relación de las intensidades de la banda con exón 7 incluido dividido por la suma de las intensidades de las bandas con exón 7 incluido y excluido. Cada mancha representa la desviación típica media +/- 1 de dos réplicas en cada concentración. Se combinaron tres experimentos independientes para producir el anterior conjunto de datos. El análisis de inclusión en porcentaje se realizó en Microsoft Excel. Los puntos de datos y las curvas se trazaron en Graphpad Prism. Tal como se muestran en la Figura 6 la adición de modificaciones de APN a un oligonucleótido aumenta la potencia del

compuesto en comparación con PMO no modificado que contiene la misma secuencia. Por lo tanto, tal como se muestra en la Figura 6, 14 mero (11/15) APN era aproximadamente un orden de magnitud más potente que 14 mero (11/15) sin el enlace de APN. Asimismo, E8/4a-APN (11/15) y E8/4b-APN (11/15) eran más potentes que E8/4a (11/15) y E8/4b (11/15) respectivamente.

5

Ejemplo 4: Protocolo de nucleofección de células de AME

Se cultivaron fibroblastos derivados de paciente de un individuo con atrofia muscular espinal (línea celular Coriell GM03813) según los protocolos patrones en MEM de Eagle con FBS al 10 %. Las células se sometieron a pase 3-5 días antes del experimento y eran aproximadamente 80 % confluentes en nucleofección. Los oligos se prepararon como soluciones madre 1-2 mM en agua libre de nucleasa (no tratada con DEPC) de las cuales se prepararon diluciones apropiadas para nucleofección. Los fibroblastos se sometieron a tripsinización, se recontaron, se centrifugaron a 90 g durante 10 minutos, y 1 a 5×10^{-5} células por pocillo se suspendieron de nuevo en solución de nucleofección P2 (Lonza). A continuación, la solución de oligo y las células se añadieron a cada pocillo de una tira de 16 pocillos Nucleocuvette y se pulsaron con el programa EN-100. Las células se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos y se transfirieron a una placa de 12 pocillos por duplicado. El ARN total se aisló de las células tratadas después de 48 h usando el spin kit GE Illustra 96 siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. El ARN recuperado se almacenó a -80°C antes del análisis.

10

15

20

25

30

Se realizó PCR transcriptasa inversa para amplificar el alelo de SMN2 usando el sistema de RT-PCR de una etapa SuperScript III (Invitrogen). 400 ng de ARN total aislado de las células sometidas a nucleofección se sometieron a transcripción inversa y se amplificaron con los siguientes cebadores específicos a gen y condiciones (descritas en Hua 2007): E6-F: 5' ATA ATT CCC CCA CCA CCT CCC 3'; E8-467-R: 5' TTG CCA CAT ACG CCT CAC ATA C 3'; Programa de PCR: 60°C durante 30 min incubación de RT; desnaturalizar a 94°C , apareamiento a 55°C , extensión a 72°C , 22 ciclos. La solución de amplificación proporcionada en el kit de una etapa se complementó con dCTP marcado con Cy5 (GE) para posibilitar la visualización de banda por fluorescencia. Después de la amplificación, los productos de PCR se digirieron con DDEI para diferenciar entre los alelos SMN1 o SMN2 (tal como se describe en Hua 2007). Las muestras digeridas se corrieron sobre un gel profundido de 10 % de acrilamida/TBE (Invitrogen) y se visualizaron sobre un Typhoon Trio (GE) usando el láser de excitación de 633 nm y el filtro de emisión BP 30 de 670 nm con el plano focal en la superficie pletina. Los geles se analizaron con ImageQuant (GE) para determinar las intensidades de las bandas. Las intensidades de todas las bandas que contenían el exón 7 se sumaron para representar los niveles de transcrito del exón 7 completo en el análisis de inclusión.

35

Ejemplo 5: Modelo de ratón con AME

Los ratones con SMN Δ 7 se pueden usar como un modelo de AME para caracterizar los oligonucleótidos antisentido modificantes de la enfermedad. Los ratones poseen solamente el gen *Smn* la pérdida de este gen es mortal en el embrión. Para generar ratones con una deficiencia de SMN que modela la AME humana, se puede introducir el gen SMN2humano dentro del ratón. Por ejemplo, se pueden introducir dos copias de SMN2humano en los ratones carentes de *Smn* para generar ratones con AME grave que pueden vivir un promedio de 5 días, mientras que se pueden introducir ocho copias de SMN2para rescatar los ratones. Además, SMN Δ 7, un transgen de SMN carente del exón 7, se puede introducir en los ratones con AME grave para incrementar la duración de vida promedio. Además, se puede inducir SMN después del nacimiento para modular la AME en ratones con SMN Δ 7. Por lo tanto, Los ratones con SMN Δ 7 se pueden usar como un modelo de AME para caracterizar los oligonucleótidos antisentido modificantes de la enfermedad.

40

45

Usando el modelo de ratón con SMN Δ 7 de AME, se pueden realizar estrategias de tratamiento múltiple para incrementar la expresión de SMN. La producción de SMN por modificación dirigida con diversos compuestos farmacológicos, tales como oligómeros antisentido, para o bien activar el promotor de SMN o alterar los patrones de corte y empalme del exón 7 se puede realizar para mejorar el fenotipo de los ratones con AME con SMN Δ 7. Por ejemplo, los oligonucleótidos antisentido pueden bloquear las secuencias diana, incluyendo los potenciadores de corte y empalme de exón o los silenciadores de corte y empalme de intrón (ISSs). Además, se puede inducir SMN después del nacimiento para conseguir un efecto terapéutico.

50

55

60

Oligómeros antisentido tales como PMO, PMO+, PPMO, y PMO-X, se pueden administrar a ratones por inyección ICV a alta concentración para alterar el corte y empalme de SMN2 e incrementar los niveles de SMN. Los ratones con AME tratados pueden demostrar mejoramiento en el aumento de peso, actividad motora y tiempo de supervivencia incrementado. Los oligómeros antisentido se pueden administrar por diversos mecanismos incluyendo, pero no limitándose a inyección intracerebroventricular (ICV), administración FV periférica, administración periférica e ICV combinadas e inyección ICV dual.

