

ÖZET

BİR SÜJEDE SMN2 UÇ BİRLEŞTİRMESİNİN MODÜLASYONU İÇİN BİLEŞİMLER VE YÖNTEMLER

5

Burada, bir süjedeki SMN2 mRNA'nın uç birleştirmesinin modüle edilmesi için bileşikler, bileşimler ve yöntemler açıklanmaktadır. Ayrıca, açıklanan bileşiklerin ve bileşimleri, spinal kas atrofisi dahil olmak üzere hastalıkların ve rahatsızlıkların tedavisi için bir ilacın üretiminde kullanımları da sağlanmaktadır.

10

İSTEMLER

1. Spinal kas atrofisi (SMA) olan bir insan süjenin tedavisinde kullanım için, insan SMN2 kodlayan bir ön-mRNA'nın intron 7'sine tamamlayıcı bir antisens oligonükleotid içeren bir antisens bileşik olup, burada
5 oligonükleotid içeren bir antisens bileşik olup, burada bileşik insan süjenin intratekal boşluğundaki beyin-omurilik sıvısının içine verilir, burada antisens oligonükleotid SEQ ID NO: 1'in nükleobaz dizisinden
10 oluşan bir nükleobaz dizisine sahiptir, burada antisens oligonükleotidin her bir nükleosidi bir modifiye şeker bölütü içerir, burada her bir modifiye şeker bölütü bir 2'-metoksietil şeker bölütüdür ve burada her bir nükleosit arası bağlantı bir fosforotioat bağlantıdır.
15
2. İnsan SMN2 kodlayan bir ön-mRNA'nın intron 7'sine tamamlayıcı bir antisens oligonükleotid içeren bir antisens bileşiğin, spinal kas atrofisi (SMA) olan bir insan süjenin tedavisinde kullanım için bir ilacın
20 üretiminde kullanımı olup, burada ilaç insan süjenin intratekal boşluğundaki beyin-omurilik sıvısının içine verilir, burada antisens oligonükleotid SEQ ID NO: 1'in nükleobaz dizisinden oluşan bir nükleobaz dizisine sahiptir, burada antisens oligonükleotidin her bir
25 nükleosidi bir modifiye şeker bölütü içerir, burada her bir modifiye şeker bölütü bir 2'-metoksietil şeker bölütüdür ve burada her bir nükleosit arası bağlantı bir fosforotioat bağlantıdır.
3. İstem 1'e göre kullanım için antisens bileşik veya istem 2'ye göre bir antisens bileşiği kullanımı olup, burada veriliş bir bolus enjeksiyon içerir.
30
4. İstem 1 veya 3'e göre antisens bileşik veya istem 2 ya da
35 3'e göre bir antisens bileşiğin kullanımı olup, burada

antisens bileşik, insan süjenin vücut ağırlığının kilogramı başına antisens bileşiğin 0,01 ila 10 miligram arasında bir dozunda verilir.

- 5 5. İstem 4'e göre kullanım için antisens bileşik veya istem 4'e göre bir antisens bileşiğin kullanımı olup, burada doz aşağıdaki gibidir:
- (a) insan süjenin vücut ağırlığının kilogramı başına 0,01 ila 5 miligram arasında antisens bileşik.
- 10 (b) insan süjenin vücut ağırlığının kilogramı başına 0,05 ila 1 miligram arasında antisens bileşik.
- (c) insan süjenin vücut ağırlığının kilogramı başına 0,01 ila 0,5 miligram arasında antisens bileşik veya
- (d) insan süjenin vücut ağırlığının kilogramı başına 0,05
- 15 ila 0,5 miligram arasında antisens bileşik.
6. İstemler 1 veya 3-5'ten herhangi birine göre kullanım için antisens bileşik veya istemler 2-5 herhangi birine göre bir antisens bileşiğin kullanımı olup, (i) tip I SMA'sı;
- 20 (ii) tip II SMA'sı veya (iii) tip III SMA'sı olan bir insan hastanın tedavisinde kullanım içindir.
7. İstemler 1 veya 3-6'dan herhangi birine göre kullanım için antisens bileşik veya istemler 2-6'dan herhangi birine
- 25 göre bir antisens bileşiğin kullanımı olup, burada antisens bileşiğin verilişi, ekson 7'ye sahip SMN2 mRNA miktarında en az %10 bir artışla sonuçlanır.
8. İstemler 1 veya 3-7'den herhangi birine göre kullanım için antisens bileşik veya istemler 2-7'den herhangi birine
- 30 göre bir antisens bileşiğin kullanımı olup, insan süje SMA'nın bir ya da daha fazla endikatörüne sahiptir.
9. İstemler 1 veya 3-8'den herhangi birine göre kullanım için
- 35 antisens bileşik veya istemler 2-8'den herhangi birine

göre bir antisens bileşiğin kullanımı olup, burada insan süje SMA ile ilişkili en az bir semptomu sahiptir.

5 10. İstemler 1 veya 3-9'dan herhangi birine göre kullanım için antisens bileşik veya istemler 2-9'dan herhangi birine göre bir antisens bileşiğin kullanımı olup, burada antisens bileşik hem sistemik olarak hem merkezi sinir sisteminin içine verilir ve burada sistemik veriliş ve merkezi sinir sisteminin içine veriliş farklı zamanlarda gerçekleştirilir.

15 11. İstem 10'a göre kullanım için antisens bileşik veya bir antisens bileşiğin kullanımı olup, burada sistemik veriliş subkütan verilişle, intravenöz veya intraperitoneal enjeksiyonlardır.

20 12. İstemler 1 veya 3-9'dan herhangi birine göre kullanım için antisens bileşik veya istemler 2-9'dan herhangi birine göre bir antisens bileşiğin kullanımı olup, burada antisens bileşiğin bir birinci dozu, insan süjenin doğumunun bir haftası içinde verilir.

25 13. İstemler 1 veya 3-9'dan herhangi birine göre kullanım için antisens bileşik veya istemler 2-9'dan herhangi birine göre bir antisens bileşiğin kullanımı olup, burada antisens bileşiğin bir birinci dozu insan süjenin doğumunun bir ayı içinde verilir.

30 14. İstemler 1 veya 3-9'dan herhangi birine göre kullanım için antisens bileşik veya istemler 2-9'dan herhangi birine göre bir antisens bileşiğin kullanımı olup, burada antisens bileşiğin bir birinci dozu insan süjenin doğumunun üç ayı içinde verilir.

15. İstemler 1 veya 3-9'dan herhangi birine göre kullanım için antisens bileşik veya istemler 2-9'dan herhangi birine göre bir antisens bileşiğin kullanımı olup, burada antisens bileşiğin bir birinci dozu insan süjenin doğumunun altı ayı içinde verilir.

5

16. İstemler 1 veya 3-9'dan herhangi birine göre kullanım için antisens bileşik veya istemler 2-9'dan herhangi birine göre bir antisens bileşiğin kullanımı olup, burada antisens bileşiğin bir birinci dozu insan süje 1 ila 2 yaşındayken verilir.

10

17. İstemler 1 veya 3-9'dan herhangi birine göre kullanım için antisens bileşik veya istemler 2-9'dan herhangi birine göre bir antisens bileşiğin kullanımı olup, burada antisens bileşiğin bir birinci dozu insan süje 1 ila 15 yaşındayken verilir.

15

TARİFNAME

BİR SÜJEDE SMN2 UÇ BİRLEŞTİRMESİNİN MODÜLASYONU İÇİN BİLEŞİMLER VE YÖNTEMLER

5

DİZİ LİSTESİ

Mevcut başvuru, elektronik formatta bir Dizi Listesiyle birlikte yapılmaktadır. Dizi Listesi, 17 Haziran 2010
10 tarihinde oluşturulan, 5 Kb boyutunda olan 20100617_CORE0086WSEQ.txt başlıklı bir dosya olarak sağlanmaktadır.

