

OLIGONUCLEÓTIDOS ANTISENTIDO QUE ACTÚAN SOBRE ALFA-SINUCLÉINA, Y USOS DE ESTOS

REFERENCIA AL LISTADO DE SECUENCIAS PRESENTADO ELECTRÓNICAMENTE

[0001] El contenido del listado de secuencias presentado electrónicamente (nombre: 3338.109PC01_SequenceListing_ST25.txt, tamaño: 13.817 bytes; y fecha de creación: 10 de enero de 2019) con la presente solicitud se incorpora en la presente por referencia en su totalidad.

CAMPO DE LA DIVULGACIÓN

[0002] La presente divulgación se refiere a compuestos oligoméricos antisentido (ASO) que actúan sobre una unión exón/intrón del transcripto de alfa-sinucleína (SNCA) en una célula, lo que produce una expresión reducida de proteína alfa-sinucleína (SNCA). La reducción de la expresión de proteína SNCA puede ser beneficiosa para diversos trastornos médicos, tales como atrofia multisistémica, enfermedad de Parkinson, demencia asociada a la enfermedad de Parkinson (PDD), y demencia con cuerpos de Lewy.

ANTECEDENTES DE LA DIVULGACIÓN

[0003] La alfa-sinucleína (SNCA), un miembro de la familia de proteínas sinucleínas, es una proteína soluble pequeña que se expresa principalmente en los tejidos neurales. Ver Marques O *et al.*, *Cell Death Dis.* 19: e350 (2012). Si bien se expresa en varios tipos de células, se ubica principalmente en los terminales presinápticos de las neuronas. Aunque aún no se determina por completo su función exacta, se ha sugerido que la SNCA posee una función importante en la regulación de la transmisión sináptica. Por ejemplo, la SNCA funciona como una chaperona molecular en la formación de complejos SNARE, que median el acoplamiento de vesículas sinápticas con las membranas presinápticas de las neuronas. SNCA también interactúa con otras proteínas como la proteína tau asociada a microtúbulos, que ayuda a estabilizar los microtúbulos y regular el tráfico vesicular.

[0004] Debido a la función de SNCA en la regulación de la transmisión sináptica, las alteraciones en la expresión y/o función de SNCA pueden interferir en procesos biológicos críticos. Se creía que tales interrupciones contribuían a las α -sinucleinopatías, que son enfermedades neurodegenerativas caracterizadas por una acumulación anómala de agregados de proteína SNCA en el cerebro. En consecuencia, las inclusiones insolubles de proteína SNCA plegada de manera incorrecta, agregada y

fosforilada son un rasgo patológico de enfermedades tales como enfermedad de Parkinson (PD), demencia asociada a la enfermedad de Parkinson (PDD), demencia con cuerpos de Lewy (DLB) y atrofia multisistémica (MSA). Ver Galvin JE *et al.*, *Archives of Neurology* 58: 186-190 (2001); y Valera E *et al.*, *J Neurochem* 139 suplemento 1: 346-352 (octubre de 2016).

[0005] Las α -sinucleinopatías, tales como enfermedad de Parkinson, son trastornos cerebrales neurodegenerativos progresivos altamente prevalentes, especialmente en personas mayores. Ver Recchia A *et al.*, *FASEB J.* 18: 617-26 (2004). Se estima que alrededor de 7 a 10 millones de personas en el mundo tienen trastornos de este tipo, con alrededor de 60.000 casos nuevos por año en Estados Unidos. Los costos de medicación para cada persona pueden exceder con facilidad los USD 2.500 al año, y la cirugía terapéutica puede costar hasta USD 100.000 por paciente. Por lo tanto, son necesarias opciones de tratamiento más consistentes y rentables.

BREVE SÍNTESIS DE LA DIVULGACIÓN

[0006] La presente divulgación se refiere a un oligonucleótido antisentido (ASO) que comprende una secuencia de nucleótidos contiguos de 10 a 30 nucleótidos de longitud que son complementarios a una secuencia de ácido nucleico dentro de un transcripto de alfa-sinucleína (SNCA), en donde la secuencia de ácido nucleico comprende los nucleótidos 7592-7637 de SEQ ID NO: 1. En algunas formas de realización, la secuencia de ácido nucleico comprende los nucleótidos 7602-7627 de SEQ ID NO: 1. En otras formas de realización, la secuencia de ácido nucleico corresponde a los nucleótidos 7603-7620 de SEQ ID NO: 1. En algunas formas de realización, la secuencia de ácido nucleico corresponde a los nucleótidos 7604-7620 de SEQ ID NO: 1. En algunas formas de realización, el transcripto de SNCA comprende SEQ ID NO: 1. En algunas formas de realización, la secuencia de nucleótidos contiguos comprende SEQ ID NO: 4 a SEQ ID NO: 21 con 1, 2, 3 o 4 errores de apareamiento. En otras formas de realización, la secuencia de nucleótidos contiguos comprende SEQ ID NO: 4 a SEQ ID NO: 21. En algunas formas de realización, la secuencia de nucleótidos contiguos comprende SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 7.

[0007] En algunas formas de realización, el oligonucleótido antisentido de la presente divulgación puede inhibir la expresión del transcripto de SNCA humana en una célula que expresa el transcripto de SNCA humana.

[0008] En algunas formas de realización, la secuencia de nucleótidos contiguos comprende al menos un análogo de nucleótido. En algunas formas de realización, el oligonucleótido antisentido es un *gapmer*. En otras formas de realización, el

oligonucleótido antisentido es un *gapmer* de flanqueo alterno.

[0009] En algunas formas de realización, el oligonucleótido antisentido divulgado en la presente comprende la Fórmula de 5'-A-B-C-3', en donde (i) la región B es una secuencia contigua de al menos 6 unidades de ADN, que pueden reclutar RNasa; (ii) la región A es una secuencia de la primera sección de 1 a 10 nucleótidos, en donde la secuencia de la primera sección comprende uno o más análogos de nucleótidos y, opcionalmente, una o más unidades de ADN, y en donde al menos uno de los análogos de nucleótidos se ubica en el extremo 3' de A; y (iii) la región C es una secuencia de la segunda sección de 1 a 10 nucleótidos, en donde la secuencia de la segunda sección comprende uno o más análogos de nucleótidos y, opcionalmente, una o más unidades de ADN, y en donde al menos uno de los análogos de nucleótidos se ubica en el extremo 5' de C.

[0010] En algunas formas de realización, la región A comprende una combinación de análogos de nucleótidos y una unidad de ADN seleccionados de (i) 1-10 análogos de nucleótidos y 0 unidades de ADN; (ii) 1-9 análogos de nucleótidos y 1 unidad de ADN; (iii) 1-8 análogos de nucleótidos y 1-2 unidades de ADN; (iv) 1-7 análogos de nucleótidos y 1-3 unidades de ADN; (v) 1-6 análogos de nucleótidos y 1-4 unidades de ADN; (vi) 1-5 análogos de nucleótidos y 1-5 unidades de ADN; (vii) 1-4 análogos de nucleótidos y 1-6 unidades de ADN; (viii) 1-3 análogos de nucleótidos y 1-7 unidades de ADN; (ix) 1-2 análogos de nucleótidos y 1-8 unidades de ADN; y (x) 1 análogo de nucleótido y 1-9 unidades de ADN. En algunas formas de realización, la región C comprende una combinación de análogos de nucleótidos y una unidad de ADN seleccionados de (i) 1-10 análogos de nucleótidos y 0 unidades de ADN; (ii) 1-9 análogos de nucleótidos y 1 unidad de ADN; (iii) 1-8 análogos de nucleótidos y 1-2 unidades de ADN; (iv) 1-7 análogos de nucleótidos y 1-3 unidades de ADN; (v) 1-6 análogos de nucleótidos y 1-4 unidades de ADN; (vi) 1-5 análogos de nucleótidos y 1-5 unidades de ADN; (vii) 1-4 análogos de nucleótidos y 1-6 unidades de ADN; (viii) 1-3 análogos de nucleótidos y 1-7 unidades de ADN; (ix) 1-2 análogos de nucleótidos y 1-8 unidades de ADN; y (x) 1 análogo de nucleótido y 1-9 unidades de ADN. En algunas formas de realización, la región A es un diseño de primera sección seleccionado de cualquier ASO en las Figuras 2 y 3, y/o la región C es un diseño de segunda sección seleccionado de cualquier ASO en las Figuras 2 y 3, en donde la letra mayúscula es un análogo de nucleósido, y la letra minúscula es un ADN.

[0011] En algunas formas de realización, el oligonucleótido antisentido de la presente divulgación comprende al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al

menos 7, al menos 8, al menos 9, o al menos 10 análogos de nucleótidos. En algunas formas de realización, el análogo o los análogos de nucleótidos son uno o más nucleósidos con azúcar modificado seleccionados del grupo que consiste en ácido nucleico bloqueado (LNA); 2'-O-alquil-ARN; 2'-amino-ADN; 2'-fluoro-ADN; ácido arabino-nucleico (ANA); 2'-fluoro-ANA, ácido hexitol-nucleico (HNA), ácido nucleico intercalado (INA), nucleósido de etilo restringido (cEt), ácido nucleico de 2'-O-metilo (2'-OMe), ácido nucleico de 2'-O-metoxietilo (2'-MOE) y cualquier combinación de estos. En algunas formas de realización, el análogo o los análogos de nucleótidos comprenden un azúcar bicíclico. En algunas formas de realización, el azúcar bicíclico comprende cEt, 2'-O-metoxietilo restringido en 2',4' (cMOE), LNA, α -L-LNA, β -D-LNA, ácidos nucleicos unidos con puentes de 2'-O,4'-C-etileno (ENA), amino-LNA, oxi-LNA o tio-LNA. En algunas formas de realización, el análogo o los análogos de nucleótidos comprenden un LNA.

[0012] En algunas formas de realización, el oligonucleótido antisentido comprende una o más nucleobases de 5' metil citosina. En algunas formas de realización, el oligonucleótido antisentido comprende dos a cinco LNA en la región 5' del oligonucleótido antisentido. En algunas formas de realización, el oligonucleótido antisentido comprende dos a cinco LNA en la región 3' del oligonucleótido antisentido.

[0013] En algunas formas de realización, el oligonucleótido antisentido tiene una tolerabilidad *in vivo* menor o igual a un puntaje total de 4, en donde el puntaje total es la suma de un puntaje unitario de cinco categorías, que son 1) hiperactividad; 2) menor actividad y estimulación; 3) disfunción motriz y/o ataxia; 4) postura y respiración anormales; y 5) temblor y/o convulsiones, y en donde el puntaje unitario para cada categoría se mide en una escala de 0-4. En algunas formas de realización, la tolerabilidad *in vivo* es menor o igual al puntaje total de 3, al puntaje total de 2, al puntaje total de 1 o al puntaje total de 0.

[0014] En algunas formas de realización, el oligonucleótido antisentido reduce la expresión de mRNA de SNCA en una célula en al menos alrededor de 20 %, al menos alrededor de 30 %, al menos alrededor de 40 %, al menos alrededor de 50 %, al menos alrededor de 60 %, al menos alrededor de 70 %, al menos alrededor de 80 %, al menos alrededor de 90 % o alrededor de 100 % en comparación con una célula no expuesta al oligonucleótido antisentido. En otras formas de realización, el oligonucleótido antisentido reduce la expresión de proteína SNCA en una célula en al menos alrededor de 60 %, al menos alrededor de 70 %, al menos alrededor de 80 %, al menos alrededor de 90 % o al menos alrededor de 95 % en comparación con una célula no expuesta al

oligonucleótido antisentido.

[0015] En algunas formas de realización, el oligonucleótido antisentido comprende los nucleótidos A, T, C y G, y al menos un análogo de los nucleótidos A, T, C y G, y que tiene un puntaje de secuencia mayor o igual a 0,2, en donde el puntaje de secuencia se calcula mediante la Fórmula I:

$$\frac{\text{N.º de nucleótidos C y análogos de estos} - \text{N.º de nucleótidos G y análogos de estos}}{(\text{I})}$$

Longitud total en nucleótidos.

[0016] En algunas formas de realización, el oligonucleótido antisentido tiene de 10 a 24 nucleótidos de longitud o de 14 a 21 nucleótidos de longitud. En otras formas de realización, el oligonucleótido antisentido tiene 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o 21 nucleótidos de longitud.

[0017] En algunas formas de realización, la secuencia de nucleótidos del oligonucleótido antisentido comprende, consiste esencialmente en, o consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 4 a 21 con un diseño seleccionado del grupo que consiste en los diseños en las Figuras 2 y 3, en donde la letra mayúscula es nucleósido con azúcar modificado y la letra minúscula es ADN. En algunas formas de realización, la secuencia de nucleótidos comprende, consiste esencialmente en, o consiste en SEQ ID NO: 15 con el diseño de ASO-005459 y SEQ ID NO: 7 con el diseño de ASO-005578 o ASO-005584. En otras formas de realización, la secuencia de nucleótidos comprende, consiste esencialmente en, o consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 4-21 con la correspondiente estructura química en las Figuras 2 y 3. En algunas formas de realización, la secuencia de nucleótidos comprende, consiste esencialmente en, o consiste en ASO-005459, ASO-005578 y ASO-005584. En algunas formas de realización, el ASO de la presente divulgación comprende una fórmula molecular de $C_{171}H_{214}N_{56}O_{90}P_{16}S_{16}$. En algunas formas de realización, el ASO comprende una fórmula molecular de $C_{182}H_{229}N_{58}O_{96}P_{17}S_{17}$. En otras formas de realización, el ASO comprende una fórmula molecular de $C_{181}H_{227}N_{58}O_{96}P_{17}S_{17}$.

[0018] En algunas formas de realización, el oligonucleótido antisentido de la presente divulgación comprende un enlace internucleósido seleccionado de: un enlace de fosfodiéster, un enlace de fosfotriéster, un enlace de metilfosfonato, un enlace de fosforamidato, un enlace de fosforotioato y combinaciones de estos. En algunas formas de realización, el enlace internucleósido comprende uno o más enlaces de fosfato modificado estereodefinidos.

[0019] La presente divulgación también proporciona un conjugado que comprende el oligonucleótido antisentido divulgado en la presente, en donde el oligonucleótido antisentido se une de manera covalente a al menos una porción no nucleótido o no polinucleótido. En algunas formas de realización, la porción no nucleótido o no polinucleótido comprende una proteína, una cadena de ácidos grasos, un residuo de azúcar, una glucoproteína, un polímero o cualquier combinación de estos.

[0020] En la presente también se proporciona una composición farmacéutica que comprende el oligonucleótido antisentido o el conjugado divulgados en la presente y un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico. En algunas formas de realización, la composición también comprende un agente terapéutico. En algunas formas de realización, el agente terapéutico es un antagonista de alfa-sinucleína. En algunas formas de realización, el antagonista de alfa-sinucleína es un anticuerpo anti-alfa-sinucleína o fragmento de este.

[0021] La presente divulgación también proporciona un kit que comprende el oligonucleótido antisentido, el conjugado o la composición divulgados en la presente. También se divulga un kit de diagnóstico que comprende el oligonucleótido antisentido, el conjugado o la composición de la presente divulgación.

[0022] La presente divulgación también se refiere un método para inhibir o reducir la expresión de proteína SNCA en una célula, en donde el método comprende administrar el oligonucleótido antisentido, el conjugado o la composición divulgados en la presente a la célula que expresa proteína SNCA, en donde la expresión de proteína SNCA en la célula se inhibe o reduce después de la administración. En algunas formas de realización, el oligonucleótido antisentido inhibe o reduce la expresión de mRNA de SNCA en la célula después de la administración. En algunas formas de realización, la expresión de mRNA de SNCA se reduce en al menos alrededor de 20 %, al menos alrededor de 30 %, al menos alrededor de 40 %, al menos alrededor de 50 %, al menos alrededor de 60 %, al menos alrededor de 70 %, al menos alrededor de 80 %, al menos alrededor de 90 % o alrededor de 100 % después de la administración en comparación con una célula no expuesta al oligonucleótido antisentido. En otras formas de realización, el oligonucleótido antisentido reduce la expresión de proteína SNCA en la célula después de la administración en al menos alrededor de 60 %, al menos alrededor de 70 %, al menos alrededor de 80 %, o al menos alrededor de 90 % en comparación con una célula no expuesta al oligonucleótido antisentido. En algunas formas de realización, la célula es una neurona.

[0023] En la presente se proporciona un método para tratar una sinucleinopatía en un

sujeto que lo necesita, en donde el método comprende administrar una cantidad eficaz del oligonucleótido antisentido, el conjugado o la composición de la presente divulgación. En algunas formas de realización, la sinucleinopatía se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Parkinson, demencia asociada a la enfermedad de Parkinson (PDD), atrofia multisistémica, demencia con cuerpos de Lewy, y cualquier combinación de estas.

[0024] En la presente también se proporciona un uso del oligonucleótido antisentido, el conjugado o la composición de la presente divulgación para la fabricación de un medicamento. La presente divulgación también proporciona el uso del oligonucleótido antisentido, el conjugado o la composición para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una sinucleinopatía en un sujeto que lo necesita. En algunas formas de realización, el oligonucleótido antisentido, el conjugado o la composición de la presente divulgación son para usar en el tratamiento de una sinucleinopatía en un sujeto que lo necesita. En otras formas de realización, el oligonucleótido antisentido, el conjugado o la composición de la presente divulgación son para usar en un tratamiento.

[0025] En algunas formas de realización, el sujeto es un ser humano. En algunas formas de realización, el oligonucleótido antisentido, el conjugado, o la composición se administra por vía oral, parenteral, intratecal, intracerebroventricular, pulmonar, tópica o intraventricular.

[0026] En algunas formas de realización, el análogo de nucleótido comprende un nucleósido con azúcar modificado. En algunas formas de realización, el nucleósido con azúcar modificado es un nucleósido con azúcar modificado que mejora la afinidad.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0027] Las Figuras 1A, 1B y 1C muestran secuencias genómicas de alfa-sinucleína (parciales), de mRNA y de proteína. La secuencia en la Figura 1A representa una secuencia genómica de SNCA parcial (es decir, residuos 6001 a 8400 de SEQ ID NO: 1). SEQ ID NO: 1 es idéntica a una secuencia de pre-mRNA de SNCA excepto que el nucleótido "t" en SEQ ID NO: 1 se muestra como "u" en el pre-mRNA. SEQ ID NO: 2, en la Figura 1B representa una secuencia de mRNA de SNCA excepto que el nucleótido "t" en SEQ ID NO: 2 se muestra como "u" en el mRNA. La Figura 1C muestra una secuencia de proteína SNCA (SEQ ID NO: 3).

[0028] La Figura 2 muestra ASO de ejemplo que actúan sobre la unión exón/intrón del pre-mRNA de SNCA. Cada columna de la Figura 2 muestra el número de ID de secuencia (SEQ ID No.) diseñado solo para la secuencia, las posiciones diana iniciales y finales en la secuencia de pre-mRNA de SNCA, las posiciones diana iniciales y finales

en la secuencia de mRNA de SNCA, el número de diseño (DES No.), la secuencia de ASO con un diseño, el número de ASO (ASO No.) y la secuencia de ASO con una estructura química.

[0029] La Figura 3 muestra ASO que actúan sobre la unión exón/intrón del pre-mRNA de SNCA con una modificación del diseño de sección de ejemplo. Cada columna de la Figura 3 muestra el número de ID de secuencia (SEQ ID No.) diseñado solo para la secuencia, las posiciones diana iniciales y finales en la secuencia de pre-mRNA de SNCA, el número de diseño (DES No.), la secuencia de ASO con un diseño, el número de ASO (ASO No.), y la secuencia de ASO con una estructura química y una modificación del diseño de sección identificadas. DES-316392, DES-316393, DES-316394 y DES-316395 muestran diversos diseños de ASO posibles para SEQ ID NO: 7. DES-287031, DES-287957, DES-287959, DES-287962, DES-288906 y DES-313413 muestran diversos diseños de ASO posibles para SEQ ID NO: 12. DES-319536, DES-319537, DES-325058, DES-325059, DES-325060, DES-325061, DES-325062, DES-325063, DES-325064, DES-325065, DES-325066, DES-325067, DES-325068 y DES-325069 muestran diversos diseños de ASO posibles para SEQ ID NO: 14. DES-324636, DES-324637, DES-324638, DES-324639, DES-324640, DES-324641, DES-324642, DES-324643, DES-324644, DES-324645, DES-324646 y DES-324647 muestran diversos diseños de ASO posibles para SEQ ID NO: 15. En los diseños de ASO, las letras mayúsculas indican análogos de nucleótidos (por ejemplo, LNA o 2'-O-metilo (OMe)), y las letras minúsculas indican ADN. Las letras mayúsculas con o sin subrayado indican que las dos letras pueden ser diferentes análogos de nucleótidos, por ejemplo, LNA y 2'-O-metilo. Por ejemplo, las letras mayúsculas subrayadas pueden ser 2'-O-metilo, mientras que las letras mayúsculas sin subrayado son LNA. En los ASO con columna de estructura química, OMe es nucleótido 2'-O-metilo, L es LNA, D es ADN, y los números seguidos por L o D se refieren a los números de LNA o ADN.

[0030] La Figura 4 muestra el porcentaje de reducción de expresión de proteína SNCA en una línea celular de neuroblastoma humano SK-N-BE(2) ("células SK") y en neuronas primarias aisladas de ratones transgénicos A53T-PAC ("neuronas PAC") luego del cultivo *in vitro* con diversos ASO, según se describe en el Ejemplo 2A para las neuronas PAC y el Ejemplo 2E para células SK. En las células SK, las células se trataron con 25 μ M de ASO, y la expresión de mRNA de SNCA (normalizada a GAPDH) se muestra como un porcentaje del control. En las neuronas PAC, las células se trataron con 40 nM o 5 μ M de ASO, y la expresión de proteína SNCA (normalizada a tubulina) se muestra como porcentaje de inhibición. En los casos en que no se proporciona un valor, el ASO

en particular no se evaluó en las condiciones particulares.

[0031] La Figura 5 muestra la potencia de los diversos ASO para reducir la expresión de proteína SNCA en las neuronas primarias aisladas de ratones transgénicos A53T-PAC *in vitro*. Como se describe en el Ejemplo 2A, las neuronas PAC se cultivaron *in vitro* con una titulación de 10 puntos de los diferentes ASO, y la potencia (IC₅₀) de los ASO se muestra como una relación de SNCA con respecto a expresión de tubulina (μM).

[0032] La Figura 6 muestra el puntaje de tolerabilidad (“puntaje Tox”) y el porcentaje de reducción (o inactivación, “KD”) de la expresión de mRNA de SNCA y de proteína SNCA en ratones WT (de tipo silvestre) o transgénicos A53T-PAC tratados con ASO (ver Ejemplo 4). Se proporcionan puntajes de tolerabilidad para los días 1 (1D) y 28 (28D) después de la administración de ASO. El porcentaje de reducción en expresión de mRNA de SNCA y de proteína SNCA se muestra para los días 3 y 28 después de la administración de ASO en el hipocampo (Hippo), tronco encefálico (BS) y cuerpo estriado (Str).

[0033] Las Figuras 7A y 7B muestran el efecto de ASO-005459 en la expresión de proteínas SNCA y tubulina (Tub) en neuronas primarias aisladas de ratones transgénicos A53T-PAC. Las neuronas se trataron con una titulación de 10 puntos de ASO-005459 y cantidades de proteínas SNCA y tubulina medidas. Se muestran el porcentaje de inhibición de una relación α-Syn/Tub (Figura 7A) y los niveles de Tub (Figura 7B). Cada punto de datos representa una replicación individual.

[0034] La Figura 8 muestra el efecto de ASO-005459 en el nivel de expresión de mRNA de SNCA (círculo), proteína S (alfa) (*PROS1* (cuadrado)) y tubulina (*TUBB3* (triángulo)) en neuronas humanas. Las neuronas se trataron con diversas concentraciones de ASO-005459 durante 6 días, y, luego, los niveles de mRNA se midieron por medio de un ensayo QUANTIGENE®. El nivel de expresión de los mRNA se muestra como un porcentaje del control. Los datos mostrados representan la media ± SD a partir de determinaciones por duplicado.

[0035] La Figura 9 muestra los niveles de expresión de mRNA de SNCA en el hipocampo de ratones A53T-PAC 3 días después de la administración ICV de 100 μg de ASO-005459 (cuadrado abierto) o vehículo de control (círculo cerrado). Los niveles de expresión de mRNA de SNCA se midieron mediante qRT-PCR, normalizada a GAPDH mRNA, y luego se expresaron con respecto al nivel de expresión media del grupo de vehículo. La línea horizontal indica el valor de referencia de 1 (es decir, el valor en el que la expresión de mRNA de SNCA sería equivalente al nivel de expresión observado en el grupo de control de vehículo). Los datos mostrados representan la

media $\pm$ SD a partir de determinación por duplicado. Las estadísticas mostradas se basan en ANOVA de un factor con posterior prueba de Dunnett. *** $p < 0,001$.

[0036] Las Figuras 10A y 10B muestran una comparación del peso corporal promedio de ratones tratados con ASO-005459. En la Figura 10A, los ratones A53T-PAC recibieron dosis de 3,13 μ g, 12,5 μ g, 25 μ g o 50 μ g de ASO-005459, y su peso corporal se midió en 0, 1 y 2 semanas después del tratamiento. En la Figura 10B, los ratones C57BL/6 recibieron dosis de 100 μ g de ASO-005459, y el peso corporal de los animales se midió una vez por semana durante 28 días. En las Figuras 10A y 10B, los animales que recibieron control de vehículo se usaron como controles. Los datos mostrados representan la media $\pm$ SD de múltiples animales ($n = 5$). Las estadísticas mostradas se basan en ANOVA de dos factores.

[0037] Las Figuras 11A, 11B y 11C muestran los niveles de expresión de mRNA de SNCA en el hipocampo (Figura 11A), tronco encefálico (Figura 11B) y cuerpo estriado (Figura 11C) de ratones A53T-PAC 14 días después de la administración ICV de ASO-005459 (3,13 μ g, 12,5 μ g, 25 μ g o 50 μ g) o el control de vehículo. Los niveles de mRNA de SNCA se midieron mediante qRT-PCR, normalizada a GAPDH mRNA, y luego se expresaron con respecto a la media del grupo de vehículo. Los datos mostrados representan media $\pm$ SD de múltiples animales ($n = 5$). Cada círculo representa un animal individual. La línea horizontal indica el valor de referencia de 1 (es decir, el valor en el que la expresión de mRNA de SNCA sería equivalente al nivel de expresión observado en el grupo de control de vehículo). Las estadísticas mostradas se basan en ANOVA de un factor con posterior prueba de Dunnett. *** $p < 0,001$.

[0038] La Figura 12 muestra el nivel de ASO-005459 detectado en el hipocampo (negro), el tronco encefálico (gris claro) y el cuerpo estriado (gris oscuro) de ratones A53T-PAC 14 días después del tratamiento con ASO-005459. Los ratones recibieron 3,13 μ g, 12,5 μ g, 25 μ g o 50 μ g de ASO-005459 mediante administración ICV. Los datos mostrados representan media $\pm$ SD de múltiples animales ($n = 5$).

[0039] Las Figuras 13A, 13B, 13C y 13D muestran la relación entre los niveles de exposición a ASO-005459 y la expresión de mRNA de SNCA en el hipocampo (Figura 13A), tronco encefálico (Figura 13B) y cuerpo estriado (Figura 13C) de ratones A53T-PAC 14 días después del tratamiento con ASO-005459. La Figura 13D muestra los datos del hipocampo (círculo), tronco encefálico (cuadrado) y cuerpo estriado (triángulo) en combinación. Cada punto de datos representa un animal individual. Un ajuste no lineal de cuatro parámetros se muestra para el hipocampo (Figura 13A) y el tronco encefálico (Figura 13B).

[0040] Las Figuras 14A y 14B muestran la curva de respuesta a la dosis del efecto de ASO-005459 en el nivel de expresión de mRNA de *SNCA* en ratones A53T-PAC. Los animales recibieron (mediante inyección ICV) 12,5 µg (círculo), 25 µg (cuadro) o 50 µg (triángulo) de ASO-005459, y se sacrificaron 24 horas, 3 días, 4, 8, 12, 16 y 20 semanas después de la administración. Los niveles de expresión de mRNA de *SNCA* en el tronco encefálico (Figura 14A) y en el cuerpo estriado (Figura 14B) se evaluaron mediante qRT-PCR y luego se normalizaron al control de vehículo. Se muestra la media de los datos. La línea horizontal indica el valor de referencia de 100 % (es decir, el valor en el que la expresión de mRNA de *SNCA* sería equivalente al nivel de expresión observado en el grupo de control de vehículo).

[0041] Las Figuras 15A y 15B muestran el efecto de ASO-005459 en el nivel de expresión de mRNA de *SNCA* en ratones A53T-PAC 4 semanas después de la administración de ASO-005459. Los animales recibieron el control de vehículo o diversas concentraciones de ASO-005459 (12,5, 25 o 50 µg). El nivel de expresión de mRNA de *SNCA* relativo (normalizado al control de vehículo) se muestra para el tronco encefálico (Figura 15A) y el cuerpo estriado (Figura 15B). Cada punto de datos representa un animal individual. También se muestra la media $\pm$ SD de múltiples animales. Las estadísticas mostradas se basan en la comparación con el grupo de vehículo usando ANOVA de un factor con corrección de Dunnett para comparaciones múltiples. La línea horizontal indica el valor de referencia de 1 (es decir, el valor en el que la expresión de mRNA de *SNCA* sería equivalente al nivel de expresión observado en el grupo de control de vehículo). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

[0042] Las Figuras 16A y 16B muestran la curva de respuesta a la dosis del efecto de ASO-005459 en el nivel de expresión de proteína *SNCA* en los tejidos cerebrales de ratones A53T-PAC. Los animales recibieron (mediante inyección ICV) 12,5 µg (círculo), 25 µg (cuadro) o 50 µg (triángulo) de ASO-005459, y se sacrificaron 24 horas, 3 días, 4, 8, 12, 16 y 20 semanas después de la administración. Los niveles de proteínas *SNCA* se midieron en el tronco encefálico (Figura 16A) y en el cuerpo estriado (Figura 16B) mediante ELISA, y luego se normalizaron al control de vehículo. Se muestra la media de los datos. La línea horizontal indica el valor de referencia de 100 % (es decir, el valor en el que la expresión de mRNA de *SNCA* sería equivalente al nivel de expresión observado en el grupo de control de vehículo).

[0043] Las Figuras 17A y 17B muestran el efecto de ASO-005459 en el nivel de expresión de proteína *SNCA* en ratones A53T-PAC 8 semanas después de la administración de ASO-005459. Los animales recibieron el control de vehículo o

diversas concentraciones de ASO-005459 (12,5, 25 o 50 μ g). Los niveles de expresión de proteína SNCA relativos (normalizados al control de vehículo) se muestran para el tronco encefálico (Figura 17A) y el cuerpo estriado (Figura 17B). Cada punto de datos representa un animal individual. La línea horizontal indica el valor de referencia de 100 % (es decir, el valor en el que la expresión de mRNA de SNCA sería equivalente al nivel de expresión observado en el grupo de control de vehículo). También se muestra la media $\pm$ SD de múltiples animales. Las estadísticas mostradas se basan en la comparación con el grupo de vehículo usando ANOVA de un factor con corrección de Dunnett para comparaciones múltiples.

[0044] Las Figuras 18A y 18B muestran el efecto de ASO-005578 y ASO-005584 en el nivel de expresión de mRNA de SNCA en los tejidos cerebrales de *Macaca fascicularis*. En la Figura 18A, los animales recibieron uno de los siguientes: control de vehículo (círculo), ASO-005578 (cuadrado, 4 mg) o ASO-005584 (triángulo, 4 mg). Luego, los animales se sacrificaron 2 semanas después de la administración. En la Figura 18B, los animales recibieron el control de vehículo o ASO-005584 (8 mg por animal), y luego se sacrificaron 2 semanas (cuadrado) y 4 semanas después de la administración (triángulo). En las Figuras 18A y 18B, se evaluó el nivel de expresión de mRNA de SNCA en los siguientes tejidos: bulbo raquídeo (panel superior izquierdo), núcleo caudado y putamen (panel superior medio), protuberancia (panel superior derecho), cerebelo (panel inferior izquierdo), médula espinal lumbar (panel inferior medio) y corteza frontal (panel inferior derecho). Los niveles de expresión de mRNA de SNCA mostrados en las Figuras 18A y 18B se normalizaron a GAPDH, y luego se muestran con respecto a la media del grupo de control ("vehículo"). Se muestran los datos de los animales individuales y la media. La línea horizontal indica el valor de referencia de 100 % (es decir, el valor en el que la expresión de mRNA de SNCA sería equivalente al nivel de expresión observado en el grupo de control de vehículo).

[0045] Las Figuras 19A y 19B muestran la cinética de niveles de expresión de mRNA de SNCA y de proteína SNCA en *Macaca fascicularis* después de la administración de ASO-005459. Cada uno de los animales recibió el control de vehículo o ASO-005459 (8 mg), y luego se sacrificaron 24 horas, 3 días, 2, 4, 8, 13 o 20 semanas después de la administración. En cada punto temporal, los niveles de expresión de mRNA de SNCA (Figura 19A) y proteína SNCA (Figura 19B) se evaluaron en los siguientes tejidos: bulbo raquídeo (panel superior izquierdo), núcleo caudado y putamen (panel superior medio), protuberancia (panel superior derecho), cerebelo (panel inferior izquierdo), médula espinal lumbar (panel inferior medio) y corteza frontal (panel inferior derecho). Los

niveles de expresión se muestran como un porcentaje del control de vehículo. Se muestran los datos de los animales individuales y la media. La línea horizontal indica el valor de referencia de 100 % (es decir, el valor en el que la expresión de mRNA de SNCA sería equivalente al nivel de expresión observado en el grupo de control de vehículo).

[0046] Las Figuras 20A y 20B muestran el nivel de expresión relativo (como porcentaje del control de vehículo) para mRNA de SNCA (Figura 20A) y proteína SNCA (Figura 20B) en *Macaca fascicularis* 2 semanas después de la administración de ASO-005459. Los animales recibieron el control de vehículo o diversas concentraciones de ASO-005459 (2, 4 u 8 mg). Los niveles de expresión se evaluaron en los siguientes tejidos: bulbo raquídeo (panel superior izquierdo), núcleo caudado y putamen (panel superior medio), protuberancia (panel superior derecho), cerebelo (panel inferior izquierdo), médula espinal lumbar (panel inferior medio) y corteza frontal (panel inferior derecho). Los niveles de expresión se muestran como un porcentaje del control de vehículo. Se muestran los datos de los animales individuales y la media. La línea horizontal indica el valor de referencia de 100 % (es decir, el valor en el que la expresión de mRNA de SNCA sería equivalente al nivel de expresión observado en el grupo de control de vehículo).

[0047] La Figura 21A muestra la secuencia de nucleótidos contiguos de ASO-005459. OxyA, OxyT y Oxy MC son adenina beta D-oxi-LNA, timina beta D-oxi-LNA, y metil citosina beta D-oxi-LNA, respectivamente; DNAt, DNAc y DNAa son timina ADN, citosina ADN y adenina ADN, respectivamente; y s es un enlace de fosforotioato.

[0048] La Figura 21B muestra la estructura molecular de ASO-005459 como se divulga en la presente. La estructura proporcionada tiene una fórmula molecular de $C_{171}H_{214}N_{56}O_{90}P_{16}S_{16}$, y cada M⁺ es un contraión aceptable desde el punto de vista farmacéutico, tal como H⁺, Na⁺ o NH₄⁺.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA DIVULGACIÓN

I. Definiciones

[0049] Cabe destacar que la expresión "un" o "una" entidad se refiere a uno o más de esa entidad; por ejemplo, se entiende que "una secuencia de nucleótidos" representa una o más secuencias de nucleótidos. De este modo, las expresiones "un" (o "una"), "uno o más" y "al menos uno" se pueden usar indistintamente en la presente.