El tratamiento de SNC temprano probablemente producirá fuertes efectos. Sin embargo, la administración de SNC retrasada puede todavía incrementar los niveles de supervivencia.

65

La inyección ICV puede producir un incremento tanto en la incorporación del exón 7 en SMN2 como en los niveles de la proteína de SMN en cerebro y médula espinal. Por lo tanto, puede ser preferible restaurar los niveles de SMN dentro

de las neuronas para tener un impacto en el AME. Es posible que el gran beneficio de supervivencia se pueda obtener sin aumentar significativamente los niveles de SMN en la periferia. Sin embargo, también es posible que la expresión creciente de SMN en el sistema nervioso autónomo fuera de la barrera hematoencefálica de como resultado corrección de AME.

5

TABLA 1

Secuencias modificadas por PMO y APN para oligonucleótidos dirigidos a AME. Las posiciones modificadas de APN se identifican en rojo en negrita y subrayadas.

Nombre de muestra	Secuencia	Identificador de secuencia
N1	ATT CAC TTT CAT AAT GCT GG	SEQ ID NO: 1
N1-B	ATT CAC TTT CAT AAT <u>GCT</u> GG	SEQ ID NO: 2
N1-C	ATT CAC TTT CAT AAT <u>GCT</u> GG	SEQ ID NO: 3
N1-D	ATT CAC TTT CAT AAT <u>GCT</u> GG	SEQ ID NO: 4
N1-E	ATT CAC TTT CAT AAT <u>GCT</u> GG	SEQ ID NO: 5
N1-F	ATT CAC TTT CAT AAT <u>GCT</u> GG	SEQ ID NO: 6
N1-G	ATT CAC TTT CAT AAT <u>GCT</u> GG	SEQ ID NO: 7
N1-H	ATT <u>CAC</u> TTT <u>CAT</u> AAT <u>GCT</u> GG	SEQ ID NO: 8
AVI-17mero	CAC TTT CAT AAT GCT GG	SEQ ID NO: 9
AVI-17mero-B	CAC <u>TTT</u> CAT AAT <u>GCT</u> GG	SEQ ID NO: 10
AVI-17mero- C	CAC <u>TTT</u> CAT AAT <u>GCT</u> GG	SEQ ID NO: 11
AVI-17mero-D	CAC <u>TTT</u> CAT AAT <u>GCT</u> GG	SEQ ID NO: 12
AVI-17mero-E	<u>CAC</u> <u>TTT</u> CAT AAT <u>GCT</u> GG	SEQ ID NO: 13
AVI-17mero-F	<u>CAC</u> <u>TTT</u> CAT AAT <u>GCT</u> GG	SEQ ID NO: 14
AVI-17mero-G	<u>CAC</u> <u>TTT</u> CAT AAT <u>GCT</u> GG	SEQ ID NO: 15
AVI-17mero-H	<u>CAC</u> <u>TTT</u> CAT AAT <u>GCT</u> GG	SEQ ID NO: 16
AVI-17mero-I	CAC TTT CAT AAT <u>GCT</u> GG	SEQ ID NO: 17
AVI-17mero-J	<u>CAC</u> <u>TTT</u> CAT AAT <u>GCT</u> GG	SEQ ID NO: 18
14mero	TTT CAT AAT GCT GG	SEQ ID NO: 19
14mero-B	<u>TTT</u> CAT AAT <u>GCT</u> GG	SEQ ID NO: 20
14mero-APN	<u>TTT</u> CAT AAT <u>GCT</u> GG	SEQ ID NO: 21
14mero-C	<u>TTT</u> CAT AAT <u>GCT</u> GG	SEQ ID NO: 22
14mero-D	<u>TTT</u> <u>CAT</u> AAT <u>GCT</u> GG	SEQ ID NO: 23
14mero-E	<u>TTT</u> <u>CAT</u> AAT <u>GCT</u> GG	SEQ ID NO: 24
14mero-F	TTT <u>CAT</u> AAT <u>GCT</u> GG	SEQ ID NO: 25
3UP11	AAT GCT GGC AG	SEQ ID NO: 26
11mero-APN	AAT GCT GGC AG	SEQ ID NO: 27
11mero-B	AAT <u>GCT</u> GGC <u>AG</u>	SEQ ID NO: 28
11mero-C	AAT <u>GCT</u> GGC <u>AG</u>	SEQ ID NO: 29
11mero- D	AAT <u>GCT</u> GGC <u>AG</u>	SEQ ID NO: 30
11mero-E	AAT <u>GCT</u> GGC <u>AG</u>	SEQ ID NO: 31
11mero-F	<u>AAT</u> <u>GCT</u> GGC <u>AG</u>	SEQ ID NO: 32
3UP8	GCT GGC AG	SEQ ID NO: 33
8mero-APN	GCT GGC AG	SEQ ID NO: 34
8mero-B	<u>GCT</u> GGC <u>AG</u>	SEQ ID NO: 35
8mero- C	GCT <u>GGC</u> AG	SEQ ID NO: 36
8mero-D	GCT <u>GGC</u> AG	SEQ ID NO: 37
8mero-E	<u>GCT</u> <u>GGC</u> <u>AG</u>	SEQ ID NO: 38
8mero-F	<u>GCT</u> <u>GGC</u> <u>AG</u>	SEQ ID NO: 39

ES 2 727 481 T3

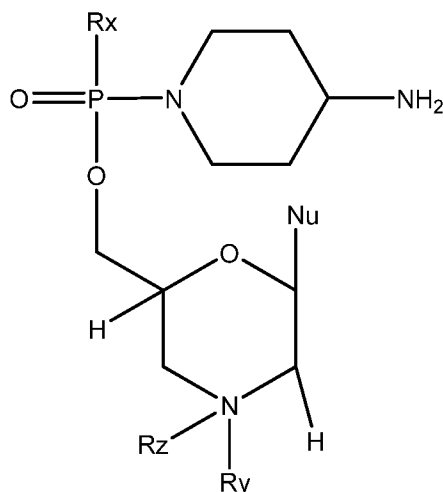
(continuación)

Secuencias modificadas por PMO y APN para oligonucleótidos dirigidos a AME. Las posiciones modificadas de APN se identifican en rojo en negrita y subrayadas.