BULUŞUN ALT YAPISI

15

Primer transkriptler veya ön-mRNA olarak bilinen yeni sentezlenmiş ökaryotik mRNA molekülleri translasyondan önce işlenir. Ön-mRNA'ların işlenmesi, transkriptin 3' ucuna bir 5' metilatlı başlığın ve yaklaşık 200-250 baz poli(A) kuyruğunun
20 eklenmesini içerir. mRNA'nın ön-mRNA'dan işlenmesi ayrıca sıklıkla, ön-mRNA'nın, memeli mRNA'larının %90-95'inin olgunlaşmasında meydana gelen uç birleştirmesini içerir. İntronlar (veya müdahil diziler), olgun mRNA'nın kodlama dizisinde yer almayan bir ön-mRNA (veya bunu kodlayan DNA)
25 bölgeleridir. Eksonlar, olgun mRNA'da muhafaza edilen primer transkript bölgeleridir. Eksonlar, olgun mRNA dizisinin oluşturulması için birlikte uç birleştirilir. Uç birleştirme kesişmeleri ayrıca, kesişimin 5' tarafının sıklıkla "5' uç birleştirme alanı" veya "uç birleştirme donör alanı" olarak ve
30 3' tarafının "3' uç birleştirme alanı" veya "uç birleştirme alıcı alanı" olarak adlandırıldığı şekilde uç birleştirme alanları olarak da ifade edilmektedir. Uç birleştirmede, bir akış yukarı eksonun 3' ucu akış aşağı eksonun 5' ucuna birleştirilir. Böylelikle, uç birleştirilmemiş ön-mRNA, bir
35 intronun 5' ucunda bir ekson/intron kesişmesine ve bir

intronun 3' ucunda bir intron/ekson kesişmesine sahip olur. Intron çıkarıldıktan sonra, eksonlar bazı durumlarda, olgun mRNA'da ekson/ekson kesişimi veya sınırı olarak ifade edilen yerde bitişiktir. Kriptik uç birleştirme alanları, daha az sıklıkla kullanılan ancak olağan uç birleştirme alanı blokeli olduğunda veya mevcut olmadığında kullanılabilen alanlardır. Birlikte uç birleştirme olarak tanımlanan alternatif uç birleştirme veya eksonların farklı kombinasyonları çoğunlukla bir tek genden birden fazla mRNA transkriptiyle sonuçlanır.

10

Bir nokta mutasyonundan ortaya çıkan insan genetik hastalıklarının %50'sine kadarı anormal ön-mRNA işlenmesiyle sonuçlanır. Bu tip nokta mutasyonları ya bir mevcut uç birleştirme alanını bozar ya da eksonların farklı bir kombinasyonundan oluşan ya da eksonların silintilerine sahip mRNA transkriptleriyle sonuçlanan şekilde yeni bir uç birleştirme alanı yaratır. Nokta mutasyonlar ayrıca bir kriptik uç birleştirme alanının aktivasyonu ile sonuçlanabilir ya da düzenleyici cis öğelerini (yani uç birleştirme güçlendiricileri veya susturucuları) bozar (Cartegni et al., Nat. Rev. Genet., 2002, 3, 285-298; Drawczak et al., Hum. Genet., 1992, 90, 41-54). Antisens oligonükleotidler, arzu edilen bir uç birleştirme ürününün sağlanması için uç birleştirmeyi yeniden yönlendirmek amacıyla, birçok genetik hastalıkta anormal uç birleştirmeye yol açan mutasyonları hedeflemek için kullanılmıştır (Kole, Acta Biochimica Polonica, 1997, 44, 231-238).

20

25

30

35

Antisens bileşikler ayrıca, Bcl-x-ön-mRNA'nın uzun ve kısa biçimleri gibi doğal oluşumlu değişimli uç birleştirme varyantlarının oranını değiştirmek (U.S. Patent 6.172.216; U.S. Patent 6.214.986; Taylor et al., Nat. Biotechnol. 1999, 17, 1097-1100) veya prematüre sonlandırma kodonları ihtiva eden spesifik eksonların atlanmasını zorlamak için kullanılmıştır (Wilton et al., Neuromuscul. Disord., 1999, 9,

330-338). U.S. Patent 5.627.274 ve WO 94/26887, bir mutasyon ihtiva eden bir ön-mRNA molekülünde, anormal uç birleştirmeye RNAz H'yi aktive etmeyen antisens oligonükleotidler kullanılarak mücadele etmek için bileşimleri ve yöntemleri

5

Yakınsal spinal kas atrofisi (SMA), spinal motor nöronlarının kaybıyla karakterize bir genetik, nörodejeneratif rahatsızlıktır. SMA, erken başlangıçlı bir otozomal çekinik hastalıktır ve halihazırda bebekler arasında ölümün önde gelen nedenidir. SMA'nın ciddiyeti hastalar arasında değişiklik gösterir ve böylelikle üç tip olarak sınıflandırılmıştır. Tip I SMA doğumda veya 6 ay içerisinde başlayan en ciddi biçimdir ve tipik olarak 2 yıl içerisinde ölümle sonuçlanır. Tip I

10

15

20

SMA'sı olan çocuklar oturamaz veya yürüyemez. Tip II SMA orta biçimdir ve hastalar oturabilir ancak ayakta duramaz veya yürüyemez. Hastalığın kronik bir biçimi olan Tip III SMA'sı olan hastalar tipik olarak 18 aylık olduktan sonra SMA'ya yakalanır (Lefebvre et al., Hum. Mol. Genet., 1998, 7, 1531-1536).

SMA'nın moleküler temeline, snRNP biyojenezinde ve devridaiminde yer aldığı düşünülen bir multi-protein kompleksinin parçası olan bir protein olan, SMN Telomerik olarak da bilinebilen sağkalım motor nöron geni 1'in (SMN1) her iki kopyasının da kaybı neden olur. Neredeyse özdeş bir gen olan, SMN Sentromerik olarak da bilinebilen SMN2, 5q13 kromozomunda kopyalanmış bir bölgede mevcuttur ve hastalık ciddiyetini modüle eder. Normal SMN1 geninin ekspresyonu yalnızca sağkalım motor nöronu (SMN) proteininin ekspresyonuyla sonuçlanır. Her ne kadar SMN1 ve SMN2 aynı proteini kodlama potansiyeline sahip olsa da, SMN2 ekson 7'nin +6 konumunda translasyonel olarak sessiz bir mutasyon ihtiva eder ve bu da SMN2 transkriptlerinde ekson 7'nin etkisiz

25

30

35

dahiliyle sonuçlanır. Böylelikle, SMN2'nin baskın formu, ekson

7'den yoksun, kararsız ve inaktif olan budanmış bir versiyondur (Cartegni and Krainer, Nat. Genet., 2002, 30, 377-384). SMN2 geninin ekspresyonu yaklaşık %10-20 SMN proteiniyle ve %80-90 kararsız/fonksiyonel-olmayan SMNdelta7 proteiniyle sonuçlanır. SMN proteini, uç birleştirme-zomun toplanmasında iyi-bilinen bir rol oynar ve ayrıca aksonda ve nöronların sinir uçlarında mRNA alışverişine aracılık edebilir.

Antisens teknolojisi, alternatif uç birleştirme ürünleri dahil olmak üzere bir ya da daha fazla spesifik gen ürününün ekspresyonunun modüle edilmesi için etkili bir araçtır ve bir dizi terapötik, tanısal ve araştırma uygulamalarında benzersiz bir şekilde faydalıdır. Antisens teknolojisinin arkasındaki prensip, bir hedef nükleik aside melezlenen bir antisens bileşiğinin, bir dizi antisens mekanizmasının biri yoluyla, transkripsiyon, uç birleştirme veya translasyon gibi gen ekspresyonu aktivitelerini modüle etmesidir. Antisens bileşiklerin dizi özgüllüğü bu bileşikleri, hedef doğrulama ve gen fonksiyonelleştirme için aletlerin yanı sıra hastalıkta yer alan genlerin ekspresyonunu seçimli olarak modüle etmek için terapötikler olarak aşırı derecede caziptir.

SMN2'ye tamamlayıcı belirli antisens bileşikleri teknikte bilinmektedir. Bakınız örneğin, WO 2007/002390; Hua et al., American J. of Human Genetics (April 2008) 82, 1-15; Singh et al., RNA Bio. 6:3, 1-10 (2009). Burada açıklanan belirli antisens bileşikleri ve yöntemleri, teknikte bilinen bu tip bileşiklere ve yöntemlere kıyasla arzu edilen karakteristiklere sahiptir. SMN2'nin uç birleştirmesini modüle etmek için tasarlanan kimerik peptit nükleik asit molekülleri tarif edilmiştir (WO 02/38738; Cartegni and Krainer, Nat. Struct. Biol., 2003, 10, 120-125). Hua Y et al (2008) The American Journal of Human Genetics 82: 834-848, insan Smn2 ön-mRNA'yı hedefleyen antisens bileşikleri ve bunların insan SMN2

transjenik farelerde ekson 7 içerilmesi üzerindeki bir etki için test edilmelerini tarif etmektedir.