[0050] Además, "y/o", cuando se usa en la presente, debe interpretarse como la divulgación específica de cada una de las dos características o los dos componentes especificados con o sin el otro. Por lo tanto, la expresión "y/o", como se usa en una frase

tal como "A y/o B" en la presente, incluye "A y B", "A o B", "A" (solo) y "B" (solo). Del mismo modo, la expresión "y/o", como se usa en una frase tal como "A, B y/o C" abarca cada uno de los siguientes aspectos: A, B y C; A, B o C; A o C; A o B; B o C; A y C; A y B; B y C; A (solo); B (solo); y C (solo).

[0051] Se entiende que, siempre que se describan aspectos en la presente con la expresión "que comprende", también se proporcionan aspectos de otro modo análogos descritos en términos de "que consiste en" y/o "que consiste esencialmente en".

[0052] A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos que se usan en la presente tienen el mismo significado que le otorga habitualmente una persona del oficio de nivel medio a quien se refiere esta invención. Por ejemplo, el Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2^a ed., 2002, CRC Press; el Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3.^a ed., 1999, Academic Press; y el Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, revisado, 2000, Oxford University Press, proporcionan a una persona del oficio de nivel medio un diccionario general con muchos de los términos que se usan en la presente divulgación.

[0053] Las unidades, los prefijos y los símbolos se indican en la forma aceptada por el Système International de Unites (SI). Los rangos numéricos incluyen los números que definen el rango. A menos que se indique lo contrario, las secuencias de nucleótidos se escriben de izquierda a derecha en dirección 5' a 3'. Las secuencias de aminoácidos se escriben de izquierda a derecha orientadas de amino a carboxi. Los títulos que se proporcionan en la presente no limitan los diversos aspectos de la divulgación, que se pueden obtener por referencia a la memoria descriptiva en su totalidad. En consecuencia, los términos que se definen a continuación se definen en mayor detalle por referencia a la memoria descriptiva en su totalidad.

[0054] La expresión "alrededor de" se usa en la presente con el sentido de aproximadamente, apenas, cerca de o en las regiones de. Cuando la expresión "alrededor de" se usa junto con un rango numérico, modifica el rango extendiendo los límites por encima y por debajo de los valores numéricos establecidos. En general, la expresión "alrededor de" puede modificar un valor numérico por encima y por debajo del valor indicado con una varianza de, por ejemplo, 10 %, hacia arriba o hacia abajo (mayor o menor). Por ejemplo, si se indica que "el ASO reduce la expresión de la proteína SNCA en una célula después de la administración del ASO en al menos alrededor de 60 %", se deduce que los niveles de SNCA se reducen en un rango de 50 % a 70 %.

[0055] La expresión "oligonucleótido antisentido" (ASO) se refiere a un oligómero o polímero de nucleósidos, tal como nucleósidos naturales o formas modificadas de estos,

que se unen de manera covalente entre sí a través de enlaces internucleótidos. El ASO útil para la divulgación incluye al menos un nucleósido no natural. Un ASO es complementario a un ácido nucleico diana, de modo que el ASO se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana. Como se usan en la presente, las expresiones "ASO antisentido", "ASO" y "oligómero" son intercambiables con el término "ASO".

[0056] La expresión "ácidos nucleicos" o "nucleótidos" abarca ácidos nucleicos plurales. En algunas formas de realización, la expresión "ácidos nucleicos" o "nucleótidos" se refiere a una secuencia diana, por ejemplo, pre-mARN, mARN o ADN *in vivo* o *in vitro*. Cuando la expresión se refiere a los ácidos nucleicos o nucleótidos en una secuencia diana, los ácidos nucleicos o nucleótidos pueden ser secuencias naturales dentro de una célula. En otras formas de realización, "ácidos nucleicos" o "nucleótidos" se refieren a una secuencia en los ASO de la divulgación. Cuando la expresión se refiere a una secuencia en los ASO, los ácidos nucleicos o nucleótidos no son naturales, es decir, se sintetizan químicamente, se producen enzimáticamente, se producen de manera recombinante, o cualquier combinación de estos. En una forma de realización, los ácidos nucleicos o nucleótidos en los ASO se producen de manera sintética o recombinante, pero no son una secuencia natural o un fragmento de esta. En otra forma de realización, los ácidos nucleicos o nucleótidos en los ASO no son naturales, dado que contienen al menos un análogo de nucleótido que no es natural. La expresión "ácido nucleico" o "nucleósido" se refiere a un segmento único de ácido nucleico, por ejemplo, un ADN, un ARN o un análogo de estos, presente en un polinucleótido. "Ácido nucleico" o "nucleósido" incluyen ácidos nucleicos naturales o ácidos nucleicos no naturales. En algunas formas de realización, los términos "nucleótido", "unidad" y "monómero" se usan de manera indistinta. Se reconocerá que, cuando se hace referencia a una secuencia de nucleótidos o monómeros, se hace referencia a la secuencia de bases, tales como A, T, G, C o U, y análogos de estas.

[0057] El término "nucleótido", como se usa en la presente, se refiere a un glucósido que comprende una porción azúcar, una porción base y un grupo ligado de manera covalente (grupo de enlace), tales como un grupo de enlace internucleótido de fosfato o fosforotioato, y abarca nucleótidos naturales, tales como ADN o ARN, y nucleótidos no naturales que comprenden bases y/o azúcares modificados, que también se denominan "análogos de nucleótidos" en la presente. En la presente, un solo nucleótido (unidad) también se puede denominar monómero o unidad de ácido nucleico. En algunas formas de realización, la expresión "análogos de nucleótidos" se refiere a nucleótidos que tienen porciones azúcar modificadas. Los ejemplos no limitativos de los nucleótidos que tienen

porciones azúcar modificadas (por ejemplo, LNA) se divulgan en otra parte de la presente. En otras formas de realización, la expresión "análogos de nucleótidos" se refiere a nucleótidos que tienen porciones nucleobase modificadas. Los nucleótidos que tienen porciones nucleobase modificadas incluyen, entre otros, 5-metilcitosina, isocitosina, pseudoisocitosina, 5-bromouracilo, 5-propiniluracilo, 6-aminopurina, 2-aminopurina, inosina, diaminopurina y 2-cloro-6-aminopurina.

[0058] Como se usa en la presente, el término "nucleósido" se refiere a un glucósido que comprende una porción azúcar y una porción base, que pueden unirse de manera covalente por medio de los enlaces internucleótidos entre los nucleósidos del ASO. En el campo de la biotecnología, el término "nucleósido" suele usarse en referencia a un monómero o una unidad de ácido nucleico. En el contexto de un ASO, el término "nucleósido" puede hacer referencia a la base sola, es decir, una secuencia de nucleobases que comprende citosina (ADN y ARN), guanina (ADN y ARN), adenina (ADN y ARN), timina (ADN) y uracilo (ARN), en donde la presencia de la estructura principal de azúcar y los enlaces internucleótidos está implícita. Asimismo, en el caso particular de oligonucleótidos en donde uno o más de los grupos de enlace internucleótido están modificados, el término "nucleótido" puede referirse a un "nucleósido". Por ejemplo, el término "nucleótido" puede usarse incluso si se especifica la presencia o naturaleza de los enlaces entre los nucleósidos.

[0059] La expresión "longitud en nucleótidos", como se usa en la presente, significa la cantidad total de nucleótidos (monómeros) en una secuencia determinada. Por ejemplo, la secuencia de AtTcctttacaccACAC (SEQ ID NO: 15) tiene 17 nucleótidos; por lo tanto, la longitud en nucleótidos de la secuencia es de 17. Por lo tanto, la expresión "longitud en nucleótidos" se usa en la presente de manera indistinta con "cantidad de nucleótidos".

[0060] Como reconocerá una persona del oficio de nivel medio, el nucleótido terminal 5' de un oligonucleótido no comprende un grupo de enlace internucleótido 5', si bien puede comprender un grupo terminal 5'.

[0061] Como se usa en la presente, una "región codificante" o "secuencia codificante" es una porción de polinucleótido que consiste en codones que se pueden traducir en aminoácidos. Si bien un "codón de detención" (TAG, TGA o TAA), en general, no se traduce en un aminoácido, puede considerarse parte de una región codificante, pero cualquier secuencia flanqueante, por ejemplo, promotores, sitios de unión a ribosomas, terminadores de la transcripción, intrones, regiones no traducidas ("UTR") y similares, no son parte de una región codificante. En general, los límites de una región codificante

se determinan mediante un codón de inicio en el terminal 5', que codifica el terminal amino del polipéptido resultante, y un codón de detención de la traducción en el terminal 3', que codifica el terminal carboxilo del polipéptido resultante.

[0062] La expresión "región no codificante", como se usa en la presente, significa una secuencia de nucleótidos que no es una región codificante. Algunos ejemplos de regiones no codificantes incluyen, entre otros, promotores, sitios de unión a ribosomas, terminadores de la transcripción, intrones, regiones no traducidas ("UTR"), exones no codificantes y similares. Algunos de los exones pueden ser la región no traducida 5' (UTR 5') o la región no traducida 3' (UTR 3') de cada transcripto en su totalidad o en parte. Las regiones no traducidas son importantes para lograr una traducción eficaz del transcripto y para controlar la velocidad de traducción y la semivida del transcripto.

[0063] El término "región", cuando se usa en el contexto de una secuencia de nucleótidos, se refiere a una sección de esa secuencia. Por ejemplo, la frase "región dentro de una secuencia de nucleótidos" o "región dentro del complemento de una secuencia de nucleótidos" se refiere a una secuencia más corta que la secuencia de nucleótidos, pero más larga que al menos 10 nucleótidos ubicados dentro de la secuencia de nucleótidos particular o el complemento de la secuencia de nucleótidos, respectivamente. El término "subsecuencia" también puede referirse a una región de una secuencia de nucleótidos.

[0064] La expresión "corriente abajo", cuando se refiere a una secuencia de nucleótidos, significa que una secuencia de nucleótidos o ácidos nucleicos se ubica en el extremo 3' con respecto a una secuencia de nucleótidos de referencia. En algunas formas de realización, las secuencias de nucleótidos corriente abajo se refieren a secuencias que siguen el punto de partida de la transcripción. Por ejemplo, el codón de iniciación de la traducción de un gen se ubica corriente abajo del sitio de inicio de la transcripción.

[0065] La expresión "corriente arriba" se refiere a una secuencia de nucleótidos que se ubica en el extremo 5' con respecto a una secuencia de nucleótidos de referencia.

[0066] A menos que se indique lo contrario, las secuencias proporcionadas en la presente se enumeran del extremo 5' (izquierda) al extremo 3' (derecha).

[0067] Como se usa en la presente, la expresión "región reguladora" se refiere a secuencias de nucleótidos ubicadas corriente arriba (secuencias no codificantes 5'), dentro o corriente abajo (secuencias no codificantes 3') de una región codificante, y que tienen influencia en la transcripción, el procesamiento de ARN, la estabilidad o la traducción de la región codificante asociada. Las regiones reguladoras pueden incluir promotores, secuencias líder de traducción, intrones, secuencias de reconocimiento de

poliadenilación, sitios de procesamiento de ARN, sitios de unión al efector, UTR y estructuras tallo-bucle. Si una región codificante tiene como fin la expresión en una célula eucariota, una secuencia de terminación de la transcripción y señal de poliadenilación generalmente se ubicará en el extremo 3' con respecto a la secuencia codificante.

[0068] El término "transcripto", como se usa en la presente, puede referirse a un transcripto primario que se sintetiza mediante la transcripción del ADN y se convierte en un ARN mensajero (mARN) después del procesamiento, es decir, un ARN mensajero precursor (pre-mARN), y al propio mARN procesado. El término "transcripto" se puede usar de manera indistinta con "pre-mARN" y "mARN." Después de que las cadenas de ADN se transcriben a transcriptos primarios, los transcriptos primarios recientemente sintetizados se modifican de varias maneras a fin de convertirse en sus formas maduras y funcionales, tales como mARN, tARN, rARN, lncARN, miARN, entre otros. Por lo tanto, el término "transcripto" puede incluir exones, intrones, UTR 5' y UTR 3'.

[0069] El término "expresión", como se usa en la presente, se refiere a un proceso mediante el cual un polinucleótido produce un producto génico, por ejemplo, un ARN o un polipéptido. Incluye, entre otros, la transcripción del polinucleótido en el ARN mensajero (mARN) y la traducción de un mARN en un polipéptido. La expresión produce un "producto génico". Como se usa en la presente, un producto génico puede ser un ácido nucleico, por ejemplo, un ARN mensajero producido mediante la transcripción de un gen o un polipéptido que se traduce de un transcripto. Los productos génicos descritos en la presente también incluyen ácidos nucleicos con modificaciones después de la transcripción, por ejemplo, poliadenilación o empalme, o polipéptidos con modificaciones después de la traducción, por ejemplo, metilación, glucosilación, adición de lípidos, asociación con otras subunidades de proteínas o escisión proteolítica.

[0070] Los términos "idéntico" o porcentaje de "identidad", en el contexto de dos o más ácidos nucleicos, se refieren a dos o más secuencias que son iguales o tienen un porcentaje especificado de residuos de aminoácidos o nucleótidos que son iguales, cuando se comparan y se alinean (introduciendo espacios, de ser necesario) para una máxima correspondencia, sin considerar cualquier sustitución de aminoácidos conservadora como parte de la identidad de secuencia. El porcentaje de identidad se puede medir usando algoritmos o *software* de comparación de secuencias o mediante inspección visual. Se conocen diversos algoritmos y *software* en el estado de la técnica que pueden usarse para obtener alineamientos de secuencias de aminoácidos o nucleótidos.

[0071] Un ejemplo no limitativo de un algoritmo de alineamiento de secuencias es el algoritmo descrito en Karlin *et al.*, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87:2264-2268, según se modificó en Karlin *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90:5873-5877 y se incorporó en los programas NBLAST y XBLAST (Altschul *et al.*, 1991, *Nucleic Acids Res.*, 25:3389-3402). En algunas formas de realización, se puede usar Gapped BLAST como se describe en Altschul *et al.*, 1997, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402. BLAST-2, WU-BLAST-2 (Altschul *et al.*, 1996, *Methods in Enzymology*, 266:460-480), ALIGN, ALIGN-2 (Genentech, South San Francisco, California) o Megalign (ADNSTAR) son otros programas de *software* disponibles al público que se pueden usar para alinear secuencias. En algunas formas de realización, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos se determina mediante el programa GAP en el paquete de *software* GCG (por ejemplo, usando una matriz NWSgapdna.CMP, un peso de espacio de 40, 50, 60, 70 u 90 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6). En algunas formas de realización alternativas, el programa GAP en el paquete de *software* GCG, que incorpora el algoritmo de Needleman y Wunsch (*J. Mol. Biol.* (48):444-453 (1970)) se puede usar para determinar el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos (por ejemplo, usando una matriz BLOSUM 62 o una matriz PAM250, y un peso de espacio de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5). De manera alternativa, en algunas formas de realización, el porcentaje de identidad entre secuencias de aminoácidos o nucleótidos se determina usando el algoritmo de Myers y Miller (CABIOS, 4:11-17 (1989)). Por ejemplo, el porcentaje de identidad se puede determinar usando el programa ALIGN (versión 2.0) y usando una PAM120 con tabla de residuos, una penalidad por longitud de espacio de 12 y una penalidad por espacio de 4. Una persona del oficio de nivel medio puede determinar los parámetros apropiados para un máximo alineamiento mediante *software* de alineamiento particular. En algunas formas de realización, se usan los parámetros predeterminados del *software* de alineamiento.

[0072] En algunas formas de realización, el porcentaje de identidad "X" de una primera secuencia de nucleótidos con una segunda secuencia de nucleótidos se calcula como $100 \times (Y/Z)$, en donde Y es la cantidad de residuos de aminoácidos que se obtuvieron como coincidencias idénticas en el alineamiento de la primera y segunda secuencia (según se alinearon mediante inspección visual o un programa de alineamiento de secuencias particular), y Z es la cantidad total de residuos en la segunda secuencia. Si la longitud de una primera secuencia es mayor que aquella de la segunda secuencia, el porcentaje de identidad de la primera secuencia con respecto a la segunda secuencia será más alto que el porcentaje de identidad de la segunda secuencia con respecto a la

primera secuencia.

[0073] Distintas regiones dentro de una sola secuencia diana de polinucleótidos que se alinea con una secuencia de polinucleótidos de referencia pueden tener, cada una, su propio porcentaje de identidad de secuencias. Cabe destacar que el valor del porcentaje de identidad de secuencias se redondea al décimo más cercano. Por ejemplo, 80,11, 80,12, 80,13 y 80,14 se redondean hacia abajo a 80,1, mientras que 80,15, 80,16, 80,17, 80,18 y 80,19 se redondean hacia arriba, a 80,2. También cabe destacar que el valor de longitud siempre será un entero.

[0074] Como se usan en la presente, los términos "homólogo" y "homología" son intercambiables con los términos "identidad" e "idéntico".

[0075] La expresión "variante natural de estas" se refiere a variantes de la secuencia de polipéptidos de SNCA o la secuencia de ácidos nucleicos de SNCA (por ejemplo, transcripto) que existen naturalmente dentro del grupo taxonómico definido, tal como mamíferos, tales como ratón, mono y humano. En general, cuando se hace referencia a "variantes naturales" de un polinucleótido, la expresión también puede abarcar cualquier variante alélica del ADN genómico que codifica SNCA que se encuentra en la posición cromosómica 17q21 mediante duplicación o traslocación cromosómica, y el ARN, tal como mRNA derivado de aquel. "Variantes naturales" también puede incluir variantes derivadas del empalme alternativo de mRNA de SNCA. En referencia a una secuencia de polipéptidos específica, por ejemplo, la expresión también incluye formas naturales de la proteína, que, por lo tanto, se pueden procesar, por ejemplo, mediante modificaciones simultáneas o posteriores a la traducción, tales como escisión del péptido de señal, escisión proteolítica, glucosilación, etc.

[0076] Para determinar el grado de "complementariedad" entre los ASO de la divulgación (o regiones de estos) y la región diana del ácido nucleico que codifica proteína SNCA de mamífero (por ejemplo, el gen SNCA), tales como los que se divulgan en la presente, el grado de "complementariedad" (también "homología" o "identidad") se expresa como el porcentaje de identidad (o porcentaje de homología) entre la secuencia del ASO (o una región de este) y la secuencia de la región diana (o el complemento inverso de la región diana) que mejor se alinee con aquella. El porcentaje se calcula contando la cantidad de bases alineadas que son idénticas en las dos secuencias, dividiendo por la cantidad total de monómeros contiguos en el ASO y multiplicando por 100. En esta comparación, si existen espacios, es preferible que los espacios sean meramente errores de apareamiento en lugar de áreas donde la cantidad de monómeros dentro del espacio difiere entre el ASO de la divulgación y la región diana.

[0077] El término "complemento", como se usa en la presente, indica una secuencia que es complementaria a una secuencia de referencia. Se conoce que la complementariedad es el principio básico de la replicación y transcripción de ADN, ya que es una propiedad compartida entre dos secuencias de ADN o ARN, de manera que, cuando se alinean antiparalelamente, las bases de nucleótidos en cada posición en las secuencias serán complementarias, similar a mirar en el espejo y ver el lado opuesto de las cosas. Por lo tanto, por ejemplo, el complemento de una secuencia de 5'"ATGC"3' se puede escribir 3'"TACG"5' o 5'"GCAT"3'. Las expresiones "complemento inverso", "complementario inverso" y "complementariedad inversa", como se usan en la presente, son intercambiables con los términos "complemento", "complementario" y "complementariedad".

[0078] Las expresiones "correspondiente a" y "corresponde a", en referencia a dos secuencias de ácidos nucleicos o nucleótidos separadas, se pueden usar para identificar regiones de las secuencias que se corresponden o son similares entre sí en función de la homología y/o funcionalidad, si bien los nucleótidos de las secuencias específicas pueden tener diferente numeración. Por ejemplo, isoformas diferentes de un transcrito de un gen pueden tener porciones similares o conservadas de secuencias de nucleótidos cuya numeración puede diferir en las isoformas respectivas en función del empalme alternativo y/u otras modificaciones. Además, se reconoce que se pueden usar distintos sistemas de numeración para caracterizar una secuencia de ácidos nucleicos o nucleótidos (por ejemplo, un transcrito de un gen, y si se debe comenzar a numerar la secuencia desde el codón de inicio de la traducción o incluir el UTR 5'). Asimismo, se reconoce que la secuencia de ácidos nucleicos o nucleótidos de diferentes variantes de un gen o transcrito de un gen puede variar. Como se usa en la presente, sin embargo, se considera que las regiones de las variantes que comparten la homología y/o funcionalidad de la secuencia de ácidos nucleicos o nucleótidos "se corresponden". Por ejemplo, una secuencia de nucleótidos de un transcrito de *SNCA* correspondiente a los nucleótidos X a Y de SEQ ID NO: 1 ("secuencia de referencia") se refiere a una secuencia de transcritos de *SNCA* (por ejemplo, pre-mARN o mARN de *SNCA*) que tiene una secuencia idéntica o una secuencia similar a los nucleótidos X a Y de SEQ ID NO: 1. Una persona del oficio de nivel medio puede identificar los residuos de X e Y correspondientes en la secuencia de transcritos de *SNCA* alineando la secuencia de transcritos de *SNCA* con SEQ ID NO: 1.

[0079] Las expresiones "análogo de nucleótido correspondiente" y "nucleótido correspondiente" indican que la nucleobase en el análogo de nucleótido y el nucleótido

natural tienen la misma capacidad de apareamiento o hibridación. Por ejemplo, cuando la unidad de 2-desoxirribosa del nucleótido está ligada a una adenina, el "análogo de nucleótido correspondiente" contiene una unidad de pentosa (diferente de 2-desoxirribosa) ligada a una adenina.

[0080] Como se usa en la presente, la expresión "número de DES" o "DES No." se refiere a un número único asignado a una secuencia de nucleótidos que tiene un patrón específico de nucleósidos (por ejemplo, ADN) y análogos de nucleósidos (por ejemplo, LNA). Como se usa en la presente, el diseño de un ASO se muestra mediante una combinación de letras mayúsculas y letras minúsculas. Por ejemplo, DES-005459 se refiere a una secuencia de ASO de AtTcctttacaccACAC (SEQ ID NO: 15) con un diseño de ASO de LDLDDDDDDDDDL LLL (es decir, AtTcctttacaccACAC), en donde L (es decir, letra mayúscula) indica un análogo de nucleósido (por ejemplo, LNA) y D (es decir, letra minúscula) indica un nucleósido (por ejemplo, ADN).

[0081] Como se usa en la presente, la expresión "número de ASO" o "ASO No." se refiere a un número único asignado a una secuencia de nucleótidos que tiene la estructura química detallada de los componentes, por ejemplo, nucleósidos (por ejemplo, ADN), análogos de nucleósidos (por ejemplo, beta-D-oxi-LNA), nucleobase (por ejemplo, A, T, G, C, U o MC) y estructura principal (por ejemplo, fosforotioato o fosfodiéster). Por ejemplo, ASO-005459 se refiere a OxyAs DNAts OxyTs DNACs DNACs DNAts DNAts DNAts DNAas DNACs DNAas DNACs DNACs OxyAs OxyMCs OxyAs OxyMC.

[0082] En general, la "potencia" se expresa como un valor IC_{50} o EC_{50} , en μM , nM o pM, a menos que se indique lo contrario. La potencia también se puede expresar en términos de porcentaje de inhibición. IC_{50} es la mediana de concentración inhibidora de una molécula terapéutica. EC_{50} es la mediana de concentración efectiva de una molécula terapéutica con respecto a un vehículo o control (por ejemplo, solución salina). En los ensayos funcionales, IC_{50} es la concentración de una molécula terapéutica que reduce una respuesta biológica, por ejemplo, la transcripción de mRNA o la expresión de la proteína, en un 50 % de la respuesta biológica que logra la molécula terapéutica. En los ensayos funcionales, EC_{50} es la concentración de una molécula terapéutica que produce 50 % de la respuesta biológica, por ejemplo, la transcripción de mRNA o la expresión de la proteína. IC_{50} o EC_{50} se puede calcular mediante cualquier cantidad de medios conocidos en el estado de la técnica.

[0083] Los términos "sujeto", "individuo", "animal", "paciente" o "mamífero" se refieren a cualquier sujeto, en particular, un sujeto que es un mamífero, para quien se desea el

diagnóstico, pronóstico o tratamiento. Los sujetos que son mamíferos incluyen seres humanos, animales domésticos, animales de granja, animales de deporte y animales de zoológico, lo que incluye, por ejemplo, seres humanos, primates no humanos, perros, gatos, conejillos de Indias, conejos, ratas, ratones, caballos, ganado, osos, etcétera.

[0084] La expresión "composición farmacéutica" se refiere a una preparación que se encuentra en una forma tal para permitir que la actividad biológica del ingrediente activo sea eficaz, y que no contiene componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos para un sujeto al que se administraría la composición. Tal composición puede ser estéril.

[0085] Una "cantidad eficaz" de un ASO, como se divulga en la presente, es una cantidad suficiente para llevar a cabo un propósito indicado específicamente. Una "cantidad eficaz" se puede determinar empíricamente y de manera rutinaria en relación con el propósito indicado.

[0086] Expresiones tales como "tratar", "tratamiento", "para tratar", "aliviar" o "para aliviar" se refieren a (1) medidas terapéuticas que curan, ralentizan, disminuyen los síntomas de, y/o detienen la progresión de un trastorno o una afección patológicos diagnosticados y (2) medidas preventivas o profilácticas que previenen y/o ralentizan el desarrollo de un trastorno o una afección patológicos que se desean tratar. Por lo tanto, aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que tienen el trastorno; aquellos que son propensos a tener el trastorno; y aquellos en los que se debe prevenir el trastorno. En algunas formas de realización, se considera que un sujeto se "trató" con éxito por una enfermedad o afección divulgadas en otra parte de la presente, de acuerdo con los métodos que se proporcionan en la presente, si el paciente muestra, por ejemplo, la eliminación o el alivio total, parcial o transitorio de los síntomas asociados a la enfermedad o el trastorno.

II. Oligonucleótidos antisentido

[0087] La presente divulgación usa oligonucleótidos antisentido, para modular la función de las moléculas de ácido nucleico que codifican α -Syn de mamífero, tales como el ácido nucleico de SNCA, por ejemplo, un transcripto de SNCA, que incluye pre-mARN de SNCA y mARN de SNCA, o variantes naturales de las moléculas de ácido nucleico que codifican α -Syn de mamífero. En el contexto de la presente divulgación, el término "ASO" se refiere a una molécula formada mediante el enlace covalente de dos o más nucleótidos (es decir, un oligonucleótido).

[0088] El ASO comprende una secuencia de nucleótidos contiguos de alrededor de 10 a alrededor de 30, tal como 10-20, 16-20 o 15-25 nucleótidos de longitud. Como se usan

en la presente, las expresiones “ASO antisentido”, “oligonucleótido antisentido” y “oligómero” son intercambiables con el término “ASO”.

[0089] Una referencia a un número de SEQ ID incluye una secuencia de nucleobases en particular, pero no incluye ningún diseño o estructura química completa mostrados en la Figura 2 o 3. Asimismo, los ASO descritos en las figuras de la presente muestran un diseño representativo, pero no se limitan al diseño específico que se muestra en las Figuras a menos que se indique lo contrario. En la presente, un solo nucleótido (unidad) también se puede denominar monómero o unidad. Cuando la presente memoria descriptiva se refiere a un número de ASO específico, la referencia incluye la secuencia, el diseño de ASO específico y la estructura química. Cuando la presente memoria descriptiva se refiere a un número de DES específico, la referencia incluye la secuencia y el diseño de ASO específico. Por ejemplo, cuando una reivindicación (o la presente memoria descriptiva) se refiere a SEQ ID NO: 15, incluye solo la secuencia de nucleótidos de attcctttacaccacac. Cuando una reivindicación (o la memoria descriptiva) se refiere a DES-005459, incluye la secuencia de nucleótidos de attcctttacaccacac con el diseño de ASO que se muestra en las Figuras (es decir, AtTcctttacaccACAC). De manera alternativa, el diseño de ASO-005459 también se puede escribir como SEQ ID NO: 15, en donde cada uno del primer nucleótido, el tercer nucleótido y los nucleótidos 14-17 del extremo 5' es un nucleótido modificado, por ejemplo, LNA, y cada uno de los otros nucleótidos es un nucleótido no modificado (por ejemplo, ADN). El número de ASO incluye la secuencia y el diseño de ASO así como los detalles específicos del ASO. Por lo tanto, el ASO-005459 mencionado en la presente solicitud indica OxyAs DNAts OxyTs DNACs DNACs DNAts DNAts DNAts DNAAs DNACs DNAAs DNACs DNACs OxyAs OxyMCs OxyAs OxyMC, en donde “s” indica un enlace de fosforotioato.

[0090] En diversas formas de realización, el ASO de la divulgación no comprende ARN (unidades). En algunas formas de realización, el ASO comprende una o más unidades de ADN. En una forma de realización, el ASO de acuerdo con la divulgación es una molécula lineal o se sintetiza como una molécula lineal. En algunas formas de realización, el ASO es una molécula monocatenaria y no comprende regiones cortas de, por ejemplo, al menos 3, 4 o 5 nucleótidos contiguos, que son complementarios a regiones equivalentes dentro del mismo ASO (es decir, dúplex); en este caso, el ASO no es (esencialmente) bicatenario. En algunas formas de realización, el ASO no es esencialmente bicatenario. En algunas formas de realización, el ASO no es un siARN. En diversas formas de realización, el ASO de la divulgación puede consistir completamente en la región de nucleótidos contiguos. Por lo tanto, en algunas formas

de realización, el ASO no es sustancialmente autocomplementario.

[0091] En una forma de realización, el ASO de la divulgación puede estar en forma de cualquier sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico. Como se usa en la presente, la expresión “sales aceptables desde el punto de vista farmacéutico” se refiere a derivados de los ASO de la divulgación, en donde el ASO se modifica (por ejemplo, adición de un catión) mediante la preparación de sales de este. Dichas sales mantienen la actividad biológica deseada del ASO sin producir efectos toxicológicos no deseados. En algunas formas de realización, el ASO de la divulgación está en forma de una sal de sodio. En otras formas de realización, el ASO está en forma de una sal de potasio.

II.A. La diana

[0092] De manera conveniente, el ASO de la divulgación es capaz de regular de manera descendente (por ejemplo, reducir o eliminar) la expresión del mRNA de *SNCA* o de la proteína. En este caso, el ASO de la divulgación puede afectar la inhibición indirecta de la proteína *SNCA* a través de la reducción en los niveles de mRNA de *SNCA*, en general, en una célula de mamífero, tal como una célula humana, tal como una célula neuronal. En particular, la presente divulgación se refiere a los ASO que actúan sobre una o más regiones del pre-mRNA de *SNCA*.

[0093] Los sinónimos de *SNCA* son conocidos e incluyen NACP, componente no A-beta de AD amiloide, PARK1, PARK4 y PD1. La secuencia para el gen *SNCA* se puede encontrar bajo el número de acceso disponible al público NC_000004.12 y la secuencia parcial para el transcripto pre-mRNA de *SNCA* (residuos 6001 a 8400) se puede encontrar bajo el número de acceso disponible al público NG_011851.1 (SEQ ID NO: 1). La secuencia para la proteína *SNCA* se puede encontrar bajo los números de acceso disponibles al público: P37840, A8K2A4, Q13701, Q4JHI3 y Q6IAU6, cada uno de los cuales se incorpora en la presente por referencia en su totalidad. Las variantes naturales del producto génico de *SNCA* son conocidas. Por ejemplo, las variantes naturales de la proteína *SNCA* pueden contener una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas de: A30P, E46K, H50Q, A53T, y cualquier combinación de estas. Por lo tanto, los ASO de la presente divulgación pueden estar diseñados para reducir o inhibir la expresión de las variantes naturales de la proteína *SNCA*.

[0094] Se conoce que las mutaciones en *SNCA* provocan una o más afecciones patológicas. Los ASO de la divulgación se pueden usar para reducir o inhibir la expresión de un SNP o transcripto de *SNCA* empalmado de manera alternativa que contiene una o más mutaciones y, en consecuencia, reduce la formación de una proteína *SNCA* mutada. Algunos ejemplos de mutantes de la proteína *SNCA* incluyen, entre otros, una

proteína SNCA que comprende una o más mutaciones seleccionadas de: D2A, E35K, Y39F, H50A, E57K, G67_V71del, V71_V82del, A76_V77del, A76del, V77del, A78del, A85_F94del, Y125F, Y133F, Y136F, y cualquier combinación de estas. El ASO de la divulgación puede estar diseñado para reducir o inhibir la expresión de cualquier mutante de las proteínas SNCA.

[0095] Un ejemplo de una secuencia de ácido nucleico diana de los ASO es pre-mARN de SNCA. SEQ ID NO: 1 en la Figura 1A representa una secuencia genómica de SNCA parcial (residuos 6001 a 8400). SEQ ID NO: 1 es idéntica a una secuencia de pre-mARN de SNCA excepto que el nucleótido "t" en SEQ ID NO: 1 se muestra como "u" en el pre-mARN. En algunas formas de realización, el "ácido nucleico diana" comprende una región de intrón de ácidos nucleicos que codifican la proteína SNCA o variantes naturales de estos, y ácidos nucleicos de ARN derivados de estos, por ejemplo, pre-mARN. En otras formas de realización, el "ácido nucleico diana" comprende una región de exón de ácidos nucleicos que codifican la proteína SNCA, o variantes naturales de estos, y ácidos nucleicos de ARN derivados de estos. En algunas formas de realización, por ejemplo, cuando se usa en investigaciones o diagnósticos, el "ácido nucleico diana" puede ser un cADN o un oligonucleótido sintético derivado de las dianas de ácido nucleico de ADN o ARN. En una forma de realización, la secuencia genómica de SNCA parcial se muestra como N.º de acceso GenBank NG_011851.1 (residuos 6001 a 8400) (SEQ ID NO: 1). El mARN que codifica la proteína SNCA se muestra como SEQ ID NO: 2. Ver Figura 1B. La secuencia de proteína SNCA codificada por el mARN de SNCA se muestra como SEQ ID NO: 3. Ver Figura 1C.

[0096] En una forma de realización, el ASO de acuerdo con la divulgación comprende una secuencia de nucleótidos contiguos de 10 a 30 nucleótidos de longitud que son complementarios a una secuencia de ácido nucleico dentro de un transcripto de SNCA, por ejemplo, una región correspondiente a una unión exón/intrón de SEQ ID NO: 1, en donde la secuencia de ácido nucleico corresponde a los nucleótidos 7602-7627 de SEQ ID NO: 1

[0097] En algunas formas de realización, los ASO se hibridan con o son complementarios a una región dentro de un transcripto de SNCA, por ejemplo, los nucleótidos 7602-7627 de SEQ ID NO: 1, y tienen un puntaje de secuencia mayor o igual a alrededor de 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 o 1,0. Los métodos para calcular el puntaje de secuencia se divulgan en otra parte de la presente.

[0098] En algunas formas de realización, los ASO de la presente divulgación se hibridan con una unión exón/intrón de un transcripto de SNCA, por ejemplo, una región

correspondiente a una unión entre intrón 1 y exón 2 de SEQ ID NO: 1. En algunas formas de realización, el ASO de la divulgación comprende una secuencia de nucleótidos contiguos que se hibrida con una secuencia de ácidos nucleicos, o una región dentro de la secuencia, de un transcripto de *SNCA* ("región diana"), en donde la secuencia de ácidos nucleicos corresponde a los nucleótidos 7602-7627 de SEQ ID NO: 1. En otra forma de realización, el ASO de la divulgación comprende una secuencia de nucleótidos contiguos que se hibrida con una secuencia de ácidos nucleicos, o una región dentro de la secuencia, de un transcripto de *SNCA*, en donde la secuencia de ácidos nucleicos corresponde a los nucleótidos 7602-7627 de SEQ ID NO: 1, y en donde el ASO tiene uno de los diseños descritos en la presente (por ejemplo, Sección II.H., por ejemplo, un diseño de *gapmer*, por ejemplo, un diseño de *gapmer* de flanqueo alterno) o una estructura química que se muestra en otra parte de la presente (por ejemplo, Figuras 2 y 3).