Nombre de muestra	Secuencia	Identificador de secuencia
8mero-G	GCT GGC AG	SEQ ID NO: 40
8mero-H	GCT GGC AG	SEQ ID NO: 41
E8/4a	C TAG TAT TTC CTG CAA ATG AG	SEQ ID NO: 42
E8/4a-APN	C TAG TAT TTC CTG CAA ATG AG	SEQ ID NO: 43
E8/4a-B	C TAG TAT TTC CTG CAA ATG AG	SEQ ID NO: 44
E8/4a-C	C TAG TAT TTC CTG CAA ATG AG	SEQ ID NO: 45
E8/4a-D	C TAG TAT TTC CTG CAA ATG AG	SEQ ID NO: 46
E8/4a-E	C TAG TAT TTC CTG CAA ATG AG	SEQ ID NO: 47
E8/4a-F	C TAG TAT TTC CTG CAA ATG AG	SEQ ID NO: 48
E8/4a-G	C TAG TAT TTC CTG CAA ATG AG	SEQ ID NO: 49
E8/4a-H	C TAG TAT TTC CTG CAA ATG AG	SEQ ID NO: 50
E8/4a-I	C TAG TAT TTC CTG CAA ATG AG	SEQ ID NO: 51
E8/4a-J	C TAG TAT TTC CTG CAA ATG AG	SEQ ID NO: 52
E8/4b	C CAG CAT TTC CTG CAA ATG AG	SEQ ID NO: 53
E8/4b-APN	C CAG CAT TTC CTG CAA ATG AG	SEQ ID NO: 54
E8/4b-B	C CAG CAT TTC CTG CAA ATG AG	SEQ ID NO: 55
E8/4b-C	C CAG CAT TTC CTG CAA ATG AG	SEQ ID NO: 56
E8/4b-D	C CAG CAT TTC CTG CAA ATG AG	SEQ ID NO: 57
E8/4b-E	C CAG CAT TTC CTG CAA ATG AG	SEQ ID NO: 58
E8/4b-F	C CAG CAT TTC CTG CAA ATG AG	SEQ ID NO: 59
E8/4b-G	C CAG CAT TTC CTG CAA ATG AG	SEQ ID NO: 60
E8/4b-H	C CAG CAT TTC CTG CAA ATG AG	SEQ ID NO: 61
E8/3	A TGC CAG CAT TTC CTG CAA ATG AGA	SEQ ID NO: 62
E8/3-B	A TGC CAG CAT TTC CTG CAA ATG AGA	SEQ ID NO: 63
E8/3-C	A TGC CAG CAT TTC CTG CAA ATG AGA	SEQ ID NO: 64
E8/3-D	A TGC CAG CAT TTC CTG CAA ATG AGA	SEQ ID NO: 65
E8/3-E	A TGC CAG CAT TTC CTG CAA ATG AGA	SEQ ID NO: 66
E8/3-F	A TGC CAG CAT TTC CTG CAA ATG AGA	SEQ ID NO: 67
E8/3-G	A TGC CAG CAT TTC CTG CAA ATG AGA	SEQ ID NO: 68
E8/3-H	A TGC CAG CAT TTC CTG CAA ATG AGA	SEQ ID NO: 69
E8/4	GCT CTA TGC CAG CAT TTC CTG CAA A	SEQ ID NO: 70
E8/4-B	GCT CTA TGC CAG CAT TTC CTG CAA A	SEQ ID NO: 71
E8/4-C	GCT CTA TGC CAG CAT TTC CTG CAA A	SEQ ID NO: 72
E8/4-D	GCT CTA TGC CAG CAT TTC CTG CAA A	SEQ ID NO: 73
E8/4-E	GCT CTA TGC CAG CAT TTC CTG CAA A	SEQ ID NO: 74
E8/4-F	GCT CTA TGC CAG CAT TTC CTG CAA A	SEQ ID NO: 75
E8/4-G	GCT CTA TGC CAG CAT TTC CTG CAA A	SEQ ID NO: 76
E8/4-H	GCT CTA TGC CAG CAT TTC CTG CAA A	SEQ ID NO: 77
E8/4-I	GCT CTA TGC CAG CAT TTC CTG CAA A	SEQ ID NO: 78
E8/4-J	GCT CTA TGC CAG CAT TTC CTG CAA A	SEQ ID NO: 79

REIVINDICACIONES

1. Un oligonucleótido antisentido para su uso en el tratamiento de una enfermedad, comprendiendo el uso aumentar el nivel de ARNm de SMN2 que contiene el exón 7 en relación al ARNm de SMN2 con delección de exón en una célula, comprendiendo además el uso poner en contacto la célula con el oligonucleótido antisentido, en donde el oligonucleótido antisentido comprende una secuencia de 14 a 21 nucleótidos, de 15 a 25 nucleótidos, o de 20 a 30 nucleótidos de longitud que específicamente hibrida con una región dentro del pre-ARNm de SMN2 seleccionado de dentro del exón 7, el intrón 7, el exón 8, o una porción del intrón 7 y el exón 8 del pre-ARNm de SMN2, en donde el oligonucleótido antisentido es un oligonucleótido de morfolino que comprende al menos un nucleótido que comprende un enlace internucleósido que está cargado positivamente a pH fisiológico, en donde el al menos un nucleótido es de la fórmula:



- 15 en donde Nu es una nucleobase;
 Rx se selecciona del grupo que consiste en HO-, un nucleótido, un resto de péptido de penetración celular, y piperazinilo;
 Ry se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, un alquilo C₁-C₆, un nucleótido, un resto peptídico, un aminoácido, un resto de formamidinilo, y acilo; y,
 20 Rz se selecciona del grupo que consiste en nada, hidrógeno, un alquilo C_rC₆, y acilo; y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, en donde la secuencia se selecciona de:

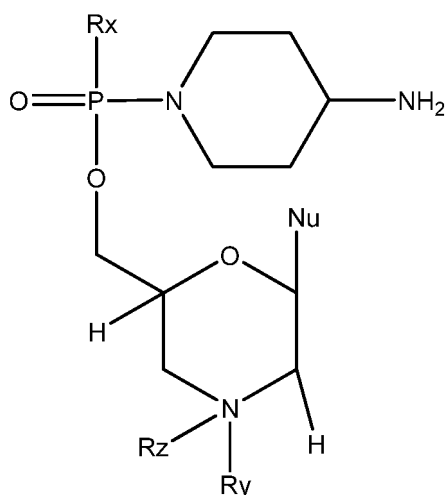
- 25 ATT CAC TTT CAT AAT GCT GG;
 ATT CAC TTT CAT AAT GCT GG;
 ATT CAC TTT CAT AAT GCT GG;
 ATT CAC TTT CAT AAT GCT GG;
 ATT CAC TTT CAT AAT GCT GG;
 ATT CAC TTT CAT AAT GCT GG;
 ATT CAC TTT CAT AAT GCT GG;
 30 CAC TTT CAT AAT GCT GG;
 CAC TTT CAT AAT GCT GG;
 CAC TTT CAT AAT GCT GG;
 CAC TTT CAT AAT GCT GG;
 CAC TTT CAT AAT GCT GG;
 CAC TTT CAT AAT GCT GG;
 CAC TTT CAT AAT GCT GG;
 CAC TTT CAT AAT GCT GG;
 CAC TTT CAT AAT GCT GG;
 35 CAC TTT CAT AAT GCT GG;
 TTT CAT AAT GCT GG;
 TTT CAT AAT GCT GG;
 TTT CAT AAT GCT GG;
 TTT CAT AAT GCT GG;
 TTT CAT AAT GCT GG;
 40 TTT CAT AAT GCT GG;
 TTT CAT AAT GCT GG;
 TTT CAT AAT GCT GG;
 TTT CAT AAT GCT GG;
 TTT CAT AAT GCT GG;
 45 C TAG TAT TTC CTG CAA ATG AG;
 C TAG TAT TTC CTG CAA ATG AG;
 C TAG TAT TTC CTG CAA ATG AG;
 C TAG TAT TTC CTG CAA ATG AG;

5 C TAG TAT TTC CTG CAA ATG AG;
 C TAG TAT TTC CTG CAA ATG AG;
 C TAG TAT TTC CTG CAA ATG AG;
 C TAG TAT TTC CTG CAA ATG AG;
 C TAG TAT TTC CTG CAA ATG AG;
 C TAG TAT TTC CTG CAA ATG AG;
 C TAG TAT TTC CTG CAA ATG AG;
 C TAG TAT TTC CTG CAA ATG AG;
 C TAG TAT TTC CTG CAA ATG AG;
 C TAG TAT TTC CTG CAA ATG AG;
 10 C TAG TAT TTC CTG CAA ATG AG;
 C TAG TAT TTC CTG CAA ATG AG;
 C TAG TAT TTC CTG CAA ATG AG;
 C TAG TAT TTC CTG CAA ATG AG;
 C TAG TAT TTC CTG CAA ATG AG;
 C TAG TAT TTC CTG CAA ATG AG;
 C TAG TAT TTC CTG CAA ATG AG;
 C TAG TAT TTC CTG CAA ATG AG;
 15 A TGC CAG CAT TTC CTG CAA ATG AGA;
 A TGC CAG CAT TTC CTG CAA ATG AGA;
 A TGC CAG CAT TTC CTG CAA ATG AGA;
 A TGC CAG CAT TTC CTG CAA ATG AGA;
 A TGC CAG CAT TTC CTG CAA ATG AGA;
 A TGC CAG CAT TTC CTG CAA ATG AGA;
 A TGC CAG CAT TTC CTG CAA ATG AGA;
 A TGC CAG CAT TTC CTG CAA ATG AGA;
 A TGC CAG CAT TTC CTG CAA ATG AGA;
 20 GCT CTA TGC CAG CAT TTC CTG CAA A;
 GCT CTA TGC CAG CAT TTC CTG CAA A;
 GCT CTA TGC CAG CAT TTC CTG CAA A;
 GCT CTA TGC CAG CAT TTC CTG CAA A;
 GCT CTA TGC CAG CAT TTC CTG CAA A;
 GCT CTA TGC CAG CAT TTC CTG CAA A;
 GCT CTA TGC CAG CAT TTC CTG CAA A;
 GCT CTA TGC CAG CAT TTC CTG CAA A;
 GCT CTA TGC CAG CAT TTC CTG CAA A;
 25 GCT CTA TGC CAG CAT TTC CTG CAA A;
 GCT CTA TGC CAG CAT TTC CTG CAA A;
 GCT CTA TGC CAG CAT TTC CTG CAA A;
 GCT CTA TGC CAG CAT TTC CTG CAA A;
 GCT CTA TGC CAG CAT TTC CTG CAA A;
 GCT CTA TGC CAG CAT TTC CTG CAA A;
 GCT CTA TGC CAG CAT TTC CTG CAA A;
 GCT CTA TGC CAG CAT TTC CTG CAA A;
 GCT CTA TGC CAG CAT TTC CTG CAA A;
 30 GCT CTA TGC CAG CAT TTC CTG CAA A, y
 GCT CTA TGC CAG CAT TTC CTG CAA A,

en donde A representa la nucleobase adenina, T representa la nucleobase timina, C representa la nucleobase citosina, y G representa la nucleobase guanina, y cuando la nucleobase en la secuencia está en **negrita** indica el al menos un nucleótido.

35 2. El oligonucleótido antisentido para el uso de una cualquiera de la reivindicación 1, en donde la secuencia es de 14 a 21 nucleótidos.