BULUŞUN KISA AÇIKLAMASI

5

Bir yönde, mevcut buluő, spinal kas atrofisi (SMA) olan bir insan süjenin tedavisinde kullanım için, insan SMN2 kodlayan bir n-mRNA'nın intron 7'sine tamamlayıcı bir antisens oligonükleotid içeren bir antisens bileşik sağlamakta olup, burada bileşik insan süjenin intratekal boşluğundaki beyin-omurilik sıvısının içine verilir, burada antisens oligonükleotid SEQ ID NO: 1'in nükleobaz dizisinden oluşan bir nükleobaz dizisine sahiptir, burada antisens oligonükleotidin her bir nükleosidi bir modifiye şeker bölütü içerir, burada her bir modifiye şeker bölütü bir 2'-metoksietil şeker bölütüdür ve burada her bir nükleosit arası bağlantı bir fosforotioat bağlantıdır.

Buluő ayrıca, insan SMN2 kodlayan bir n-mRNA'nın intron 7'sine tamamlayıcı bir antisens oligonükleotid içeren bir antisens bileşiğin, spinal kas atrofisi (SMA) olan bir insan süjenin tedavisinde kullanım için bir ilacın üretiminde kullanımını da sağlamakta olup, burada ilaç insan süjenin intratekal boşluğundaki beyin-omurilik sıvısının içine verilir, burada antisens oligonükleotid SEQ ID NO: 1'in nükleobaz dizisinden oluşan bir nükleobaz dizisine sahiptir, burada antisens oligonükleotidin her bir nükleosidi bir modifiye şeker bölütü içerir, burada her bir modifiye şeker bölütü bir 2'-metoksietil şeker bölütüdür ve burada her bir nükleosit arası bağlantı bir fosforotioat bağlantıdır.

Buluşun diğer yönleri mevcut istemlerde düzenlenmektedir.

Belirli durumlarda, mevcut açıklama, bir süjeye, insan SMN2 n-mRNA kodlayan bir nükleik asidin intron 7'sine tamamlayıcı

bir antisens oligonükleotid içeren bir antisens bileşiğinin verililişini içeren yöntemleri sağlamakta olup, burada antisens bileşik beyin-omurilik sıvısının içine verilir. Belirli durumlarda, verililiş intratekal boşluğun içinedir. Belirli durumlarda, verililiş beyindeki beyin-omurilik sıvısının içinedir. Belirli durumlarda, verililiş bir bolus enjeksiyon içerir. Belirli durumlarda, verililiş bir aktarma pompasıyla infüzyon içerir.

- 10 Belirli durumlarda, antisens bileşik, süjenin vücut ağırlığının kilogramı başına 0,01 ila 10 miligram arasında bir antisens bileşik dozunda verilir. Belirli durumlarda, doz süjenin vücut ağırlığının kilogramı başına 0,01 ila 10 miligram arasında antisens bileşiktir. Belirli durumlarda, doz
- 15 süjenin vücut ağırlığının kilogramı başına 0,01 ila 5 miligram arasında antisens bileşiktir. Belirli durumlarda, doz süjenin vücut ağırlığının kilogramı başına 0,05 ila 1 miligram arasında antisens bileşiktir. Belirli durumlarda, doz süjenin vücut ağırlığının kilogramı başına 0,01 ila 0,5 miligram
- 20 arasında antisens bileşiktir. Belirli durumlarda, doz süjenin vücut ağırlığının kilogramı başına 0,05 ila 0,5 miligram arasında antisens bileşiktir.

- Belirli durumlarda, doz günlük olarak verilir. Belirli
- 25 durumlarda, doz haftalık olarak verilir. Belirli durumlarda, antisens bileşik kesintisiz olarak verilir ve burada doz, gün başına verilen miktardır. Belirli durumlarda, yöntem, bir indükleme evresinde en az bir indükleme dozunun verililişini ve bir idame evresinde en az bir idame dozunun verililişini içerir.
- 30 Belirli durumlarda, indükleme dozu, süjenin vücut ağırlığının kilogramı başına 0,05 ila 5,0 miligram arasında antisens bileşiktir. Belirli durumlarda, idame dozu, süjenin vücut ağırlığının kilogramı başına 0,01 ila 1,0 miligram arasında antisens bileşiktir. Belirli durumlarda, indükleme evresinin
- 35 süresi en az 1 haftadır. Belirli durumlarda, idame evresinin

süresi en az 1 haftadır. Belirli durumlarda, her bir indükleme dozu ve her bir idame dozu bir tekli enjeksiyon içerir. Belirli durumlarda, her bir indükleme dozu ve her bir idame dozu bağımsız olarak iki ya da daha fazla enjeksiyon içerir.

5 Belirli durumlarda, antisens bileşik, en az 1 haftalık bir tedavi periyodu boyunca en az 2 kez verilir. Belirli durumlarda, tedavi periyodu en az bir aydır. Belirli durumlarda, tedavi periyodu en az 2 aydır. Belirli durumlarda, tedavi periyodu en az 4 aydır. Belirli durumlarda, indükleme
10 dozu bir ya da daha fazla bolus enjeksiyonla verilir ve idame dozu bir infüzyon pompasıyla verilir.

Belirli durumlarda, yöntem antisens bileşiğın tolere edilebilirliğının ve/veya etkililiğının tayin edilmesini
15 içerir. Belirli durumlarda, antisens bileşiğın doz miktarı veya sıklığı, antisens bileşiğın verililişinin tolere edilmediğının bir endikasyonunu takiben indirgenir. Belirli durumlarda, antisens bileşiğın doz miktarı veya sıklığı, antisens bileşiğın verililişinin etkili olduğının bir
20 endikasyonunu takiben muhafaza edilir veya indirgenir. Belirli durumlarda, antisens bileşiğın dozu, antisens bileşiğın verililişinin etkili olmadığının bir endikasyonunu takiben arttırılır. Belirli durumlarda, antisens bileşiğın sıklığı, antisens bileşiğın verililişinin etkili olduğının bir
25 endikasyonunu takiben indirgenir. Belirli durumlarda, antisens bileşiğın sıklığı, antisens bileşiğın verililişinin etkili olmadığının bir endikasyonunu takiben arttırılır.

Belirli durumlarda, yöntemler, antisens bileşiğın ve en az bir
30 adet diğır terapinin eş-verilişini içerir. Belirli durumlarda, bir antisens bileşik ve en az bir adet diğır terapi aynı zamanda eş-verilir. Belirli durumlarda, bir antisens bileşik, en az bir adet diğır terapinin verililişı öncesinde verilir. Belirli durumlarda, bir antisens bileşik, en az bir adet diğır
35 terapinin verililişinden sonra verilir. Belirli durumlarda, en

az bir adet diğer terapi, valproik asidin, riluzolun, hidroksiürenin ve bir bütiratın birinin ya da daha fazlasının verilmesini içerir. Belirli durumlarda, en az bir adet diğer terapi, trikostatın-A'nın verilmesini içerir. Belirli durumlarda, en az bir adet diğer terapi, kök hücrelerin verilmesini içerir. Belirli durumlarda, en az bir adet diğer terapi gen terapisi. Belirli durumlarda, gen terapisi CSF'ye verilir ve bir antisens bileşik sistemik olarak verilir. Belirli durumlarda, gen terapisi CSF'ye verilir ve bir antisens bileşik sistemik olarak ve CSF'ye verilir. Belirli durumlarda, açıklama, başlangıçta bir antisens bileşiğın CSF'ye ve sistemik olarak verildiğı, arından gen terapinin CSF'ye verildiğı ve antisens bileşiğın sistemik verildiğı tedavi rejimleri sağılar. Bu tip belirli durumlarda, süje ilk tedavi zamanında bir bebektir. Bu tip belirli durumlarda, süje 2 yaşından küçüktür. Belirli durumlarda, antisens bileşik bir süjenin CNS'sine, süje gen terapisi için yeterince büyüyene kadar verilir. Bu tip belirli durumlarda, antisens bileşik başından sonuna kadar sistemik olarak verilir.

Belirli durumlarda, antisens bileşik yaklaşık 0,01 mg/ml'lik, yaklaşık 0,05 mg/ml'lik, yaklaşık 0,1 mg/ml'lik, yaklaşık 0,5 mg/ml'lik, yaklaşık 1 mg/ml'lik, yaklaşık 5 mg/ml'lik, yaklaşık 10 mg/ml'lik, yaklaşık 50 mg/ml'lik veya yaklaşık 100 mg/ml'lik bir konsantrasyonda verilir.