[0099] En algunas formas de realización, la región diana corresponde a los nucleótidos 7604-7620 de SEQ ID NO: 1. En otras formas de realización, la región diana corresponde a los nucleótidos 7603-7620 de SEQ ID NO: 1. En otras formas de realización, la región diana corresponde a los nucleótidos 7602-7619 de SEQ ID NO: 1. En algunas formas de realización, los ASO se hibridan con una región dentro de un exón de un transcripto de *SNCA*, por ejemplo, SEQ ID NO: 1, y tienen un puntaje de secuencia mayor o igual a alrededor de 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 o 1,0. Los métodos para calcular el puntaje de secuencia se divulgan en otra parte de la presente.

[0100] En algunas formas de realización, la región diana corresponde a los nucleótidos 7602-7627 de SEQ ID NO: 1 $\pm$ 10 nucleótidos en el extremo 3', el extremo 5', o ambos. En otras formas de realización, la región diana corresponde a los nucleótidos 7604-7620 de SEQ ID NO: 1 $\pm$ 1, $\pm$ 2, $\pm$ 3, $\pm$ 4, $\pm$ 5, $\pm$ 6, $\pm$ 7, $\pm$ 8, $\pm$ 9 o $\pm$ 10 nucleótidos en el extremo 3', el extremo 5', o ambos.

[0101] En algunas formas de realización, el ASO de la divulgación es capaz de hibridarse con el ácido nucleico diana (por ejemplo, transcripto de *SNCA*) en condiciones fisiológicas, es decir en condiciones *in vivo*. En algunas formas de realización, el ASO de la divulgación es capaz de hibridarse con el ácido nucleico diana (por ejemplo, transcripto de *SNCA*) *in vitro*. En algunas formas de realización, el ASO de la divulgación es capaz de hibridarse con el ácido nucleico diana (por ejemplo, transcripto de *SNCA*) *in vitro* en condiciones rigurosas. Las condiciones rigurosas para la hibridación *in vitro* dependen de la absorción de células productiva, accesibilidad al ARN, temperatura, energía libre de asociación, concentración salina y tiempo, entre otros (ver, por ejemplo,

Stanley T Crooks, Antisense Drug Technology: Principles, Strategies and Applications, 2.^a edición, CRC Press (2007)). En general, las condiciones de rigurosidad alta a moderada se usan en la hibridación *in vitro* para permitir la hibridación entre ácidos nucleicos sustancialmente similares, pero no entre ácidos nucleicos disímiles. Un ejemplo de condiciones de hibridación rigurosas incluye la hibridación en amortiguador de 5X citrato de sodio salino (SSC) (cloruro de sodio 0,75 M/citrato de sodio 0,075 M) durante 1 hora a 40 °C, y luego se lavó la muestra 10 veces en 1X SSC a 40 °C y 5 veces en amortiguador de 1X SSC a temperatura ambiente. Las condiciones de hibridación *in vivo* consisten en condiciones intracelulares (por ejemplo, pH fisiológico y condiciones iónicas intracelulares) que rigen la hibridación de los oligonucleótidos antisentido con secuencias diana. Las condiciones *in vivo* se pueden imitar *in vitro* mediante condiciones de rigurosidad baja. Por ejemplo, la hibridación se puede realizar *in vitro* en 2X SSC (cloruro de sodio 0,3 M/citrato de sodio 0,03 M), 0,1 % de SDS a 37 °C. Se puede usar una solución de lavado que contiene 4X SSC, 0,1 % de SDS a 37 °C, con un lavado final en 1X SSC a 45 °C.

II.B. Secuencias de ASO

[0102] Los ASO de la divulgación comprenden una secuencia de nucleótidos contiguos que corresponde al complemento de una región del transcripto de SNCA, por ejemplo, una secuencia de nucleótidos que corresponde a SEQ ID NO: 1.

[0103] En algunas formas de realización, la divulgación proporciona un ASO que comprende una secuencia de nucleótidos contiguos con un total de 10-30 nucleótidos, tal como 10-15 nucleótidos, 10-20 nucleótidos o 10-25 nucleótidos de longitud, en donde la secuencia de nucleótidos contiguos tiene al menos alrededor de 85 %, al menos alrededor de 90 %, al menos alrededor de 95 %, al menos alrededor de 98 %, o al menos alrededor de 99 % de identidad de secuencia con respecto a una región dentro del complemento de un transcripto de SNCA de mamífero, tal como SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.

[0104] El ASO puede comprender una secuencia de nucleótidos contiguos que es totalmente complementaria (perfectamente complementaria) a la región equivalente de un ácido nucleico que codifica una proteína SNCA de mamífero (por ejemplo, SEQ ID NO: 1 y 2). El ASO puede comprender una secuencia de nucleótidos contiguos que es totalmente complementaria (perfectamente complementaria) a una secuencia de ácido nucleico, o una región dentro de la secuencia, correspondiente a los nucleótidos X-Y de SEQ ID NO: 1, en donde X e Y son el sitio de inicio de pre-mARN y el sitio final de pre-mARN de NG_011851.1, respectivamente, como se muestra en la Figura 2. Además, el

ASO puede tener un diseño descrito en otra parte de la presente (por ejemplo, Sección II.G, por ejemplo, un diseño de *gapmer*, por ejemplo, un diseño de *gapmer* de flanqueo alterno) o una estructura química que se muestra en otra parte de la presente (por ejemplo, Figuras 2 y 3). En algunas formas de realización, el ASO comprende una secuencia de nucleótidos contiguos que es totalmente complementaria (perfectamente complementaria) a una secuencia de ácido nucleico, o una región dentro de la secuencia, correspondiente a los nucleótidos X-Y de SEQ ID NO: 2, en donde X e Y son el sitio de inicio de mARN y el sitio final de mARN, respectivamente.

[0105] En algunas formas de realización, la secuencia de nucleótidos de los ASO de la divulgación o la secuencia de nucleótidos contiguos tiene al menos alrededor de 80 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 4 a 21 (es decir, las secuencias en las Figuras 2 y 3), tal como al menos alrededor de 85 %, al menos alrededor de 90 %, al menos alrededor de 91 %, al menos alrededor de 92 %, al menos alrededor de 93 %, al menos alrededor de 94 %, al menos alrededor de 95 %, al menos alrededor de 96 % de identidad de secuencia, al menos alrededor de 97 % de identidad de secuencia, al menos alrededor de 98 % de identidad de secuencia, al menos alrededor de 99 % de identidad de secuencia, tal como alrededor de 100 % de identidad de secuencia (homóloga). En algunas formas de realización, el ASO tiene un diseño descrito en otra parte de la presente (por ejemplo, Sección II.G.I, por ejemplo, un diseño de *gapmer*, por ejemplo, un diseño de *gapmer* de flanqueo alterno) o una estructura química de nucleósido que se muestra en otra parte de la presente (por ejemplo, Figuras 2 y 3).

[0106] En algunas formas de realización, el ASO de la divulgación comprende al menos un ASO con el diseño (por ejemplo, número de DES) divulgado en las Figuras 2 y 3. En algunas formas de realización, el ASO de la divulgación comprende al menos un ASO con el diseño (por ejemplo, número de DES) divulgado en las Figuras 2 y 3, en donde el ASO es un nucleótido, dos nucleótidos, tres nucleótidos o cuatro nucleótidos más corto en el extremo 3' que los ASO divulgados en las Figuras 2 y 3. En otras formas de realización, el ASO de la divulgación comprende al menos un ASO con el diseño (por ejemplo, número de DES) divulgado en las Figuras 2 y 3, en donde el ASO es un nucleótido, dos nucleótidos, tres nucleótidos o cuatro nucleótidos más corto en el extremo 5' que los ASO divulgados en las Figuras 2 y 3. En otras formas de realización, el ASO de la divulgación comprende al menos un ASO con el diseño (por ejemplo, número de DES) divulgado en las Figuras 2 y 3, en donde el ASO es un nucleótido, dos nucleótidos, tres nucleótidos o cuatro nucleótidos más corto en el extremo 5' y/o el

extremo 3' que los ASO divulgados en las Figuras 2 y 3.

[0107] En otras formas de realización, el ASO de la divulgación comprende al menos un ASO con la estructura química (por ejemplo, número de ASO) divulgada en las Figuras 2 y 3. En algunas formas de realización, el ASO de la divulgación comprende al menos un ASO con la estructura química (por ejemplo, número de ASO) divulgada en las Figuras 2 y 3, en donde el ASO es un nucleótido, dos nucleótidos, tres nucleótidos, o cuatro nucleótidos más corto en el extremo 3' que el ASO divulgado en las Figuras 2 y 3. En otras formas de realización, el ASO de la divulgación comprende al menos un ASO con la estructura química (por ejemplo, número de ASO) divulgada en las Figuras 2 y 3, en donde el ASO es un nucleótido, dos nucleótidos, tres nucleótidos o cuatro nucleótidos más corto en el extremo 5' que los ASO divulgados en las Figuras 2 y 3. Aun en otras formas de realización, el ASO de la divulgación comprende al menos un ASO con la estructura química (por ejemplo, número de ASO) divulgada en las Figuras 2 y 3, en donde el ASO es un nucleótido, dos nucleótidos, tres nucleótidos o cuatro nucleótidos más corto en el extremo 5' y/o el extremo 3' que los ASO divulgados en las Figuras 2 y 3.

[0108] En algunas formas de realización, el ASO (o la porción de nucleótidos contiguos de este) comprende o se selecciona de una de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4 a 21 y una región de estas de al menos 10 nucleótidos contiguos, en donde el ASO (o porción de nucleótidos contiguos de estas) puede comprender, opcionalmente, 1, 2, 3 o 4 errores de apareamiento cuando se compara con el transcripto de *SNCA* correspondiente.

[0109] En una forma de realización, el ASO comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, y SEQ ID NO: 21. En algunas formas de realización, el ASO comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 7 (por ejemplo, la secuencia de ASO-005578 y ASO-005584) y SEQ ID NO: 15 (por ejemplo, la secuencia de ASO-005459).

[0110] En algunas formas de realización, los ASO de la divulgación se unen a la secuencia de ácido nucleico diana (por ejemplo, transcripto de *SNCA*) y pueden inhibir o reducir la expresión del transcripto de *SNCA* en al menos alrededor de 10 %, al menos alrededor de 20 %, al menos alrededor de 30 %, al menos alrededor de 40 %, al menos alrededor de 50 %, al menos alrededor de 60 %, al menos alrededor de 70 %, al menos

alrededor de 80 %, al menos alrededor de 90 %, o alrededor de 100 % en un tejido (por ejemplo, una región del cerebro) de un ratón que expresa un gen SNCA humano (por ejemplo, A53T-PAC) cuando se administran *in vivo* en dosis de 3,13 µg, 12,5 µg, 25 µg, 50 µg o 100 µg en comparación con el control (por ejemplo, un control interno, tal como GADPH o tubulina, o un ratón al que se le administra control de vehículo solo), según se mide mediante un ensayo, por ejemplo, PCR cuantitativa o análisis QUANTIGENE®, divulgado en la presente.

[0111] En algunas formas de realización, los ASO pueden reducir la expresión de proteína SNCA en al menos alrededor de 10 %, al menos alrededor de 20 %, al menos alrededor de 30 %, al menos alrededor de 40 %, al menos alrededor de 50 %, al menos alrededor de 60 %, al menos alrededor de 70 %, al menos alrededor de 80 %, al menos alrededor de 90 %, o alrededor de 100 % en un tejido (por ejemplo, una región del cerebro) de un ratón que expresa un gen SNCA humano (por ejemplo, A53T-PAC) cuando se administran *in vivo* en dosis de 3,13 µg, 12,5 µg, 25 µg, 50 µg o 100 µg en comparación con el control (por ejemplo, un control interno, tal como GADPH o tubulina, o un ratón al que se le administra control de vehículo solo), según se mide mediante un ensayo, por ejemplo, ensayo de alto contenido, divulgado en la presente (ver Ejemplo 2A).

[0112] En algunas formas de realización, los ASO de la divulgación se unen a la secuencia de ácido nucleico diana (por ejemplo, transcritos de SNCA) y pueden inhibir o reducir la expresión del transcritos de SNCA en al menos alrededor de 10 %, al menos alrededor de 20 %, al menos alrededor de 30 %, al menos alrededor de 40 %, al menos alrededor de 50 %, al menos alrededor de 60 %, al menos alrededor de 70 %, al menos alrededor de 80 %, al menos alrededor de 90 %, o alrededor de 100 % en un tejido (por ejemplo, una región del cerebro) de un *Macaca fascicularis* que expresa el gen SNCA de tipo silvestre cuando se administran una o dos veces *in vivo* en dosis de 2 mg, 4 mg u 8 mg, en comparación con el control (por ejemplo, un control interno, tal como GADPH o tubulina, o un *Macaca fascicularis* al que se le administra control de vehículo solo), según se mide mediante un ensayo, por ejemplo, PCR cuantitativa o análisis QUANTIGENE®, divulgado en la presente.

[0113] En algunas formas de realización, los ASO pueden reducir la expresión de proteína SNCA en al menos alrededor de 10 %, al menos alrededor de 20 %, al menos alrededor de 30 %, al menos alrededor de 40 %, al menos alrededor de 50 %, al menos alrededor de 60 %, al menos alrededor de 70 %, al menos alrededor de 80 %, al menos alrededor de 90 %, o alrededor de 100 % en un tejido (por ejemplo, una región del

cerebro) de un *Macaca fascicularis* que expresa el gen SNCA de tipo silvestre cuando se administran una o dos veces *in vivo* en dosis de 2 mg, 4 mg u 8 mg, en comparación con el control (por ejemplo, un control interno, tal como GADPH o tubulina, o un *Macaca fascicularis* al que se le administra control de vehículo solo), según se mide mediante un ensayo, por ejemplo, ensayo de alto contenido, divulgado en la presente (ver Ejemplo 2A).

[0114] En otras formas de realización, los ASO de la divulgación pueden reducir la expresión de mRNA de SNCA *in vitro* en al menos alrededor de 20 %, al menos alrededor de 30 %, al menos alrededor de 40 %, al menos alrededor de 50 %, al menos alrededor de 60 %, al menos alrededor de 70 %, al menos alrededor de 80 %, al menos alrededor de 90 %, o alrededor de 100 % en neuronas primarias de ratón que expresan un gen SNCA humano de longitud completa (por ejemplo, neuronas PAC) cuando las neuronas están en contacto con 5 μ M, 3,3 μ M, 1 μ M, 4 nM, 40 nM o 200 nM del oligonucleótido antisentido en comparación con un control (por ejemplo, un control interno, tal como GADPH o tubulina, o neuronas primarias de ratón que expresan un gen SNCA humano de longitud completa en contacto con solución salina sola), según se mide mediante un ensayo, por ejemplo, análisis QUANTIGENE®, divulgado en la presente.

[0115] En otras formas de realización, los ASO pueden reducir la expresión de proteína SNCA *in vitro* en al menos alrededor de 60 %, al menos alrededor de 70 %, al menos alrededor de 80 %, al menos alrededor de 90 %, o al menos alrededor de 95 % en neuronas primarias de ratón que expresan un gen SNCA humano de longitud completa (por ejemplo, neuronas PAC) cuando las neuronas están en contacto con 5 μ M, 3,3 μ M, 1 μ M, 4 nM, 40 nM o 200 nM del oligonucleótido antisentido en comparación con un control (por ejemplo, un control interno, tal como GADPH o tubulina, o neuronas primarias de ratón que expresan un gen SNCA humano de longitud completa (en contacto con solución salina sola), según se mide mediante un ensayo, por ejemplo, ensayo de alto contenido, divulgado en la presente (ver Ejemplo 2A).

[0116] En algunas formas de realización, los ASO pueden reducir la expresión de mRNA de SNCA *in vitro* en al menos alrededor de 10 %, al menos alrededor de 20 %, al menos alrededor de 30 %, al menos alrededor de 40 %, al menos alrededor de 50 %, al menos alrededor de 60 %, al menos alrededor de 70 %, al menos alrededor de 80 %, al menos alrededor de 90 %, o alrededor de 100 % en una línea celular de neuroblastoma humano (por ejemplo, SK-N-BE(2)) que expresa un gen SNCA humano de longitud completa cuando las células de neuroblastoma están en contacto con 25 μ M del oligonucleótido

antisentido en comparación con un control (por ejemplo, un control interno, tal como GADPH o tubulina, o células de neuroblastoma que expresan un gen SNCA humano de longitud completa en contacto con solución salina sola), según se mide mediante un ensayo, por ejemplo, PCR cuantitativa, divulgado en la presente.

[0117] En algunas formas de realización, los ASO divulgados en la presente pueden reducir la expresión de proteína SNCA *in vitro* en al menos alrededor de 10 %, al menos alrededor de 20 %, al menos alrededor de 30 %, al menos alrededor de 40 %, al menos alrededor de 50 %, al menos alrededor de 60 %, al menos alrededor de 70 %, al menos alrededor de 80 %, al menos alrededor de 90 %, o alrededor de 100 % en una línea celular de neuroblastoma humano (por ejemplo, SK-N-BE(2)) que expresa un gen SNCA humano de longitud completa cuando las células de neuroblastoma están en contacto con 25 μ M del oligonucleótido antisentido en comparación con un control (por ejemplo, un control interno, tal como GADPH o tubulina, o células de neuroblastoma que expresan un gen SNCA humano de longitud completa en contacto con solución salina sola), según se mide mediante un ensayo, por ejemplo, ensayo de alto contenido, divulgado en la presente (ver Ejemplo 2A).

[0118] En algunas formas de realización, los ASO de la divulgación se unen al transcripto de SNCA e inhiben o reducen la expresión del mRNA de SNCA en al menos alrededor de 10 % o alrededor de 20 % en comparación con el nivel de expresión normal (es decir, control) en la célula, por ejemplo, al menos alrededor de 30 %, alrededor de 40 %, alrededor de 50 %, alrededor de 60 %, alrededor de 70 %, alrededor de 80 %, alrededor de 90 % o alrededor de 95 % en comparación con el nivel de expresión normal (tal como el nivel de expresión en ausencia de los ASO o conjugados en la célula. En algunas formas de realización, el ASO reduce la expresión de la proteína SNCA en una célula después de la administración del ASO en al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 % o al menos 90 % en comparación con una célula no expuesta al ASO (es decir, control). En algunas formas de realización, el ASO reduce la expresión de la proteína SNCA en una célula después de la administración del ASO en al menos alrededor de 60 %, al menos alrededor de 70 %, al menos alrededor de 80 % o al menos alrededor de 90 % en comparación con una célula no expuesta al ASO (es decir, control).

[0119] En algunas formas de realización, el ASO de la divulgación tiene al menos una propiedad seleccionada de: (1) reduce la expresión del mRNA de SNCA en una célula, en comparación con una célula de control que no estuvo expuesta al ASO; (2) no reduce considerablemente las oscilaciones de calcio en una célula; (3) no reduce

considerablemente la intensidad de la tubulina en una célula; (4) reduce la expresión de la proteína α -Syn en una célula; y (5) cualquier combinación de esta en comparación con una célula de control que no estuvo expuesta al ASO.

[0120] En algunas formas de realización, el ASO de la divulgación no reduce considerablemente las oscilaciones de calcio en una célula, por ejemplo, células neuronales. Si el ASO no reduce considerablemente las oscilaciones de calcio en una célula, esta propiedad del ASO corresponde a una reducción de la neurotoxicidad del ASO. En algunas formas de realización, las oscilaciones de calcio son mayores o iguales a 95 %, mayores o iguales a 90 %, mayores o iguales a 85 %, mayores o iguales a 80 %, mayores o iguales a 75 %, mayores o iguales a 70 %, mayores o iguales a 65 %, mayores o iguales a 60 %, mayores o iguales a 55 %, o mayores o iguales a 50 % de oscilaciones en una célula no expuesta al ASO.

[0121] Las oscilaciones de calcio son importantes para el correcto funcionamiento de las células neuronales. Se demostró que las redes de neuronas corticales sufren oscilaciones de calcio espontáneas, lo que da como resultado la liberación del neurotransmisor glutamato. Las oscilaciones de calcio también pueden regular interacciones de neuronas con glías asociadas, además de otras neuronas asociadas de la red, para liberar otros neurotransmisores además del glutamato. Las oscilaciones de calcio reguladas son necesarias para la homeostasis de las redes neuronales para el funcionamiento normal del cerebro. (Ver Shashank *et al.*, *Brain Research*, 1006(1): 8–17 (2004); Rose *et al.*, *Nature Neurosci.*, 4:773 – 774 (2001); Zonta *et al.*, *J Physiol Paris.*, 96(3-4):193-8 (2002); Pasti *et al.*, *J. Neurosci.*, 21(2): 477-484 (2001)). El glutamato también activa dos canales de iones distintos, receptores del ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA) y receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA).

[0122] En algunas formas de realización, las oscilaciones de calcio medidas en los métodos de la presente son oscilaciones de calcio dependientes de AMPA. En algunas formas de realización, las oscilaciones de calcio son oscilaciones de calcio dependientes de NMDA. En algunas formas de realización, las oscilaciones de calcio son oscilaciones de calcio dependientes del ácido gamma-aminobutírico (GABA). En algunas formas de realización, las oscilaciones de calcio pueden ser una combinación de dos o más oscilaciones de calcio dependientes de AMPA, dependientes de NMDA o dependientes de GABA.

[0123] En algunas formas de realización, las oscilaciones de calcio medidas en los métodos de la presente son oscilaciones de calcio dependientes de AMPA. A fin de

medir las oscilaciones de calcio dependientes de AMPA, las oscilaciones de calcio se pueden medir en presencia de iones de Mg^{2+} (por ejemplo, $MgCl_2$). En algunas formas de realización, el método también comprende agregar iones de Mg^{2+} (por ejemplo, $MgCl_2$) en una cantidad que permite detectar oscilaciones de calcio dependientes de AMPA. En algunas formas de realización, la concentración de iones eficaz que permite detectar oscilaciones de calcio dependientes de AMPA es de al menos alrededor de 0,5 mM. En otras formas de realización, la concentración eficaz de iones para inducir oscilaciones de calcio dependientes de AMPA es de al menos alrededor de 0,6 mM, al menos alrededor de 0,7 mM, al menos alrededor de 0,8 mM, al menos alrededor de 0,9 mM, al menos alrededor de 1 mM, al menos alrededor de 1,5 mM, al menos alrededor de 2,0 mM, al menos alrededor de 2,5 mM, al menos alrededor de 3,0 mM, al menos alrededor de 4 mM, al menos alrededor de 5 mM, al menos alrededor de 6 mM, al menos alrededor de 7 mM, al menos alrededor de 8 mM, al menos alrededor de 9 mM o al menos alrededor de 10 mM. En una forma de realización particular, la concentración de iones de Mg^{2+} (por ejemplo, $MgCl_2$) útil para los métodos es de 1 mM. En algunas formas de realización, la concentración de iones de Mg^{2+} (por ejemplo, $MgCl_2$) útil para los métodos de la presente es de alrededor de 1 mM a alrededor de 10 mM, alrededor de 1 mM a alrededor de 15 mM, alrededor de 1 mM a alrededor de 20 mM o alrededor de 1 mM a alrededor de 25 mM. Los iones de Mg^{2+} se pueden agregar mediante la adición de sales de magnesio, tales como carbonato de magnesio, cloruro de magnesio, citrato de magnesio, hidróxido de magnesio, óxido de magnesio, sulfato de magnesio y sulfato de magnesio heptahidrato.

[0124] En algunas formas de realización, las oscilaciones de calcio se miden en el presente método mediante el uso de sondas fluorescentes que detectan las fluctuaciones de los niveles de calcio intracelular. Por ejemplo, la detección del flujo de calcio intracelular se puede lograr mediante la tinción de las células con tinturas fluorescentes que se unen a los iones de calcio (conocidos como indicadores de calcio fluorescentes) con un cambio detectable resultante en la fluorescencia (por ejemplo, las tinturas Fluo-4 AM y Fura Red AM disponibles de Molecular Probes. Eugene, OR, Estados Unidos de América).

[0125] En otras formas de realización, los ASO de la divulgación no reducen considerablemente la intensidad de la tubulina en una célula. En algunas formas de realización, la intensidad de la tubulina es mayor o igual a 95 %, mayor o igual a 90 %, mayor o igual a 85 %, mayor o igual a 80 %, mayor o igual a 75 %, mayor o igual a 70 %, mayor o igual a 65 %, mayor o igual a 60 %, mayor o igual a 55 %, o mayor o igual

a 50 % mayor o igual a ASO (o expuesta a solución salina).

[0126] En algunas formas de realización, tal propiedad se observa cuando se usa una concentración de 0,04 nM a 400 μ M del ASO de la divulgación. En la misma forma de realización o en otra diferente, la inhibición o reducción de la expresión del mRNA de SNCA y/o la proteína SNCA en la célula da como resultado menos de 100 %, por ejemplo, menos de 98 %, menos de 95 %, menos de 90 %, menos de 80 %, por ejemplo, menos de 70 % de niveles de mRNA o proteína en comparación con las células no expuestas al ASO. La modulación del nivel de expresión se puede determinar midiendo los niveles de proteína SNCA, por ejemplo, mediante métodos, tales como SDS-PAGE y luego con transferencia Western usando anticuerpos adecuados producidos contra la proteína diana. De manera alternativa, la modulación de los niveles de expresión se puede determinar midiendo los niveles del mRNA de SNCA, *por ejemplo*, mediante transferencia Northern o RT-PCR cuantitativa. Al medir la inhibición mediante los niveles de mRNA, el nivel de regulación descendente cuando se usa una dosis adecuada, por ejemplo, una concentración de alrededor de 0,04 nM a alrededor de 400 μ M, es, en algunas formas de realización, generalmente hasta un nivel de alrededor de 10-20 % de los niveles normales en la célula en ausencia del ASO.

[0127] En algunas formas de realización, el ASO de la divulgación tiene una tolerabilidad *in vivo* menor o igual a un puntaje total de 4, en donde el puntaje total es la suma de un puntaje unitario de cinco categorías, que son 1) hiperactividad; 2) menor actividad y estimulación; 3) disfunción motriz y/o ataxia; 4) postura y respiración anormales; y 5) temblor y/o convulsiones, y en donde el puntaje unitario para cada categoría se mide en una escala de 0-4. En algunas formas de realización, la tolerabilidad *in vivo* es menor o igual al puntaje total de 3, al puntaje total de 2, al puntaje total de 1 o al puntaje total de 0. En algunas formas de realización, la evaluación de la tolerabilidad *in vivo* se determina como se describe a continuación en los ejemplos.

[0128] En algunas formas de realización, el ASO puede tolerar 1, 2, 3 o 4 (o más) errores de apareamiento, cuando se hibrida con la secuencia diana, y aun así unirse lo suficiente a la diana para mostrar el efecto deseado, es decir, la regulación descendente del mRNA y/o la proteína diana. Los errores de apareamiento se pueden compensar, por ejemplo, mediante una mayor longitud de la secuencia de nucleótidos ASO y/o mediante una mayor cantidad de análogos de nucleótidos, que se describen en otra parte de la presente.

[0129] En algunas formas de realización, el ASO de la divulgación comprende no más de 3 errores de apareamiento cuando se hibrida con la secuencia diana. En otras formas

de realización, la secuencia de nucleótidos contiguos comprende no más de 2 errores de apareamiento cuando se hibrida con la secuencia diana. En otras formas de realización, la secuencia de nucleótidos contiguos comprende no más de 1 error de apareamiento cuando se hibrida con la secuencia diana.

[0130] En algunas formas de realización, el ASO de acuerdo con la divulgación comprende una secuencia de nucleótidos, o una región dentro de la secuencia, de acuerdo con cualquiera de SEQ ID NO: 4 a 21, las secuencias de ASO con el diseño descrito en las Figuras 2 y 3, y la secuencia de ASO con la estructura química descrita en las Figuras 2 y 3.

[0131] Sin embargo, se reconoce que, en algunas formas de realización, la secuencia de nucleótidos del ASO puede comprender nucleótidos adicionales 5' o 3', tales como, independientemente, 1, 2, 3, 4 o 5 nucleótidos adicionales 5' y/o 3', que no son complementarios de la secuencia diana. En este sentido, el ASO de la divulgación puede, en algunas formas de realización, comprender una secuencia de nucleótidos contiguos que se flanquean en 5' y/o 3' por nucleótidos adicionales. En algunas formas de realización, los nucleótidos adicionales 5' y/o 3' son nucleótidos naturales, tales como ADN o ARN.

[0132] En algunas formas de realización, el ASO de la divulgación tiene un puntaje de secuencia mayor o igual a 0,2, en donde el puntaje de secuencia se calcula mediante la Fórmula I:

$$\frac{\# \text{ de nucleótidos C y análogos de estos} - \# \text{ de nucleótidos G y análogos de estos}}{\text{Longitud total en nucleótidos}} \quad (I)$$

[0133] En otras formas de realización, el ASO de la divulgación tiene un puntaje de secuencia mayor o igual a 0,2, en donde el puntaje de secuencia se calcula mediante la Fórmula IA:

$$\frac{\# \text{ de nucleótidos C y nucleótidos de 5-metilcitosina} - \# \text{ de nucleótidos G}}{\text{Longitud total en nucleótidos}} \quad (IA)$$

[0134] En estas formas de realización, un puntaje de secuencia mayor o igual a un valor de corte corresponde a una menor neurotoxicidad del ASO.

[0135] En algunas formas de realización, el ASO de la divulgación tiene un puntaje de secuencia mayor o igual a alrededor de 0,1, 0,2, 0,25, 0,3, 0,35, 0,4, 0,45, 0,5, 0,55, 0,6, 0,65, 0,7, 0,75, 0,8, 0,85, 0,9, 0,95 o 1,0. En una forma de realización, el ASO de la divulgación comprende una secuencia de nucleótidos contiguos que se hibrida con una región no codificante de un transcripto de SNCA, en donde el puntaje de secuencia del ASO es mayor o igual a alrededor de 0,1, 0,2, 0,25, 0,3, 0,35, 0,4, 0,45, 0,5, 0,55, 0,6,

0,65, 0,7, 0,75, 0,8, 0,85, 0,9, 0,95 o 1,0. En otra forma de realización, el ASO de la divulgación comprende una secuencia de nucleótidos contiguos que se hibrida con una región de intrón de un transcripto de *SNCA*, en donde el puntaje de secuencia del ASO es mayor o igual a alrededor de 0,1, 0,2, 0,25, 0,3, 0,35, 0,4, 0,45, 0,5, 0,55, 0,6, 0,65, 0,7, 0,75, 0,8, 0,85, 0,9, 0,95 o 1,0. En otra forma de realización, el ASO de la divulgación comprende una secuencia de nucleótidos contiguos que se hibrida con una unión exón/intrón de un transcripto de *SNCA*, en donde el puntaje de secuencia del ASO es mayor o igual a alrededor de 0,1, 0,2, 0,25, 0,3, 0,35, 0,4, 0,45, 0,5, 0,55, 0,6, 0,65, 0,7, 0,75, 0,8, 0,85, 0,9, 0,95 o 1,0. En todas estas formas de realización, se considera que cuando el puntaje de secuencia es mayor o igual al valor de corte, el ASO tiene menor neurotoxicidad.

II.C. Longitud de ASO

[0136] Los ASO pueden comprender una secuencia de nucleótidos contiguos de un total de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos contiguos de longitud.

[0137] En algunas formas de realización, los ASO comprenden una secuencia de nucleótidos contiguos de un total de alrededor de 10-22, tal como 10-21 o 12-18, tal como 13-17 o 12-16, tal como 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o 21 nucleótidos contiguos de longitud.

[0138] En algunas formas de realización, los ASO comprenden una secuencia de nucleótidos contiguos de un total de 16, 17, 18, 19 o 20 (16 a 20) nucleótidos contiguos de longitud.

[0139] En algunas formas de realización, el ASO de acuerdo con la divulgación consiste en no más de 22 nucleótidos, tal como no más de 21 o 20 nucleótidos, tal como no más de 18 nucleótidos, tal como 15, 16 o 17 nucleótidos. En algunas formas de realización, el ASO de la divulgación comprende menos de 22 nucleótidos. Debe comprenderse que cuando se determina un rango para la longitud de un ASO o secuencia de nucleótidos contiguos, el rango incluye las longitudes inferiores y superiores proporcionadas en el rango de, por ejemplo, 10-30, lo que incluye tanto 10 como 30.

II.D. Nucleósidos y análogos de nucleósidos

[0140] En un aspecto de la divulgación, los ASO comprenden uno o más análogos de nucleótidos no naturales. Como se usa en la presente, la expresión "análogos de nucleótidos" significa variantes de nucleótidos naturales, tales como nucleótidos de ADN o ARN, en virtud de las modificaciones en las porciones base y/o azúcar. En principio, los análogos podrían ser simplemente "silenciosos" o "equivalentes" a los nucleótidos

naturales en el contexto del oligonucleótido, es decir, no tienen ningún efecto funcional en la manera en que funciona el oligonucleótido para inhibir la expresión del gen diana. No obstante, tales análogos "equivalentes" pueden ser útiles si, por ejemplo, su elaboración es más fácil o económica, si son más estables a las condiciones de almacenamiento o elaboración, o si representan una etiqueta. Sin embargo, en algunas formas de realización, los análogos tienen un efecto funcional en la manera en que el ASO funciona para inhibir la expresión; por ejemplo, produciendo una mayor afinidad de unión a la diana y/o una mayor resistencia a las nucleasas intracelulares y/o una mayor facilidad de transporte hasta el interior de la célula. Los ejemplos específicos de análogos de nucleósidos están descritos, por ejemplo, por Freier & Altmann; *Nucl. Acid Res.*, 1997, 25, 4429-4443 y Uhlmann; *Curr. Opinion in Drug Development*, 2000, 3(2), 293-213, y en el Esquema 1.

II.D.1. Nucleobase

[0141] El término nucleobase incluye la porción purina (por ejemplo, adenina y guanina) y pirimidina (por ejemplo, uracilo, timina y citosina) presente en nucleósidos y nucleótidos que forman enlaces hidrógeno en la hibridación de ácido nucleico. En el contexto de la presente divulgación, el término nucleobase también comprende nucleobases modificadas que pueden diferir de nucleobases naturales, pero son funcionales durante la hibridación de ácido nucleico. En algunas formas de realización, la porción nucleobase se modifica al modificar o reemplazar la nucleobase. En este contexto, "nucleobase" se refiere a nucleobases naturales, tales como adenina, guanina, citosina, timidina, uracilo, xantina e hipoxantina, y a variantes no naturales. Tales variantes se describen, por ejemplo, en Hirao *et al.*, (2012) *Accounts of Chemical Research*, vol. 45 pág. 2055, y Bergstrom (2009) *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*, suplemento 37 1.4.1.

[0142] En algunas formas de realización, la porción nucleobase se modifica cambiando la purina o pirimidina por una purina o pirimidina modificadas, tal como purina sustituida o pirimidina sustituida, tal como una nucleobase seleccionada de isocitosina, pseudoisocitosina, 5-metil citosina, 5-tiozolo-citosina, 5-propinil-citosina, 5-propinil-uracilo, 5-bromouracil 5-tiazolo-uracilo, 2-tio-uracilo, 2'tio-timina, inosina, diaminopurina, 6-aminopurina, 2-aminopurina, 2,6-diaminopurina y 2-cloro-6-aminopurina.

[0143] Las porciones nucleobase pueden indicarse por medio del código de letra para cada nucleobase correspondiente, por ejemplo, A, T, G, C o U, en donde cada letra puede opcionalmente incluir nucleobases modificadas de función equivalente. Por ejemplo, en los oligonucleótidos de ejemplo, las porciones nucleobase se seleccionan

de A, T, G, C y 5-metil citosina. De manera opcional, en los *gapmer* de LNA, pueden usarse nucleósidos de LNA de 5-metil citosina.

II.D.2. Modificación de azúcar

[0144] El ASO de la divulgación puede comprender uno o más nucleósidos que tienen una porción azúcar modificada, es decir una modificación de la porción azúcar, en comparación con la porción azúcar ribosa hallada en el ADN y ARN. Se prepararon numerosos nucleósidos con modificación de la porción azúcar ribosa, principalmente a fin de mejorar algunas propiedades de los oligonucleótidos, tales como la afinidad y/o resistencia a la nucleasa.