40 3. Un oligonucleótido antisentido que comprende una secuencia de 14 a 21 nucleótidos, de 15 a 25 nucleótidos, o de 20 a 30 nucleótidos de longitud que específicamente hibrida con una región dentro del pre-ARNm de SMN2 seleccionado de dentro del exón 7, el intrón 7, el exón 8, o una porción del intrón 7 y el exón 8 del pre-ARNm de SMN2, de modo que se aumenta el nivel de ARNm de SMN2 que contiene el exón 7 en relación al ARNm de SMN2 con delección del exón 7 en la célula, en donde el oligonucleótido antisentido es un oligonucleótido de morfolino que comprende al menos un nucleótido que comprende un enlace internucleósido que está cargado positivamente a pH fisiológico, en donde el al menos un nucleótido es de la fórmula:



en donde Nu es una nucleobase;

R_x se selecciona del grupo que consiste en HO-, un nucleótido, un resto de péptido de penetración celular, y piperazinilo;

5 R_y se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, un alquilo C₁-C₆, un nucleótido, un resto peptídico, un aminoácido, un resto de formamidinilo, y acilo; y,

R_z se selecciona del grupo que consiste en nada, hidrógeno, un alquilo C_rC₆, y acilo; y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, en donde la secuencia se selecciona de:

10 ATT CAC TTT CAT AAT GCT GG;
 ATT CAC TTT CAT AAT GCT GG;
 ATT CAC TTT CAT AAT GCT GG;
 ATT CAC TTT CAT AAT GCT GG;
 ATT CAC TTT CAT AAT GCT GG;
 15 ATT CAC TTT CAT AAT GCT GG;
 ATT CAC TTT CAT AAT GCT GG;
 CAC TTT CAT AAT GCT GG;
 CAC TTT CAT AAT GCT GG;
 CAC TTT CAT AAT GCT GG;
 CAC TTT CAT AAT GCT GG;
 20 CAC TTT CAT AAT GCT GG;
 CAC TTT CAT AAT GCT GG;
 CAC TTT CAT AAT GCT GG;
 CAC TTT CAT AAT GCT GG;
 CAC TTT CAT AAT GCT GG;
 25 TTT CAT AAT GCT GG;
 TTT CAT AAT GCT GG;
 TTT CAT AAT GCT GG;
 TTT CAT AAT GCT GG;
 TTT CAT AAT GCT GG;
 30 TTT CAT AAT GCT GG;
 C TAG TAT TTC CTG CAA ATG AG;
 C TAG TAT TTC CTG CAA ATG AG;
 C TAG TAT TTC CTG CAA ATG AG;
 C TAG TAT TTC CTG CAA ATG AG;
 35 C TAG TAT TTC CTG CAA ATG AG;
 C TAG TAT TTC CTG CAA ATG AG;
 C TAG TAT TTC CTG CAA ATG AG;
 C TAG TAT TTC CTG CAA ATG AG;
 C TAG TAT TTC CTG CAA ATG AG;
 40 C TAG TAT TTC CTG CAA ATG AG;
 C CAG CAT TTC CTG CAA ATG AG;
 C CAG CAT TTC CTG CAA ATG AG;
 C CAG CAT TTC CTG CAA ATG AG;
 C CAG CAT TTC CTG CAA ATG AG;
 45 C CAG CAT TTC CTG CAA ATG AG;
 C CAG CAT TTC CTG CAA ATG AG;
 C CAG CAT TTC CTG CAA ATG AG;
 C CAG CAT TTC CTG CAA ATG AG;
 A TGC CAG CAT TTC CTG CAA ATG AGA;
 50 A TGC CAG CAT TTC CTG CAA ATG AGA;
 A TGC CAG CAT TTC CTG CAA ATG AGA;
 A TGC CAG CAT TTC CTG CAA ATG AGA;
 A TGC CAG CAT TTC CTG CAA ATG AGA;
 A TGC CAG CAT TTC CTG CAA ATG AGA;
 55 A TGC CAG CAT TTC CTG CAA ATG AGA;
 GCT CTA TGC CAG CAT TTC CTG CAA A;
 GCT CTA TGC CAG CAT TTC CTG CAA A;
 GCT CTA TGC CAG CAT TTC CTG CAA A;
 GCT CTA TGC CAG CAT TTC CTG CAA A;
 60 GCT CTA TGC CAG CAT TTC CTG CAA A;
 GCT CTA TGC CAG CAT TTC CTG CAA A;
 GCT CTA TGC CAG CAT TTC CTG CAA A;
 GCT CTA TGC CAG CAT TTC CTG CAA A; y
 GCT CTA TGC CAG CAT TTC CTG CAA A,
 65

en donde A representa la nucleobase adenina, T representa la nucleobase timina, C representa la nucleobase citosina, y G representa la nucleobase guanina, y cuando la nucleobase en la secuencia está en negrita indica el al menos un nucleótido.

- 5 4. El oligonucleótido antisentido de la reivindicación 3, en donde la secuencia es complementaria a una región diana dentro del intrón 7 del pre-ARNm de SMN2.
5. El oligonucleótido antisentido de la reivindicación 3, en donde la secuencia es complementaria a una porción del intrón 7 y el exón 8 del pre-ARNm de SMN2.
- 10 6. El oligonucleótido antisentido de la reivindicación 3, en donde la secuencia es de 14 a 21 nucleótidos.
7. El oligonucleótido antisentido de la reivindicación 3, en donde el oligonucleótido antisentido comprende además un resto peptídico que aumenta la absorción celular.
- 15 8. El oligonucleótido antisentido de la reivindicación 7, en donde el péptido es un péptido rico en arginina.
9. Un oligonucleótido antisentido según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8 para su uso en el tratamiento de la atrofia muscular espinal (AME) en un paciente.
- 20