Belirli durumlarda, süjedeki bir motonörondaki SMN2 mRNA'nın ekson 7'sinin inklüzyonu artar. Belirli durumlarda, süjedeki bir motonörondaki SMN2 polipeptidindeki ekson 7 amino asitlerinin inklüzyonu artar.

Belirli durumlarda, açıklama, bir süjedeki bir motonörondaki SMN2 mRNA'nın ekson 7'sinin inklüzyonunun arttırılmasının, süjeye, insan SMN2 kodlayan bir nükleik asidin intron 7'sine

tamamlayıcı bir antisens oligonükleotid içeren bir antisens bileşiğin verilmesini ve böylelikle süjedeki motonörondaki SMN2 mRNA'nın ekson 7'sinin inklüzyonun arttırılmasını içeren yöntemler sağlamaktadır.

5

Belirli durumlarda, açıklama, bir süjedeki bir motonörondaki SMN2 polipeptidindeki ekson 7 amino asitlerinin inklüzyonunun arttırılmasının, süjeye, insan SMN2 kodlayan bir nükleik asidin intron 7'sine tamamlayıcı bir antisens oligonükleotid içeren bir antisens bileşiğin verilmesini ve böylelikle süjedeki motonörondaki SMN2 polipeptidinin ekson 7 amino asitlerinin inklüzyonun arttırılmasını içeren yöntemler sağlamaktadır.

10

15 Belirli durumlarda, süje SMA'lıdır. Belirli durumlarda, süje tip I SMA'lıdır. Belirli durumlarda, süje tip II SMA'lıdır. Belirli durumlarda, süje tip III SMA'lıdır.

Belirli durumlarda, bir birinci doz in utero verilir. Belirli durumlarda, birinci doz, kan-beyin-bariyerinin tam oluşumu öncesinde verilir. Belirli durumlarda, bir birinci doz süjenin doğumunun 1 haftası içinde verilir. Belirli durumlarda, bir birinci doz süjenin doğumunun 1 ayı içinde verilir. Belirli durumlarda, bir birinci doz süjenin doğumunun 3 ayı içinde verilir. Belirli durumlarda, bir birinci doz süjenin doğumunun 6 ayı içinde verilir. Belirli durumlarda, bir birinci doz, süje 1 ila 2 yaşındayken verilir. Belirli durumlarda, bir birinci doz, süje 1 ila 15 yaşındayken verilir. Belirli durumlarda, bir birinci doz, süje 15 yaşından büyükken verilir.

25

30

Belirli durumlarda, süje bir memelidir. Belirli durumlarda, süje bir insandır.

Belirli durumlarda, yöntemler, SMA'sı olan bir süjenin tanımlanmasını içerir. Belirli durumlarda, süje, süjenin bir ya da daha fazla kasının elektriksel aktivitesinin ölçülmesiyle tanımlanır. Belirli durumlarda, süje, süjenin, 5 süjenin SMN1 geninde bir mutasyona sahip olup olmadığının belirlenmesi için bir genetik testle tanımlanır. Belirli durumlarda, süje kas biyopsisiyle tanımlanır.

Belirli durumlarda, antisens bileşiğinin verilişi, ekson 7'ye 10 sahip SMN2 mRNA miktarında en az %10 bir artışla sonuçlanır. Belirli durumlarda, ekson 7'ye sahip SMN2 mRNA miktarındaki artış en az %20'dir. Belirli durumlarda, ekson 7'ye sahip SMN2 mRNA miktarındaki artış en az %50'dir. Belirli durumlarda, ekson 7'ye sahip SMN2 mRNA'nın miktarı en az %70'tir.

15 Belirli durumlarda, antisens bileşiğinin verilişi, ekson 7 amino asitlerine sahip SMN2 polipeptidi miktarında en az %10 bir artışla sonuçlanır. Belirli durumlarda, ekson 7 amino asitlerine sahip SMN2 polipeptidi miktarındaki artış en az 20 %20'dir. Belirli durumlarda, ekson 7 amino asitlerine sahip SMN2 polipeptidi miktarındaki artış en az %50'dir. Belirli durumlarda, ekson 7 amino asitlerine sahip SMN2 polipeptidi miktarındaki artış en az %70'tir.

25 Belirli durumlarda, antisens bileşiğinin verilişi, süjedeki SMA'nın en az bir semptomunu iyileştirir. Belirli durumlarda, antisens bileşiğinin verilişi, süjede gelişmiş motor fonksiyonuyla sonuçlanır. Belirli durumlarda, antisens bileşiğinin verilişi, süjede geciktirilmiş veya indirgenmiş 30 motor fonksiyonu kaybıyla sonuçlanır. Belirli durumlarda, antisens bileşiğinin verilişi, gelişmiş solunum fonksiyonuyla sonuçlanır. Belirli durumlarda, antisens bileşiğinin verilişi, gelişmiş sağkalımla sonuçlanır.

Belirli durumlarda, antisens nükleotidin en az bir nükleosidi bir modifiye şeker bölütü içerir. Belirli durumlarda, en az bir modifiye şeker bölütü bir 2'-metoksietil şeker bölütü içerir. Belirli durumlarda, antisens oligonükleotidin esasen
5 her bir nükleosidi bir modifiye şeker bölütü içerir. Belirli durumlarda, bir modifiye şeker bölütü içeren nükleositlerin tamamı aynı şeker modifikasyonunu içerir. Belirli durumlarda, her bir modifiye şeker bölütü bir 2'-metoksietil şeker bölütü içerir. Belirli durumlarda, antisens oligonükleotidin her bir
10 nükleosidi bir modifiye şeker bölütü içerir. Belirli durumlarda, nükleositlerin tamamı aynı şeker modifikasyonunu içerir. Belirli durumlarda, her bir modifiye şeker bölütü bir 2'-metoksietil şeker bölütü içerir. Belirli durumlarda, en az bir nükleosit arası bağlantı bir fosforotioat nükleosit arası
15 bağlantıdır. Belirli durumlarda, her bir nükleosit arası bağlantı bir fosforotioat nükleosit arası bağlantıdır.

Belirli durumlarda, antisens oligonükleotid 10 ila 25 arasında bağlı nükleositten oluşur. Belirli durumlarda, antisens
20 oligonükleotid 12 ila 22 arasında bağlı nükleositten oluşur. Belirli durumlarda, antisens oligonükleotid 15 ila 20 arasında bağlı nükleositten oluşur. Belirli durumlarda, antisens oligonükleotid 18 bağlı nükleositten oluşur.

25 Belirli durumlarda, antisens oligonükleotid, insan SMN2 kodlayan nükleik aside en az %90 tamamlayıcıdır. Belirli durumlarda, antisens oligonükleotid, insan SMN2 kodlayan nükleik aside tamamen tamamlayıcıdır. Belirli durumlarda, oligonükleotid, SEQ ID NO: 1 nükleobaz dizisinin en az 10
30 bitişik nükleobazını içeren bir nükleobaz dizisine sahiptir. Belirli durumlarda, oligonükleotid, SEQ ID NO: 1 nükleobaz dizisinin en az 15 bitişik nükleobazını içeren bir nükleobaz dizisine sahiptir. Belirli durumlarda, oligonükleotid, SEQ ID NO: 1 nükleobaz dizisini içeren bir nükleobaz dizisine

sahiptir. Belirli durumlarda, oligonükleotid, SEQ ID NO: 1 nükleobaz dizisinden oluşan bir nükleobaz dizisine sahiptir.

5 Belirli durumlarda, antisens bileşik bir konjugat grubu veya terminal grubu içerir.

Belirli durumlarda, antisens bileşik antisens oligonükleotidden oluşur.

10 Belirli durumlarda, antisens bileşik ayrıca sistemik olarak verilir. Belirli durumlarda, sistemik veriliş, intravenöz veya intraperitoneal enjeksiyonlardır. Belirli durumlarda, sistemik veriliş ve merkezi sinir sisteminin içine veriliş aynı zamanda gerçekleştirilir. Belirli durumlarda, sistemik veriliş ve merkezi sinir sisteminin içine veriliş farklı zamanlarda
15 gerçekleştirilir.

Belirli durumlarda, açıklama, antisens bileşiklerin ya tek başına ya da CSF'nin içine aktarımla kombinasyon halinde sistemik verilişini sağlar. Belirli durumlarda, farmasötik
20 bileşimler sistemik olarak verilir. Belirli durumlarda, farmasötik bileşimler subkütan olarak verilir. Belirli durumlarda, farmasötik bileşimler intravenöz olarak verilir. Belirli durumlarda, farmasötik bileşimler intramusküler enjeksiyonla verilir.