[0145] Tales modificaciones incluyen aquellas en las que la estructura de anillo de ribosa está modificada, por ejemplo, por el reemplazo con un anillo de hexosa (HNA), o un anillo bicíclico, que en general tiene un puente birradical entre los carbonos C2' y C4' en el anillo de ribosa (LNA), o un anillo de ribosa no ligado, que en general carece de un enlace entre los carbonos C2' y C3' (por ejemplo, UNA). Otros nucleósidos con azúcar modificado incluyen, por ejemplo, ácidos nucleicos de biciclohexosa (WO2011/017521) o ácidos nucleicos tricíclicos (WO2013/154798). Los nucleósidos modificados también incluyen nucleósidos en donde la porción azúcar se reemplaza con una porción no azúcar, por ejemplo, en el caso de ácidos nucleicos de péptido (PNA) o ácidos nucleicos de morfolino.

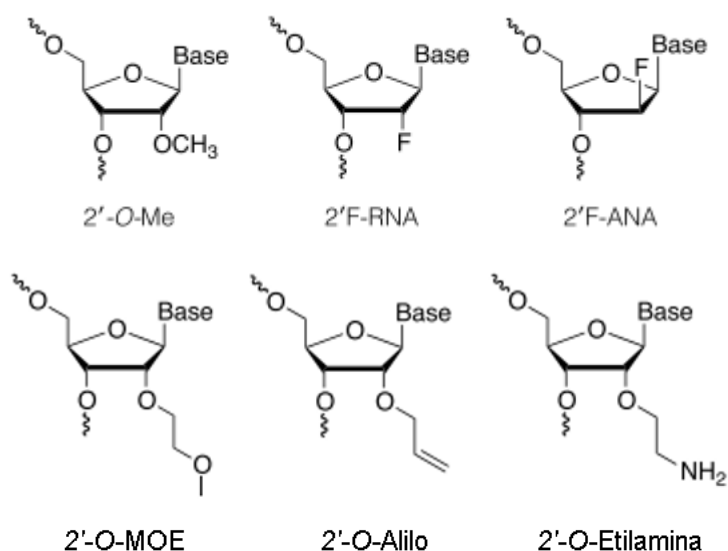
[0146] Las modificaciones de azúcar también incluyen modificaciones generadas por la alteración de los grupos sustituyentes en el anillo de ribosa por grupos distintos de hidrógeno, o el grupo 2'-OH que se encuentra naturalmente en los nucleósidos de ARN. Los sustituyentes pueden introducirse, por ejemplo, en las posiciones 2', 3', 4' o 5'. Los nucleósidos con porciones azúcar modificada también incluyen nucleósidos modificados en 2', tales como nucleósidos sustituidos en 2'. De hecho, se ha puesto énfasis en el desarrollo de nucleósidos sustituidos en 2', y se descubrió que numerosos nucleósidos sustituidos en 2' tenían propiedades beneficiosas cuando se incorporaban en oligonucleótidos, tales como mayor resistencia del nucleósido y mayor afinidad.

[0147] En algunas formas de realización, la modificación de azúcar comprende una modificación de azúcar que mejora la afinidad, por ejemplo, LNA. Una modificación de azúcar que mejora la afinidad aumenta la afinidad de unión de los ASO a la secuencia de ARN diana (por ejemplo, unión intrón1/exón2 de mRNA de SNCA). En algunas formas de realización, un ASO que comprende una modificación de azúcar divulgado en la presente tiene una afinidad de unión a una secuencia de ARN diana que aumenta en al menos 5 %, al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al

menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, o al menos 100 % en comparación con un control (por ejemplo, un ASO sin dicha modificación de azúcar).

II.D.2.a Nucleósidos modificados en 2'

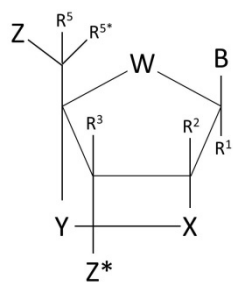
[0148] Un nucleósido con azúcar modificado en 2' es un nucleósido que tiene un sustituyente distinto de H o –OH en la posición 2' (nucleósido sustituido en 2') o comprende un birradical ligado en 2', e incluye nucleósidos sustituidos en 2' y nucleósidos de LNA (2'-4' con puente birradical). Por ejemplo, el azúcar modificada en 2' puede proporcionar al oligonucleótido mayor afinidad de unión y/o mayor resistencia a la nucleasa. Los ejemplos de nucleósidos modificados sustituidos en 2' son 2'-O-alkil-ARN, 2'-O-metil-ARN, 2'-alcoxi-ARN, 2'-O-metoxietil-ARN (MOE), 2'-amino-ADN, 2'-fluoro-ARN y 2'-F-ANA nucleósido. Para otros ejemplos ver, por ejemplo, Freier & Altmann; Nucl. Acid Res., 1997, 25, 4429-4443 y Uhlmann; Curr. Opinion in Drug Development, 2000, 3(2), 293-213, y Deleavey y Damha, Chemistry and Biology 2012, 19, 937. A continuación se ilustran algunos nucleósidos modificados sustituidos en 2'.



II.D.2.b Nucleósidos de ácido nucleico bloqueado (LNA).

[0149] Los nucleósidos de LNA son nucleósidos modificados que comprenden un grupo ligador (denominado birradical o puente) entre C2' y C4' del anillo de azúcar ribosa de un nucleótido. Estos nucleósidos también se denominan ácido nucleico con puente o ácido nucleico bicíclico (BNA) en la literatura.

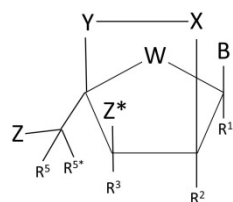
[0150] En algunas formas de realización, el nucleósido modificado o los nucleósidos de LNA del ASO de la divulgación tienen una estructura general de la Fórmula II o III:



Fórmula II

β -D

O



Fórmula III

α -L

en donde W se selecciona de -O-, -S-, -N(R^a)-, -C(R^aR^b)-, por ejemplo, en algunas formas de realización, -O-; B indica una nucleobase o porción nucleobase modificada; Z indica un enlace internucleósido a un nucleósido adyacente, o un grupo terminal 5'; Z* indica un enlace internucleósido a un nucleósido adyacente, o un grupo terminal 3'; y X indica un grupo seleccionado del grupo que consiste en -C(R^aR^b)-, -C(R^a)=C(R^b)-, -C(R^a)=N-, -O-, -Si(R^a)₂-, -S-, -SO₂-, -N(R^a)- y >C=Z.

[0151] En algunas formas de realización, X se selecciona del grupo que consiste en: -O-, -S-, NH-, NR^aR^b, -CH₂-, CR^aR^b, -C(=CH₂)- y -C(=CR^aR^b)-. En algunas formas de realización, X es -O-.

[0152] En algunas formas de realización, Y indica un grupo seleccionado del grupo que consiste en -C(R^aR^b)-, -C(R^a)=C(R^b)-, -C(R^a)=N-, -O-, -Si(R^a)₂-, -S-, -SO₂-, -N(R^a)- y >C=Z. En algunas formas de realización, Y se selecciona del grupo que consiste en: -CH₂-, -C(R^aR^b)-, -CH₂CH₂-, -C(R^aR^b)-C(R^aR^b)-, -CH₂CH₂CH₂-, -C(R^aR^b)C(R^aR^b)C(R^aR^b)-, -C(R^a)=C(R^b)- y -C(R^a)=N-.

[0153] En algunas formas de realización, Y se selecciona del grupo que consiste en: -CH₂-, -CHR^a-, -CHCH₃-, CR^aR^b- y -X-Y- juntos indican un grupo ligador bivalente (también denominado radical) juntos indican un grupo ligador bivalente que consiste en 1, 2, 3 o 4 grupos/átomos seleccionados del grupo que consiste en -C(R^aR^b)-, -C(R^a)=C(R^b)-, -C(R^a)=N-, -O-, -Si(R^a)₂-, -S-, -SO₂-, -N(R^a)- y >C=Z.

[0154] En algunas formas de realización, -X-Y indica un birradical seleccionado de los grupos que consisten en: -X-CH₂-, -X-CR^aR^b-, -X-CHR^a-, -X-C(HCH₃)-, -O-Y-, -O-CH₂-, -S-CH₂-, -NH-CH₂-, -O-CHCH₃-, -CH₂-O-CH₂-, -O-CH(CH₃CH₃)-, -O-CH₂-CH₂-, OCH₂-CH₂-CH₂-, -O-CH₂OCH₂-, -O-NCH₂-, -C(=CH₂)-CH₂-, -NR^a-CH₂-, N-O-CH₂-, -S-CR^aR^b- y -S-CHR^a-.

[0155] En algunas formas de realización, -X-Y- indica -O-CH₂- o -O-CH(CH₃)-.

[0156] En algunas formas de realización, Z se selecciona de -O-, -S- y -N(R^a)-, y R^a y, cuando está presente, R^b, se selecciona, cada uno independientemente entre sí, de hidrógeno, C₁₋₆-alquilo opcionalmente sustituido, C₂₋₆-alquenilo opcionalmente

sustituido, C₂₋₆-alquinilo opcionalmente sustituido, hidroxilo, C₁₋₆-alcoxi opcionalmente sustituido, C₂₋₆-alcoxialquilo, C₂₋₆-alqueniloxi, carboxi, C₁₋₆-alcoxycarbonilo, C₁₋₆-alquilcarbonilo, formilo, arilo, ariloxi-carbonilo, ariloxi, arilcarbonilo, heteroarilo, heteroariloxi-carbonilo, heteroariloxi, heteroarilcarbonilo, amino, mono- y di(C₁₋₆-alquil)amino, carbamoilo, mono- y di(C₁₋₆-alquil)-amino-carbonilo, amino-C₁₋₆-alquil-aminocarbonilo, mono- y di(C₁₋₆-alquil)amino-C₁₋₆-alquil-aminocarbonilo, C₁₋₆-alquil-carbonilamino, carbamido, C₁₋₆-alcanoiloxi, sulfono, C₁₋₆-alquilsulfoniloxi, nitro, azido, sulfanilo, C₁₋₆-alquiltio, halógeno, en donde arilo y heteroarilo pueden sustituirse opcionalmente, y en donde dos sustituyentes geminales R^a y R^b juntos pueden indicar metileno opcionalmente sustituido (=CH₂), en donde, en todos los centros quirales, pueden encontrarse grupos asimétricos en orientación *R* o *S*.

[0157] En algunas formas de realización, R¹, R², R³, R⁵ y R^{5*} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en: hidrógeno, C₁₋₆-alquilo opcionalmente sustituido, C₂₋₆-alquenilo opcionalmente sustituido, C₂₋₆-alquinilo opcionalmente sustituido, hidroxilo, C₁₋₆-alcoxi, C₂₋₆-alcoxialquilo, C₂₋₆-alqueniloxi, carboxi, C₁₋₆-alcoxycarbonilo, C₁₋₆-alquilcarbonilo, formilo, arilo, ariloxi-carbonilo, ariloxi, arilcarbonilo, heteroarilo, heteroariloxi-carbonilo, heteroariloxi, heteroarilcarbonilo, amino, mono- y di(C₁₋₆-alquil)amino, carbamoilo, mono- y di(C₁₋₆-alquil)-amino-carbonilo, amino-C₁₋₆-alquil-aminocarbonilo, mono- y di(C₁₋₆-alquil)amino-C₁₋₆-alquil-aminocarbonilo, C₁₋₆-alquil-carbonilamino, carbamido, C₁₋₆-alcanoiloxi, sulfono, C₁₋₆-alquilsulfoniloxi, nitro, azido, sulfanilo, C₁₋₆-alquiltio y halógeno, en donde arilo y heteroarilo pueden sustituirse opcionalmente, y en donde dos sustituyentes geminales juntos pueden indicar oxo, tioxo, imino o metileno opcionalmente sustituido.

[0158] En algunas formas de realización, R¹, R², R³, R⁵ y R^{5*} se seleccionan independientemente de C₁₋₆ alquilo, tal como metilo e hidrógeno.

[0159] En algunas formas de realización, R¹, R², R³, R⁵ y R^{5*} son todos hidrógeno.

[0160] En algunas formas de realización, R¹, R², R³, son todos hidrógeno, y uno de R⁵ y R^{5*} también es hidrógeno y el otro de R⁵ y R^{5*} es distinto de hidrógeno, tal como C₁₋₆ alquilo, tal como metilo.

[0161] En algunas formas de realización, R^a es hidrógeno o metilo. En algunas formas de realización, cuando está presente, R^b es hidrógeno o metilo.

[0162] En algunas formas de realización, uno o ambos de R^a y R^b son hidrógeno.

[0163] En algunas formas de realización, uno de R^a y R^b es hidrógeno y el otro es distinto de hidrógeno.

[0164] En algunas formas de realización, uno de R^a y R^b es metilo y el otro es hidrógeno.

[0165] En algunas formas de realización, R^a y R^b son metilo.

[0166] En algunas formas de realización, el birradical $-X-Y-$ es $-O-CH_2-$, W es O , y R^1 , R^2 , R^3 , R^5 y R^{5*} son todos hidrógeno. Los nucleósidos de LNA de este tipo se divulgan en WO99/014226, WO00/66604, WO98/039352 y WO2004/046160 que se incorporan en la presente por referencia en su totalidad, e incluyen lo que usualmente se denomina nucleósidos de beta-D-oxi LNA y de alfa-L-oxi LNA.

[0167] En algunas formas de realización, el birradical $-X-Y-$ es $-S-CH_2-$, W es O , y R^1 , R^2 , R^3 , R^5 y R^{5*} son todos hidrógeno. Los nucleósidos de tio LNA de este tipo se divulgan en WO99/014226 y WO2004/046160.

[0168] En algunas formas de realización, el birradical $-X-Y-$ es $-NH-CH_2-$, W es O , y R^1 , R^2 , R^3 , R^5 y R^{5*} son todos hidrógeno. Los nucleósidos de amino LNA de este tipo se divulgan en WO99/014226 y WO2004/046160.

[0169] En algunas formas de realización, el birradical $-X-Y-$ es $-O-CH_2-CH_2-$ o $-O-CH_2-CH_2-CH_2-$, W es O , y R^1 , R^2 , R^3 , R^5 y R^{5*} son todos hidrógeno. Los nucleósidos de LNA de este tipo se divulgan en WO00/047599 y Morita *et al.*, *Bioorganic & Med.Chem. Lett.* 12 73-76, que se incorporan en la presente por referencia, e incluyen lo que usualmente se denomina ácidos nucleicos con puente de 2'-O-4'-C-etileno (ENA).

[0170] En algunas formas de realización, el birradical $-X-Y-$ es $-O-CH_2-$, W es O , y todos de R^1 , R^2 , R^3 y uno de R^5 y R^{5*} son hidrógeno, y el otro de R^5 y R^{5*} es distinto de hidrógeno, tal como C_{1-6} alquilo, tal como metilo. Los nucleósidos de LNA sustituidos en 5' de este tipo se divulgan en WO2007/134181.

[0171] En algunas formas de realización, el birradical $-X-Y-$ es $-O-CR^aR^b-$, en donde uno o ambos de R^a y R^b son distintos de hidrógeno, tal como metilo, W es O , y todos de R^1 , R^2 , R^3 , y uno de R^5 y R^{5*} son hidrógeno, y el otro de R^5 y R^{5*} es distinto de hidrógeno, tal como C_{1-6} alquilo, tal como metilo. Tales nucleósidos de LNA modificados en bis se divulgan en WO2010/077578.

[0172] En algunas formas de realización, el birradical $-X-Y-$ indican el grupo ligador bivalente $-O-CH(CH_2OCH_3)-$ (ácido 2' O-metoxietil nucleico bicíclico, Seth *at al.*, 2010, *J. Org. Chem.* Vol. 75(5) pp. 1569-81). En algunas formas de realización, el birradical $-X-Y-$ indica el grupo ligador bivalente $-O-CH(CH_2CH_3)-$ (ácido 2'O-etil nucleico bicíclico, Seth *at al.*, 2010, *J. Org. Chem.* Vol. 75(5) pp. 1569-81). En algunas formas de realización, el birradical $-X-Y-$ es $-O-CHR^a-$, W es O , y R^1 , R^2 , R^3 , R^5 y R^{5*} son todos hidrógeno. Los nucleósidos de LNA sustituidos en 6' de este tipo se divulgan en WO10036698 y WO07090071.

[0173] En algunas formas de realización, el birradical $-X-Y-$ es $-O-CH(CH_2OCH_3)-$, W

es O, y R^1 , R^2 , R^3 , R^5 y R^{5*} son todos hidrógeno. Tales nucleósidos de LNA también se denominan MOE cíclicos en el estado de la técnica (cMOE) y se divulgan en WO07090071.

[0174] En algunas formas de realización, el birradical $-X-Y-$ indica el grupo ligador bivalente $-O-CH(CH_3)-$ en la configuración R o S. En algunas formas de realización, el birradical $-X-Y-$ en conjunto indica el grupo ligador bivalente $-O-CH_2-O-CH_2-$ (Seth *et al.*, 2010, *J. Org. Chem*). En algunas formas de realización, el birradical $-X-Y-$ es $-O-CH(CH_3)-$, W es O, y R^1 , R^2 , R^3 , R^5 y R^{5*} son todos hidrógeno. Tales nucleósidos de metilo LNA 6' también se denominan nucleósidos de cET en el estado de la técnica, y pueden ser estereoisómeros (S)cET o (R)cET, como se divulga en WO07090071 (beta-D) y WO2010/036698 (alfa-L)).

[0175] En algunas formas de realización, el birradical $-X-Y-$ es $-O-CR^aR^b-$, en donde ni R^a ni R^b es hidrógeno, W es O, y R^1 , R^2 , R^3 , R^5 y R^{5*} son todos hidrógeno. En algunas formas de realización, R^a y R^b son metilo. Los nucleósidos de LNA di-sustituídos en 6' de este tipo se divulgan en WO 2009006478.

[0176] En algunas formas de realización, el birradical $-X-Y-$ es $-S-CHR^a-$, W es O, y R^1 , R^2 , R^3 , R^5 y R^{5*} son todos hidrógeno. Los nucleósidos de tio LNA sustituidos en 6' de este tipo se divulgan en WO11156202. En algunas formas de realización de tio LNA sustituido en 6', R^a es metilo.

[0177] En algunas formas de realización, el birradical $-X-Y-$ es $-C(=CH_2)-C(R^aR^b)-$, tal como $-C(=CH_2)-CH_2-$ o $-C(=CH_2)-CH(CH_3)-$, W es O, y R^1 , R^2 , R^3 , R^5 y R^{5*} son todos hidrógeno. Tales nucleósidos de vinil carbo LNA se divulgan en WO08154401 y WO09067647.

[0178] En algunas formas de realización, el birradical $-X-Y-$ es $-N(-OR^a)-$, W es O, y R^1 , R^2 , R^3 , R^5 y R^{5*} son todos hidrógeno. En algunas formas de realización, R^a es C_{1-6} alquilo, tal como metilo. Tales nucleósidos de LNA también se denominan LNA N-sustituídos y se divulgan en WO2008/150729. En algunas formas de realización, el birradical $-X-Y-$ en conjunto indica el grupo ligador bivalente $-O-NR^a-CH_3-$ (Seth *et al.*, 2010, *J. Org. Chem*). En algunas formas de realización, el birradical $-X-Y-$ es $-N(R^a)-$, W es O, y R^1 , R^2 , R^3 , R^5 y R^{5*} son todos hidrógeno. En algunas formas de realización, R^a es C_{1-6} alquilo, tal como metilo.

[0179] En algunas formas de realización, uno o ambos de R^5 y R^{5*} es hidrógeno y, cuando está sustituido, el otro de R^5 y R^{5*} es C_{1-6} alquilo, tal como metilo. En dicha forma de realización, R^1 , R^2 , R^3 , pueden ser todos hidrógeno, y el birradical $-X-Y-$ puede seleccionarse de $-O-CH_2-$ o $-O-CH(CR^a)-$, tal como $-O-CH(CH_3)-$.

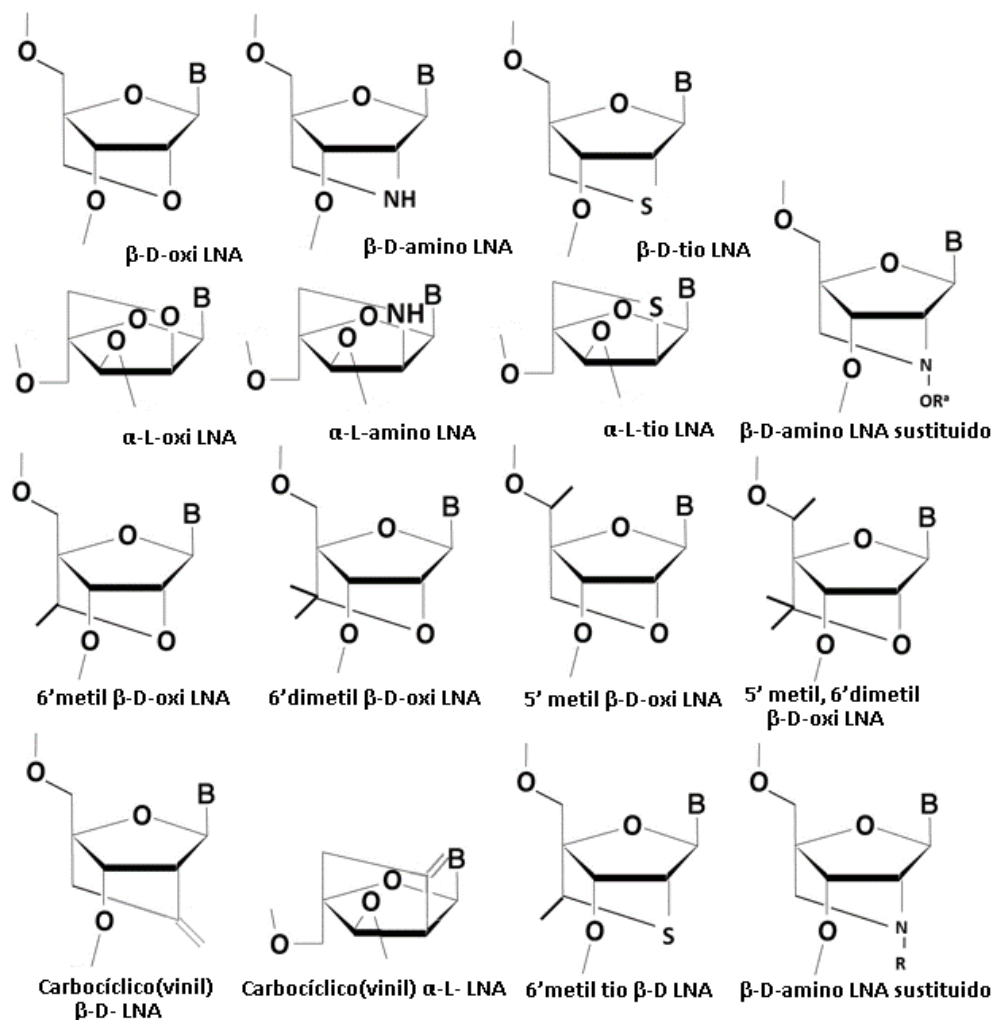
[0180] En algunas formas de realización, el birradical es $-\text{CR}^{\text{a}}\text{R}^{\text{b}}-\text{O}-\text{CR}^{\text{a}}\text{R}^{\text{b}}-$, tal como $\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$, W es O, y $\text{R}^1, \text{R}^2, \text{R}^3, \text{R}^5$ y R^{5*} son todos hidrógeno. En algunas formas de realización, R^{a} es C_{1-6} alquilo, tal como metilo. Tales nucleósidos de LNA también se denominan nucleótidos conformacionalmente restringidos (CRN) y se divulgan en WO2013036868.

[0181] En algunas formas de realización, el birradical es $-\text{O}-\text{CR}^{\text{a}}\text{R}^{\text{b}}-\text{O}-\text{CR}^{\text{a}}\text{R}^{\text{b}}-$, tal como $\text{O}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$, W es O, y $\text{R}^1, \text{R}^2, \text{R}^3, \text{R}^5$ y R^{5*} son todos hidrógeno. En algunas formas de realización, R^{a} es C_{1-6} alquilo, tal como metilo. Tales nucleósidos de LNA también se denominan nucleótidos COC y se divulgan en Mitsuoka *et al.*, *Nucleic Acids Research* 2009 37(4), 1225-1238.

[0182] Cabe destacar que, a menos que se especifique lo contrario, los nucleósidos de LNA pueden estar en estereoisofoma beta-D o alfa-L.

[0183] Algunos ejemplos de nucleósidos de LNA se presentan en el Esquema 1.

Esquema 1



[0184] Como se ilustra en los ejemplos, en algunas formas de realización de la divulgación, los nucleósidos de LNA en los oligonucleótidos son nucleósidos de beta-D-oxi-LNA.

II.E. Degradación mediada por nucleasa

[0185] La degradación mediada por nucleasa se refiere a un oligonucleótido que puede mediar en la degradación de una secuencia de nucleótidos complementaria durante la formación de un dúplex con dicha secuencia.

[0186] En algunas formas de realización, el oligonucleótido puede funcionar a través de la degradación mediada por nucleasa del ácido nucleico diana, en donde los oligonucleótidos de la divulgación pueden reclutar una nucleasa, en particular, y endonucleasa, preferentemente, endorribonucleasa (RNasa), tal como RNasa H. Los ejemplos de diseños de oligonucleótido que funcionan a través de mecanismos mediados por nucleasa son los oligonucleótidos que en general comprenden una región de al menos 5 o 6 nucleósidos de ADN y están flanqueados en un lateral o en ambos por nucleósidos que mejoran la afinidad, por ejemplo, los *gapmer*.

II.F. Reclutamiento y actividad de RNasa H

[0187] La actividad de RNasa H de un oligonucleótido antisentido se refiere a su capacidad para reclutar RNasa H cuando se encuentra en un dúplex con una molécula de ARN complementario, e inducir la escisión y posterior degradación de la molécula de ARN complementario. WO01/23613 proporciona métodos *in vitro* para determinar la actividad de RNasa H, que pueden usarse para determinar la capacidad para reclutar RNasa H. Por lo general, se considera que un oligonucleótido es capaz de reclutar RNasa H si, cuando se le proporciona una secuencia de ácido nucleico diana complementario, tiene una velocidad inicial, medida en pmol//min, de al menos 5 %, tal como al menos 10 % o más de 20 % de la velocidad inicial determinada usando un oligonucleótido con la misma secuencia base que el oligonucleótido modificado que se evalúa, pero que contiene solo monómeros de ADN, con enlaces de fosforotioato entre todos los monómeros en el oligonucleótido, y usando la metodología proporcionada en los Ejemplos 91-95 de WO01/23613.

[0188] En algunas formas de realización, se considera que un oligonucleótido es esencialmente incapaz de reclutar RNasaH si, cuando se le proporciona el ácido nucleico diana complementario, la velocidad inicial de RNasaH, medida en pmol//min, es menor de 20 %, tal como menor de 10 %, tal como menor de 5 % de la velocidad inicial determinada usando un oligonucleótido con la misma secuencia base que el oligonucleótido que se evalúa, pero que contiene solo monómeros de ADN, sin

sustituciones en 2', con enlaces de fosforotioato entre todos los monómeros en el oligonucleótido, y usando la metodología proporcionada en los Ejemplos 91-95 de WO01/23613.

II.G. Diseño de ASO

[0189] El ASO de la divulgación puede comprender una secuencia de nucleótidos que comprende nucleótidos y análogos de nucleótidos, y puede ser en forma de un *gapmer*. Los ejemplos de configuraciones de un *gapmer* que se puede usar con el ASO de la divulgación se describen en la publicación de solicitud de patente estadounidense N.º 2012/0322851.

[0190] Como se usa en la presente, el término *gapmer* se refiere a un oligonucleótido antisentido que comprende una región de oligonucleótidos que reclutan RNasa H (espacio) cuando se flanquea en 5' y 3' por uno o más nucleósidos modificados que mejoran la afinidad (flancos). En la presente se describen varios diseños de *gapmer*. La expresión *gapmer* de LNA se refiere a un oligonucleótido de *gapmer* en donde al menos uno de los nucleósidos que mejoran la afinidad modificados es un nucleósido de LNA. La expresión *gapmer* de sección mixta se refiere a un *gapmer* de LNA en donde las regiones flanqueantes comprenden al menos un nucleósido de LNA y al menos un nucleósido de ADN o nucleósido de LNA no modificado, tal como al menos un nucleósido modificado sustituido en 2', por ejemplo, nucleósidos de 2'-O-alkil-ARN, 2'-O-metil-ARN, 2'-alcoxi-ARN, 2'-O-metoxietil-ARN (MOE), 2'-amino-ADN, 2'-fluoro-ARN y 2'-F-ANA. En algunas formas de realización, el *gapmer* de sección mixta tiene un flanco que comprende nucleósidos de LNA (por ejemplo, 5' o 3') y el otro flanco (3' o 5' respectivamente) comprende nucleósidos modificados sustituidos en 2'.

[0191] En algunas formas de realización, además de mejorar la afinidad del ASO para la región diana, algunos análogos de nucleósidos también median la unión y la escisión de RNasa (por ejemplo, RNasaH).

II.G.1. Diseño de *gapmer*

[0192] En una forma de realización, el ASO de la divulgación es un *gapmer*. Un ASO *gapmer* es un ASO que comprende una porción contigua de nucleótidos que puede reclutar una RNasa, tal como RNasaH, por ejemplo, una región de al menos 6 nucleótidos de ADN, denominados en la presente región B (B), en donde la región B está flanqueada en 5' y 3' por las regiones de análogos de nucleótidos mejoradores de la afinidad, tal como de 1-10 análogos de nucleótidos en 5' y 3' con respecto a la porción contigua de nucleótidos que puede reclutar RNasa, estas regiones se denominan regiones A (A) y C (C), respectivamente.

[0193] En algunas formas de realización, el *gapmer* es un *gapmer* de flanqueo alterno, cuyos ejemplos se analizan más adelante. En algunas formas de realización, el *gapmer* de flanqueo alterno exhibe menos unión inespecífica que un *gapmer* tradicional. En algunas formas de realización, el *gapmer* de flanqueo alterno tiene mejor tolerabilidad a largo plazo que un *gapmer* tradicional.

[0194] Un *gapmer* de flanqueo alterno puede comprender una secuencia de (poli)nucleótidos de la Fórmula (5' a 3'), A-B-C, en donde: la región A (A) (región 5' o una secuencia de la primera sección) comprende al menos un análogo de nucleótido, por ejemplo, al menos una unidad de LNA, tal como de 1-10 análogos de nucleótidos, tal como unidades de LNA, y; la región B (B) comprende al menos seis nucleótidos consecutivos que pueden reclutar RNasa (cuando se forma en un dúplex con una molécula de ARN complementario, tal como pre-mARN o mARN diana), tal como nucleótidos de ADN, y; la región C (C) (región 3' o una secuencia de la segunda sección) comprende al menos un análogo de nucleótido, por ejemplo, al menos una unidad de LNA, tal como de 1-10 análogos de nucleótidos, tales como unidades de LNA; en donde las regiones A y C pueden incluir en cualquier posición en A y C 1-3 inserciones de las regiones de nucleótidos de ADN (por ejemplo, inserciones de ADN), en donde estas inserciones de ADN pueden tener, cada una, 1-6 unidades de ADN de longitud.

[0195] En algunas formas de realización, el *gapmer*, por ejemplo, un *gapmer* de flanqueo alterno, comprende una secuencia de (poli)nucleótidos de la Fórmula (5' a 3'), A-B-C, u opcionalmente, A-B-C-D o D-A-B-C, en donde: la región A (A) (región 5') comprende al menos un análogo de nucleótido, por ejemplo, al menos una unidad de LNA, tal como de 1-10 análogos de nucleótidos, tales como unidades de LNA, y; la región B (B) comprende al menos cinco nucleótidos consecutivos que pueden reclutar RNasa (cuando se forma en un dúplex con una molécula de ARN complementario, tal como mARN diana), tal como nucleótidos de ADN, y; la región C (C) (región 3') comprende al menos un análogo de nucleótido, por ejemplo, al menos una unidad de LNA, tal como de 1-10 análogos de nucleótidos, tales como unidades de LNA, y; la región D (D), cuando está presente, comprende 1, 2 o 3 unidades de nucleótidos, tales como nucleótidos de ADN.

[0196] En algunas formas de realización, la región A comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 análogos de nucleótidos, tales como unidades de LNA, tales como 2-5 análogos de nucleótidos, tales como 2-5 unidades de LNA, tales como 2-5 análogos de nucleótidos, tales como 3-5 unidades de LNA; y/o la región C consiste en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 análogos de nucleótidos, tales como unidades de LNA, tales como de 2-

5 análogos de nucleótidos, tales como 2-5 unidades de LNA, tales como 2-5 análogos de nucleótidos, tales como 3-5 unidades de LNA.

[0197] En algunas formas de realización, B comprende 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 o 23 nucleótidos consecutivos que pueden reclutar RNasa, o de 6-14, 7-14, 8-14, o de 7-10, o de 7-9, tal como 8, tal como 9, tal como 10 o tal como 14 nucleótidos consecutivos que son capaces de reclutar RNasa. En algunas formas de realización, la región B comprende al menos 5 unidades de nucleótidos de ADN, tales como 5-23 unidades de ADN, tales como 5-20 unidades de ADN, tales como 5-18 unidades de ADN, tales como 6-14 unidades de ADN, tales como 8-14 unidades de ADN, tales como 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 unidades de ADN.

[0198] En algunas formas de realización, la región A comprende 3, 4 o 5 análogos de nucleótidos, tales como LNA; la región B consiste en 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 unidades de ADN, y la región C consiste en 3, 4 o 5 análogos de nucleótidos, tales como LNA. Tales diseños incluyen (A-B-C) 5-10-5, 3-14-3, 3-10-3, 3-10-4, 4-10-3, 3-9-3, 3-9-4, 4-9-3, 3-8-3, 3-8-4, 4-8-3, 3-7-3, 3-7-4 y 4-7-3 y también pueden incluir la región D, que pueden tener de 1 a 3 unidades de nucleótidos, tales como unidades de ADN.

[0199] En algunas formas de realización, el ASO de la divulgación, por ejemplo, un *gapmer* de flaqueo alterno, comprende la Fórmula de 5'-A-B-C-3', en donde

(i) la región B es una secuencia contigua de al menos 5, 6, 7, 8, 9 o 10, por ejemplo, 5 a 18 unidades de ADN, que pueden reclutar RNasa;

(ii) la región A es una secuencia de la primera sección de 1 a 10 nucleótidos, en donde la secuencia de la primera sección comprende uno o más análogos de nucleótidos y, opcionalmente, una o más unidades de ADN (por ejemplo, inserción de ADN), y en donde al menos uno de los análogos de nucleótidos se ubica en el extremo 3' de A; y

(iii) la región C es una secuencia de la segunda sección de 1 a 10 nucleótidos, en donde la secuencia de la segunda sección comprende uno o más análogos de nucleótidos y, opcionalmente, una o más unidades de ADN (por ejemplo, inserción de ADN), y en donde al menos uno de los análogos de nucleótidos se ubica en el extremo 5' de C.

[0200] En algunas formas de realización, la secuencia de la primera sección (la región A en la fórmula) comprende una combinación de análogos de nucleótidos y unidades de ADN seleccionados de (i) 1-10 análogos de nucleótidos y 0 unidades de ADN; (ii) 1-9 análogos de nucleótidos y 1 unidad de ADN; (iii) 1-8 análogos de nucleótidos y 1-2 unidades de ADN; (iv) 1-7 análogos de nucleótidos y 1-3 unidades de ADN; (v) 1-6

análogos de nucleótidos y 1-4 unidades de ADN; (vi) 1-5 análogos de nucleótidos y 1-5 unidades de ADN; (vii) 1-4 análogos de nucleótidos y 1-6 unidades de ADN; (viii) 1-3 análogos de nucleótidos y 1-7 unidades de ADN; (ix) 1-2 análogos de nucleótidos y 1-8 unidades de ADN; (x) 1 análogo de nucleótido y 1-9 unidades de ADN.