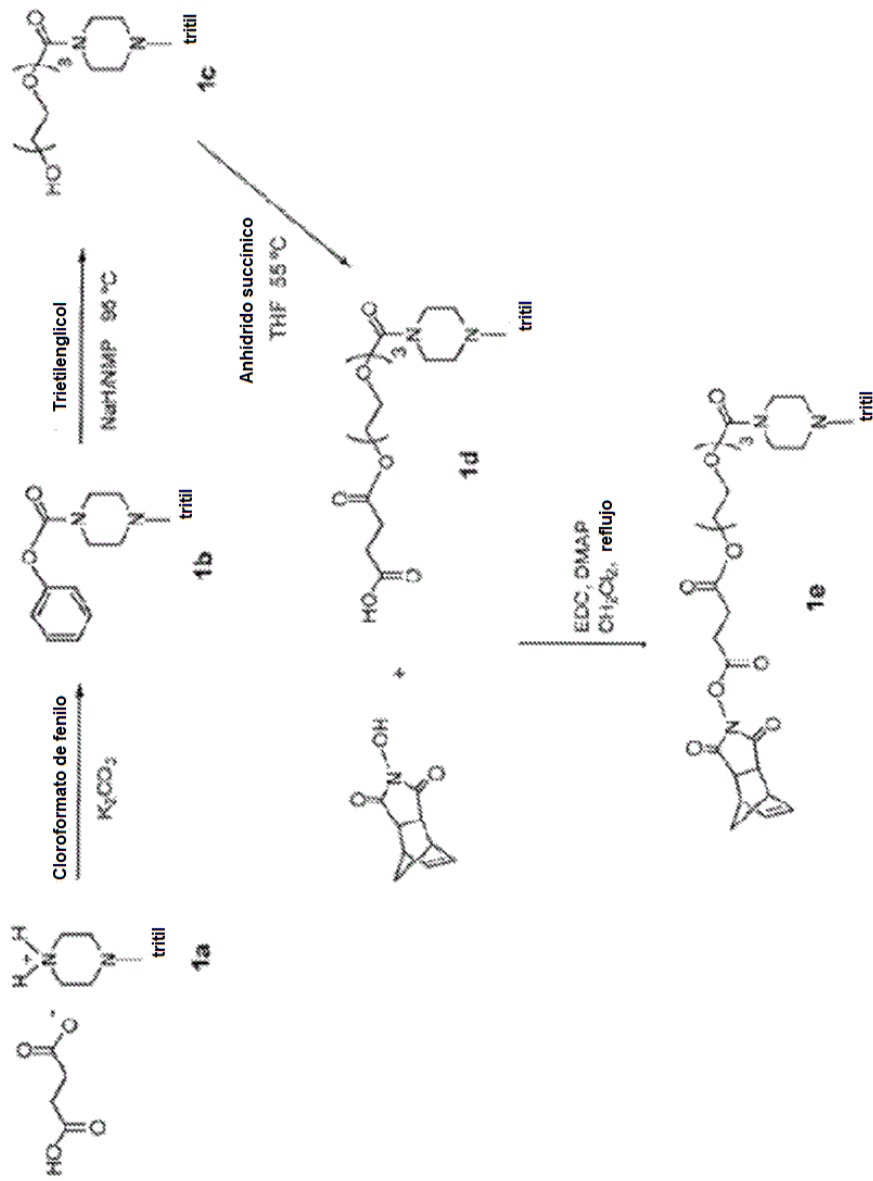


FIGURA 1

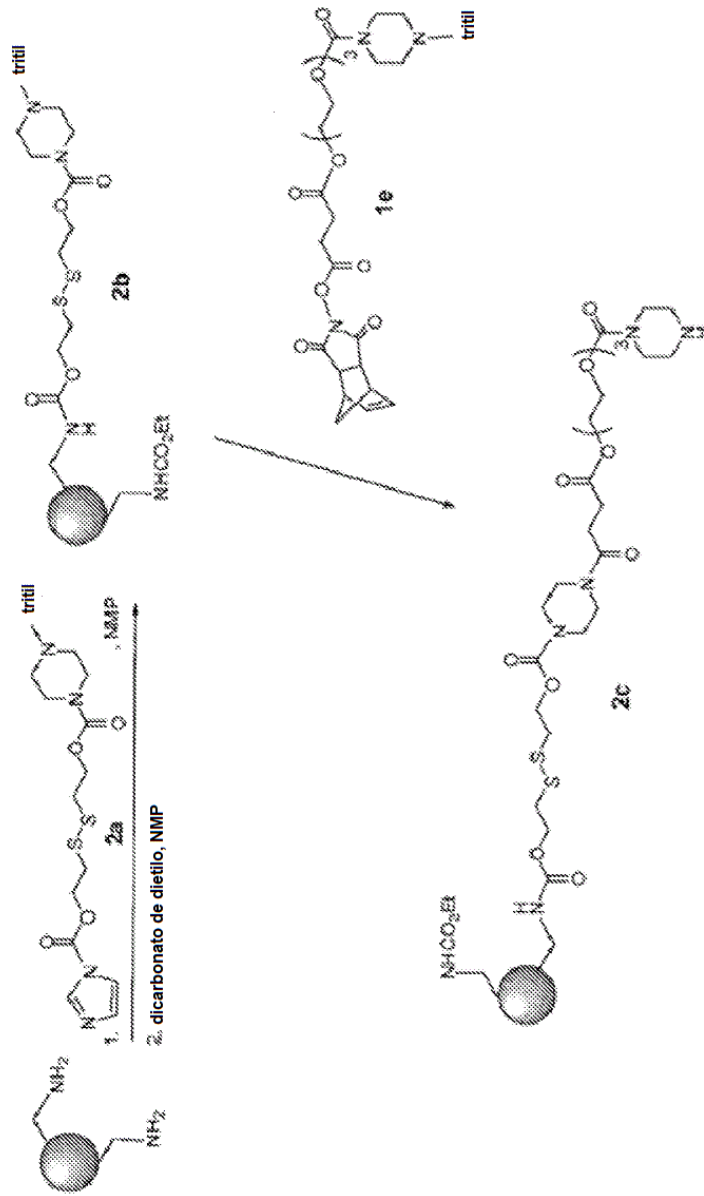


FIGURA 2

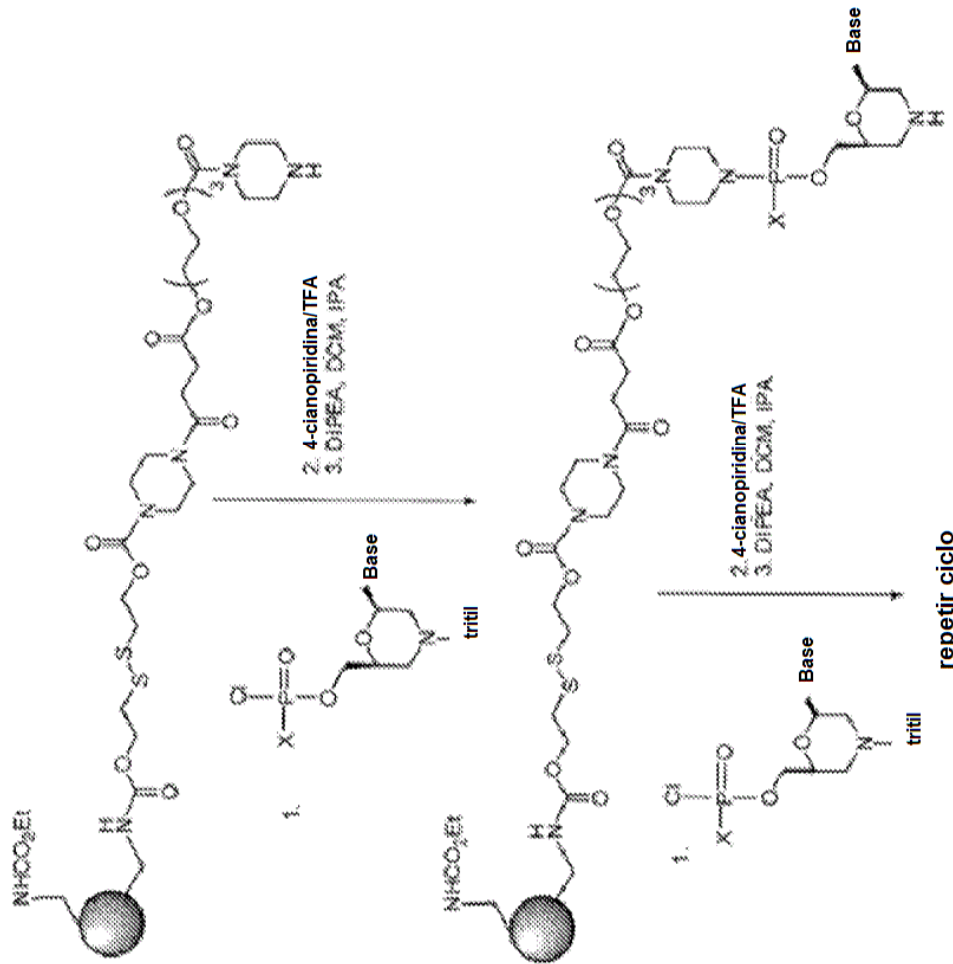


FIGURA 3

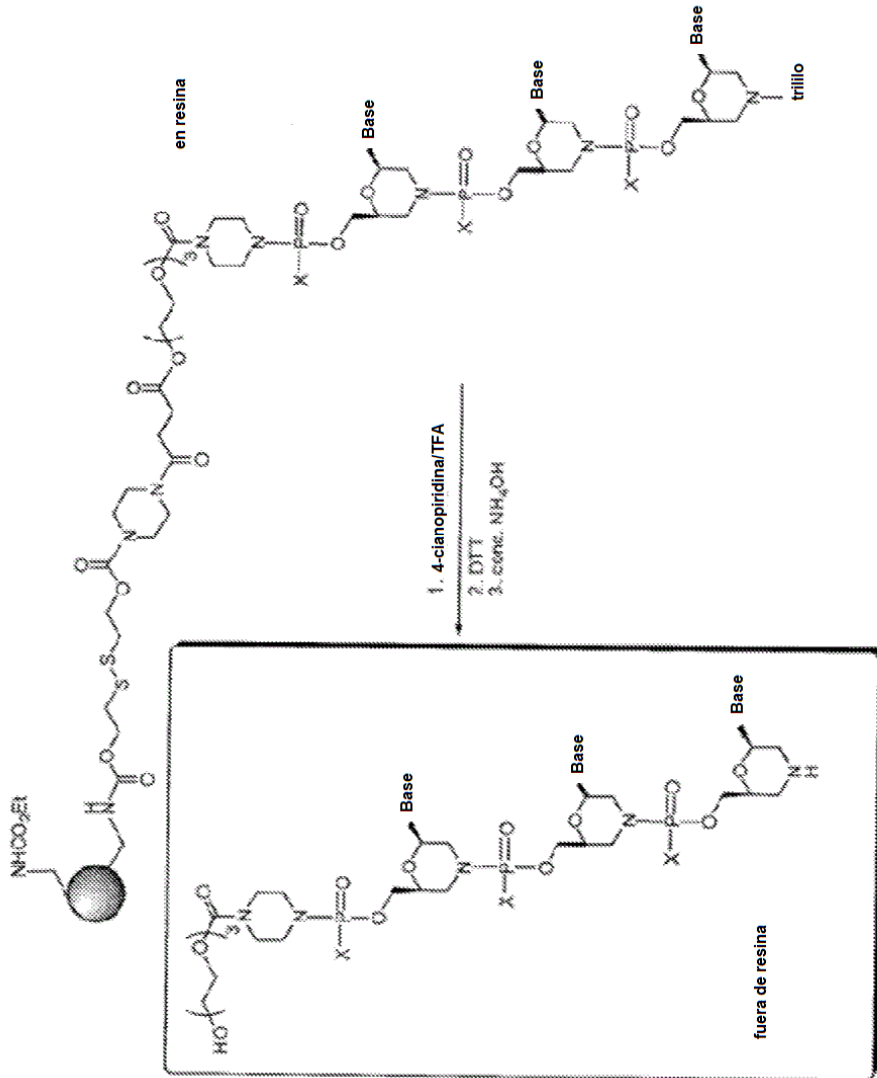


FIGURA 4

Secuencias ensayadas

Nombre Secuencia	Secuencia (orientación 5' a 3')	Identificadores de secuencia
N1	A TTC ACT TTC ATAATG CTG G	SEQ ID NO:1
14mero	T TTC ATAATG CTG G	SEQ ID NO:19
14mero-APN	T <u>T</u> TTC <u>A</u> TA <u>A</u> T <u>G</u> CT <u>G</u> G	SEQ ID NO:21
E8/4a	C TAG TAT TTC CTG CAAATG AG	SEQ ID NO:42
E8/4a-APN	C <u>T</u> AG <u>T</u> AT TTC <u>C</u> TG CAA <u>A</u> T <u>G</u> AG	SEQ ID NO:43
E8/4b	C CAG CAT TTC CTG CAAATG AG	SEQ ID NO:53
E8/4b-APN	C CAG CA <u>T</u> <u>T</u> T <u>C</u> <u>C</u> TG CAA <u>A</u> T <u>G</u> AG	SEQ ID NO:54