25

Belirli durumlarda, farmasötik bileşimler hem doğrudan CSF'ye (örneğin IT ve/veya ICV enjeksiyonu ve/veya infüzyon) hem sistemik olarak verilir.

30 Belirli durumlarda, açıklama, SMA ile ilişkili en az bir semptomu olan bir süjeye, 15 ila 20 arasında bağlı nükleositlerden oluşan bir oligonükleotid içeren ve tam uzunluğu boyunca SEQ ID NO. 7'ye %100 tamamlayıcı olan bir nükleobaz dizisine sahip bir antisens bileşiğin en az bir
35 dozunun verilişinin yöntemlerini sağlamaktadır ve burada her

bir nükleosit bir 2'-MOE modifiye nükleosittir ve burada 0,1 mg/kg ila 5 mg/kg arasındaki en az bir doz CSF'ye verilir. Bu tip belirli durumlarda, doz 0,5 mg/kg ila 2 mg/kg arasındadır. Belirli durumlarda, en az bir doz bolus enjeksiyonla verilir.

5 Bu tip belirli durumlarda, en az bir ikinci doz verilir. Bu tip belirli durumlarda, ikinci doz birinci dozdan en az 2 hafta sonra verilir. Belirli durumlarda, ikinci doz birinci dozdan en az 4 hafta sonra verilir. Belirli durumlarda, ikinci doz birinci dozdan en az 8 hafta sonra verilir. Belirli durumlarda, ikinci doz birinci dozdan en az 12 hafta sonra verilir. Belirli durumlarda, ikinci doz birinci dozdan en az 16 hafta sonra verilir. Belirli durumlarda, ikinci doz birinci dozdan en az 20 hafta sonra verilir. Belirli durumlarda, süje birinci dozun verilmiş zamanında 2 yaşın altındadır. Belirli durumlarda, süje 2 ila 15 yaş arasındadır. Belirli durumlarda, süje 15 ila 30 yaş arasındadır. Belirli durumlarda, süje 30 yaşından büyüktür. Belirli durumlarda, SMA ile ilişkili en az bir semptomun ilerleyişi yavaşlayıp azalır. Belirli durumlarda, oligonükleotid ISIS396443'tür.

15

20 Belirli durumlarda, açıklama, SMA ile ilişkili en az bir semptomu olan bir süjeye, 15 ila 20 arasında bağlı nükleositlerden oluşan bir oligonükleotid içeren ve tam uzunluğu boyunca SEQ ID NO. 7'ye %100 tamamlayıcı olan bir

25 nükleobaz dizisine sahip bir antisens bileşiğin en az bir sistemik dozunun verilmesinin yöntemlerini sağlamaktadır ve burada her bir nükleosit bir 2'-MOE modifiye nükleosittir ve burada en az bir doz sistemik olarak verilir. Bu tip belirli durumlarda, en az bir doz bolus enjeksiyonla verilir. Belirli durumlarda, verilen doz 0,5mg/kg ila 50mg/kg arasındadır. Belirli durumlarda, doz 1 mg/kg ila 10mg/kg arasındadır. Belirli durumlarda, doz 1 mg/kg ila 5 mg/kg arasındadır. Belirli durumlarda, doz 0,5mg/kg ila 1mg/kg arasındadır. Belirli durumlarda, en az bir ikinci doz verilir. Bu tip

30

35 belirli durumlarda, ikinci doz birinci dozdan en az 2 hafta

sonra verilir. Belirli durumlarda, ikinci doz birinci dozdan en az 4 hafta sonra verilir. Belirli durumlarda, ikinci doz birinci dozdan en az 8 hafta sonra verilir. Belirli durumlarda, ikinci doz birinci dozdan en az 12 hafta sonra verilir. Belirli durumlarda, ikinci doz birinci dozdan en az 16 hafta sonra verilir. Belirli durumlarda, ikinci doz birinci dozdan en az 20 hafta sonra verilir. Belirli durumlarda, süje birinci dozun verililiş zamanında 2 yaşın altındadır. Belirli durumlarda, süje 2 ila 15 yaş arasındadır. Belirli durumlarda, süje 15 ila 30 yaş arasındadır. Belirli durumlarda, süje 30 yaşından büyüktür. Belirli durumlarda, SMA ile ilişkili en az bir semptomun ilerleyişi yavaşlayıp azalır. Belirli durumlarda, oligonükleotid ISIS396443'tür.

Belirli durumlarda, açıklama, SMA ile ilişkili en az bir semptomu olan bir süjeye, 15 ila 20 arasında bağlı nükleositlerden oluşan bir oligonükleotid içeren ve tam uzunluğu boyunca SEQ ID NO. 7'ye %100 tamamlayıcı olan bir nükleobaz dizisine sahip bir antisens bileşiğin en az bir CSF dozunun ve en az bir sistemik dozunun verililişinin yöntemlerini sağlamaktadır ve burada her bir nükleosit bir 2'-MOE modifiye nükleosittir. Bu tip belirli durumlarda, CSF dozu 0,1 mg/kg ila 5 mg/kg arasındadır. Belirli durumlarda, sistemik doz 0,5mg/kg ila 50mg/kg arasındadır. Belirli durumlarda, en az bir CSF dozu bolus enjeksiyonla verilir. Belirli durumlarda, en az bir sistemik doz bolus enjeksiyonla verilir. Bu tip belirli durumlarda, en az bir sistemik doz subkütan enjeksiyonla verilir. Belirli durumlarda, CSF dozu ve sistemik doz aynı zamanda verilir. Belirli durumlarda, CSF dozu ve sistemik doz farklı zamanlarda verilir. Belirli durumlarda, süje birinci dozun verililiş zamanında 2 yaşın altındadır. Belirli durumlarda, süje 2 ila 15 yaş arasındadır. Belirli durumlarda, süje 15 ila 30 yaş arasındadır. Belirli durumlarda, süje 30 yaşından büyüktür. Belirli durumlarda, SMA

ile ilişkili en az bir semptomun ilerleyişi yavaşlayıp azalır. Belirli durumlarda, oligonükleotid ISIS396443'tür.

5 Belirli durumlarda, açıklama, SMA ile ilişkili en az bir semptomu olan bir süjeye, 15 ila 20 arasında bağlı nükleositlerden oluşan bir oligonükleotid içeren ve tam uzunluğu boyunca SEQ ID NO. 7'ye %100 tamamlayıcı olan bir nükleobaz dizisine sahip ve her bir nükleosidin bir 2'-MOE modifiye nükleosit olduğu bir antisens bileşiğinin en az bir sistemik dozunun ve bir gen terapisi ajanının en az bir dozunun verililişinin yöntemlerini sağlamaktadır. Belirli durumlarda, sistemik doz 0,5mg/kg ila 50mg/kg arasındadır. Belirli durumlarda, en az bir sistemik doz bolus enjeksiyonla verilir. Bu tip belirli durumlarda, en az bir sistemik doz subkütan enjeksiyonla verilir. Belirli durumlarda, sistemik doz ve gen terapisi ajanı aynı zamanda verilir. Belirli durumlarda, sistemik doz ve gen terapisi ajanı farklı zamanlarda verilir. Belirli durumlarda, gen terapisi ajanı CSF'ye verilir. Bu tip belirli durumlarda, gen terapisi ajanı intratekal enjeksiyonla ve/veya infüzyonla verilir. Bu tip belirli durumlarda, gen terapisi ajanı intraserebroventriküler enjeksiyonla ve/veya infüzyonla verilir. Belirli durumlarda, süje birinci dozun verililiş zamanında 2 yaşın altındadır. Belirli durumlarda, süje 2 ila 15 yaş arasındadır. Belirli durumlarda, süje 15 ila 30 yaş arasındadır. Belirli durumlarda, süje 30 yaşından büyüktür. Belirli durumlarda, SMA ile ilişkili en az bir semptomun ilerleyişi yavaşlayıp azalır. Belirli durumlarda, oligonükleotid ISIS396443'tür.

30 Belirli durumlarda, açıklama, SMA ile ilişkili en az bir semptomu olan bir süjenin seçilmesinin ve bir antisens bileşiğinin yukarıdaki yöntemlerin herhangi birine göre verililişinin yöntemlerini sağlamaktadır. Bu tip belirli durumlarda, SMA'nın en az bir semptomu verililişten sonra tayin edilir. Bu tip belirli durumlarda, SMA'nın en az bir semptomu

iyileşir. Bu tip belirli durumlarda, SMA'nın en az bir semptomu ilerlemez veya antisens bileşiğın verilişini almamış olan bir süjeye kıyasla daha yavaş ilerler.