[0201] En algunas formas de realización, la secuencia de la segunda sección (la región C en la fórmula) comprende una combinación de análogos de nucleótidos y unidad de ADN seleccionados de (i) 1-10 análogos de nucleótidos y 0 unidades de ADN; (ii) 1-9 análogos de nucleótidos y 1 unidad de ADN; (iii) 1-8 análogos de nucleótidos y 1-2 unidades de ADN; (iv) 1-7 análogos de nucleótidos y 1-3 unidades de ADN; (v) 1-6 análogos de nucleótidos y 1-4 unidades de ADN; (vi) 1-5 análogos de nucleótidos y 1-5 unidades de ADN; (vii) 1-4 análogos de nucleótidos y 1-6 unidades de ADN; (viii) 1-3 análogos de nucleótidos y 1-7 unidades de ADN; (ix) 1-2 análogos de nucleótidos y 1-8 unidades de ADN; (x) 1 análogo de nucleótido y 1-9 unidades de ADN.

[0202] En algunas formas de realización, la región A en la fórmula de ASO tiene una subfórmula seleccionada del diseño de primera sección de cualquier ASO en las Figuras 2 y 3, y/o la región C en la fórmula de ASO tiene una subfórmula seleccionada del diseño de segunda sección de cualquier ASO en las Figuras 2 y 3, en donde la letra mayúscula es un análogo de nucleótido (por ejemplo, análogo con azúcar modificada, que también se puede escribir como L) y la letra minúscula es ADN (que también se puede escribir como D).

[0203] En algunas formas de realización, el ASO, por ejemplo, un *gapmer* de flanqueo alterno, tiene la Fórmula de 5' A-B-C 3', en donde la región B es una secuencia contigua de 5 a 18 unidades de ADN, la región A tiene una Fórmula de LLDLL, LDLLL o LLLDL, y la región C tiene una Fórmula de LLDLL o LDLDLL, y en donde L es una unidad de LNA y D es una unidad de ADN.

[0204] En algunas formas de realización, el ASO tiene la Fórmula de 5' A-B-C 3', en donde la región B es una secuencia contigua de 10 unidades de ADN, la región A tiene la Fórmula de LDL, y la región C tiene la Fórmula de LLLL, en donde L es una unidad de LNA y D es una unidad de ADN.

[0205] Otros diseños de *gapmer* se divulgan en WO2004/046160, que se incorpora en la presente por referencia en su totalidad. WO2008/113832, incorporada en la presente por referencia en su totalidad, se refiere a ASO *gapmer* 'shortmer'. En algunas formas de realización, los ASO presentados en la presente pueden ser tales *gapmer shortmer*.

[0206] En algunas formas de realización, el ASO, por ejemplo, un *gapmer* de flanqueo alterno, comprende una secuencia de nucleótidos contiguos de un total de 10, 11, 12,

13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 unidades de nucleótidos, en donde la secuencia de nucleótidos contiguos es de la Fórmula (5' – 3'), A-B-C, u opcionalmente A-B-C-D o D-A-B-C, en donde; la región A consiste en 1, 2, 3, 4 o 5 análogos de unidades de nucleótidos, tales como unidades de LNA; la región B consiste en 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 unidades de nucleótidos contiguos que pueden reclutar RNasa cuando se forma en un dúplex con una molécula de ARN complementario (tal como un mRNA diana); y la región C consiste en 1, 2, 3, 4 o 5 análogos de unidades de nucleótidos, tales como unidades de LNA. Cuando está presente, la región D consiste en una única unidad de ADN.

[0207] En algunas formas de realización, A comprende 1 unidad de LNA. En algunas formas de realización, la región A comprende 2 unidades de LNA. En algunas formas de realización, la región A comprende 3 unidades de LNA. En algunas formas de realización, la región A comprende 4 unidades de LNA. En algunas formas de realización, la región A comprende 5 unidades de LNA. En algunas formas de realización, la región C comprende 1 unidad de LNA. En algunas formas de realización, C comprende 2 unidades de LNA. En algunas formas de realización, la región C comprende 3 unidades de LNA. En algunas formas de realización, la región C comprende 4 unidades de LNA. En algunas formas de realización, la región C comprende 5 unidades de LNA. En algunas formas de realización, la región B comprende 6 unidades de nucleótidos. En algunas formas de realización, la región B comprende 7 unidades de nucleótidos. En algunas formas de realización, la región B comprende 8 unidades de nucleótidos. En algunas formas de realización, la región B comprende 9 unidades de nucleótidos. En algunas formas de realización, la región B comprende 10 unidades de nucleósidos. En algunas formas de realización, la región B comprende 11 unidades de nucleósidos. En algunas formas de realización, la región B comprende 12 unidades de nucleósidos. En algunas formas de realización, la región B comprende 13 unidades de nucleósidos. En algunas formas de realización, la región B comprende 14 unidades de nucleósidos. En algunas formas de realización, la región B comprende 7-23 monómeros de ADN o 5-18 monómeros de ADN. En algunas formas de realización, la región B comprende 6-23 unidades de ADN, por ejemplo, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 o 23 unidades de ADN. En algunas formas de realización, la región B consiste en unidades de ADN. En algunas formas de realización, la región B comprende al menos una unidad de LNA que está en la configuración alfa-L, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 o 23 unidades de LNA en la configuración alfa-L. En algunas formas de

realización, la región B comprende al menos una unidad de alfa-L-oxi LNA o en donde todas las unidades de LNA en la configuración alfa-L son unidades de alfa-L-oxi LNA. En algunas formas de realización, la cantidad de nucleótidos presentes en A-B-C se selecciona de (unidades de análogos de nucleótidos – región B – unidades de análogos de nucleótidos): 1-8-1, 1-8-2, 2-8-1, 2-8-2, 3-8-3, 2-8-3, 3-8-2, 4-8-1, 4-8-2, 1-8-4, 2-8-4 o; 1-9-1, 1-9-2, 2-9-1, 2-9-2, 2-9-3, 3-9-2, 1-9-3, 3-9-1, 4-9-1, 1-9-4 o; 1-10-1, 1-10-2, 2-10-1, 2-10-2, 1-10-3 y 3-10-1. En algunas formas de realización, la cantidad de nucleótidos en A-B-C se selecciona de: 2-7-1, 1-7-2, 2-7-2, 3-7-3, 2-7-3, 3-7-2, 3-7-4 y 4-7-3. En otras formas de realización, el ASO contiene 10 unidades de ADN en B, LDLLL en A (primera sección) y LLDLL en C (segunda sección). Aun en otras formas de realización, el ASO contiene 9 unidades de ADN en B, LDDLL en A y LDLDLL en C. Aun en otras formas de realización, el ASO contiene 10 unidades de ADN en B, LLDLL en A y LLDLL en C. En formas de realización adicionales, el ASO contiene 9 unidades de ADN en B, LLLLL en A y LDDLL en C. En algunas formas de realización, cada una de las regiones A y C comprende tres monómeros de LNA, y la región B consiste en 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 monómeros de nucleósidos, por ejemplo, monómeros de ADN. En algunas formas de realización, A y C consisten en dos unidades de LNA cada una, y B consiste en 7, 8 o 9 unidades de nucleótidos, por ejemplo, unidades de ADN. En diversas formas de realización, otros diseños de *gapmer* incluyen aquellos donde las regiones A y/o C consisten en 3, 4, 5 o 6 análogos de nucleósidos, tales como monómeros que contienen una azúcar 2'-O-metoxietil-ribosa (2'-MOE) o monómeros que contienen una azúcar 2'-fluoro-desoxirribosa, y la región B consiste en 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 o 23 nucleósidos, tales como monómeros de ADN, en donde las regiones A-B-C tienen 3-8-3, 3-9-3, 3-10-3, 5-10-5 o 4-12-4 monómeros. Otros diseños de *gapmer* se describen en WO 2007/146511A2, que se incorpora en la presente por referencia en su totalidad.

[0208] En algunas formas de realización, el ASO de flanqueo alterno tiene al menos 10 nucleótidos contiguos, que comprenden la región A, región B y región C (A-B-C), en donde la región B comprende al menos 5 unidades de nucleósidos consecutivos y está flanqueada en 5' por la región A de 1-8 unidades de nucleósidos contiguos y en 3' por la región C de 1-8 unidades de nucleósidos contiguos, en donde la región B, cuando se forma en un dúplex con un ARN complementario, es capaz de reclutar RNasaH, y en donde la región A y la región C se seleccionan del grupo que consiste en:

(i) la región A comprende una unidad de 5' nucleósido de LNA y una unidad de 3' nucleósido de LNA, y al menos una unidad de nucleósido de ADN entre la unidad de

(ii) la región A comprende al menos un 5' nucleósido de LNA, y la región C comprende una unidad de 5' nucleósido de LNA, al menos dos unidades de 3' nucleósido de LNA del terminal, y al menos una unidad de nucleósido de ADN entre la unidad de 5' nucleósido de LNA y las unidades de 3' nucleósido LNA, y

[0209] En algunas formas de realización, la región A o la región C comprenden 1, 2 o 3 unidades de nucleósidos de ADN. En otras formas de realización, la región A y la región C comprenden 1, 2 o 3 unidades de nucleósidos de ADN. Aun en otras formas de realización, la región B comprende al menos cinco unidades de nucleósidos de ADN consecutivos. En algunas formas de realización, la región B comprende 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 unidades de nucleósidos de ADN consecutivos. En algunas formas de realización, la región B tiene 8, 9, 10, 11 o 12 nucleótidos de longitud. En otras formas de realización, la región A comprende dos unidades de nucleósidos de LNA del terminal 5'. En algunas formas de realización, la región A tiene la fórmula 5'[LNA]₁₋₃[ADN]₁₋₃[LNA]₁₋₃ o 5'[LNA]₁₋₂[ADN]₁₋₂[LNA]₁₋₂[ADN]₁₋₂[LNA]₁₋₂. En otras formas de realización, la región C tiene la fórmula [LNA]₁₋₃[ADN]₁₋₃[LNA]₂₋₃ 3', o [LNA]₁₋₂[ADN]₁₋₂[LNA]₁₋₂[ADN]₁₋₂[LNA]₂₋₃3'. Aun en otras formas de realización, la región A tiene la fórmula 5'[LNA]₁₋₃[ADN]₁₋₃[LNA]₁₋₃ o 5'[LNA]₁₋₂[ADN]₁₋₂[LNA]₁₋₂[ADN]₁₋₂[LNA]₁₋₂, y la región C comprende 2, 3, 4 o 5 unidades de nucleósidos de LNA consecutivos. En algunas formas de realización, la región C tiene la fórmula [LNA]₁₋₃[ADN]₁₋₃[LNA]₂₋₃3' o [LNA]₁₋₂[ADN]₁₋₂[LNA]₁₋₂[ADN]₁₋₂[LNA]₂₋₃3', y la región A comprende 1, 2, 3, 4 o 5 unidades de nucleósidos de LNA consecutivos. Aun en otras formas de realización, la región A tiene una secuencia de nucleósidos de LNA y ADN, 5' – 3', seleccionada del grupo que consiste en L, LL, LDL, LLL, LLDL, LDLL, LDDL, LLLL, LLLLL, LLLDL, LLDLL, LDLLL, LLDDL, LDDL, LLDLD, LDLLD, LDDDL, LLLLLL, LLLLDL, LLLDLL, LLDLLL, LDLLLL, LLLDDL, LLDLDL, LLDDL, LDDL, LDLDL, LDDDL, LLDDL y LDLDL, en donde L representa un nucleósido de LNA, y D representa un nucleósido de ADN. Aun en otras formas de realización, la región C tiene una secuencia de nucleósidos de

[0210] En algunas formas de realización, el ASO de flanqueo alterno tiene nucleótidos contiguos que comprenden una secuencia de nucleósidos, 5'–3', seleccionada del grupo que consiste en

LDLDDDDDDDDDDLLLL,	LLDDDLDDDDDDDDLL,
LDLLDLDDDDDDDDLL,	LLLDDDDDDDDDLDDL,
LLLDDDDDDDDDLDDLL,	LLLDDDDDDDDLDDL,
LLLDLDDDDDDDDLDDL,	LLLLDDDDDDDDLDDL,
LLLDDDLDDDDDDDDLL,	LLDDDLDDDDDDDDLL,
LLLDLDDDDDDDDLLL,	LLLLLDDDDDDDDLDDL,
LDLLLDDDDDDDDLDDL,	LDLLLDDDDDDDDDL,
LLLDLDDDDDDDDDDLL,	LLLDLDDDDDDDDLDDL,
LLLLDDDDDDDDLDDLL,	LDDLDDDDDDDDDLDDL,
LLLLLDDDDDDDDDDLDDL,	LLLDDDDDDDDDDLDDL,
LDLDDDDDDDDDDDDLDDL,	LDLLLDDDDDDDDDDLDDL,
LLLDDDDDDDDDDLDDLL,	LLLDDDDDDDDLDDL,
LLLLDDDDDDDDDDLDDL,	LLLLDDDDDDDDLDDL,
LLLLDDDDDDDDLDDL,	LLLLDDDDDDDDLDDL,
LLDLLDDDDDDDDDDDL,	LLDLLDDDDDDDDDDL,
LLLDLDDDDDDDDDDLDDL,	LLLDLDDDDDDDDLDDL,
LLLLDDDDDDDDLDDL,	LLLLLDDDDDDDDLDDL,
LLLLDDDDDDDDDDLDDL,	LLLLDDDDDDDDDDLDDL,
LLLDDDDDDDDDDDDLDDL,	LLLDDDDDDDDDDLDDL,
LLLDDDDDDDDDDDDLDDL,	LLDLLDDDDDDDDDDLDDL,
LLLDLDDDDDDDDDDDDL,	LLLDLDDDDDDDDDDLDDL,
LLLLDDDDDDDDLDDL,	LLLLDDDDDDDDLDDL,
LDLLLDDDDDDDDDDLDDL,	LLDLLDDDDDDDDDDLDDL,

LLDDLDDDDDDDDDDDDDL LLL,
LLDLDDDDDDDDDDDDDDL LLL,
LLDDLDDDDDDDDDDDDDDL LLL,
LLLDLDDDDDDDDDDDDDDL LLL,
LLLLDDDDDDDDDDDDL LLDLL,
LLLDDLDDDDDDDDDDL LDLLL,
LLDDLDDDDDDDDDDL LDLLL,
LLDLLDDDDDDDDDDL LDDLLL,
LLDLDDLDDDDDDDDDDL LLLL,
LLLDLDDDDDDDDDDL LDDLLL,
LLDLLDDDDDDDDDDL LDLLL,
LLDDLDDDDDDDDDDL LLLL,
LLLDLDDDDDDDDDDL LDDLLL,
LLLDLDDDDDDDDDDL LLDLL,
DDDDDDDL LLL y

LLLLDDDDDDDDDDDDLDLLL y

LLLLDDDDDDDDDDDDLDLLL y

9-1-1-1-1-2, 2-1-2-9-1-2-3, 3-1-1-10-1-1-3, 2-1-1-2-1-9-4, 4-9-1-1-1-2-2, 3-1-1-9-1-2-3, 2-1-1-1-1-10-4, 2-1-2-10-1-1-3, 2-1-1-1-1-9-2-1-2, 2-2-2-9-2-1-2, 4-9-1-2-1-1-2, 3-2-1-9-2-1-2, 2-1-2-9-2-2-2, 2-1-1-1-1-9-1-1-3, 3-1-1-9-2-2-2, 2-2-2-10-4, 2-1-2-9-1-1-1-1-2, 4-10-1-2-3, 3-2-1-10-4, 3-1-1-10-2-1-2, 4-10-1-1-1-1-2, 4-11-1-1-3 y 2-2-2-10-1-1-2; en donde el primer número representa una cantidad de unidades de LNA, el siguiente una cantidad de unidades de ADN, y luego regiones de LNA y ADN alternas.

[0212] En otras formas de realización, los ASO de la divulgación se representan como cualquiera de los números de ASO seleccionados de las Figuras 2 y 3.

[0213] En algunas formas de realización, el ASO de la divulgación (es decir, ASO-005459) comprende una secuencia de nucleótidos contiguos de 17 nucleótidos de longitud, que corresponde al complemento de una región (es decir, unión entre intrón 1 y exón 2) del transcripto de *SNCA*, es decir, nucleótidos 7.604-7.620 de SEQ ID NO: 1. En algunas formas de realización, el ASO de la divulgación tiene la secuencia de nucleótidos indicada en SEQ ID NO: 15 (es decir, attcctttacaccacac) con un diseño de ASO de LDLDDDDDDDDDDLLLL (es decir, AtTcctttacaccACAC), en donde L indica un nucleósido de ácido nucleico bloqueado (es decir, LNA, por ejemplo, beta-D-oxi-LNA) y D indica un ácido desoxirribonucleico (ADN). En consecuencia, los nucleótidos 1, 3, y 14-17 del extremo 5' de ASO-005459 son beta-D-oxi-LNA, y cada uno de los otros nucleótidos es ADN. En otras formas de realización, el ASO divulgado en la presente también tiene la siguiente estructura química: OxyAs DNAts OxyTs DNACs DNACs DNAts DNAts DNAts DNAAs DNACs DNAAs DNACs DNACs OxyAs OxyMCs OxyAs OxyMC,, en donde "s" indica un enlace de fosforotioato. La fórmula estructural para ASO-005459 se proporciona en la Figura 21B, en donde M⁺ es un contraión aceptable desde el punto de vista farmacéutico. Como se usa en la presente, la expresión "contraión aceptable desde el punto de vista farmacéutico" se refiere a un ion que acompaña una especie iónica con el fin de mantener la neutralidad eléctrica que no es indeseable biológicamente o en otro sentido y, por lo tanto, permite la producción de una forma de sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico. En consecuencia, en algunas formas de realización, el contraión aceptable desde el punto de vista farmacéutico puede ser H⁺, Na⁺, K⁺, NH₄⁺, Li⁺ o cualquier otro catión, por ejemplo, un catión con una carga de 1+. En algunas formas de realización, el contraión aceptable desde el punto de vista farmacéutico es H⁺, Na⁺, NH₄⁺, o combinaciones de estos.

II.H. Enlaces internucleótidos

[0214] Los monómeros de los ASO descritos en la presente se acoplan juntos mediante

grupos de enlace. De manera adecuada, cada monómero se une al monómero adyacente 3' mediante un grupo de enlace.

[0215] La persona del oficio de nivel medio entenderá que, en el contexto de la presente divulgación, el monómero 5' en el extremo de un ASO no comprende un grupo de enlace 5', a pesar de que puede comprender o no un grupo terminal 5'.

[0216] Las expresiones "grupo de enlace" y "enlace internucleótido" se refieren a un grupo que puede acoplar dos nucleótidos de manera covalente. Los ejemplos específicos y preferidos incluyen grupos fosfato y grupos fosforotioato.

[0217] Los nucleótidos del ASO de la divulgación o la secuencia de nucleótidos contiguos de este se acoplan juntos mediante grupos de enlace. De manera adecuada, cada nucleótido se liga al nucleótido adyacente 3' mediante un grupo de enlace.

[0218] Los enlaces internucleótidos adecuados incluyen aquellos enumerados en WO2007/031091, por ejemplo, los enlaces internucleótidos enumerados en el primer párrafo de la página 34 de WO2007/031091 (incorporado en la presente por referencia en su totalidad).

[0219] Los ejemplos de enlaces internucleótidos adecuados que se pueden usar con la divulgación incluyen un enlace de fosfodiéster, un enlace de fosfotriéster, un enlace de metilfosfonato, un enlace de fosforamidato, un enlace de fosforotioato y combinaciones de estos.

[0220] En algunas formas de realización, se prefiere modificar el enlace internucleótido de su fosfodiéster normal a uno que sea más resistente al ataque de la nucleasa, tal como fosforotioato o boranofosfato, en donde estos dos, que se escinden mediante RNasaH, también permiten que esa vía de inhibición antisentido reduzca la expresión del gen diana.

[0221] Se puede preferir el azufre (S) adecuado que contiene enlaces internucleótidos proporcionados en la presente. También se prefieren los enlaces internucleótidos de fosforotioato, en particular, para la región de espacio (B) de *gapmer*. Los enlaces de fosforotioato también se pueden usar para las regiones de flaqueo (A y C, y para ligar A o C a D, y dentro de la región D, según corresponda).

[0222] Sin embargo, las regiones A, B y C pueden comprender enlaces internucleótidos que no sean fosforotioato, tales como enlaces de fosfodiéster, en particular, por ejemplo, cuando el uso de análogos de nucleótidos protege los enlaces internucleótidos dentro de las regiones A y C de la degradación de la endo-nucleasa, tal como cuando las regiones A y C comprenden nucleótidos de LNA.

[0223] Los enlaces internucleótidos en el ASO pueden ser fosfodiéster, fosforotioato o

boranofosfato a fin de permitir la escisión mediante RNasaH del ARN diana. Se prefiere el fosforotioato, por su resistencia mejorada a la nucleasa y por otras razones, tales como la facilidad de fabricación. En algunas formas de realización, los enlaces internucleótidos comprenden uno o más enlaces internucleótidos estereodefinidos (tales como enlaces de fosfato modificados estereodefinidos, por ejemplo, enlaces de fosfodiéster, fosforotioato o boranofosfato con una estructura estereoquímica definida). La expresión "enlace internucleótido estereodefinido" se usa de manera indistinta con "enlace internucleótido quiralmente controlado" y se refiere a un enlace internucleótido en el que la designación estereoquímica del átomo de fósforo se controla de manera que una cantidad específica de R_p o S_p del enlace internucleótido está presente en una cadena de ASO. La designación estereoquímica de un enlace quiral se puede definir (controlar), por ejemplo, mediante síntesis asimétrica. Un ASO que tiene al menos un enlace internucleótido estereodefinido se puede denominar ASO estereodefinido, que incluye tanto un ASO completamente estereodefinido como un ASO parcialmente estereodefinido.

[0224] En algunas formas de realización, un ASO está completamente estereodefinido. Un ASO completamente definido se refiere a una secuencia de ASO que tiene un centro quiral definido (R_p o S_p) en cada enlace internucleótido en el ASO. En algunas formas de realización, un ASO está parcialmente estereodefinido. Un ASO parcialmente definido se refiere a una secuencia de ASO que tiene un centro quiral definido (R_p o S_p) en al menos un enlace internucleótido, pero no en todos los enlaces internucleótidos. Por lo tanto, un ASO parcialmente estereodefinido puede incluir enlaces que son aquirales o no estereodefinidos, además de al menos un enlace estereodefinido. Cuando un enlace internucleótido en un ASO es estereodefinido, la configuración deseada, ya sea R_p o S_p , está presente en al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o esencialmente 100 % del ASO.

[0225] En un aspecto del ASO de la divulgación, los nucleótidos y/o análogos de nucleótidos se ligan entre sí mediante grupos fosforotioato.

[0226] Se reconoce que la inclusión de los enlaces de fosfodiéster, tales como uno o dos enlaces, en un ASO de fosforotioato diferente, en particular, entre unidades de análogos de nucleótidos o adyacente a estas (en general, en la región A y/o C), puede modificar la biodisponibilidad y/o biodistribución de un ASO, ver WO2008/113832, que

se incorpora en la presente por referencia.

[0227] En algunas formas de realización, tales como las formas de realización mencionadas anteriormente, cuando sea adecuados y no se indique específicamente, todos los grupos de enlace restantes son fosfodiéster o fosforotioato, o una mezcla de estos.

[0228] En algunas formas de realización, todos los grupos de enlace internucleótido son fosforotioato.

[0229] Cuando se hace referencia a secuencias de oligonucleótidos de *gapmer* específicas, tales como aquellas proporcionadas en la presente, se entenderá que, en diversas formas de realización, cuando los enlaces son enlaces de fosforotioato, se pueden usar enlaces alternativos, tales como aquellos descritos en la presente, por ejemplo, se pueden usar enlaces de fosfato (fosfodiéster), en particular, enlaces entre análogos de nucleótidos, tales como unidades de LNA. Asimismo, cuando se hace referencia a secuencias de oligonucleótidos de *gapmer* específicas, tales como aquellas proporcionadas en la presente, cuando los residuos de C se mencionan como citosina modificada por 5'-metilo, en diversas formas de realización, una o más de las C presentes en el ASO pueden ser residuos de C no modificados.

[0230] La publicación estadounidense N.º 2011/0130441, que se publicó el 2 de junio de 2011 y se incorpora en la presente por referencia en su totalidad, se refiere a compuestos ASO que tienen al menos un nucleósido bicíclico unido a los terminales 3' o 5' mediante un enlace internucleósido neutro. Por consiguiente, los ASO de la presente divulgación pueden tener al menos un nucleósido bicíclico unido a los terminales 3' o 5' por un enlace internucleósido neutro, tal como uno o más de fosfotriéster, metilfosfonato, MMI (3'-CH₂-N(CH₃)-O-5'), amida-3 (3'-CH₂-C(=O)-N(H)-5'), formacetal (3'-O-CH₂-O-5') o tioformacetal (3'-S-CH₂-O-5'). Los enlaces restantes pueden ser fosforotioato.

[0231] En algunas formas de realización, los ASO de la divulgación tienen enlaces internucleótidos descritos en las Figuras 2 y 3. Como se usa en la presente, por ejemplo, en las Figuras 2 y 3, los enlaces de fosforotioato se indican con "s", y los enlaces de fosfodiéster se indican mediante la ausencia de "s".

II.I. Conjugados

[0232] El término "conjugado", como se usa en la presente, se refiere a un oligonucleótido que está unido de manera covalente a una porción no nucleótido (porción de conjugado o región C o tercera región).

[0233] La conjugación del oligonucleótido de la divulgación con una o más porciones no

nucleótido puede mejorar la farmacología del oligonucleótido, por ejemplo, al afectar la actividad, distribución celular, absorción celular o estabilidad del oligonucleótido. En algunas formas de realización, la porción de conjugado modifica o mejora las propiedades farmacocinéticas del oligonucleótido al mejorar la distribución celular, biodisponibilidad, metabolismo, excreción, permeabilidad y/o absorción celular del oligonucleótido. En particular, el conjugado puede dirigir el oligonucleótido a un órgano, tejido o tipo de célula específicos y, por lo tanto, mejorar la efectividad del oligonucleótido en dicho órgano, tejido o tipo de célula. Al mismo tiempo, el conjugado puede servir para reducir la actividad del oligonucleótido en tipos de células, tejidos u órganos no diana, por ejemplo, actividad diana inespecífica o actividad en tipos de células, tejidos u órganos no diana. WO 93/07883 y WO2013/033230 proporcionan porciones de conjugado adecuadas. Otras porciones de conjugado adecuadas son aquellas capaces de unirse al receptor de asialoglucoproteína (ASGPr). En particular, las porciones de conjugado N-acetilgalactosamina trivalentes son adecuadas para unirse al ASGPr, ver, por ejemplo, WO 2014/076196, WO 2014/207232 y WO 2014/179620.

[0234] Los conjugados de oligonucleótidos y sus síntesis también se informaron en revisiones exhaustivas de Manoharan en *Antisense Drug Technology, Principles, Strategies, and Applications*, S.T. Crooke, ed., cap. 16, Marcel Dekker, Inc., 2001 y Manoharan, *Antisense and Nucleic Acid Drug Development*, 2002, 12, 103.

[0235] En una forma de realización, la porción no nucleótido (porción de conjugado) se selecciona del grupo que consiste en carbohidratos, ligandos receptores de la superficie celular, sustancias farmacológicas, hormonas, sustancias lipofílicas, polímeros, proteínas, péptidos, toxinas (por ejemplo, toxinas bacterianas), vitaminas, proteínas virales (por ejemplo, cápsides) y combinaciones de estos.

II.J. ASO activados

[0236] Como se usa en la presente, la expresión "ASO activado" se refiere a un ASO de la divulgación que se liga de manera covalente (es decir, se funcionaliza) a al menos una porción funcional que permite el enlace covalente del ASO a una o más porciones conjugadas, es decir, porciones que no son en sí mismas ácidos nucleicos o monómeros, para formar los conjugados descritos en la presente. En general, una porción funcional comprenderá un grupo químico que puede unirse de manera covalente al ASO mediante, por ejemplo, un grupo 3'-hidroxilo o el grupo NH₂ exocíclico de la base adenina, un espaciador que puede ser hidrófilo y un grupo terminal que se puede unir a una porción conjugada (por ejemplo, un grupo amino, sulfhidrilo o hidroxilo). En algunas formas de realización, este grupo terminal no está protegido, por ejemplo, es un grupo

NH₂. En otras formas de realización, el grupo terminal está protegido, por ejemplo, mediante un grupo protector adecuado, tal como aquellos descritos en "Protective Groups in Organic Synthesis" de Theodora W Greene y Peter G M Wuts, 3.^a edición (John Wiley & Sons, 1999).

[0237] En algunas formas de realización, los ASO de la divulgación se funcionalizan en el extremo 5' para permitir la unión covalente de la porción conjugada al extremo 5' del ASO. En otras formas de realización, los ASO de la divulgación se pueden funcionalizar en el extremo 3'. Aun en otras formas de realización, los ASO de la divulgación se pueden funcionalizar a lo largo de la estructura principal o en la porción base heterocíclica. Aun en otras formas de realización, los ASO de la divulgación se pueden funcionalizar en más de una posición seleccionada independientemente del extremo 5', el extremo 3, la estructura principal y la base.

[0238] En algunas formas de realización, los ASO activados de la divulgación se sintetizan incorporando, durante la síntesis, uno o más monómeros que se unen de manera covalente a una porción funcional. En otras formas de realización, los ASO activados de la divulgación se sintetizan con monómeros que no fueron funcionalizados, y el ASO se funcionaliza después de que se completa la síntesis.

III. Composiciones farmacéuticas y vías de administración

[0239] El ASO de la divulgación se puede usar en formulaciones y composiciones farmacéuticas. De manera adecuada, tales composiciones comprenden un diluyente, un portador, una sal o un adyuvante aceptables desde el punto de vista farmacéutico.

[0240] El ASO de la divulgación se puede incluir en una formulación unitaria, por ejemplo, en un portador o diluyente aceptables desde el punto de vista farmacéutico en una cantidad suficiente para administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz sin provocar efectos adversos graves en el paciente tratado. Sin embargo, en algunas formas de tratamiento, los efectos adversos graves pueden ser aceptables en términos de garantizar un resultado positivo del tratamiento terapéutico.

[0241] El fármaco formulado puede comprender agentes aglutinantes y adyuvantes aceptables desde el punto de vista farmacéutico. Las cápsulas, los comprimidos o las píldoras pueden contener, por ejemplo, los siguientes compuestos: celulosa microcristalina, goma o gelatina como aglutinantes; almidón o lactosa como excipientes; estearatos como lubricantes; diversos agentes endulzantes o saborizantes. Para las cápsulas, la unidad de dosificación puede contener un portador líquido, tal como aceites grasos. Asimismo, los recubrimientos del azúcar y de los agentes entéricos pueden formar parte de la unidad de dosificación. Las formulaciones de oligonucleótidos también

pueden ser emulsiones de los ingredientes farmacéuticos activos y un lípido que forma una emulsión micelar.

[0242] Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación se pueden administrar de varias maneras según si es conveniente el tratamiento local o sistémico, y según el área que se desea tratar. La administración puede ser (a) oral, (b) pulmonar, por ejemplo, por inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, que incluyen mediante un nebulizador; por vía intratraqueal, intranasal, (c) tópica, que incluye epidérmica, transdérmica, oftálmica, y a través de membranas mucosas, que incluye la administración vaginal y rectal; o (d) parenteral, que incluye inyección o infusión intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular; o intracraneal, por ejemplo, administración intratecal, intracerebroventricular o intraventricular. En una forma de realización, el ASO se administra IV, IP, por vía oral, tópica o como una inyección de bolo, o se administra directamente en un órgano diana. En otra forma de realización, el ASO se administra por vía intratecal o intracerebroventricular como una inyección de bolo.

[0243] Las composiciones y formulaciones farmacéuticas para la administración tópica pueden incluir parches transdérmicos, pomadas, lociones, cremas, geles, gotas, pulverizaciones, supositorios, líquidos y polvos. Los portadores, las bases acuosas, en polvo u oleosas y los espesantes farmacéuticos convencionales pueden ser necesarios o deseables. Los ejemplos de formulaciones tópicas incluyen aquellas en donde el ASO de la divulgación se mezcla con un agente de administración tópica, tal como lípidos, liposomas, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, esteroides, agentes quelantes y tensioactivos. Las composiciones y formulaciones para administración oral incluyen, entre otros, polvos o gránulos, microparticulados, nanoparticulados, suspensiones o soluciones en medios acuosos o no acuosos, cápsulas, cápsulas de gel, sachets, comprimidos o minicomprimidos. Las composiciones y formulaciones para administración parenteral, intratecal, intracerebroventricular o intraventricular pueden incluir soluciones acuosas estériles que también pueden contener amortiguadores, diluyentes y otros aditivos adecuados, tales como mejoradores de la penetración, compuestos portadores y otros portadores o excipientes aceptables desde el punto de vista farmacéutico.

[0244] Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación incluyen, entre otras, soluciones, emulsiones y formulaciones que contienen liposomas. Estas composiciones se pueden producir a partir de varios componentes que incluyen, entre otros, líquidos preformados, sólidos autoemulsionantes y semisólidos

autoemulsionantes. La administración del fármaco al tejido diana se pueden mejorar mediante la administración mediada por el portador que incluye, entre otros, liposomas catiónicos, ciclodextrinas, derivados de porfirina, dendrímeros de cadena ramificada, polímeros de polietilenimina, nanopartículas y microesferas (Dass CR. *J Pharm Pharmacol* 2002; 54(1):3-27).

[0245] Las formulaciones farmacéuticas de la presente divulgación, que se pueden presentar de manera conveniente en formas de dosis unitarias, se pueden preparar de acuerdo con técnicas convencionales conocidas en la industria farmacéutica. Tales técnicas incluyen la etapa de mezclar los ingredientes activos con los portadores o excipientes farmacéuticos. En general, las formulaciones se preparan mezclando minuciosa y uniformemente los ingredientes activos con portadores líquidos, portadores sólidos finamente divididos, o ambos, y luego, si es necesario, dándole forma al producto.

[0246] Para la administración parenteral, subcutánea, intradérmica o tópica, la formulación puede incluir un diluyente estéril, amortiguadores, reguladores de la tonicidad y agentes antibacterianos. Los ASO activos se pueden preparar con portadores que los protegen de la degradación o eliminación inmediata del cuerpo, que incluye implantes o microcápsulas con propiedades de liberación controlada. Para la administración intravenosa, los portadores pueden ser solución salina fisiológica o solución salina amortiguada con fosfato. La publicación internacional N.º WO2007/031091 (A2), publicada el 22 de marzo de 2007, también proporciona un diluyente, un portador y adyuvantes aceptables desde el punto de vista farmacéutico, que se incorporan en la presente por referencia.

IV. Diagnóstico

[0247] La presente descripción también proporciona un método de diagnóstico útil durante el diagnóstico de enfermedades relacionadas con SNCA, por ejemplo, una sinucleinopatía. Los ejemplos no limitativos de sinucleinopatía incluyen, entre otros, enfermedad de Parkinson, demencia asociada a la enfermedad de Parkinson (PDD), demencia con cuerpos de Lewy y atrofia multisistémica.

[0248] Los ASO de la divulgación se pueden usar para medir la expresión del transcrito de SNCA en un tejido o fluido corporal de un sujeto y comparar el nivel de expresión medido con un nivel de expresión del transcrito de SNCA estándar en tejidos o fluidos corporales normales, mediante los cuales un aumento en el nivel de expresión comparado con el estándar indica un trastorno que se puede tratar con un ASO de la divulgación.

[0249] El ASO de la divulgación se puede usar para analizar los niveles del transcripto de SNCA en una muestra biológica usando cualquier método conocido por las personas del oficio de nivel medio. (Touboul *et. al.*, *Anticancer Res.* (2002) 22 (6A): 3349-56; Verjout *et. al.*, *Mutat. Res.* (2000) 640: 127-38); Stowe *et. al.*, *J. Virol. Methods* (1998) 75 (1): 93-91).

[0250] "Muestra biológica" significa cualquier muestra biológica obtenida de un individuo, línea celular, cultivo tisular u otra fuente de células que expresen potencialmente transcripto de SNCA. Los métodos para obtener biopsias de tejido y fluidos corporales de mamíferos son conocidos en el estado de la técnica.