Figura 5

Modificación de oligonucleótido APN aumenta la inclusión de exón 7 en SMN2

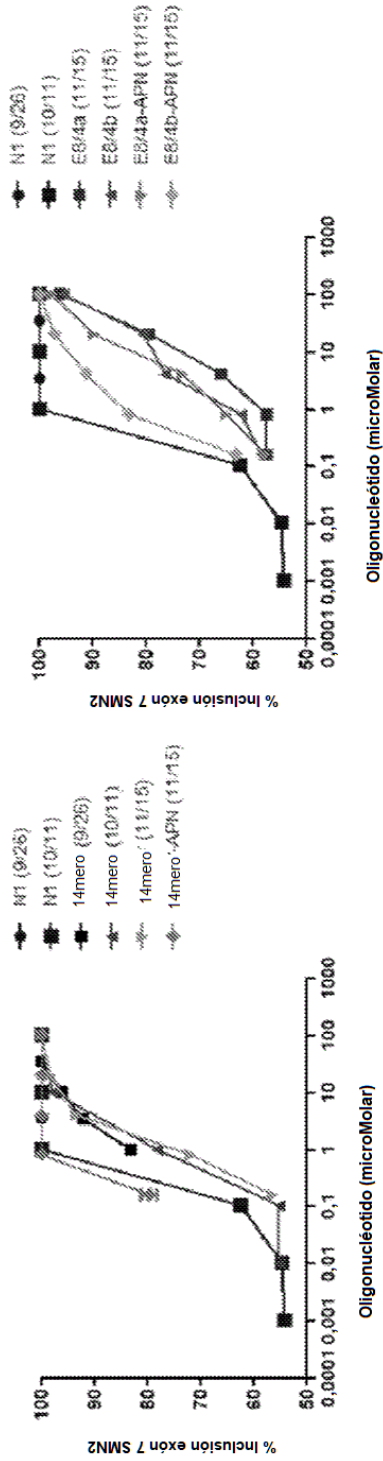


Figura 6

Gel representativo de Nucleofección con oligonucleótidos dirigidos a SMN2



Figura 7

Productos de banda de gel de SMN2 esperados

Codón de parada de SMN2 está localizado cerca del extremo del exón 7

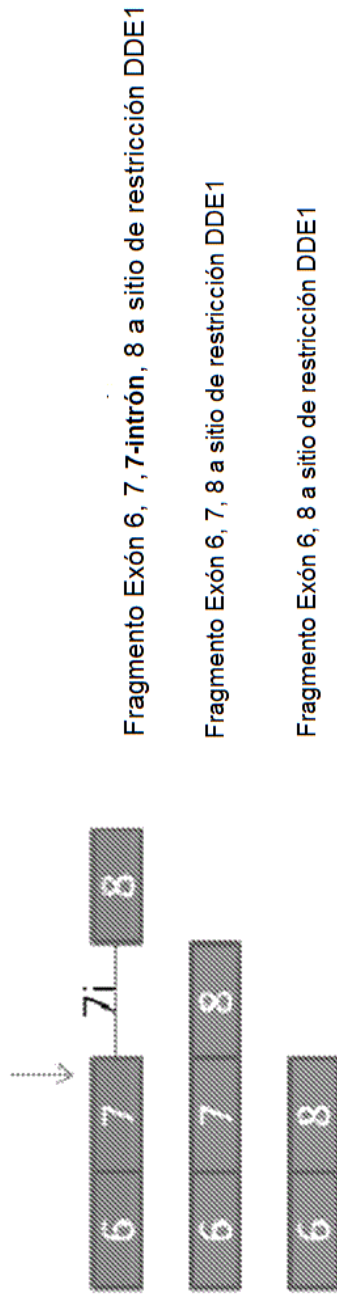


Figura 8

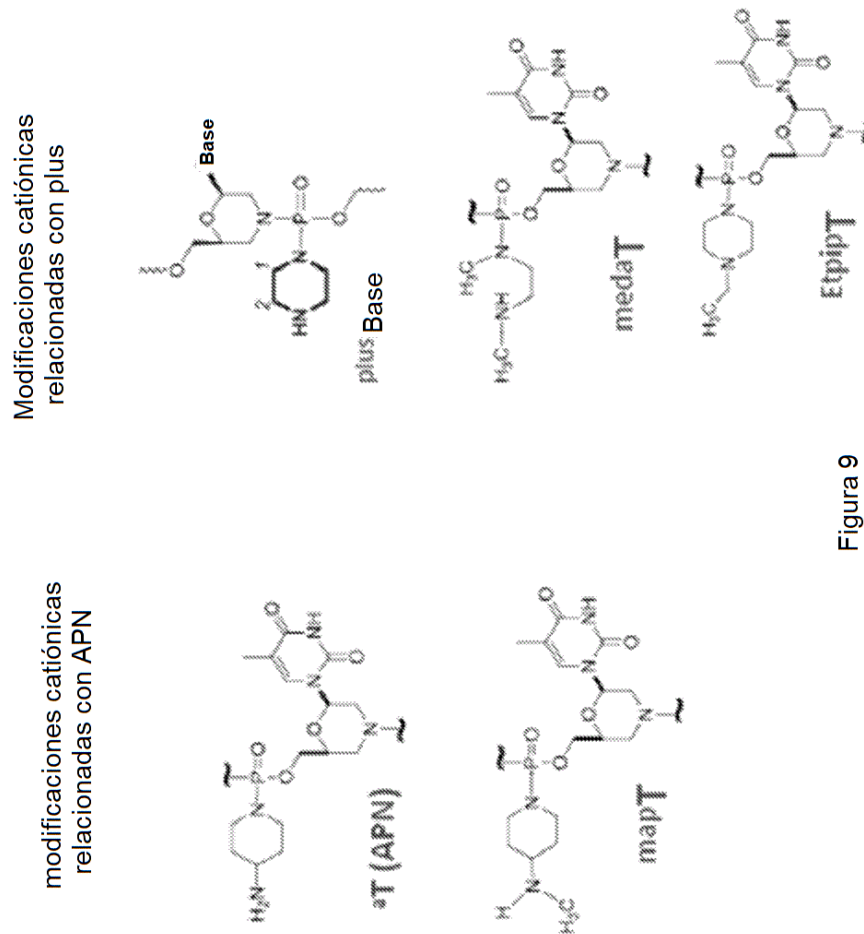


Figura 9