5 Belirli durumlarda, açıklama, yukarıdaki yöntemlerin herhangi birinde kullanım için, insan SMN2 kodlayan bir nükleik asidin intron 7'sine tamamlayıcı bir antisens oligonükleotid içeren bir antisens bileşik sağlar. Belirli durumlarda, açıklama, sağkalım motor nöronu 1 (SMN1) ile ilişkili bir hastalığın ya
10 da durumun tedavisinde kullanım için bu tip bir bileşik sağlar.

Belirli durumlarda, açıklama, insan SMN2 kodlayan bir nükleik asidin intron 7'sine tamamlayıcı bir antisens oligonükleotid
15 içeren bir antisens bileşiğın, yukarıdaki yöntemlerin herhangi birinde kullanım için bir ilacın üretiminde kullanımını sağlar. Belirli durumlarda, ilaç, sağkalım motor nöronu 1 (SMN1) ile ilişkili bir hastalığın ya da durumun tedavisi içindir.

20

ŞEKİLLERİN KISA AÇIKLAMASI

Şekil 1, Örnek 4'te müzakere edilen, ekson 7 (y-ekseni) içeren SMN2 yüzdesinin, 7 günlük tedavinin (x-ekseni)
25 sonlandırılmasından 0, 2, 4, 6 ve 8. haftada tayin edildiğı eylem çalışmasının bir süresinden alınan sonuçları göstermektedir. "0." hafta numunesi, tedavinin sonlandırılmasından 1 gün sonra alınmıştır. CON, salin tedavili fareleri temsil etmektedir. Kontrol salin
30 tedavili fareler arasında 0. ila 6. aya kadar farklı zaman noktalarında inklüzyon %'sinde hiç fark olmamıştır. Şekil 2, Örnek 4'te müzakere edilen, ekson 7 içeren SMN2 yüzdesinin, 7 günlük tedavinin sonlandırılmasından 0, 0,5, 1, 2, 5 ve 6. haftada tayin edildiğı eylem
35 çalışmasının bir süresinden alınan sonuçları

göstermektedir. "0." hafta numunesi, tedavinin sonlandırılmasından 1 gün sonra alınmıştır. CON, salin tedavili fareleri temsil etmektedir. Kontrol salin tedavili fareler arasında 0. ila 6. aya kadar farklı zaman noktalarında inklüzyon %'sinde hiç fark olmamıştır. Şekil 3, ISIS396443'ün embriyonik verilişinin, SMA farelerinin Tayvan suşunda kuyruk-boyu üzerindeki etkisini ölçen Örnek 6'da müzakere edilen bir deneyden alınan sonuçları göstermektedir. Şekil 3A; bu birinci deneyi göstermektedir ve Şekil 3B, antisens bileşiğin farklı bir konsantrasyonunu test eden, kaydedildiği şekilde ve kıyaslama amacıyla normal fareler için verileri içeren tekrarlanan bir deneyi göstermektedir. Şekil 4, Örnek 7'de müzakere edilen western lekelemelerinden alınan sonuçları göstermektedir. Y eksenini, ekson 7 içeren çeşitli numunelerdeki SMN yüzdesidir. Şekiller 5 ve 6, Örnek 7'de müzakere edilen deneylerden alınan sonuçları göstermektedir. SMA farelerinin (Tayvan suşu) bir dizi tayini, ya bir antisens bileşik ya da bir kontrol oligonükleotidiyle tedavinin ardından gerçekleştirilmiştir. Şekil 7, Örnek 7'de müzakere edilen bir deneyden alınan bir sağkalım eğrisini göstermektedir. Şekil 8, Örnek 7'de müzakere edildiği üzere, bir antisens bileşik ya da bir kontrol oligonükleotidiyle tedavinin ardından omuriliğin farklı kısımlarındaki motor nöronlarının sayısının bir tayininden alınan sonuçları göstermektedir. Şekil 9, Örnek 7'de müzakere edildiği üzere antisensle tedavi edilen hayvanlardaki (ekson 7 içeren) tam SMN RNA'nın bir tayininden alınan sonuçları göstermektedir. Şekil 10, hayvanların ya (1) tedavi edilmediği; (2) doğumda (P0. Gün) antisens bileşiğin bir tekli dozunun verildiği ya da (3) P0'da bir birinci dozun ve 21. günde

(P21) bir ikinci dozun verildiği Örnek 7’de müzakere edilen bir deneyden alınan bir sağkalım eğrisini göstermektedir.

5 Şekil 11, ikinci dozu almış olan hayvanlarla yalnızca birinci dozu almış olan hayvanları karşılaştıran Örnek 7’de tarif edilen bir deneyden alınan bir sağkalım eğrisini göstermektedir.

10 Şekil 12, antisens bileşiğin maymunlara intratekal infüzyonla verilmiş olduğu ve bileşiğin konsantrasyonunun 96 saat sonra farklı dokularda tayin edilmiş olduğu Örnek 9’da müzakere edilen bir deneyden alınan sonuçları göstermektedir.

15 Şekil 13, Örnek 12’de müzakere edilen, antisens bileşiğin farklı dozlarının ciddi SMA’lı farelere subkutan enjeksiyonla verilmiş olduğu deneyler için bir sağkalım eğrisini göstermektedir.

BULUŞUN DETAYLI AÇIKLAMASI

20 Hem yukarıdaki genel tarifnamenin hem aşağıdaki ayrıntılı tarifnamenin yalnızca emsal ve açıklayıcı olduğu ve koruması talep edildiği şekilde buluşu kısıtlayıcı olmadığı anlaşılmalıdır. Burada, aksi spesifik olarak belirtilmediği sürece tekil kullanım çoğul kullanımı da içermektedir. Burada

25 kullanıldığı şekliyle, “veya” sözcüğünün kullanımı, aksi belirtilmediği sürece “ve/veya” anlamına gelmektedir. Dahası, “içeren” teriminin yanı sıra “içerir” ve “içermiştir” gibi diğer biçimlerin kullanımı sınırlayıcı değildir. Ayrıca, “öge” veya “bileşen” gibi terimler, aksi spesifik olarak

30 belirtilmediği sürece, hem bir ünite içeren öğeleri ve bileşenleri hem birden fazla alt ünite içeren öğeleri ve bileşenleri kapsamaktadır.

Burada kullanılan bölüm başlıkları yalnızca düzenleme amaçlıdır ve tarif edilen ana konuyu sınırlayıcı olarak değerlendirilmemelidir.

5 I. Tanımlar

Spesifik tanımlar sağlanmadığı sürece, burada tarif edilen analitik kimyayla, sentetik organik kimyayla ve tıbbi ve farmasötik kimyayla bağlantılı olarak kullanılan terimlendirme ve bunların prosedürleri ve teknikleri teknikte iyi bilinen ve yaygın olarak kullanılanlardır. Kimyasal sentez ve kimyasal analiz için standart teknikler kullanılabilir. Bu tip belirli teknikler örneğin Sangvi ve Cook tarafından yayına hazırlanan "Carbohydrate Modifications in Antisense Research" American Chemical Society, Washington D.C., 1994'te; "Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Publishing Co., Easton, Pa., 18. baskı, 1990'da ve Stanley T. Crooke tarafından yayına hazırlanan "Antisense Drug Technology, Principles, Strategies, and Applications" CRC Press, Boca Raton, Florida'da ve Sambrook et al., "Molecular Cloning, A laboratory Manual," 2. Baskı, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989'da bulunabilir.

Aksi gösterilmediği sürece, aşağıdaki terimler aşağıdaki anlamlara sahiptir:

"Nükleosit", bir heterosiklik baz bölütü ve bir şeker bölütü içeren bir bileşik anlamına gelmektedir. Nükleositlere, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, doğal oluşumlu nükleositler, modifiye nükleositler ve mimetik bazlara ve/veya şeker bölütlerine sahip nükleositler dahildir. Nükleositler çeşitli ornatıkların herhangi biriyle modifiye edilebilir.

"Şeker bölütü", bir doğal veya modifiye şeker ya da şeker vekili anlamına gelmektedir.

"Doğal şeker", DNA (2'-H) veya RNA (2'-OH)'nin bir ribofüranoz bölütü anlamına gelmektedir.