V. Kits que comprenden ASO

[0251] La presente descripción también proporciona kits que comprenden un ASO de la divulgación descrito en la presente que se pueden usar para realizar los métodos aquí descritos. En algunas formas de realización, un kit comprende al menos un ASO en uno o más recipientes. En algunas formas de realización, los kits contiene todos los componentes necesarios y/o suficientes para realizar un ensayo de detección, que incluye todos los controles, las indicaciones para realizar los ensayos y cualquier *software* necesario para el análisis y la presentación de los resultados. Una persona del oficio de nivel medio reconocerá fácilmente que el ASO descrito se puede incorporar con facilidad a uno de los formatos de kits establecidos que son conocidos en el estado de la técnica.

VI. Métodos de uso

[0252] Los ASO de la divulgación se pueden utilizar para tratamientos y profilaxis.

[0253] SNCA es una proteína de 140 aminoácidos que se expresa preferentemente en neuronas en terminales presinápticos en donde se cree que tiene una función en la regulación de la transmisión sináptica. Se ha propuesto que existe de manera nativa como un monómero desplegado y un tetrámero estable de α -hélices y se demostró que experimenta varias modificaciones después de la traducción. Una modificación que se estudió exhaustivamente es la fosforilación de SNCA en el aminoácido serina 129 (S129). En general, solo un pequeño porcentaje de SNCA se fosforila constitutivamente en S129 (pS129), mientras que la mayor parte de SNCA que se encuentra en inclusiones intracelulares patológicas es SNCA pS129. Estas inclusiones patológicas consisten en acumulaciones insolubles agregadas de proteínas SNCA plegadas de manera incorrecta y son un rasgo característico de un grupo de enfermedades neurodegenerativas que se conocen en conjunto como sinucleinopatías.

[0254] En las sinucleinopatías, SNCA puede formar agregados patológicos en neuronas

conocidas como cuerpos de Lewy, que son característicos de la enfermedad de Parkinson (PD), la demencia asociada a la enfermedad de Parkinson (PDD), y la demencia con cuerpos de Lewy (DLB). Por lo tanto, los ASO de la presente pueden reducir la cantidad de agregados patológicos de SNCA o prevenir la formación de agregados patológicos de SNCA. Además, las lesiones ricas en SNCA anormales, denominadas inclusiones citoplásmicas gliales (GCI), se encuentran en los oligodendrocitos y representan una característica distintiva de una sinucleinopatía mortal que progresa rápidamente, conocida como atrofia multisistémica (MSA). En algunas formas de realización, los ASO de la divulgación reducen la cantidad de GCI o previenen la formación de GCI. Los informes de niveles indetectables o bajos de expresión de mRNA de SNCA en oligodendrocitos sugieren que una forma patológica de SNCA se propaga de las neuronas, en donde se expresa en niveles altos, a los oligodendrocitos. En algunas formas de realización, los ASO de la invención reducen o previenen la propagación de SNCA, por ejemplo, la forma patológica de SNCA, de las neuronas.

[0255] Los ASO se pueden usar en investigaciones, por ejemplo, para inhibir específicamente la síntesis de la proteína SNCA (en general, mediante la degradación o inhibición de mRNA, y así prevenir la formación de proteínas) en células y animales experimentales, y así facilitar el análisis funcional del objetivo o una valoración de su utilidad como un objetivo de la intervención terapéutica. También se proporcionan métodos para regular de manera descendente la expresión de mRNA de SNCA y/o la proteína SNCA en células o tejidos que comprenden poner en contacto las células o los tejidos, *in vitro* o *in vivo*, con una cantidad eficaz de uno o más de los ASO, conjugados o composiciones de la divulgación.

[0256] Para los tratamientos, un animal o un ser humano que se sospecha que tienen una enfermedad o un trastorno que se puede tratar mediante la modulación de la expresión del transcritto de SNCA y/o de la proteína SNCA se trata mediante la administración de compuestos ASO de acuerdo con la presente divulgación. También se proporcionan métodos para tratar un mamífero, por ejemplo, para tratar un ser humano, que se sospecha que tiene o es propenso a contraer una enfermedad o afección, asociadas a la expresión del transcritto de SNCA y/o de la proteína SNCA, mediante la administración de una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de uno o más de los ASO o las composiciones de la divulgación. El ASO, un conjugado o una composición farmacéutica de acuerdo con la divulgación se administra, en general, en una cantidad eficaz. En algunas formas de realización, el ASO o el

conjugado de la divulgación se usan en tratamientos.

[0257] La divulgación además proporciona un ASO de acuerdo con la divulgación para usar en el tratamiento de una o más enfermedades mencionadas en la presente, tales como una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en enfermedad de Parkinson, demencia asociada a la enfermedad de Parkinson (PDD), demencia con cuerpos de Lewy, atrofia multisistémica, y cualquier combinación de estas.

[0258] La divulgación también proporciona un método para tratar α -sinucleinopatías, en donde el método comprende administrar una cantidad eficaz de uno o más ASO, conjugados o composiciones farmacéuticas de estos a un animal que lo necesita (tal como un paciente que lo necesita).

[0259] En algunas formas de realización, la enfermedad, el trastorno o la afección están asociados a la sobreexpresión del transcripto del gen *SNCA* y/o de la proteína *SNCA*.

[0260] La divulgación también proporciona métodos para inhibir (por ejemplo, para reducir) la expresión del transcripto del gen *SNCA* y/o de la proteína *SNCA* en una célula o en un tejido, en donde el método comprende poner en contacto la célula o el tejido, *in vitro* o *in vivo*, con una cantidad eficaz de uno o más ASO, conjugados o composiciones farmacéuticas de estos, de la divulgación para afectar la degradación de la expresión del transcripto del gen *SNCA* y así reducir la proteína *SNCA*.

[0261] En algunas formas de realización, los ASO se usan para reducir la expresión de mRNA de *SNCA* en una o más secciones del cerebro, por ejemplo, el hipocampo, tronco encefálico, cuerpo estriado o cualquier combinación de estos. En otras formas de realización, los ASO reducen la expresión de mRNA de *SNCA*, por ejemplo, en el tronco encefálico y/o cuerpo estriado, menos de 70 %, menos de 60 %, menos de 50 %, menos de 40 %, menos de 30 %, menos de 20 %, menos de 10 % o menos de 5 % en comparación con la expresión de mRNA de *SNCA* después de la administración de o exposición a un vehículo (no ASO), el Día 3, Día 5, Día 7, Día 10, Día 14, Día 15, Día 20, Día 21 o Día 25. En algunas formas de realización, la expresión de mRNA de *SNCA* se mantiene por debajo de 70 %, debajo de 60 %, debajo de 50 %, debajo de 40 %, debajo de 30 %, debajo de 20 %, debajo de 10 % o debajo de 5 % en comparación con la expresión de mRNA de *SNCA* después de la administración de o exposición a un vehículo (no ASO) hasta el Día 28, Día 30, Día 32, Día 35, Día 40, Día 42, Día 45, Día 49, Día 50, Día 56, Día 60, Día 63, Día 70 o Día 75.

[0262] En otras formas de realización, los ASO de la presente divulgación reducen la expresión de mRNA de *SNCA* y/o proteína *SNCA* en el bulbo raquídeo, núcleo caudado y putamen, protuberancia, cerebelo, médula espinal lumbar, corteza frontal y/o cualquier

combinación de estos.

[0263] La divulgación también proporciona el uso del ASO o conjugado de la divulgación como se describe para la fabricación de un medicamento. La divulgación también proporciona una composición que comprende el ASO o conjugado de este para usar en el tratamiento de un trastorno mencionado en la presente, o para un método de tratamiento de un trastorno mencionado en la presente. La presente divulgación también proporciona ASO o conjugados para usar en el tratamiento. La presente divulgación también proporciona ASO o conjugados para usar en el tratamiento de sinucleinopatía.

[0264] La divulgación también proporciona un método para inhibir la proteína SNCA en una célula que expresa SNCA, que comprende administrar a la célula un ASO o un conjugado de acuerdo con la divulgación para afectar la inhibición de la proteína SNCA en la célula.

[0265] La divulgación incluye un método para reducir, mejorar, prevenir o tratar la hiperexcitabilidad neuronal en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar un ASO o un conjugado de acuerdo con la divulgación.

[0266] La divulgación también proporciona un método para tratar un trastorno mencionado en la presente, en donde el método comprende administrar a un paciente que lo necesita un ASO o un conjugado de acuerdo con la divulgación como se describe en la presente y/o una composición farmacéutica de acuerdo con la divulgación.

[0267] Los ASO y otras composiciones de acuerdo con la divulgación se pueden usar para el tratamiento de afecciones asociadas a la sobreexpresión o expresión de la versión mutada de la proteína SNCA.

[0268] La divulgación prevé el ASO o el conjugado de acuerdo con la divulgación, para usar como un medicamento, tal como para el tratamiento de α -sinucleinopatías. En algunas formas de realización, la α -sinucleinopatía es una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en enfermedad de Parkinson, demencia asociada a la enfermedad de Parkinson (PDD), demencia con cuerpos de Lewy, atrofia multisistémica y cualquier combinación de estas.

[0269] La divulgación también proporciona el uso de un ASO de la divulgación en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad, un trastorno o una afección mencionados en la presente. En algunas formas de realización, el ASO o el conjugado de la divulgación se usa para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una α -sinucleinopatía, un trastorno convulsivo o una combinación de estos.

[0270] En general, un aspecto de la divulgación se refiere a un método para tratar un mamífero que tiene o es susceptible a tener afecciones asociadas a niveles anormales de SNCA, es decir, una α -sinucleinopatía), que comprende administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de un ASO que se dirige al transcrito de SNCA que comprende una o más unidades de LNA. El ASO, un conjugado o una composición farmacéutica de acuerdo con la divulgación se administra, en general, en una cantidad eficaz.

[0271] En algunas formas de realización, la enfermedad o el trastorno, como se indica en la presente, pueden estar asociados a una mutación en el gen SNCA o un gen cuyo producto de proteína está asociado a la proteína SNCA o interactúa con esta. Por lo tanto, en algunas formas de realización, el mRNA diana es una forma mutada de la secuencia de SNCA.

[0272] Un aspecto interesante de la divulgación se refiere al uso de un ASO (compuesto) definido en la presente o de un conjugado definido en la presente para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad, un trastorno o una afección indicados en la presente.

[0273] Los métodos de la divulgación se pueden usar para el tratamiento o la profilaxis contra enfermedades causadas por niveles anormales de proteína SCNA. En algunas formas de realización, las enfermedades causadas por niveles anormales de proteína SNCA son α -sinucleinopatías. En algunas formas de realización, las α -sinucleinopatías incluyen enfermedad de Parkinson, demencia asociada a la enfermedad de Parkinson (PDD), demencia con cuerpos de Lewy y atrofia multisistémica.

[0274] De manera alternativa, en algunas formas de realización, la divulgación también se refiere a un método para tratar niveles anormales de proteína SNCA, en donde el método comprende administrar un ASO de la divulgación, o un conjugado de la divulgación o una composición farmacéutica de la divulgación a un paciente que lo necesita.

[0275] La divulgación también se refiere a un ASO, una composición o un conjugado como se define en la presente para usar como un medicamento.

[0276] La divulgación también se refiere al uso de un compuesto, una composición o un conjugado como se define en la presente para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de niveles anormales de proteína SCNA o la expresión de formas mutantes de proteína SCNA (tales como variantes alélicas, tales como aquellas asociadas a una de las enfermedades indicadas en la presente).

[0277] Un paciente que necesita el tratamiento es un paciente que padece o es posible

que padezca la enfermedad o el trastorno.

[0278] En la práctica de la presente divulgación, se usarán, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular, biología transgénica, microbiología, ADN recombinante e inmunología, que se encuentran dentro del ámbito de las personas del oficio de nivel medio. Dichas técnicas se explican en su totalidad en la literatura. Ver, por ejemplo, Sambrook *et al.*, ed. (1989) *Molecular Cloning A Laboratory Manual* (2.^a ed; Cold Spring Harbor Laboratory Press); Sambrook *et al.*, ed. (1992) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (Cold Springs Harbor Laboratory, NY); D. N. Glover ed., (1985) *ADN Cloning*, volúmenes I y II; Gait, ed. (1984) *Oligonucleotide Synthesis*; Mullis *et al.* patente estadounidense N.º 4,683,195; Hames y Higgins, eds. (1984) *Nucleic Acid Hybridization*; Hames y Higgins, eds. (1984) *Transcription And Translation*; Freshney (1987) *Culture Of Animal Cells* (Alan R. Liss, Inc.); *Immobilized Cells And Enzymes* (IRL Press) (1986); Perbal (1984) *A Practical Guide To Molecular Cloning*; the treatise, *Methods In Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.); Miller y Calos eds. (1987) *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells*, (Cold Spring Harbor Laboratory); Wu *et al.*, eds., *Methods In Enzymology*, vol. 154 y 155; Mayer y Walker, eds. (1987) *Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology* (Academic Press, London); Weir y Blackwell, eds., (1986) *Handbook Of Experimental Immunology*, volúmenes I-IV; *Manipulating the Mouse Embryo*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1986);); Crooke, *Antisense drug Technology: Principles, Strategies and Applications*, 2.^a ed. CRC Press (2007) y en Ausubel *et al.* (1989) *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley and Sons, Baltimore, Md.).

[0279] Todas las referencias mencionadas anteriormente, al igual que todas las referencias aquí mencionadas, se incorporan en la presente por referencia en su totalidad.

[0280] Los siguientes ejemplos se presentan a modo ilustrativo y no son limitativos.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Construcción de ASO

[0281] Los oligonucleótidos antisentido descritos en la presente se diseñaron para actuar sobre distintas regiones en pre-mARN de *SNCA*. Ver la Figura 1A para una secuencia genómica de *SNCA* y la Figura 1B para cADN de *SNCA*. Por ejemplo, los ASO se construyeron para actuar sobre las regiones indicadas usando el sitio de inicio pre-mARN y el sitio final pre-mARN de NG_011851.1 como se muestra en la Figura 2 y/o el sitio de inicio de mARN y el sitio final de sus mARN. Las secuencias de ejemplo

de los ASO (por ejemplo, números de SEQ ID) se describen en las Figuras 2 y 3. En algunas formas de realización, los ASO se diseñaron para ser *gapmer* (por ejemplo, *gapmer* alternos). Ver números de DES.

[0282] Las Figuras 2 y 3 muestran ejemplos no limitativos del diseño de ASO para las secuencias seleccionadas. Se pueden aplicar los mismos métodos a cualquier otra secuencia descrita en la presente. Los *gapmer* se construyeron para contener ácidos nucleicos bloqueados – LNA (letras mayúsculas). Por ejemplo, un *gapmer* puede tener beta-desoxi LNA en el extremo 5' y el extremo 3', y puede tener una estructura principal de fosforotioato. Sin embargo, los LNA también se pueden sustituir con cualquier otro análogo de nucleótido y la estructura principal puede ser otro tipo de estructura principal (por ejemplo, un enlace de fosfodiéster, un enlace de fosfotriéster, un enlace de metilfosfonato, un enlace de fosforamidato, o combinaciones de estos).

[0283] Los ASO se sintetizaron mediante métodos conocidos en el estado de la técnica. Los métodos de ejemplo para preparar tales ASO se describen en Barciszewski *et al.*, capítulo 10 – "Locked Nucleic Acid Aptamers" en *Nucleic Acid and Peptide Aptamers: Methods and Protocols*, vol. 535, Gunter Mayer (ed.) (2009), cuyo contenido se incorpora expresamente en la presente en su totalidad por referencia.

Ejemplo 2A: Ensayo de alto contenido para medir la reducción de la proteína SNCA en neuronas primarias

[0284] Los ASO que actúan sobre SNCA se evaluaron para determinar su capacidad para reducir la expresión de la proteína SNCA en neuronas primarias de ratón. Los cultivos neuronales primarios se establecieron del prosencéfalo de ratones PAC-Tg(SNCA^{A53T})^{+/+};SNCA^{-/-} ("PAC-A53T") que tenían el gen SNCA humano completo con una mutación A53T en un fondo de inactivación de SNCA de ratón. Ver Kuo Y *et al.*, *Hum Mol Genet.*, 19: 1633-50 (2010). Todos los procedimientos que incluyeron ratones se llevaron a cabo de acuerdo con los métodos de pruebas en animales (ATM) aprobados por la Comisión de cuidado y uso de animales de Bristol-Myers Squibb (ACUC). Las neuronas primarias se generaron mediante digestión de papaína de acuerdo con el protocolo del fabricante (Worthington Biochemical Corporation, LK0031050). Las neuronas aisladas se lavaron y se volvieron a suspender en medio neurobasal (NBM, Invitrogen) enriquecido con B27 (Gibco), 1,25 µM de Glutamax (Gibco), 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin y 25 µg/ml de anfotericina B.

[0285] Las células se colocaron en placas recubiertas con poli D-lisina de múltiples

cavidades a 5400 células/cm² (por ejemplo, en placas de 384 cavidades, 6000 células/cavidad en 25 µl de NBM). Los ASO se diluyeron en agua y se agregaron a las células en DIV01 (es decir, 1 día después de la colocación en placas). Los ASO se agregaron a una concentración final 2x en medio, luego se suministraron a las células manualmente. De manera alternativa, los ASO en agua se distribuyeron usando un dispensador acústico ECHO de Labcyte. Para la distribución mediante ECHO, 250 nl de ASO en agua se agregaron a las células en el medio, y luego se agregó una alícuota de igual volumen de una nueva alícuota de NBM. Para el cribado primario, los ASO se agregaron en concentraciones finales de 5 µM, 3,3 µM, 1 µM, 200 nM o 40 nM. Para la determinación de la potencia, se prepararon titulaciones de 8-10 puntos de los ASO de 0,75 mM de reserva, luego se suministraron a células cultivadas para un rango de concentración final de 2,7-4000 nM o 4,5-10.000 nM. ASO-000010 (TCTgtcttggtTTG, SEQ ID NO: 22) y ASO-000838 (AGAAataagtggTAGT, SEQ ID NO: 23) (5 µM) se incluyeron en cada placa como inhibidores de control de referencia para tubulina y SNCA, respectivamente. Las células se incubaron con los ASO durante 14 días para alcanzar una reducción de estado estable de mARN.

[0286] Después de la incubación de 14 días, las células se fijaron mediante la adición de fijador en concentraciones finales de 4 % de formaldehído (J.T. Baker) y 4 % de sacarosa (Sigma) en las cavidades. Las células se fijaron durante 15 minutos, y luego el fijador se aspiró de las cavidades. Luego, las células se permeabilizaron durante 20 minutos con una solución salina amortiguada con fosfato (PBS) que contenía 0,3 % de Triton-X 100 y 3 % de albúmina de suero bovino (BSA) o 3 % de suero de cabra normal. Luego, el amortiguador de permeabilización se aspiró de las cavidades, y las células se lavaron una vez con PBS. Los anticuerpos primarios luego se diluyeron en PBS que contenía 0,1 % de Triton X-100 y 3 % de BSA. Se usaron diluciones de 1:1000 de anti-SNCA de conejo (Abcam) y 1:500 de anti-tubulina de pollo (Abcam). Las células se incubaron con anticuerpos primarios de 2 horas a durante la noche. Luego de la incubación, la solución de tinción del anticuerpo primario se aspiró, y las células se lavaron 2 veces con PBS. Una solución secundaria que contenía una dilución 1:500 de anticuerpo caprino anti-gallina Alexa 567, anticuerpo caprino anti-conejo Alexa 488, y Hoechst (10 µg/ml) en PBS que contenía 0,1 % de Triton X-100 con 3 % de BSA se agregó a las cavidades, y las placas se incubaron durante 1 hora. Luego, la solución de tinción secundaria se aspiró de las cavidades y las células se lavaron 3 veces con PBS. Después de lavar las células, 60 µl de PBS se agregaron a cada cavidad. Luego las placas se almacenaron en PBS hasta el diagnóstico por imágenes.

[0287] Para el diagnóstico por imágenes, las placas se sometieron a barrido en un Thermo-Fisher (Cellomics) CX5 Imager usando la bioaplicación Spot Detector (Cellomics) para cuantificar núcleos (tinta Hoechst, canal 1), extensiones de tubulina (Alexa 567, canal 2) y SNCA (Alexa 488, canal 3). El recuento de objetos (núcleos) se controló, pero no se publicó en la base de datos. El área total cubierta por tubulina se cuantificó con la característica SpotTotalAreaCh2 y la intensidad total de tinción para SNCA se cuantificó como SpotTotalIntenCh3. La medición de tubulina se incluyó para controlar la toxicidad. Para determinar la reducción de proteína SNCA, la relación de la intensidad de SNCA con respecto al área de tinción de tubulina se calculó y los resultados se normalizaron como mediana de % de inhibición usando la mediana de vehículo tratado con cavidades como total y las cavidades ASO-000010 o ASO-000838 como cavidades inhibidas al máximo para tubulina o SNCA, respectivamente.

Ejemplo 2B: Medición de oscilación del calcio espontánea

[0288] Las oscilaciones en la concentración de calcio libre intracelular (oscilación de calcio) corresponde a mayor neurotoxicidad y, por lo tanto, puede indicar tolerabilidad reducida *in vivo*. Con el fin de medir la oscilación de calcio espontánea en neuronas corticales primarias, se prepararon neuronas corticales primarias de rata de embriones de ratas Sprague-Dawley (E19). Brevemente, la corteza cerebral se diseccionó y se incubó a 37 °C durante 30-45 minutos en solución de papaína/DNasa/solución salina equilibrada de Earle (EBSS). Después de la trituración y centrifugación del pelet celular, la reacción se detuvo mediante incubación con EBSS que contenía inhibidores de proteasa, albúmina de suero bovino (BSA) y DNasa. Luego, las células se trituraron y se lavaron con Neurobasal (NB, Invitrogen) enriquecido con 2 % de B-27, 100 µg/ml de penicilina, 85 µg/ml de estreptomicina y 0,5 mM de glutamina.

[0289] Las células se colocaron en placas en una concentración de 25.000 células/cavidad en placas fluorescentes recubiertas con poli-D-lisina de 384 cavidades para diagnóstico por imágenes (BD Biosciences) en 25 µl/cavidad de medio neurobasal (NB) enriquecido (que contenía suplemento B27 y 2 mM de glutamina). Las células se cultivaron durante 12 días a 37 °C en 5 % de CO₂ y se alimentaron con 25 µl de medio adicional en DIV04 (es decir, 4 días después de la colocación en placas) y DIV08 (es decir, 8 días después de la colocación en placas) para usar en DIV12 (es decir, 12 días después de la colocación en placas).

[0290] El día del experimento, el medio NB se retiró de la placa, y las células se lavaron una vez con 50 µl/cavidad de amortiguador de ensayo a 37 °C (solución salina

[0291] Las placas se leyeron en un lector de placas fluorescente FDSS 7000 (Hamamatsu) en una longitud de onda de excitación de 485 nm y longitud de onda de emisión de 525 nm. El tiempo de registro de fluorescencia total fue 600 segundos a velocidad de adquisición de 1 Hz para todas las 384 cavidades. Una señal de referencia inicial (medición de calcio intracelular) se estableció durante 99 segundos antes de la adición de los ASO. Se agregaron ASO con un cabezal de 384 cavidades en las FLIPR en 20 µl de amortiguador de ensayo a 75 µM para obtener una concentración final de 25 µM. En algunos casos, un ASO que actúa sobre *tau*, tal como ASO-000013 (OxyAs OxyTs OxyTs DNAts DNACs DNACs DNAas DNAas DNAas DNAts DNAts DNACs DNAas OxyMCs OxyTs OxyT; ATTtccaaattcaCTT, SEQ ID NO: 24) o ASO-000010 (TCTgtcttggttTG, SEQ ID NO: 22) se incluyó como control.

74

controles de ASO positivo y negativo (ASO-000010 y ASO-000013) presentaban farmacología bien caracterizada en el ensayo de Ca, y si el vehículo y las cavidades de control farmacológico generaban un mínimo de ~20 oscilaciones de calcio durante el período experimental de 300 s.

Ejemplo 2C: Análisis DE QUANTIGENE® (ensayo de 96 cavidades) para medir la reducción de mARN en neuronas humanas

[0293] La capacidad de los ASO para reducir mARN de *SNCA* humana y/o posibles especies de mARN humano de diana inespecífica se midió *in vitro* mediante análisis de QUANTIGENE®. Las neuronas humanas (Cellular Dynamics Inc., "iNeurons") se descongelaron, se colocaron en placas y se cultivaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Estas iNeurons son una población altamente pura de neuronas humanas derivadas de células madre pluripotentes inducidas (iPS) usando protocolos internos de purificación y diferenciación de Cellular Dynamic.

[0294] Lisis: Las células se colocaron en placas recubiertas con poli-L-ornitina/laminina de 96 cavidades de 50.000 a 100.000 células por cavidad (según la expresión de la diana inespecífica que se investiga) y se mantuvo en medio neurobasal enriquecido con B27, glutamax y penicilina-estreptomicina. Los ASO se diluyeron en agua y se agregaron a las células en DIV01 (es decir, 1 día después de la colocación en placas). Para mediciones de punto único, en general se usó una concentración final de ASO de 0,5 µM. Para determinaciones de IC₅₀, las neuronas se evaluaron con una dilución 1:4 de repuesta de concentración de siete puntos, con una concentración máxima de 5 µM para definir la IC₅₀. Luego, las células se incubaron at 37 °C y 5 % de CO₂ durante 6 días para alcanzar una reducción de estado estable de mARN.

[0295] Después de la incubación, el medio se retiró, y las células se lavaron 1X en DPBS y se lisaron como se indica a continuación. La medición del ARN mensajero lisado se realizó mediante el sistema de reactivo Quantigene® 2.0 (Affymetrix®), que cuantifica el ARN mediante un método de amplificación de la señal de ADN ramificado que depende del kit de sonda de captura de ARN específicamente diseñado. La solución amortiguadora de lisis celular de trabajo se elaboró al agregar 50 µl de proteinasa K a 5 ml de mezcla de lisis precalentada (37 °C) y se diluyó en dH₂O a una dilución final de 1:4. El amortiguador de lisis de trabajo se agregó a las placas (100 a 150 µl/cavidad, según la expresión de la diana inespecífica que se investiga), se trituró 10 veces, se selló y se incubó durante 30 min a 55 °C. Luego de la lisis, las cavidades se trituraron 10 veces más, y las placas se almacenaron a -80 °C o se evaluaron inmediatamente.

[0296] Ensayo: Según la sonda de captura específica usada (es decir, *SNCA*, *PROS1* o tubulina), los lisados se diluyeron (o no se diluyeron) en la mezcla de lisis. Luego, los lisados se agregaron a las placas de captura (placa de poliestireno de 96 cavidades recubierta con sondas de captura) en un volumen total de 80 µl/cavidad. Los reactivos para conjuntos de sondas de trabajo se generaron al combinar agua libre de nucleasa (12,1 µl), mezcla de lisis (6,6 µl), reactivo de bloqueo (1 µl) y de kit de sondas 2.0 específicas (0,3 µl) (*SNCA* humano catálogo N.º SA-50528, *PROS1* humano catálogo N.º SA-10542 o tubulina beta 3 humana catálogo N.º SA-15628) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (QUANTIGENE® 2.0 AFFYMETRIX®). Luego se agregaron 20 µl de reactivos de kit de sondas de trabajo a una dilución de 80 µl de lisado (u 80 µl de mezcla de lisis para las muestras de fondo) en la placa de captura. Las placas se centrifugaron a 240 g durante 20 s y luego se incubaron durante 16-20 horas a 55 °C hasta hibridarse (captura de ARN diana).

[0297] La amplificación de señal y la detección del ARN diana comenzó lavando placas con amortiguador 3 veces (300 µl/cavidad) para eliminar cualquier material no unido. Luego, se agregó reactivo de hibridación preamplificador 2.0 (100 µl/cavidad), se incubó a 55 °C durante 1 hora, luego se aspiró, y se agregó amortiguador de lavado y se aspiró 3 veces. Luego se agregó el reactivo de hibridación amplificador 2.0 como se describió (100 µl/cavidad), se incubó durante 1 hora a 55 °C, y la etapa de lavado se repitió como se describió anteriormente. A continuación se agregó reactivo de hibridación de sonda etiquetada 2.0 (100 µl/cavidad), se incubó durante 1 hora a 50 °C, y la etapa de lavado se repitió como se describió anteriormente. Las placas se volvieron a centrifugar a 240 g durante 20 segundos para retirar cualquier exceso de amortiguador de lavado, y luego, se agregó 2.0 Substrate (100 µl/cavidad) a las placas. Las placas se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente, y luego se obtuvieron imágenes de estas placas en un lector multidetector Envision de PerkinElmer en modo luminómetro durante 15 minutos.

[0298] Determinación de datos: Para el gen de interés, la señal de fondo de ensayo promedio se sustrajo de la señal promedio de cada réplica técnica. Las señales promedio sustraídas del fondo para el gen de interés luego se normalizaron a la señal promedio sustraída del fondo para el ARN de tubulina constitutiva. El porcentaje de inhibición de la muestra tratada se calculó con respecto al lisado de la muestra de control tratada. Los resultados de los ensayos de Quantigene® para las células tratadas con los ASO se muestran, por ejemplo, en la Figura 8.

Ejemplo 2D: Análisis de QUANTIGENE® (ensayo de 96 cavidades) para medir la reducción de mRNA en células Ramos

[0299] Para medir la posible reducción de mRNA de IKZF3 de diana inespecífica humana (dedo de zinc 3 familia IKAROS), se usaron células Ramos (una línea celular linfocítica humana). Como las células Ramos no expresan *SNCA*, *RB1* (correpresor transcripcional RB 1), que se expresa en células Ramos, se usó como control positivo para evaluar la expresión de mRNA de IKZF3 de inactivación mediada por ASO. Se sintetizaron dos ASO para unirse e inactivar la expresión de mRNA de RB1 humano. Se usó beta-2 microglobulina ($\beta 2M$) como control de gen constitutivo. Las células Ramos se cultivaron en suspensión en medio RPMI enriquecido con FBS, glutamina y Pen/Strep.

[0300] Lisis: Las células se colocaron en placas de 96 cavidades recubiertas con poli-L-ornitina/laminina a 20.000 células por cavidad y se mantuvieron en medio Neurobasal que contenía B27, glutamax y penicilina-estreptomicina. Los ASO se diluyeron en agua y se agregaron a las células 1 día después de la colocación en placas (DIV01) hasta obtener una concentración final de 1 μM . Después del tratamiento con ASO, las células se incubaron a 37 °C durante 4 días para lograr la reducción estable del mRNA. Luego de la incubación, el medio se retiró y las células se lisaron como se indica a continuación. La medición del ARN mensajero lisado se realizó mediante el sistema de reactivo QUANTIGENE® 2.0 (AFFYMETRIX®), que cuantificó el ARN mediante un método de amplificación de la señal de ADN ramificado que dependía del kit de sonda de captura de ARN específicamente diseñado. La mezcla de lisis (QUANTIGENE® 2.0 AFFYMETRIX®) se calentó previamente en una incubadora a 37 °C durante 30 minutos. Para el lisado de células en suspensión, se agregaron 100 μl de amortiguador de lisis 3X (con 10 $\mu l/ml$ de proteinasa K) a 200 μl de células en suspensión. Luego, las células se trituraron 10 veces para lisar, y la placa se selló y se incubó durante 30 min a 55 °C. Luego, los lisados se almacenaron a -80 °C o se sometieron a ensayo inmediatamente.

[0301] Ensayo: Según la sonda de captura específica usada (es decir, IKZF3, RB1 y $\beta 2M$), los lisados se diluyeron (o no se diluyeron) en la mezcla de lisis. Luego, los lisados se agregaron a la placa de captura (placa de poliestireno de 96 cavidades recubierta con sondas de captura) en un volumen total de 80 $\mu l/cavidad$. Los reactivos para conjuntos de sondas de trabajo se generaron al combinar 12,1 μl de agua libre de nucleasa, 6,6 μl de mezcla de lisis, 1 μl de reactivo de bloqueo, 0,3 μl de conjunto de sondas 2.0 específicas (IKZF3 humano catálogo N.º SA-17027, RB1 humano catálogo N.º SA-10550 o microglobulina beta-2 humana catálogo N.º SA-10012) de acuerdo con

las instrucciones del fabricante (QUANTIGENE® 2.0 AFFYMETRIX®). Luego se agregaron 20 µl de reactivos de kit de sondas de trabajo a una dilución de 80 µl de lisado (u 80 µl de mezcla de lisis para las muestras de fondo) en la placa de captura. Las placas luego se incubaron durante 16-20 horas a 55 °C hasta hibridarse (captura de ARN diana). La amplificación de señal y la detección del ARN diana se inició lavando placas con amortiguador 3 veces (300 µl/cavidad) para eliminar cualquier material no unido. Luego, se agregó reactivo de hibridación preamplificador 2.0 (100 µl/cavidad), se incubó a 55 °C durante 1 hora, luego se aspiró, y se agregó amortiguador de lavado y se aspiró 3 veces. Luego se agregó el reactivo de hibridación amplificador 2.0 como se describió (100 µl/cavidad), se incubó durante 1 hora a 55 °C, y la etapa de lavado se repitió como se describió anteriormente. A continuación se agregó reactivo de hibridación de sonda etiquetada 2.0 (100 µl/cavidad), se incubó durante 1 hora a 50 °C, y la etapa de lavado se repitió como se describió anteriormente. Las placas se volvieron a centrifugar a 240 g durante 20 segundos para retirar cualquier exceso de amortiguador de lavado, y luego, se agregó 2.0 Substrate (100 µl/cavidad) a las placas. Las placas se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente, y luego se obtuvieron imágenes de estas placas en un lector multidetector Envision de PerkinElmer en modo luminómetro durante 15 minutos.

[0302] Determinación de datos: Para el gen de interés, la señal de fondo de ensayo promedio (es decir, sin lisado, solo amortiguador de lisis 1X) se sustrajo de la señal promedio de cada réplica técnica. Las señales promedio sustraídas del fondo para el gen de interés luego se normalizaron a la señal promedio sustraída del fondo para el mRNA constitutivo (para células Ramos fue beta-2-microglobulina). El porcentaje de inhibición de la muestra tratada se calculó con respecto al promedio del lisado de la muestra de control sin tratar. Los resultados de los ensayos de Quantigene® para las células tratadas con los ASO se muestran en la Tabla 4.

Ejemplo 2E: Ensayo qPCR para medir la reducción de mRNA de SNCA en células SK-N-BE(2)

[0303] ASO SAN-005459 que actúa sobre SNCA se evaluó para determinar su capacidad de reducir la expresión de mRNA de SNCA en célula de neuroblastoma SK-N-BE(2) humana adquirida de ATCC (CRL-2271).

[0304] Las células SK-N-BE(2) se cultivaron en medio de cultivo celular (MEM [Sigma, cat. N.º M2279] enriquecido con 10 % de suero bovino fetal [Sigma, cat. N.º F7524], 1x GLUTAMAX™ [Sigma, cat. N.º 3050-038] solución de aminoácido no esencial MEM 1x

[Sigma, cat. N.º M7145] y 0,025 mg/ml de gentamicina [Sigma, cat. N.º G1397]). Las células se tripsinizaron cada 5 días mediante lavado con solución salina amortiguada con fosfato (PBS), [Sigma cat. N.º 14190-094] y luego adición de 0,25 % de solución de tripsina-EDTA (Sigma, T3924), incubación de 2-3 minutos a 37 °C y trituración antes de la siembra celular. Las células se mantuvieron en cultivo por hasta 15 pases.

[0305] Para uso experimental, se sembraron 12.500 células por cavidad en placas de 96 cavidades (Nunc cat. N.º 167008) en 100 µl de medio de cultivo. Se prepararon oligonucleótidos de una reserva de 750 µM. Se agregó ASO disuelto en PBS aproximadamente 24 horas después de que las células se sembraran en una concentración final de 25 µM para estudios de punto único. Las células se incubaron durante 4 días sin ningún cambio de medio. Para la determinación de potencia, se prepararon 8 concentraciones de ASO para un rango de concentración final de 16-50.000 nM. ASO-004316 (CcAAAtcttataataACTAC, SEQ ID NO: 25) y ASO-002816 (TTCctttacaccACAC, SEQ ID NO: 12) se incluyeron como controles.

[0306] Después de la incubación, las células se recolectaron al retirar el medio y luego agregar 125 µl de amortiguador de lisis PURELINK® Pro 96 (Invitrogen 12173.001A) y 125 µl de etanol al 70 %. Se purificó el ARN de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se eluyó en un volumen final de 50 µl de agua, lo que dio como resultado una concentración de ARN de 10-20 ng/µl. El ARN se diluyó 10 veces en agua antes de la reacción qPCR de una etapa. Para una reacción qPCR de una etapa, se mezcló la mezcla de qPCR (qScript TMXLE de 1 etapa RT-qPCR TOUGHMIX® Low ROX de QauntaBio, cat. N.º 95134-500) con dos sondas de Taqman en una relación 10:1:1 (mezcla de qPCR: sonda1:sonda2) para generar la mezcla maestra Mastermix. Se adquirieron sondas Taqman de LifeTechnologies: SNCA: Hs01103383_m1; PROS1: Hs00165590_m1; TBP: 4325803; GAPDH 4325792. Mastermix (6 µl) y ARN (4 µl, 1-2 ng/µl) se mezclaron en una placa de qPCR (óptica de 384 cavidades de MICROAMP®, 4309849). Después del sellado, la placa se giró rápidamente, 1000 g durante 1 minuto a RT, y se transfirió a un sistema ViiATM 7 (Applied Biosystems, Thermo) y se usaron las siguientes condiciones de PCR: 50 °C durante 15 minutos; 95 °C durante 3 minutos; 40 ciclos de: 95 °C durante 5 s, y luego una disminución de temperatura de 1,6 °C/s, y luego 60 °C durante 45 s. Los datos se analizaron usando el software de PCR en tiempo real de QUANTSTUDIO™.

Ejemplo 3: Análisis *in vitro* de ASO-005459 en la reducción de mRNA de SNCA humana

[0307] ASO-005459 es un ASO modificado por LNA de base 17 que actúa sobre el límite intrón1-exón2 de pre-mARN de *SNCA* humano (ver Figura 2, SEQ ID NO: 15).

Potencia de ASO-005459 en neuronas de ratón

[0308] El uso de los métodos descritos anteriormente en el Ejemplo 2A, ASO-005459 se evaluó para determinar su capacidad de reducir la expresión de proteína de *SNCA* como un resultado corriente abajo de la reducción en mARN de *SNCA*. Brevemente, las neuronas primarias derivadas de ratones PAC-A53T se trataron con ASO-005459 o ASO de control durante 14 días. Las células luego se fijaron y los niveles de proteína *SNCA* y proteína tubulina se midieron mediante diagnóstico por imágenes de alto contenido. Los niveles de tubulina se midieron para controlar la toxicidad y normalizar la reducción de proteína *SNCA*.

[0309] Como se muestra en la Tabla 1 a continuación, la incubación de células con 4 nM de ASO-005459 tuvo como resultado una reducción de 21 % en la expresión de la proteína *SNCA*. Con 40 nM y 5 μ M de ASO-005459, la expresión de la proteína *SNCA* se redujo 84 % y 86 %, respectivamente. En contraste, ASO-005459 tuvo un efecto mínimo o ningún efecto en el nivel de expresión de proteína tubulina.

Tabla 1: Actividad de ASO-005459 en neuronas A53T-PAC

Concentración de ASO-005459	% de inh. de aSyn/tub	SD	N	% de inh. de tub.	SD	N
4 nM	21,11	33,71	3	-8,60	12,07	4
40 nM	84,28	13,21	8	4,32	28,65	7
5 μ M	86,45	7,91	2	29,01	18,06	2

SD = desviación estándar

N = cantidad de pruebas

[0310] Asimismo, para evaluar la potencia, las neuronas A53T-PAC se trataron con una titulación de 10 puntos de ASO-005459, como se describió en el Ejemplo 2A, y se determinaron las IC₅₀ para efecto en proteína *SNCA* y tubulina. Como se muestra en las Figuras 7A y 7B, y la Tabla 2 (a continuación), se observó una reducción dependiente de la concentración en una relación α -Syn/tubulina, con una IC₅₀ promedio de 7,4 nM. Esta observación fue consistente con los datos de actividad de punto único que se muestran en la Tabla 1 (más arriba). Además, ASO-005459 produjo efectos insignificantes en los niveles de Tub. En conjunto, estos resultados indican que ASO-005459 reduce con potencia los niveles de proteína *SNCA* con un efecto mínimo en la viabilidad celular general.

Tabla 2: Cálculo de potencia y selectividad para ASO-005459 para proteína SNCA y tubulina en neuronas A53T-PAC

IC ₅₀ de aSyn/tub(nM)	SD	N	IC ₅₀ de tub (nM)	SD	N
7,42	2,73	6	>4000	NA	5

SD = desviación estándar

N = cantidad de pruebas

Eficacia de ASO-005459 en células SK-N-BE(2)

[0311] Mediante el método descrito en el Ejemplo 2E, ASO-005459 se evaluó para determinar su capacidad para reducir mRNA de SNCA en SK-N-BE(2) después de 4 días de tratamiento.

[0312] La incubación de células con 25 μ M de ASO-005459 produjo 92 % de reducción en mRNA de SNCA en células SK-N-BE(2).

Potencia de ASO-005459 en neuronas humanas

[0313] La potencia de ASO-005459 para SNCA se confirmó mediante el uso de neuronas humanas primarias como se describió anteriormente en el Ejemplo 2C. En resumen, las neuronas humanas se derivaron de células madre pluripotentes inducidas (iPS). Las células se trataron con ASO-005459 o ASO de control durante 6 días y luego se midieron los niveles de mRNA mediante el ensayo QUANTIGENE®. Debido a que las neuronas humanas también expresan *PROS1*, una potencial diana inespecífica para ASO-005459, el nivel de mRNA de *PROS1* también se midió para evaluar el efecto de ASO-005459 en genes de diana inespecífica. Además, el mRNA de tubulina (*TUBB*) se midió para controlar la toxicidad.

[0314] Como se muestra en la Figura 8 y la Tabla 3 (a continuación), ASO-005459 indujo una reducción dependiente de la concentración en SNCA expresada en neuronas humanas, con una IC₅₀ promedio de 100 nM. Esta IC₅₀ es ~13 veces más débil que la IC₅₀ para reducir la proteína SNCA en neuronas PAC-A53T (Tabla 2, más arriba). El motivo para este desplazamiento de potencia no está claro, pero podría deberse a las diferencias en la absorción de ASO, metabolismo o cinética de inhibición de SNCA. Si bien ASO-005459 también presentó reducciones dependientes de la concentración de mRNA de *PROS1* en las neuronas humanas; la IC₅₀ fue 30-50 veces más débil que la IC₅₀ para SNCA. Estos resultados confirman la actividad de ASO-005459 para SNCA en neuronas humanas e indica que ASO-005459 es 30-50 veces más selectiva para SNCA en comparación con *PROS1*.

Tabla 3: Potencia y selectividad de ASO-005459 en mRNA de SNCA y PROS1 en neuronas humanas

Fecha de ensayo	Lote	SNCA IC ₅₀ (nM)	PROS1 IC ₅₀ (nM)	TUBB3 IC ₅₀ (nM)	Relación IC ₅₀ de PROS1/SNCA
26/08/2016	01-001	42	2127	>5000	51
08/12/2016	01-004	157	>5000	>5000	>32

Lote = número de lote particular de ASO-005459 usado

Potencia de ASO-005459 en células Ramos

[0315] IKZF3 es otra potencial diana inespecífica para ASO-005459, pero a diferencia de PROS1, no se expresa en neuronas humanas. En su lugar, IKZF3 se expresa de manera robusta en células Ramos, una línea celular linfocítica humana. Las células Ramos se trataron con 1 μ M de ASO-005459, y se midió el efecto en la expresión de mRNA de IKZF3. Para controlar la toxicidad, también se midió el mRNA de beta-2 microglobulina. Como las células Ramos no expresan SNCA, se usó otro gen, RB1 (correpresor transcripcional RB 1) como control positivo para la inhibición mediada por ASO. ASO-006754 (GGTgaggttttggaGA, SEQ ID NO: 26) y ASO-006755 (GGTgaggttttgtagaAG, SEQ ID NO: 27) actúan sobre RB1 y se incluyeron en el estudio. Como se muestra en la Tabla 4 (a continuación), a 1 μ M de concentración, ASO-005459 no afectó la expresión de mRNA de IKZF3, lo que demostró la especificidad de ASO-005459 para SNCA. ASO-005459 tampoco afectó la expresión de mRNA de RB1 y β 2M, lo que indicó que ASO-005459 no es tóxico para células Ramos. En contraste, ASO-006754 y ASO-006755 (los ASO de control) redujeron los niveles de RB1 en 87 % y 83 %, respectivamente, lo que confirmó la actividad de ASO en células Ramos.

Tabla 4: Efecto de 1 μ M de ASO-005459 en IKZF3 en células Ramos

ASO	Diana	Lote	IKZF3 (% de con)	RB1 (% de con)	β 2M (% de con)
ASO-005459	SNCA	01-004	102	99	94
ASO-006754	RB1	01-001	104	13	87
ASO-006755	RB1	01-001	116	17	83

Lote = número de lote particular de ASO usado

[0316] En conjunto, los resultados presentados en la presente demuestran que ASO-005459 es potente y altamente selectivo para reducir mRNA de SNCA, que a su vez media en la reducción de niveles de proteína SNCA. Los resultados también muestran que ASO-005459 es bien tolerado tanto en neuronas de ratón como humanas. Estos resultados respaldan el desarrollo continuo de ASO-005459 como un agente terapéutico que modifica la enfermedad para el tratamiento de sinucleinopatías.

Ejemplo 4: Tolerabilidad *in vivo* y reducción de mRNA de SNCA *in vivo*

[0317] La tolerabilidad *in vivo* de ASO seleccionados se evaluó para observar cómo se toleraban los ASO cuando se inyectaban en modelos animales diferentes (es decir, ratones y *Macaca fascicularis*):

Ratones

[0318] *Sujetos:* Ratones macho y hembra (2-3 meses de vida) PAC-Tg(SNCA^{A53T})^{+/+}; SNCA^{-/-} ("PAC-A53T") que tenían el gen SNCA humano completo con una mutación A53T en un fondo de inhibición de SNCA de ratón se usaron para estudios de eficacia *in vivo* breves, a largo plazo y PK/PD. En algunos casos, los ratones C57B/6 de tipo silvestre (WT) se usaron para una evaluación de salud a largo plazo (es decir, 4 semanas). Los ratones se alojaron en grupos de 4 o 5 en una jaula de temperatura controlada con agua y alimento disponibles a demanda. Todos los procedimientos que incluyeron ratones se llevaron a cabo de acuerdo con los métodos de pruebas en animales (ATM) aprobados por la Comisión de cuidado y uso de animales de Bristol-Myers Squibb (ACUC).

[0319] *Preparación de la solución de dosis de ASO:* Se usaron jeringas de solución salina estériles (1 ml) equipadas con filtros Whatman de 0.2 µm y tubos de centrifuga libres de nucleasa para preparar las soluciones de dosis. El volumen indicado de agua o solución salina se agregó a un polvo de ASO y se agitó por vórtice (~1 min) para disolver el polvo de ASO. Luego, la solución se dejó reposar durante 10 min y se volvió a agitar por vórtice durante ~1 min. Los tubos se centrifugaron brevemente para volver a colocar todo el líquido en el fondo del tubo, y luego, la solución se filtró a través de un filtro estéril de 0.2 µm en un segundo tubo libre de RNasa. Una pequeña alícuota de la reserva primaria se diluyó a 1 mg/ml para análisis de la concentración usando Nanodrop. La muestra analítica se agitó por vórtice tres veces con inversión manual para mezclar exhaustivamente. Luego, la absorbancia de UV de la muestra se midió dos veces a 260 nm con Nanodrop (el pedestal se enjuagó y se secó tres veces antes de aplicar la muestra). La muestra de prueba se descartó una vez que se completó el análisis. La muestra se consideró lista para la dosis si la absorbancia de UV era de 90 a 110 % de la muestra. Si la absorbancia de UV excedía 110 % de la muestra, se preparó una dilución secundaria; si la absorbancia era < 90 %, la muestra se preparó a una concentración inicial mayor y se siguieron etapas similares a las descritas anteriormente. Las muestras se almacenaron a 4 °C hasta su uso.

[0320] *Inyección intracerebroventricular (ICV) a pulso:* Las inyecciones ICV se realizaron usando una microjeringa Hamilton equipada con una aguja de calibre 27 o

30, de acuerdo con el método de Haley y McCormick. La aguja se equipó con una protección de polietileno a 2,5-3 mm de la punta a fin de limitar su penetración en el cerebro. Los ratones se anestesiaron usando anestésico de isoflurano (1-4 %). Una vez que estaban suficientemente anestesiados, los ratones se sujetaron por la piel flácida de la parte trasera del cuello con el pulgar y los primeros dedos de la mano. Con una presión suave pero firme, la cabeza del animal luego se inmovilizó presionándola contra una superficie plana firme. La administración se llevó a cabo usando jeringas Hamilton de 10 µl equipadas con agujas de 27 ½ g. Luego, la punta de la aguja se insertó a través del pericráneo y el cráneo, alrededor de 1 mm en dirección lateral y 1 mm en dirección caudal al bregma (es decir, a la derecha de la línea media, alrededor de 3 mm para atrás midiendo desde la línea del ojo). Una vez que la aguja estaba en posición, el ASO se proporcionó en un volumen de 5 µl en vehículo de solución salina y se inyectó durante ~30 segundos. La aguja se dejó durante 5-10 segundos antes de retirarla. Los ratones se volvieron a colocar en sus jaulas y se permitió que se recuperaran durante ~2-4 min. Los ratones se observaron de manera continua durante 30 minutos inmediatamente después de la administración para detectar efectos adversos en la conducta ante el fármaco y/o dosis. Durante este tiempo, cualquier ratón que convulsionó más de 3 veces separadas se sometió a eutanasia de inmediato, y se le asignó un puntaje automático de 20. La tolerabilidad al fármaco se calificó 1 h $\pm$ 15 min después de la dosis. Los animales con compuestos no tolerados (puntaje de tolerabilidad > 4) se sometieron a eutanasia inmediatamente luego de una 1 h de evaluación.

[0321] *Evaluación de la tolerabilidad de ASO:* Los animales que recibieron una dosis de ASO se evaluaron justo después de la administración y se controlaron durante 2 h para detectar cualquier efecto adverso. Para los estudios de tolerabilidad aguda (AT), los ratones se evaluaron en el momento de la dosis y de nuevo en la retirada, es decir, 3 días después de la inyección de ASO. Para las evaluaciones de salud a largo plazo, los ratones se pesaron semanalmente y se controlaron para detectar cualquier problema de salud y conducta hasta completarse el experimento. Los ratones que tuvieron pérdidas de peso mayores a 15 % de su peso corporal inicial o exhibieron problemas de tolerabilidad se retiraron del estudio y se sometieron a eutanasia. Las evaluaciones de salud y tolerabilidad se llevaron a cabo de acuerdo con la siguiente tabla:

Tabla 5: Sistema de puntaje de tolerabilidad^a

Categoría	Puntaje 1	Puntaje 2	Puntaje 3	Puntaje 4
Hiperactividad, estereotipias, conducta en jaula	•Aumento muy leve de exploración de jaula o encabritamiento en comparación con controles	•Aumento de exploración de jaula (por ejemplo, excavación, enterramiento, etc.) •Aumento de acicalamiento	•Aumento moderado de la actividad en jaula •Estereotipias detectables (por ejemplo, movimientos en círculo, conductas repetitivas, etc.)	•Hiperactividad marcada •Estereotipias marcadas
Menor vigilancia, exploración y grado de respuesta	•Cierta reducción en la actividad exploratoria •Responde normalmente a la estimulación	•Somnolencia •Respuesta levemente reducida a tacto y manipulación	•Estupor (grado de respuesta reducido, menor reflejo corneal)	•Coma (no responde a estimulación, por ejemplo, pellizco), sin reflejo corneal
Coordinación y fuerza motoras	•Leve cambio en la marcha y la fuerza de prensión (caídas cada 5-10 s) •Sin caídas, respuesta de enderezamiento normal	•Fuerza (caídas en menos de 5 s) •Leve ataxia (por ejemplo, respuesta de enderezamiento lenta, tambaleo)	•Fuerza de prensión altamente reducida (caídas en menos de 2 s) •Ataxia (por ejemplo, marcha vacilante, caídas, caminata alterada)	•Ataxia intensa (por ejemplo, gateo, no sujeta la barra) •Sin capacidad de enderezamiento
Postura, aspecto, respiración	•Postura muy levemente anormal (sutil)	•Postura levemente anormal (por ejemplo, encorvamiento, extensión, postura baja, posición de la cola, cola rígida) •Piloerección o ptosis •pelaje descuidado	•Postura moderadamente anormal (por ejemplo, decúbito prono) •Respiración superficial	•Postura marcadamente anormal (por ejemplo, decúbito lateral) •Parálisis facial (por ejemplo, hipersalivación, lengua afuera) •Respiración dificultosa
Temblor, hiperactividad, convulsión	•Temblor detectable	•Hipersensibilidad a estímulos (por ejemplo, ruido) •Temblores marcados	•Pocas convulsiones o convulsiones parciales, encabritamiento y caídas como parte de la convulsión	•Convulsiones repetidas o continuas (con carreras y rebotes, clónicas y/o tónicas)

^a Normal se califica como "0". Los animales se califican individualmente en puntos temporales sucesivos después de la dosis. Las observaciones se califican a 1 h $\pm$ 15 min, luego 24 h $\pm$ 2 h, luego 7 días (si corresponde). Recuento de convulsiones para el punto temporal de 1 h, incluso si ocurren antes del intervalo de observación. Un puntaje de tolerabilidad total se calcula en función de la suma de los puntajes individuales por categoría, con un puntaje máximo posible de 20.

[0322] *Recolección de tejidos*: Luego de las evaluaciones de conducta y salud, los ratones se decapitaron en una guillotina y los cerebros se extrajeron rápidamente. Cada cerebro se dividió en dos hemisferios y a) el hipocampo se diseccionó para mediciones de mRNA en los estudios de tolerabilidad aguda de 3 días; b) el hipocampo, tronco encefálico y cuerpo estriado de un hemisferio se diseccionaron para mediciones de

mARN, mientras las mismas regiones se diseccionaron del segundo hemisferio para mediciones de proteína/PK en los estudios PK/PD de evolución temporal de respuesta a la dosis.

[0323] En algunos de los estudios, la sangre y el líquido cefalorraquídeo (CSF) también se recolectaron para mediciones de PK (sangre) y PK/proteína (CSF). Para extraer la sangre y el CSF, los ratones se anestesiaron profundamente con isoflurano (4 %). La sangre se extrajo mediante punción cardíaca usando una aguja 23G. Una vez extraída, la sangre se transfirió en tubos BD Microtainer (K2EDTA BD N.º 365974) de 2 ml y se colocó en hielo hasta el procesamiento. Para procesar la sangre, los tubos se centrifugaron en 4500 xg durante 10 min a 4 °C. Luego, el plasma se retiró y se colocó en tubos Eppendorf de 0,5 ml y se almacenó a -80 °C. Para recolectar el CSF, la cavidad torácica se abrió para exponer el corazón, y se drenó la mayor cantidad posible de sangre para evitar la contaminación del CSF. Las muestras de CSF se extrajeron mediante Cisterna magna usando micropipetas y se colocaron en tubos Lo-bind para proteínas de Eppendorf. Luego, los tubos se centrifugaron en 4500 xg durante 15 min a 4 °C. El CSF se transfirió cuidadosamente a tubos lo-bind de Eppendorf de 0,5 ml limpios y se almacenó a -80 °C hasta volver a usarse.

Datos de *Macaca fascicularis*

[0324] *Sujeto:* Se usaron *Macaca fascicularis* macho que pesaban 3,5-10,0 kg al comienzo del estudio. A cada uno se le implantó un catéter para líquido cefalorraquídeo (CSF) por vía intratecal que ingresó en las vértebras L3 o L4. El extremo distal del catéter de poliuretano se extendió dentro del espacio intratecal hasta aproximadamente la vértebra L1. El extremo proximal se conectó a un puerto de acceso subcutáneo ubicado en la zona lumbar del animal. Se permitió que los animales se recuperaran durante al menos dos semanas antes del inicio del estudio. La atención a animales de laboratorio se llevó adelante de acuerdo con la Política del servicio de salud pública sobre cuidado y uso éticos de animales de laboratorio y la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio del NRC (2011) (National Research Council: Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (The National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health). National Academies Press (EE.UU.), Washington (DC)). El protocolo fue aprobado por la Comisión de cuidado y uso de animales de Wallingford de Bristol-Myers Squibb Company.

[0325] *Muestreo de CSF y sangre:* Se accedió al puerto de CSF por vía subcutánea usando técnicas asépticas, y se obtuvieron muestras de CSF de animales despiertos sentados rectos en una silla de contención para primates. Se descartó

aproximadamente 0,1 ml de CSF en el comienzo de la recolección para despejar el espacio muerto en el catéter y el puerto. El CSF se recolectó por flujo de gravedad hasta un máximo de 0,5 ml de CSF por muestra. El CSF se agitó a 2.000 g a 4 °C durante 10 min. El sobrenadante se congeló en hielo seco o en nitrógeno líquido y se mantuvo a -90 °C hasta analizarse.

[0326] Se obtuvieron muestras de sangre de una vena disponible, generalmente la vena safena. Las muestras de sangre se prepararon en un número de procedimientos según la medida particular en cuestión. Para el plasma, la sangre se extrajo en tubos tratados con EDTA. Para el suero, la sangre se extrajo en tubos separadores de suero y se dejó coagular durante al menos 30 min antes de la centrifugación. Para las medidas de coagulación y factores de coagulación, la sangre se extrajo en tubos citratados, y para el análisis de ARN, la sangre se extrajo en tubos que contenían RNA-later. Luego del procesamiento, las muestras se congelaron en hielo seco o en nitrógeno líquido y se mantuvieron congeladas hasta analizarse.

[0327] *Dosis por vía intratecal:* Los animales se entrenaron para recibir la dosis despiertos y con el uso de sillas de contención disponibles en el comercio, los animales se mantuvieron en posición prono. Los oligonucleótidos antisentido (ASO) que actúan sobre *SNCA* se disolvieron en solución salina, se esterilizaron mediante filtración y se administraron a 0,33 ml/min en un volumen de 1,0 ml seguido de 0,5 ml de chorro de agua estéril. El tiempo de infusión total fue de 4,5 min. Los animales se mantuvieron en posición prono durante 30 min después de la infusión.

[0328] *Autopsia:* A los *Macaca fascicularis* se les administró el volumen adecuado de una solución de eutanasia disponible en el comercio, y se anestesiaron con ketamina e/o isoflurano. Los tejidos de la autopsia se obtuvieron inmediatamente después, y el cerebro se transfirió a hielo húmedo para su disección. Se diseccionaron áreas de interés mediante el uso de rebanadas de 4-6 mm en una matriz de cerebro de *Macaca fascicularis* ASI, además de técnicas de manos libres. Las muestras se colocaron frescas en RNAlater, o se congelaron en hielo seco para su análisis posterior. El tejido de SNC se diseccionó rápidamente de *Macaca fascicularis*, y se recolectaron piezas no más grandes de 4 mm en cualquier eje y se colocaron en 5 ml de RNAlater. Las muestras se almacenaron a 4 °C durante la noche, y luego se transfirieron a -20 °C para almacenamiento hasta analizarse.

[0329] Las regiones del cerebro analizadas incluyeron bulbo raquídeo, protuberancia, cerebro medio, cerebelo, núcleo caudado y putamen (izquierdo y derecho), hipocampo (izquierdo y derecho), corteza frontal (izquierda y derecha), corteza temporal (izquierda

y derecha), corteza parietal (izquierda y derecha), corteza occipital (izquierda y derecha) y materia blanca cortical. Además, se obtuvieron muestras de médula espinal en las regiones cervical, torácica y lumbar. También se obtuvieron muestras del hígado, riñón y corazón. En algunos casos, las muestras de núcleos trigéminos, nervio tibial y aorta se recolectaron para examinar la farmacología inespecífica en aquellas áreas.

Cuantificación de ELISA de concentración de ASO en tejido, plasma y CSF de ratón o mono:

[0330] El tejido se homogenizó con plasma y agua en una relación 1:1. La curva estándar se generó mediante una dilución serial en 2 veces de 5000 a 4,9 nM en plasma (para plasma y CSF) y en plasma:agua (para muestras de tejidos), y luego se volvió a diluir en un total de 5000 veces con 5X SSCT (750 mM de NaCl y 75 mM de citrato de sodio, pH 7,0, que contenía 0,05 % (v/v) de Tween-20) solo y en 5X SSCT que contenía 35 nM de reactivo de captura y 35 nM de reactivo de detección para obtener un rango estándar de 1-1000 pM. El factor de dilución usado varió según el rango de concentración de la muestra previsto. La sonda de captura fue AAAGGAA con 3' biotina (Exiqon) y la sonda de detección fue 5' DigN-isopropil 18 ligador--GTGTGGT (Exiqon).

[0331] Las muestras y estándares experimentales se agregaron a amortiguador de lisis de Clarity (Phenomenex, cat. N.º AL0-8579) en una relación 1:1 antes de la dilución con amortiguador de captura y de detección y antes de transferencia a la placa de ELISA. Las muestras de CSF se diluyeron con plasma (2 veces) antes de la adición de amortiguador de lisis. Una placa recubierta de estreptavidina (Thermo 15119) se lavó 3 veces con amortiguador SSCT 5X. Se agregaron muestras de 100 µl y se incubaron durante 60 min a temperatura ambiente. La sonda de detección, 100 µl de fragmento Fab anti-Dig-AP diluido 1:4000 en PBS que contenía 0,05 % de Tween-20 (Roche Applied Science, Cat. N.º 11 093 274 910) se agregó y se incubó durante 60 min a temperatura ambiente. Después de lavar la placa con amortiguador SSCT 2X, se agregaron 100 µl de sustrato Tropix CDP-star Sapphire II (Applied Biosystems) durante 30 min a temperatura ambiente. Las concentraciones de oligonucleótido antisentido se midieron mediante luminiscencia (Enspire-PerkinElmer).

Mediciones de proteína alfa-sinucleína:

[0332] Las muestras de tejido cerebral se homogeneizaron a 10 ml/g de tejido en amortiguador de RIPA (50 mM de Tris HCl, 150 mM de NaCl, 1 % de NP-40, 0,5 % de desoxicolato de sodio, 0,1 % de dodecil sulfato de sodio) usando homogeneizadores de microesferas Qiagen Tissuelyser II durante 25 ciclo/s, con una microesfera de acero inoxidable de 5 mm durante un total de 2 min. Las muestras homogeneizadas se

incubaron 30 min en hielo. 50 µl de alícuota de cada muestra se conservaron para análisis de PK. Las muestras restantes se centrifugaron 20.800 g, durante 60 min, 4 °C. El sobrenadante se conservó y se usó para análisis. La proteína total se midió usando un kit de ensayo de proteína BCA de Pierce (23227).

[0333] *Extractos de tejido cerebral:* La proteína SNCA se midió usando ELISA MJFR1+4B12. Brevemente, las placas ELISA (Costar) se recubrieron con 100 µl de anticuerpo anti-SNCA MJFR1 (Abcam) en una concentración de 0,1 µg/ml diluida en amortiguador carbonato-bicarbonato BupH, pH 9.4 (Thermo Scientific) durante la noche (O/N) a 4 °C. Las placas del día siguiente se lavaron 4 veces con PBS de Dulbecco (Life Technologies) y se bloquearon con 3 % de BSA (albúmina de suero bovino, libre de proteasa, fracción V, Roche Diagnostic) en PBS durante 2~3 h a temperatura ambiente (RT) o durante la noche a 4 °C. Tanto los estándares como las muestras cerebrales se diluyeron con 1 % de BSA/0,05 % de Tween/PBS que contenía inhibidor de la proteasa de Roche (Roche 11836145001, 1 pelet/25 ml) y fosfato inhibidor 2&3 (Sigma, 1:100). Se usó SNCA de tipo silvestre (rPeptide) como estándar. Las muestras se cargaron por duplicado (50 µl/cavidad) y se incubaron para O/N a 4 °C. Después de equilibrar las placas a RT, 50 µl del anticuerpo de detección 4B12 (Biolegend) (diluido 1:4000 en 1 % de BSA/0,1 % de Tween/DPBS) se agregaron a cada cavidad y se coincubaron con las muestras a RT durante ~2 h. El anticuerpo de detección se conjugó previamente con fosfatasa alcalina (kit AP de Novus Biologicals). Luego, las placas se lavaron 4 veces con 0,05 % de Tween/PBS y se desarrollaron con 100 µl de sustrato de fosfatasa alcalina (Tropix CDP Star listo para usar con Sapphire II, T-2214, Life Technologies) durante 30 minutos. Los recuentos de luminiscencia se midieron con Perkin Elmer EnVision (lector multidetector 2102). Las placas se conservaron en agitación constante (agitador de placas de título, velocidad 3) durante el ensayo. Los datos se analizaron mediante GraphPad Prism. La proteína total en el tejido cerebral se midió usando un kit de ensayo de proteína Micro (Thermofisher N.º 23235) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

[0334] *Líquido cefalorraquídeo (CSF):* La proteína SNCA se midió usando el kit de SNCA humana U-PLEX: (cat. N.º K151WKK-2, Meso Scale Discovery) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras de CSF se diluyeron 10 veces. La hemoglobina se midió en muestras de CSF usando el kit ELISA de hemoglobina de ratón Abcam (ab157715). Las muestras de CSF se diluyeron 40 veces para mediciones de hemoglobina.

Mediciones de mRNA mediante RT-PCR

[0335] Las regiones del cerebro se recolectaron y se colocaron en tubos de protección de tejido de 1,5 ml de RNA-later (Qiagen cat. N.º 76514) que se llenaron previamente con RNA-later, una solución de estabilización de ARN. El tejido en la solución de RNA-later se puede almacenar a 4 °C durante 1 mes, o a -20 °C u -80 °C indefinidamente.

[0336] Aislamiento de ARN: *Minikit Plus de RNeasy*: El ARN de hipocampo y corteza de ratón se aisló usando un minikit plus de RNeasy (Qiagen cat. N.º 74134). Las muestras de tejido se homogeneizaron en un volumen de 600 µl o 1200 µl de amortiguador RLT Plus que contenía 10 µl/ml de 2-mercaptoetanol y 0,5 % de reactivo Dx. Se usaron 600 µl de amortiguador de lisis si la muestra de tejido era <20 mg, se usaron 1200 µl de amortiguador de lisis para muestras de tejido de >20 mg. Para homogeneización, la muestra de tejido se transfirió a un tubo de fondo redondo de 2,0 ml con traba de seguridad de Eppendorf (Eppendorf cat N.º 022600044) que contenía 600 µl de amortiguador RLT Plus (más 10 µl/ml de 2-mercaptoetanol y 0,5 % de reactivo Dx) y se homogeneizaron muestras de microesferas de acero inoxidable de 5 mm (Qiagen cat N.º 69989) usando un instrumento TissueLyser II de Qiagen. Las muestras se procesaron durante 2,0 min a 20 Hz, se giraron a 180° y se procesaron durante otros 2,0 min a 20 Hz. Luego, las muestras se procesaron 2,0 min a 30 Hz, se giraron a 180° y se procesaron durante otros 2,0 min a 30 Hz. Se usó una homogeneización más extensa y/o a mayor frecuencia si el procesamiento no estaba completo. Luego, se transfirieron 600 µl del lisado en una columna de agitación gDNA Eliminator en un tubo de recolección de 2,0 ml y las muestras se centrifugaron durante 30 s a 10.000 g. Todas las etapas de centrifugación se llevaron a cabo a RT. El flujo se recolectó y un volumen equivalente de etanol al 70 % se agregó y se mezcló. 600 µl se transfirieron a una columna de agitación RNeasy colocada en un tubo de recolección de 2,0 ml, y las muestras se centrifugaron durante 15 s a 10.000 g. El flujo se descartó y los 600 µl restantes de la muestra se agregaron a la columna de agitación. Las columnas de agitación se centrifugaron y el flujo se descartó. Las columnas se lavaron con 700 µl de amortiguador de lavado RW1, se centrifugaron durante 15 s a 10.000 g, y el flujo se descartó. Luego, las columnas se lavaron 2 veces con 500 µl de amortiguador RPE que contenía 4 volúmenes de etanol como describe el protocolo del kit. Las columnas se centrifugaron primero durante 15 s a 10.000 g para el primer lavado, y luego durante 2,0 min a 10.000 g para el segundo lavado. Después del segundo lavado, las columnas se centrifugaron una vez durante 1,0 min a 10.000 g para secar las membranas. Luego, las columnas se transfirieron a un nuevo tubo de recolección de 1,5 ml y se agregaron 30 µl de agua libre de RNasa directamente en el centro de la membrana. Las membranas

se incubaron durante 10 min a RT. Luego, las columnas se centrifugaron durante 1,0 min a 10.000 g para eluir el ARN. La elución, que contenía el ARN, se recolectó y se almacenó en hielo hasta que las concentraciones de ARN pudieran determinarse mediante absorbancia de UV usando un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo). Las muestras de ARN se almacenaron a -80 °C.

[0337] Aislamiento de ARN: Minikit Plus Universal de RNEASY®: El ARN de todas las otras muestras de tejido de *Macaca fascicularis*, ratón y rata se aisló usando un minikit Plus Universal RNEASY® (Qiagen cat. N.º 73404). Para la homogenización, se transfirieron 50 µg o menos de muestra de tejido a un tubo de fondo redondo de 2,0 ml con traba de seguridad de Eppendorf (Eppendorf cat. N.º 022600044) que contenía 900 µl de reactivo de lisis QIAZOL®, y las muestras de microesferas de acero inoxidable de 5 mm (Qiagen cat. N.º 69989) se homogeneizaron usando un instrumento TissueLyser II de Qiagen. Las muestras se procesaron durante 2,0 min a 20 Hz, se giraron a 180° y se procesaron durante otros 2,0 min a 20 Hz. Luego, las muestras se procesaron 2,0 min a 30 Hz, se giraron a 180° y se procesaron durante otros 2,0 min a 30 Hz. Se usó una homogeneización más extensa y/o a mayor frecuencia si el procesamiento no estaba completo. Luego, el lisado de tejido homogeneizado se transfirió a un tubo de fondo redondo de 2,0 ml con traba de seguridad de Eppendorf durante 5,0 min. Se agregaron 100 µl de solución gDNA Eliminator en cada tubo, y los tubos se agitaron vigorosamente durante 30 s. Se agregaron 180 µl de cloroformo (Sigma cat. N.º 496189) en cada tubo, y los tubos se agitaron vigorosamente durante 30 s. Los tubos se dejaron a RT durante 3 min. Los tubos se centrifugaron a 12.000 g durante 15 min a 4 °C. Después de la centrifugación, la fase acuosa superior se transfirió a un nuevo tubo de fondo redondo de 2,0 ml con traba de seguridad de Eppendorf ~500 µl. Se agregó un volumen equivalente de etanol al 70 % y se mezcló. Todas las etapas de centrifugación siguientes se llevaron a cabo a RT. 500 µl se transfirieron a una columna de agitación RNeasy colocada en un tubo de recolección de 2,0 ml, y las muestras se centrifugaron durante 15 s a 10.000 g. El flujo se descartó y los 500 µl restantes de la muestra se agregaron a la columna de agitación. Las columnas de agitación se centrifugaron y el flujo se descartó y las columnas se lavaron con 700 µl de amortiguador de lavado RWT que contenía 2 volúmenes de etanol. Las columnas se centrifugaron durante 15 s a 10.000 g, el flujo se descartó. Luego, las columnas se lavaron dos veces con 500 µl de amortiguador RPE que contenía 4 volúmenes de etanol como se describe en el protocolo del kit. Las columnas se centrifugaron primero durante 15 s a 10.000 g para el primer lavado, y luego durante 2,0 min a 10.000 g para el segundo lavado. Después del

segundo lavado, las columnas se centrifugaron una vez durante 1,0 min a 10.000 g para secar las membranas. Luego, las columnas se transfirieron a un nuevo tubo de recolección de 1,5 ml y se agregaron 30 µl de agua libre de RNasa directamente en el centro de la membrana. Las membranas se incubaron durante 10 min a RT. Las columnas se centrifugaron durante 1,0 min a 10.000 g para eluir el ARN. Las eluciones, que contenían el ARN, se recolectaron y se almacenaron en hielo hasta la concentración de ARN determinada mediante absorbancia de UV usando un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo). Las muestras de ARN se almacenaron a -80 °C.