5 "Modifiye şeker", doğal bir şekerinkinden farklı en az bir ornatık içeren bir ribofüranoz bölütü anlamına gelmektedir.

10 "Şeker vekili", bir ribofüranoz halkasından farklı olan, bir nükleosidin şekerinin yerine geçebilen bir yapı anlamına gelmektedir. Şeker vekillerinin örneklerine, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, açık halka sistemleri, 6-üyeli halkalar, oksijenin, örneğin, sülfür ya da nitrojenle değiştirildiği şekerler dahildir. Örneğin, şeker vekillerine, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, morfolinler ve 4'-tiyo-içeren
15 şekerler dahildir.

"Nükleobaz", bir nükleosidin heterosiklik baz kısmı anlamına gelmektedir. Nükleobazlar doğal oluşumlu olabilir veya modifiye edilebilir. Belirli durumlarda, bir nükleobaz, bir
20 başka nükleik asidin bir nükleobazına hidrojen bağlayabilen herhangi bir atom veya atom grubu içerebilir.

"Nükleotid", bir fosfat bağlayıcı grup içeren bir nükleosit anlamına gelmektedir. Burada kullanıldığı şekliyle,
25 nükleositlere nükleotidler dahildir.

"Modifiye nükleosit", doğal oluşumlu RNA veya DNA nükleositlerine kıyasla en az bir modifikasyon içeren bir nükleosittir. Bu tip modifikasyon şeker bölütünde ve/veya
30 nükleobazda olabilir.

"Bisiklik nükleosit" veya "BNA", nükleosidin şeker bölütünün iki karbon atomunu birleştiren bir köprü içerdiği, böylelikle bir bisiklik şeker bölütü oluşturduğu bir nükleosit anlamına
35 gelmektedir.

“4’-2’ bisiklik nükleosit”, şeker halkasının 2’ karbon atomunu ve 4’ karbon atomunu birleştiren furanoz halkasının iki karbon atomunu birleştiren bir köprü içeren bir furanoz halkası içeren bir bisiklik nükleosit anlamına gelmektedir.

10

“2’-modifiye” veya “2’-ikameli”, H veya OH’den farklı 2’ konumunda bir ornatık içeren bir şeker içeren bir nükleosit anlamına gelmektedir.

“2’-OMe” veya “2’-OCH₃” veya “2’-O-metil” terimlerinin her biri, şeker halkasının 2’ konumunda bir -OCH₃ grubu içeren bir şeker anlamına gelmektedir.

15 “MOE” veya “2’-MOE” veya “2’-OCH₂CH₂OCH₃” veya “2’-O-metoksietil” terimlerinin her biri, şeker halkasının 2’ konumunda bir -OCH₂CH₂OCH₃ grubu içeren bir şeker anlamına gelmektedir.

20 “Oligonükleotid”, birden fazla bağlı nükleosit içeren bir bileşik anlamına gelmektedir. Belirli durumlarda, birden fazla nükleosidin biri ya da daha fazlası modifiyedir. Belirli durumlarda, bir oligonükleotid bir ya da daha fazla ribonükleosit (RNA) ve/veya deoksiribonükleosit (DNA) içerir.

25

“Oligonükleosit”, nükleosit arası bağlantıların hiçbirinin bir fosfor atomu ihtiva etmediği bir oligonükleotid anlamına gelmektedir. Burada kullanıldığı şekliyle, oligonükleotidlere oligonükleositler dahildir.

30

“Modifiye oligonükleotid”, en az bir modifiye nükleosit ve/veya en az bir modifiye nükleosit arası bağlantı içeren bir oligonükleotid anlamına gelmektedir.

"Nükleosit arası bağlantı", bir oligonükleotidin komşu nükleositleri arasında eşdeğerli bir bağlantı anlamına gelmektedir.

5 "Doğal oluşumlu nükleosit arası bağlantı", bir 3' veya 5' fosfodiester bağlantısı anlamına gelmektedir.

"Modifiye nükleosit arası bağlantı", bir doğal oluşumlu nükleosit arası bağlantıdan farklı herhangi bir nükleosit
10 arası bağlantı anlamına gelmektedir.

"Oligomerik bileşik", bir oligonükleotid içeren bir bileşik anlamına gelmektedir. Belirli durumlarda, bir oligomerik bileşim bir oligonükleotidden oluşur. Belirli durumlarda, bir
15 oligomerik bileşik ayrıca, bir ya da daha fazla konjugat ve/veya terminal grubu içerir.

"Antisens bileşik", en azından bir kısmı, melezlendiği bir hedef nükleik aside en azından kısmen tamamlayıcı olan bir
20 oligomerik bileşik anlamına gelmekte olup, burada bu tip melezleme en az bir antisens aktiviteyle sonuçlanır.

"Antisens oligonükleotid", oligomerik bileşiğin bir oligonükleotidden oluştuğu bir antisens bileşik anlamına
25 gelmektedir.

"Antisens aktivite", bir antisens bileşiğin hedef nükleik asidine melezlenmesine atfedilebilen herhangi bir saptanabilir ve/veya ölçülebilir etkiyi ifade etmektedir. Belirli
30 durumlarda, bu tip antisens aktivite, bir nükleik asidin ya da proteinin bir miktarında bir artış veya azalmadır. Belirli durumlarda, bu tip antisens aktivite, bir nükleik asidin veya proteinin uç birleştirme varyantlarının oranında bir değişikliktir. Belirli durumlarda, bu tip antisens aktivite,
35 bir hücredeki ve/veya süjedeki bir fenotipik değişikliktir.

Antisens aktivitenin "saptanması" veya "ölçülmesi" doğrudan veya dolaylı olabilir. Örneğin, belirli durumlarda, antisens aktivite, hedef nükleik asidin ya da proteinin miktarının veya
5 bir hedef nükleik asidin ya da proteinin uç birleştirme varyantlarının bağıl miktarlarının saptanmasıyla ve/veya ölçülmesiyle tayin edilir. Belirli durumlarda, antisens aktivite, bir hücrede veya hayvanda bir fenotipik değişikliğin gözlemlenmesiyle saptanır. Herhangi bir aktivite, yanıt veya
10 etkiyle bağlantılı olarak, "saptama" ve "ölçme" terimleri, saptama veya ölçme için bir testin gerçekleştirildiğini göstermektedir. Bu tip saptama ve/veya ölçme, sıfır değerlerini içerebilir. Böylelikle, saptama veya ölçme için bir test hiç aktivite (sıfır aktivite) olmadığına dair bir
15 bulguyla sonuçlanırsa, aktivitenin saptanması veya ölçülmesi adımı yine de gerçekleştirilmiştir.

"Hedef nükleik asit", ekspresyonu, miktarı veya aktivitesi bir antisens bileşiklerle modüle edilebilme kapasitesine sahip
20 herhangi bir nükleik asit molekülünü ifade etmektedir.

"Hedef mRNA", bir proteini kodlayan bir önceden-seçilmiş RNA molekülü anlamına gelmektedir.

25 "Hedef ön-mRNA", mRNA'nın içine tamamen işlenmemiş olan bir önceden-seçilmiş RNA transkripti anlamına gelmektedir. Özellikle, ön-mRNA bir ya da daha fazla intron içerir.

"Hedef protein", bir hedef nükleik asit tarafından kodlanan
30 bir protein anlamına gelmektedir.

"Modülasyon", fonksiyon veya aktivitenin bir pertürbasyonu anlamına gelmektedir. Belirli durumlarda, modülasyon gen ekspresyonunda bir artış anlamına gelmektedir. Belirli

durumlarda, modülasyon gen ekspresyonunda bir azalma anlamına gelmektedir.

5 "Ekspresyon", sayesinde bir genin kodlanmış bilgisinin bir hücrede mevcut olan ve çalışan yapılara dönüştürüldüğü herhangi bir fonksiyon ve adım anlamına gelmektedir.

10 "Nükleobaz dizisi", herhangi bir şeker, bağlantı ve/veya nükleobaz modifikasyonundan bağımsız olarak bitişik nükleobazların bir 5' ila 3' yöneliminde sıralaması anlamına gelmektedir.

15 "Bitişik nükleobazlar", bir nükleik asitte birbirine hemen komşu olan nükleobazlar anlamına gelmektedir.

"Nükleobaz tamamlayıcılığı", iki nükleobazın, hidrojen bağlanma vasıtasıyla eşdeğerli-olmayan eşleşme yetisi anlamına gelmektedir.