[0338] Síntesis de cADN mediante transcripción inversa: 300 ng de ARN se diluyeron hasta un volumen final de 10,8 µl usando agua libre de nucleasa (Invitrogen cat. N.º 10977-015) en una microplaca PCR-96-AB-C (Axygen cat. N.º 321-65-051). Se agregaron 6,0 µl en cada cavidad de mezcla de reacción 1 que contenía: 2,0 µl de 50 µM de cebadores aleatorios tipo decamer (Ambion cat. N.º AM5722G) y 4,0 µl de una mezcla dNTP 1X (Invitrogen cat. N.º 10297-018). La placa se selló con sellador óptico (Applied Biosystems cat. N.º 4360954) y se centrifugó durante 1,0 min a 1.000 x g a RT. Luego, la placa se calentó durante 3,0 min a 70 °C usando un sistema de PCR de ciclador térmico GeneAmp 9700 de 96 cavidades (Applied Biosystems). Luego, la placa se enfrió completamente en hielo. Luego, 3,25 µl de la mezcla de reacción 2 (que contenía 2 µl de amortiguador de cadena 10X, 1,0 µl de enzima transcriptasa inversa MMLV-RT a 200 U/µl (Ambion cat. N.º 2044), y 0,25 µl de inhibidor de RNasa a 40 U/µl (Ambion cat. N.º AM2682)) se agregaron en cada una de las cavidades. La placa se selló con sellador óptico y se centrifugó durante 1,0 min a 1.000 x g a RT. Mediante el uso de un ciclador térmico de 96 cavidades, la placa se calentó a 42 °C durante 60 min, y luego a 95 °C durante 10 min. Luego, las placas se enfriaron en hielo. Las placas de cADN se almacenaron a -20 °C hasta que estuvieron listas para usarse para el análisis de PCR.

[0339] qPCR para amplificación y cuantificación de la expresión de mRNA de SNCA y GAPDH: cADN se diluyó 5 veces en agua libre de nucleasa en una microplaca PCR-96-AB-C. 16 µl de solución Master Mix que consistía en: 10 µl de Gene Expression Master Mix de Taqman 2X (Applied Biosystems cat. N.º 4369016), 1,0 µl de conjunto cebador-sonda de Taqman 20X (Applied Biosystems), y 5,0 µl de agua libre de nucleasa, se agregó en cada cavidad de una placa de PCR óptica de 384 cavidades (Applied Biosystems cat. N.º 4483315). 4,0 µl del cADN diluido se agregaron en cada cavidad de la placa de PCR óptica de 384 cavidades. La placa se selló con sellador óptico y se centrifugó durante 1,0 min a 1.000 x g a RT. Se llevó a cabo una PCR en el sistema de

PCR en tiempo real Applied Biosystems 700 HT Fast usando los siguientes parámetros en modo estándar: 50 °C durante 2,0 min, 95 °C durante 10 min, y luego 40 ciclos de 95 °C durante 15 s y 60 °C durante 1,0 min.

[0340] Conjuntos de cebador-sonda de qRT-PCR: Los conjuntos de cebador-sonda de Applied Biosystems (Thermo Fisher) incluían lo siguiente:

[0341] Alfa sinucleína humana (cat. N.º Hs01103383_m1) etiquetada con FAM

[0342] PROS1 humano (cat. N.º HS00165590_m1) etiquetado con FAM

[0343] Alfa sinucleína de *Macaca Fascicularis* (cat. N.º Mf02793033_m1) etiquetada con FAM

[0344] GAPDH de *Macaca Fascicularis* (cat. N.º Mf04392546_g1) etiquetada con FAM

[0345] GAPDH de *Macaca Fascicularis* (cat. N.º Mf04392546_g1) limitada en cebador etiquetada con VIC

[0346] Alfa sinucleína de rata (cat. N.º Rn01425141_m1) etiquetada con FAM

[0347] GAPDH de rata (cat. N.º Rn01775763-g1) etiquetada con FAM

[0348] GAPDH de rata (cat. N.º 4352338E) limitada en cebador etiquetada con VIC

[0349] GAPDH de ratón (cat. N.º Mm99999915-g1) etiquetada con FAM

[0350] GAPDH de ratón (cat. N.º 4352339E) limitada en cebador etiquetada con VIC.

Ejemplo 5: Análisis de actividad y tolerabilidad *in vivo* de ASO-005459 en ratones

[0351] ASO-005459 es un ASO modificado por LNA específico para SNCA humana. Los resultados *in vitro* (descritos anteriormente) demuestran que ASO-005459 es potente y selectivo para reducir el mRNA de SNCA en neuronas primarias. Los resultados *in vitro* también sugieren que ASO-005459 es bien tolerado.

Ratones A53T-PAC

[0352] Para evaluar si estos resultados también aplican *in vivo*, se administraron 100 µg de ASO-005459 a ratones A53T-PAC mediante inyección ICV, y se evaluó tanto la tolerabilidad como la inactivación (KD) de mRNA de SNCA en el hipocampo 3 días después de la inyección, como se describió en el Ejemplo 4 (más arriba).

[0353] Como se muestra en la Tabla 6 (a continuación), ASO-005459 se toleró bien con un puntaje de tolerabilidad media general de 1. Además, ASO-005459 redujo significativamente los niveles de mRNA de SNCA >90 % en el hipocampo 3 días después de la administración. (Figura 9).

Tabla 6: Tolerabilidad de ASO-005459 en ratones A53T-PAC, estudio de 3 días

Animal N.º	Hiperactividad	Vigilancia	Coordinación y fuerza motoras	Postura/ Respiración	Temblor/ Convulsiones	Puntaje total
31	0	2	1	2	0	5
32	0	0	0	0	0	0
33	0	0	0	0	0	0
34	0	0	0	0	0	0
35	0	0	0	0	0	0
media						1,00
SEM						1,00

[0354] Para evaluar la actividad *in vivo*, a los ratones A53T-PAC se les administró ASO-005459 en una concentración de 3,13 µg, 12,5 µg, 25 µg o 50 µg mediante inyección ICV. La tolerabilidad se evaluó al medir los pesos corporales en los días 7 y 14 después de la administración. La expresión de *mARN* de *SNCA* se evaluó 14 días después de la administración, los animales se sacrificaron y se recolectaron sus tejidos. La inactivación de *mARN* de *SNCA* se midió en tres regiones del cerebro: hipocampo, tronco encefálico y cuerpo estriado. El tronco encefálico y el cuerpo estriado son dos de las regiones más afectadas en el cerebro de los pacientes con MSA y PD. En otro estudio, a los ratones C57BL/6 se les administró 100 µg de ASO-005459, y la tolerabilidad se evaluó midiendo el peso corporal de los animales en los días 7, 14, 21 y 28 después de la administración. 100 µg de ASO-005459 se administraron ICV en ratones C57BL/6 de tipo silvestre (WT), y el peso corporal y la conducta se evaluaron durante 4 semanas. Dado que ASO-005459 no actúa sobre *SNCA* de ratón, la reducción en la expresión de *mARN* de *SNCA* no se midió en estos animales.

[0355] Como se muestra en las Figuras 10A y 10B, no se observaron diferencias significativas en el peso corporal de los ratones (ratones A53T-PAC y ratones C57BL/6) tratados con ASO-005459 (todas las concentraciones) y los tratados con el vehículo de control. Los animales (C57BL/6) no presentaron conductas anómalas durante el experimento. Ver Tabla 7 (a continuación). Dichos resultados demuestran que ASO-005459 fue bien tolerado. Además, en los ratones tratados con ASO-005459, se observó una reducción significativa y dependiente de la dosis en la expresión de *mARN* de *SNCA* para las tres regiones cerebrales evaluadas. Ver las Figuras 11A-11C. En el hipocampo, la expresión de *mARN* de *SNCA* se redujo en 53 %, 73 %, 80 % y 96 % para 3,13, 12,5, 25 y 50 µg de ASO-005459, respectivamente. Se observaron inactivaciones dependientes de la dosis similares en el tronco encefálico. En el cuerpo estriado, las inactivaciones de *mARN* de *SNCA* fueron más variables y menos robustas en comparación con las otras regiones (Figuras 11A-11C): se observaron 75 % y 46 % de

inactivación para 50 µg y 25 µg de ASO-005459, respectivamente. No obstante, para 12,5 µg y 3,13 µg de ASO-005459, no se observó una reducción significativa en la expresión de mRNA de SNCA. Las posibles explicaciones para la menor actividad observada en el cuerpo estriado se basan en las diferencias en los niveles de ASO o la cinética de la inactivación de mRNA de SNCA.

Tabla 7: Tolerabilidad de ASO-005459 en estudio de 28 días

Animal N.º	Punto temporal (días)	Hiperactividad	Vigilancia	Coordinación y fuerza motoras	Postura/Respiración	Temblor/Convulsiones	Puntaje total
26	1	0	0	0	0	0	0
26	28	0	0	0	0	0	0
27	1	0	0	0	0	0	0
27	28	0	0	0	0	0	0
28	1	0	0	0	0	0	0
28	28	0	0	0	0	0	0
29	1	0	0	0	0	0	0
29	28	0	0	0	0	0	0
30	1	0	0	0	0	0	0
30	28	0	0	0	0	0	0

[0356] Los niveles de ASO-005459 se midieron en las tres regiones cerebrales de los ratones A53T-PAC. Como se muestra en la Figura 12 y la Tabla 8 (a continuación), la exposición en el cerebro fue aproximadamente proporcional a la dosis y similar en las tres regiones, que incluyen el cuerpo estriado. Las relaciones exposición-respuesta a ASO-005459 para las diferentes regiones cerebrales se muestran en las Figuras 13A-13D. Se observaron relaciones exposición-respuesta similares en el hipocampo y el tronco encefálico con IC₅₀ estimadas de 179 y 206 nM, respectivamente. En comparación, las relaciones exposición-respuesta en el cuerpo estriado fueron relativamente pronunciadas, lo que sugiere una cinética más lenta en la reducción de mRNA de SNCA en esa región. Ver la Figura 13C.

Tabla 8: Resumen de exposición a ASO-005459 en el cerebro de un estudio de A53T-PAC de 14 días

	Dosis (µg)	Media (nM)	SD	Con respecto a hippo
Hipocampo	3,13	214	43	
	12,5	411	140	
	25	600	223	
	50	1916	807	
Tronco encefálico	3,13	160	47	0,7
	12,5	266	47	0,6
	25	440	102	0,7
	50	707	202	0,4
Cuerpo estriado	3,13	212	38	1,0

Tabla 8: Resumen de exposición a ASO-005459 en el cerebro de un estudio de A53T-PAC de 14 días

Dosis (µg)	Media (nM)	SD	Con respecto a hippo
12,5	438	103	1,1
25	586	109	1,0
50	1332	302	0,7

[0357] A fin de proporcionar datos de respuesta a la dosis/evolución temporal más amplios, ASO-005459 se volvió a administrar (0, 12,5, 25 o 50 µg) directamente en los ventrículos cerebrales de ratones A53T-PAC mediante inyección ICV a pulso. Los animales se sacrificaron 24 horas, 3 días, 4, 8, 12, 16 y 20 semanas después de la administración, y se evaluó la expresión de mRNA de *SNCA* en el tronco encefálico y el cuerpo estriado.

[0358] Como se muestra en las Figuras 14A y 14B (y de acuerdo con los datos proporcionados anteriormente), la administración de ASO-005459 a los ratones A53T-PAC produce una reducción significativa del nivel de expresión de mRNA de *SNCA* (con respecto al control de vehículo) en el tronco encefálico y el cuerpo estriado. La reducción parecía depender del tiempo y la dosis, una reducción de picos (~90 %) se observó en el tronco encefálico para 50 µg de ASO-005459 alrededor de 4 semanas después de la administración (Figura 14A). En el cuerpo estriado, una reducción de picos (~55 %) se observó para 50 µg de ASO-005459 alrededor de 3 días después de la administración (Figura 14B). Los niveles de expresión de mRNA de *SNCA* se mantuvieron significativamente reducidos comparación con el control de vehículo 4 semanas después de la administración (Figuras 15A y 15B) y volvieron al control inicial alrededor de 16 semanas después de la administración (Figuras 14A y 14B).

[0359] Como se muestra en las Figuras 16A y 16B, la administración de ASO-005459 a los animales también produjo una reducción dependiente del tiempo y de la dosis en el nivel de proteína *SNCA* en el tejido cerebral del tronco encefálico y el cuerpo estriado. Una reducción de picos (~75 %) se observó en el tronco encefálico para una dosis de 50 µg 8 semanas después de la administración (Figura 16A). En el tejido cerebral del cuerpo estriado, una reducción de picos (~75 %) también se observó para dosis de 50 µg pero a las 4 semanas después de la administración (Figura 16B). Los niveles de expresión de los ratones individuales para 8 semanas después de la administración se proporcionan en las Figuras 17A (tronco encefálico) y 17B (cuerpo estriado). Mientras que el nivel de proteína *SNCA* volvió a acercarse al inicio alrededor de 12 semanas después de la administración en el cuerpo estriado, el nivel de expresión aún se mantuvo significativamente reducido (~25 %) en el tronco encefálico hasta 16 semanas después

de la administración.

Ejemplo 7: Análisis de actividad y tolerabilidad *in vivo* de oligonucleótidos antisentido (ASO) que actúan sobre SNCA en *Macaca fascicularis*

[0360] Asimismo, para evaluar la actividad y tolerabilidad de ASO *in vivo*, se desarrolló un modelo de *Macaca fascicularis* con puerto intratecal (*Macaca fascicularis* IT). Este modelo permitió la evaluación de la inactivación de SNCA mediada por ASO-005459 así como de la inactivación de las potenciales dianas inespecíficas con errores de apareamiento en el par de bases 1, PROS1 e IKZF3. Los sitios diana de ASO-005459 en SNCA, PROS1 e IKZF3, se conservan por completo en seres humanos y *Macaca fascicularis*.

[0361] Como se describió anteriormente para el Ejemplo 3, a cada animal se le implantó un catéter para líquido cefalorraquídeo (CSF) por vía intratecal que ingresó en las vértebras L3 o L4. Los ASO (ASO-005459, ASO-005584 y ASO-005578) se disolvieron en solución salina y se administraron a los animales, se infundieron durante 4,5 min usando el puerto IT (2 animales por grupo de dosis). Cada uno de los animales recibió una de las siguiente dosis: (i) ASO-005578 (4 mg en total), (ii) ASO-005584 (4 u 8 mg en total) y (iii) ASO-005459 (8 mg en total). Luego, los animales se sometieron a eutanasia en diversos puntos temporales después de la administración, y los tejidos se recolectaron para el análisis de la exposición a y actividad de ASO. Las regiones del cerebro analizadas incluyeron bulbo raquídeo (Med), protuberancia (V-Pons), cerebro medio (V-MB), cerebelo (CBL), núcleo caudado y putamen (izquierdo y derecho) (CauP), hipocampo (izquierdo y derecho) (Hip), corteza frontal (izquierda y derecha) (FrC), corteza temporal (izquierda y derecha) (TeC), corteza parietal (izquierda y derecha) (PaC), corteza occipital (izquierda y derecha) (Occ) y materia blanca cortical (WM). Además, se obtuvieron muestras de médula espinal en las regiones cervical (CSC), torácica (TSC) y lumbar (LSC). También se recolectaron muestras del hígado, riñón, corazón, núcleos trigéminos, nervio tibial y aorta para evaluar la farmacología inespecífica en esas áreas.

[0362] Como en el caso de los ratones, los ASO fueron bien tolerados en *Macaca fascicularis*, sin que se observaran efectos adversos (datos no mostrados). Y como se muestra en la Figura 18A y la Tabla 9 a continuación, la administración de ASO-005578 o ASO-005584 a los animales produjo una reducción significativa de los niveles de mRNA de SNCA en todos los tejidos cerebrales analizados. 2 semanas después de la administración, ASO-005578 indujo reducciones de 75 %, 32 %, 65 %, 69 %, 98 % y 87

% en el bulbo raquídeo, núcleo caudado y putamen, protuberancia, cerebelo, médula espinal lumbar y corteza frontal, respectivamente. ASO-005584 indujo reducciones de 59%, 45%, 61%, 57%, 97% y 88% en el bulbo raquídeo, núcleo caudado y putamen, protuberancia, cerebelo, médula espinal lumbar y corteza frontal, respectivamente. Se observaron reducciones similares en los puntos temporales de 2 semanas y 4 semanas después de la dosis, luego de la administración de 8 mg de ASO-005584 (Figura 18B). ASO-005459 también presentó una inhibición robusta de mARN de *SNCA* en diversas regiones del cerebro de *Macaca fascicularis* (Tabla 9).

Tabla 9: Efecto de los ASO sobre los niveles de mARN de *SNCA* cerebral en el cerebro de *Macaca fascicularis*

ASO N.º	Dosis (mg)	Punto temporal (semanas)	Med	CBL	FrC	PaC	CauP	TeC	Occ	Hip	V-MB	V-Pons	CSC	TSC	LSC	WM
ASO-005578	4	2	25	32	13	27	68	24	38	45	27	35	15	7	2	64
ASO-005584	4	2	41	44	12	34	55	8	38	44	53	39	16	9	3	45
	8	2	21	62	10	16	62	6	19	36	34	23	2	2	2	38
	8	4	36	70	11	23	65	7	28	48	48	37	5	4	3	78
ASO-005459	8	24 horas	174	140	146		149					137			73	
	8	24 horas	129	108	138		133					145			90	
	8	3 días	162	69	69		112					62			19	
	8	3 días	127	67	72		114					87			31	
	2	2	133	140	109		161					104			21	
	2	2	117	127	100		126					180			111	
	4	2	62	86	22		116					49			4	
	4	2	81	72	50		145					97			13	
	8	2	31	97	7		124					66			14	
	8	2	30	38	15	26	75	12	29	29	86	29	13	6	2	79
	8	4	26	50	4	12	53	3	13	9	24	21	4	6	4	87
	8	4	38	61	9		120					30			10	
	8	8	121	85	40		98					78			5	
	8	8	93	52	14		61					36			11	
	8	13	30	63	8		81					27			1	
	8	13	25	28	8		49					22			1	
	8	20	40	38	35		76					63			9	
	8	20	22	52	35		76					26			11	

[0363] A fin de caracterizar adicionalmente la reducción dependiente del tiempo de mARN de *SNCA* descrita anteriormente, a los *Macaca fascicularis* se les administró ASO-005459 (8 mg en total por animal) y se sacrificaron 24 horas, 3 días, 2, 4, 8, 13 o 20 semanas después de la administración, para evaluar el nivel de expresión de mARN de *SNCA* en los diferentes tejidos. Como se muestra en la Figura 19A, se observó una reducción en los picos entre las semanas 2 y 13 después de la administración. Se observaron reducciones de picos de 70 %, 65 %, 75 %, 35 %, 94 % y 99 % en el bulbo raquídeo, cerebelo, protuberancia, núcleo caudado y putamen, corteza frontal y médula espinal lumbar, respectivamente. Esta reducción del nivel de expresión de mARN de

SNCA también se correlaciona con una reducción dependiente del tiempo en el nivel de expresión de proteína SNCA (Figura 19B).

[0364] Luego, para evaluar adicionalmente si la reducción en el nivel de expresión en *Macaca fascicularis* también dependía de la dosis, los animales recibieron 2, 4 u 8 mg de ASO-005459, y se sacrificaron 2 semanas después de la administración. Como se muestra en las Figuras 20A y 20B, la reducción en los niveles de expresión de mRNA de SNCA y de proteína SNCA también dependía de la dosis, en donde la mayor reducción se observó para 8 mg de ASO-005459.

[0365] Los resultados que se presentan en la presente demuestran que ASO-005459 es potente y selectivo para reducir mRNA de SNCA, y que ASO-005459 es bien tolerado en las neuronas y en estudios de especies preclínicas *in vivo*. Además, los resultados de las neuronas A53T-PAC confirman que las reducciones de mRNA mediadas por ASO-005459 producen reducciones de los niveles de proteína SNCA *in vitro* e *in vivo*. Además, los resultados en ratones A53T-PAC y en *Macaca fascicularis* demuestran que ASO-005459 reduce el mRNA de SNCA y la proteína SNCA en el cerebro en dosis que son bien toleradas. En conjunto, estos resultados respaldan el desarrollo continuo de ASO-005459 como un agente terapéutico que modifica la enfermedad para el tratamiento de sinucleinopatías.

[0366] La presente solicitud PCT reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud provisional estadounidense N.º 62/616.994, presentada el 12 de enero de 2018, que se incorpora en la presente por referencia en su totalidad.

REIVINDICACIONES

1. Un oligonucleótido antisentido que comprende una secuencia de nucleótidos contiguos de 10 a 30 nucleótidos de longitud que son complementarios a una secuencia de ácido nucleico dentro de un transcripto de alfa-sinucleína (SNCA), en donde la secuencia de ácido nucleico comprende los nucleótidos 7592-7637 de SEQ ID NO: 1.
2. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la secuencia de ácido nucleico comprende los nucleótidos 7602-7627 de SEQ ID NO: 1.
3. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la secuencia de ácidos nucleicos corresponde a los nucleótidos 7603-7620 de SEQ ID NO: 1.
4. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la secuencia de ácidos nucleicos corresponde a los nucleótidos 7604 – 7620 de SEQ ID NO: 1.
5. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el transcripto de SNCA comprende SEQ ID NO: 1.
6. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la secuencia de nucleótidos contiguos comprende SEQ ID NO: 4 a SEQ ID NO: 21 con 1, 2, 3 o 4 errores de apareamiento.
7. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la secuencia de nucleótidos contiguos comprende SEQ ID NO: 4 a SEQ ID NO: 21.
8. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la secuencia de nucleótidos contiguos comprende SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 7.
9. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el oligonucleótido antisentido puede inhibir la expresión del transcripto de SNCA humano en una célula que expresa el transcripto de SNCA humano.
10. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la secuencia de nucleótidos contiguos comprende al menos un análogo de nucleótido.
11. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que es un *gapmer*.

12. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con la reivindicación 11, que es un *gapmer* de flanqueo alterno.
13. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con la reivindicación 11 o 12, que comprende la Fórmula de 5'-A-B-C-3', en donde
- (i) la región B es una secuencia contigua de al menos 6 unidades de ADN, que pueden reclutar RNasa;
 - (ii) la región A es una secuencia de la primera sección de 1 a 10 nucleótidos, en donde la secuencia de la primera sección comprende uno o más análogos de nucleótidos y, opcionalmente, una o más unidades de ADN, y en donde al menos uno de los análogos de nucleótidos se ubica en el extremo 3' de A; y
 - (iii) la región C es una secuencia de la segunda sección de 1 a 10 nucleótidos, en donde la secuencia de la segunda sección comprende uno o más análogos de nucleótidos y, opcionalmente, una o más unidades de ADN, y en donde al menos uno de los análogos de nucleótidos se ubica en el extremo 5' de C.
14. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con la reivindicación 13, en donde la región A comprende una combinación de análogos de nucleótidos y una unidad de ADN seleccionados de (i) 1-10 análogos de nucleótidos y 0 unidades de ADN; (ii) 1-9 análogos de nucleótidos y 1 unidad de ADN; (iii) 1-8 análogos de nucleótidos y 1-2 unidades de ADN; (iv) 1-7 análogos de nucleótidos y 1-3 unidades de ADN; (v) 1-6 análogos de nucleótidos y 1-4 unidades de ADN; (vi) 1-5 análogos de nucleótidos y 1-5 unidades de ADN; (vii) 1-4 análogos de nucleótidos y 1-6 unidades de ADN; (viii) 1-3 análogos de nucleótidos y 1-7 unidades de ADN; (ix) 1-2 análogos de nucleótidos y 1-8 unidades de ADN; y (x) 1 análogo de nucleótido y 1-9 unidades de ADN.
15. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con la reivindicación 13 o 14, en donde la región C comprende una combinación de análogos de nucleótidos y una unidad de ADN seleccionados de (i) 1-10 análogos de nucleótidos y 0 unidades de ADN; (ii) 1-9 análogos de nucleótidos y 1 unidad de ADN; (iii) 1-8 análogos de nucleótidos y 1-2 unidades de ADN; (iv) 1-7 análogos de nucleótidos y 1-3 unidades de ADN; (v) 1-6 análogos de nucleótidos y 1-4 unidades de ADN; (vi) 1-5 análogos de nucleótidos y 1-5 unidades de ADN; (vii) 1-4 análogos de nucleótidos y 1-6 unidades de ADN; (viii) 1-3 análogos de nucleótidos y 1-7 unidades de ADN; (ix) 1-2 análogos de nucleótidos y 1-8 unidades de ADN; y (x)

- 1 análogo de nucleótido y 1-9 unidades de ADN.
16. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en donde la región A es un diseño de primera sección seleccionado de cualquier ASO en las Figuras 2 y 3, y/o la región C es un diseño de segunda sección seleccionado de cualquier ASO en las Figuras 2 y 3, en donde la letra mayúscula es un análogo de nucleótido, y la letra minúscula es un ADN.
 17. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, que comprende al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9 o al menos 10 análogos de nucleótidos.
 18. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 17, en donde el análogo o los análogos de nucleótidos son uno o más nucleósidos con azúcar modificado seleccionados del grupo que consiste en ácido nucleico bloqueado (LNA); 2'-O-alkil-ARN; 2'-amino-ADN; 2'-fluoro-ADN; ácido arabino-nucleico (ANA); 2'-fluoro-ANA, ácido hexitol-nucleico (HNA), ácido nucleico intercalado (INA), nucleósido de etilo restringido (cEt), ácido nucleico de 2'-O-metilo (2'-OMe), ácido nucleico de 2'-O-metoxietilo (2'-MOE) y cualquier combinación de estos.
 19. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 17, en donde el análogo o los análogos de nucleótidos comprenden un azúcar bicíclico.
 20. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con la reivindicación 19, en donde el azúcar bicíclico comprende cEt, 2'-O-metoxietilo restringido en 2',4' (cMOE), LNA, α -L-LNA, β -D-LNA, ácidos nucleicos unidos con puentes de 2'-O,4'-C-etileno (ENA), amino-LNA, oxi-LNA o tio-LNA.
 21. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 20, en donde el análogo o los análogos de nucleótidos comprenden un LNA.
 22. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 21, en donde el oligonucleótido antisentido comprende una o más nucleobases de 5' metil cistósina.
 23. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con la reivindicación 21, que comprende dos a cinco LNA en la región 5' del oligonucleótido antisentido.
 24. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con la reivindicación 21, que comprende dos a cinco LNA en la región 3' del oligonucleótido antisentido.
 25. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, en donde el oligonucleótido antisentido tiene una tolerabilidad *in vivo*

menor o igual a un puntaje total de 4, en donde el puntaje total es la suma de un puntaje unitario de cinco categorías, que son 1) hiperactividad; 2) menor actividad y estimulación; 3) disfunción motriz y/o ataxia; 4) postura y respiración anormales; y 5) temblor y/o convulsiones, y en donde el puntaje unitario para cada categoría se mide en una escala de 0-4.

26. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con la reivindicación 25, en donde la tolerabilidad *in vivo* es menor o igual al puntaje total de 3, al puntaje total de 2, al puntaje total de 1 o al puntaje total de 0.
27. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26, que reduce la expresión de mRNA de SNCA en una célula en al menos alrededor de 20 %, al menos alrededor de 30 %, al menos alrededor de 40 %, al menos alrededor de 50 %, al menos alrededor de 60 %, al menos alrededor de 70 %, al menos alrededor de 80 %, al menos alrededor de 90 % o alrededor de 100 % en comparación con una célula no expuesta al oligonucleótido antisentido.
28. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 27, que reduce la expresión de la proteína SNCA en una célula en al menos alrededor de 60 %, al menos alrededor de 70 %, al menos alrededor de 80 %, al menos alrededor de 90 % o al menos alrededor de 95 % en comparación con una célula no expuesta al oligonucleótido antisentido.
29. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28, que comprende los nucleótidos A, T, C y G, y al menos un análogo de los nucleótidos A, T, C y G, y que tiene un puntaje de secuencia mayor o igual a 0,2, en donde el puntaje de secuencia se calcula mediante la Fórmula I:

$$\frac{\text{N.º de nucleótidos C y análogos de estos} - \text{N.º de nucleótidos G y análogos de estos}}{\text{Longitud total en nucleótidos}} \quad (I)$$
30. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29, que tiene de 10 a 24 nucleótidos de longitud o de 14 a 21 nucleótidos de longitud.
31. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 30, que tiene 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o 21 nucleótidos de longitud.
32. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con la reivindicación 1 a 31, en donde la secuencia de nucleótidos comprende, consiste esencialmente en, o consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4 a 21 con un diseño seleccionado del grupo que consiste en los diseños en las Figuras

2 y 3, en donde la letra mayúscula es nucleósido con azúcar modificado y la letra minúscula es ADN.

33. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con la reivindicación 32, en donde la secuencia de nucleótidos comprende, consiste esencialmente en, o consiste en SEQ ID NO: 15 con el diseño de ASO-005459 y SEQ ID NO: 7 con el diseño de ASO-005578 o ASO-005584.
34. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 31, en donde la secuencia de nucleótidos comprende, consiste esencialmente en, o consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4-21 con la correspondiente estructura química en las Figuras 2 y 3.
35. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con la reivindicación 34, en donde la secuencia de nucleótidos comprende, consiste esencialmente en, o consiste en ASO-005459, ASO-005578 y ASO-005584.
36. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con la reivindicación 34, en donde el ASO comprende una fórmula molecular de $C_{171}H_{214}N_{56}O_{90}P_{16}S_{16}$.
37. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con la reivindicación 34, en donde el ASO comprende una fórmula molecular de $C_{182}H_{229}N_{58}O_{96}P_{17}S_{17}$.
38. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con la reivindicación 34, en donde el ASO comprende una fórmula molecular de $C_{181}H_{227}N_{58}O_{96}P_{17}S_{17}$.
39. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 35, que comprende un enlace internucleósido seleccionado de: un enlace de fosfodiéster, un enlace de fosfotriéster, un enlace de metilfosfonato, un enlace de fosforamidato, un enlace de fosforotioato y combinaciones de estos.
40. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con la reivindicación 39, en donde el enlace internucleósido comprende uno o más enlaces de fosfato modificado estereodefinidos.
41. Un conjugado que comprende el oligonucleótido antisentido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 40, en donde el oligonucleótido antisentido se une de manera covalente a al menos una porción no nucleótido o no polinucleótido.
42. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 41, en donde la porción no nucleótido o no polinucleótido comprende una proteína, una cadena de ácidos grasos, un residuo de azúcar, una glucoproteína, un polímero o cualquier combinación de estos.

43. Una composición farmacéutica que comprende el oligonucleótido antisentido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 40, o el conjugado de acuerdo con las reivindicaciones 41 o 42, y un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico.
44. La composición de acuerdo con la reivindicación 43, que también comprende un agente terapéutico.
45. La composición de acuerdo con la reivindicación 44, en donde el agente terapéutico es un antagonista de alfa-sinucleína.
46. La composición de acuerdo con la reivindicación 45, en donde el antagonista de alfa-sinucleína es un anticuerpo anti-alfa-sinucleína o un fragmento de este.
47. Un kit que comprende el oligonucleótido antisentido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 40, o el conjugado de acuerdo con las reivindicaciones 41 o 42, o la composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 43 a 46, y las instrucciones para su uso.
48. Un kit de diagnóstico que comprende el oligonucleótido antisentido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 40, el conjugado de acuerdo con las reivindicaciones 41 o 42, o la composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 43 a 46, y las instrucciones para su uso.
49. Un método para inhibir o reducir la expresión de la proteína SNCA en una célula, en donde el método comprende administrar el oligonucleótido antisentido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 40, o el conjugado de acuerdo con las reivindicaciones 41 o 42, o la composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 43 a 46 a la célula que expresa la proteína SNCA, en donde la expresión de la proteína SNCA en la célula se inhibe o se reduce después de la administración.
50. El método de acuerdo con la reivindicación 49, en donde el oligonucleótido antisentido inhibe o reduce la expresión de mRNA de SNCA en la célula después de la administración.
51. El método de acuerdo con las reivindicaciones 49 o 50, en donde la expresión de mRNA de SNCA se reduce en al menos alrededor de 20 %, al menos alrededor de 30 %, al menos alrededor de 40 %, al menos alrededor de 50 %, al menos alrededor de 60 %, al menos alrededor de 70 %, al menos alrededor de 80 %, al menos alrededor de 90 % o alrededor de 100 % después de la administración en comparación con una célula no expuesta al oligonucleótido antisentido.

52. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 49 a 51, en donde el oligonucleótido antisentido reduce la expresión de la proteína SNCA en la célula después de la administración en al menos alrededor de 60 %, al menos alrededor de 70 %, al menos alrededor de 80 % o al menos alrededor de 90 % en comparación con una célula no expuesta al oligonucleótido antisentido.
53. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 49 a 52, en donde la célula es una neurona.
54. Un método para tratar una sinucleinopatía en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz del oligonucleótido antisentido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 40, el conjugado de acuerdo con las reivindicaciones 41 o 42, o la composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 43 a 46.
55. El uso del oligonucleótido antisentido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 40, el conjugado de acuerdo con la reivindicación 41 o 42, o la composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 43 a 46 para la fabricación de un medicamento.
56. El uso del oligonucleótido antisentido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 40, el conjugado de acuerdo con la reivindicación 41 o 42, o la composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 43 a 46 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una sinucleinopatía en un sujeto que lo necesita.
57. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 40, el conjugado de acuerdo con las reivindicaciones 41 o 42 o la composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 43 a 46 para usar en un tratamiento.
58. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 40, el conjugado de acuerdo con la reivindicación 41 o 42, o la composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 43 a 46 para usar en el tratamiento de una sinucleinopatía en un sujeto que lo necesita.
59. El método de acuerdo con la reivindicación 54, el uso de acuerdo con la reivindicación 55 o 56 o el oligonucleótido antisentido para usar de acuerdo con la reivindicación 57 o 58, en donde la sinucleinopatía se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Parkinson, demencia asociada a la enfermedad de Parkinson (PDD), atrofia multisistémica, demencia con cuerpos de Lewy, y combinaciones de estos.

60. El método de acuerdo con la reivindicación 54 o 59, el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 55, 56 y 59 o el oligonucleótido antisentido para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 57 a 59, en donde el sujeto es un ser humano.
61. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 54, 59 y 60, el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 55, 56, 59 y 60, o el oligonucleótido antisentido para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 57 a 60, en donde el oligonucleótido antisentido, el conjugado o la composición se administran por vía oral, parenteral, intratecal, intracerebroventricular, pulmonar, tópica o intraventricular.
62. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 40, el conjugado de acuerdo con la reivindicación 41 o 42, la composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 43 a 46, el kit de acuerdo con la reivindicación 47 o 48, el método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 49 a 54 y 59 a 61, el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 55, 56 y 59 a 61, o el oligonucleótido antisentido para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 57 a 61, en donde el análogo de nucleótido comprende un nucleósido con azúcar modificado.
63. El oligonucleótido antisentido, el conjugado, la composición, el kit, el método, el uso o el oligonucleótido antisentido para usar de acuerdo con la reivindicación 62, en donde el nucleósido con azúcar modificado es un nucleósido con azúcar modificado que mejora la afinidad.

RESUMEN

La presente divulgación se refiere a oligonucleótidos antisentido, que actúan sobre mARN de SNCA (por ejemplo, en una unión intrón-exón) en una célula, que tiene como resultado una expresión reducida de la proteína SNCA. La reducción de la expresión de la proteína SCNA es beneficiosa para el tratamiento de determinados trastornos médicos, por ejemplo, un trastorno neurológico.