20 "Tamamlayıcı", bir nükleik asidin bir ikinci nükleik aside sıkı melezleme koşulları altında melezlenebildiği anlamına gelmektedir. Örneğin, bir antisens bileşik hedef nükleik asidine, hedef nükleik asidi sıkı melezleme koşulları altında melezleyebiliyorsa tamamlayıcıdır.

25 "Tamamen tamamlayıcı", bir birinci nükleik asidin her bir nükleobazının, bir ikinci nükleik asitteki her bir karşılık gelen bitişik konumda bir nükleobazla eşleşebildiği anlamına gelmektedir.

30 Bir antisens bileşiğin "tamamlayıcılık yüzdesi", antisens bileşiğin bir hedef nükleik asidin bir eşit-uzunluktaki kısmına tamamlayıcı olan nükleobazlarının yüzdesi anlamına gelmektedir. Tamamlayıcılık yüzdesi, antisens bileşiğin bir
35 hedef nükleik asidin hedef nükleik asitteki karşılık gelen

bitişik konumlardaki nükleobazlara tamamlayıcı olan nükleobazlarının sayısının antisens bileşiğin toplam uzunluğuna bölünmesiyle hesaplanır.

5 "Özdeşlik yüzdesi", birinci nükleik asitteki nükleobazların toplam sayısına bölünen, birinci nükleik asitte, bir ikinci nükleik asitteki karşılık gelen konumlardaki nükleobazlara özdeş olan nükleobazların sayısı anlamına gelmektedir.

10 "Melezleme", nükleobaz tamamlayıcılık üzerinden ortaya çıkan tamamlayıcı nükleik asitlerin yeniden birleştirilmesi anlamına gelmektedir.

"Uyumsuz", bir birinci nükleik asidin, bir ikinci nükleik asidin karşılık gelen konumundaki bir nükleobazla eşleşemeyen bir nükleobazı anlamına gelmektedir.

20 "Özdeş nükleobaz dizisi", nükleositlere herhangi bir kimyasal modifikasyondan bağımsız olarak, aynı nükleobaz dizisine sahip olma anlamına gelmektedir.

"Farklı modifikasyonlar" veya "farklı olarak modifiye", modifikasyonların yokluğu dahil olmak üzere, birbirinden farklı nükleosit modifikasyonlarına veya nükleosit arası bağlantılara sahip nükleositleri veya nükleosit arası bağlantıları ifade etmektedir. Böylelikle, örneğin, bir MOE nükleosidi ve bir modifiye edilmemiş DNA nükleosidi, DNA nükleosidi modifiye edilmemiş olsa bile "farklı olarak modifiyedir". Benzer şekilde, her ikisi de doğal-oluşumlu modifiye edilmemiş nükleositler olsa bile, DNA ve RNA "farklı olarak modifiyedir". Aksi belirtilmediği sürece, aynı olan ancak farklı nükleobazlar içeren nükleositler farklı olarak modifiye değildir. Örneğin, bir 2'-OMe modifiye şeker ve bir adenin nükleobazı içeren bir nükleosit ve bir 2'-OMe modifiye

şeker ve bir timin nükleobazı içeren bir nükleosit farklı olarak modifiye değildir.

“Aynı modifikasyonlar”, (modifiye edilmemiş nükleositler ve nükleosit arası bağlantılar dahil olmak üzere) birbiriyle aynı olan nükleositleri ve nükleosit arası bağlantıları ifade etmektedir. Böylelikle, örneğin, DNA nükleosidi modifiye edilmemiş olsa bile, iki modifiye edilmemiş DNA nükleosidi “aynı modifikasyona” sahiptir.

10

“Modifikasyon tipi” veya bir “tipteki” nükleosid, bir nükleosidin modifikasyon anlamına gelmektedir ve modifiye ve modifiye edilmemiş nükleositleri içerir. Dolayısıyla, aksi belirtilmediği sürece, “bir birinci tipte bir modifikasyona sahip bir nükleosit” modifiye edilmemiş bir nükleosit olabilir.

15

Bir oligonükleotidin “ayrı bölgeleri”, bir oligonükleotidin, bölge içerisindeki nükleositlerin ve nükleosit arası bağlantıların tamamının aynı modifikasyonları içerdiği bir kısmı anlamına gelmektedir ve herhangi bir komşu kısmın nükleositleri ve/veya nükleosit arası bağlantıları en az bir farklı modifikasyon içerir.

20

“Motif”, bir oligonükleotiddeki modifiye ve/veya modifiye edilmemiş nükleobazların, şekerlerin ve/veya nükleosit arası bağlantıların bir paterni anlamına gelmektedir.

25

“Tamamen modifiye oligonükleotid”, her bir nükleobazın, her bir şekerin ve/veya her bir nükleosit arası bağlantısının modifiye edildiği anlamına gelmektedir.

30

“Eşit şekilde modifiye oligonükleotid”, her bir nükleobazın, her bir şekerin ve/veya her bir nükleosit arası bağlantısının,

modifiye oligonükleotid boyunca aynı modifikasyona sahip olduğu anlamına gelmektedir.

5 "Değişen motif", bir $(AB)_nA_m$ paternindeki modifiye nükleositlerin en az dört ayrı bölgesine sahip bir oligonükleotid veya bunun bir kısmı anlamına gelmekte olup, burada A, bir birinci tipte modifikasyona sahip nükleositlerin bir bölgesini temsil etmektedir; B, farklı tipte bir modifikasyona sahip nükleositlerin bir bölgesini temsil etmektedir; n, 2-15'tir ve m, 0 veya 1'dir. Böylelikle, 10 belirli durumlarda, değişen motifler 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 veya 20 ya da daha fazla değişen bölge içerir. Belirli durumlarda, her bir A bölgesi ve her bir B bölgesi bağımsız olarak 1-4 nükleosit içerir.

15 "Süje", tedavi veya terapi için seçilmiş olan bir insan veya insan-olmayan hayvan anlamına gelmektedir.

"İhtiyaç duyan bir süje", bir terapi veya tedaviye ihtiyacı olan olara tanımlanmış bir süje anlamına gelmektedir. Bu tip 20 örneklerde, bir süje, SMA'sı olmanın veya geliştirmenin bir ya da daha fazla endikasyonuna sahiptir.

"Veriliş", bir süjeye farmasötik bir ajanın veya bileşimin sağlanması anlamına gelmektedir ve, bunlarla sınırlı kalmamak 25 kaydıyla, bir tıbbi profesyonel tarafından ve kendi kendine-veriliş ile verilişi içerir.

"Parenteral veriliş", enjeksiyon veya infüzyon yoluyla veriliş anlamına gelmektedir. Parenteral verilişe, bunlarla sınırlı 30 kalmamak kaydıyla, subkütan veriliş, intravenöz veriliş veya intramusküler veriliş dahildir.

"Sistemik veriliş", istenen aktivite konumlarından farklı bir alana veriliş anlamına gelmektedir. Sistemik verilişin

örnekleri subkütan veriliş ve intravenöz veriliş ver intraperitoneal veriliştir.

5 "Subkütan veriliş", derinin hemen altına veriliş anlamına gelmektedir.

"İntravenöz veriliş", bir damarın içine veriliş anlamına gelmektedir.

10 "Beyin-omurilik sıvısı" veya "CSF", beyin ve omurilik etrafındaki boşluğu dolduran sıvı anlamına gelmektedir.

15 "Omurilik sıvısının içine veriliş", bir maddeyi doğrudan CSF'nin içine aktaran herhangi bir veriliş anlamına gelmektedir.

"İntraserebroventriküler" veya "ICV", beyinin ventriküler sisteminin içine veriliş anlamına gelmektedir.

20 "İntratekal" veya "IT", CSF'nin içine, beyni ve omuriliği kaplayan araknoid membranın altına veriliş anlamına gelmektedir. IT enjeksiyon, omuriliğin tekası üzerinden, farmasötik bir ajanın omuriliği çevreleyen şetin içine enjekte edildiği subaraknoid boşluğun içine gerçekleştirilir.

25 "İndükleme evresi", o esnada verilişin başlatıldığı ve aktif farmasötik ajanın durağan durum konsantrasyonlarının hedef bir dokuda elde edildiği bir dozlama evresi anlamına gelmektedir. Örneğin, bir indükleme evresi, o esnada antisens
30 oligonükleotidin durağan durumdaki konsantrasyonlarının karaciğerde elde edildiği bir dozlama evresidir.

"İdame evresi", ilacın hedef doku durağan durum konsantrasyonlarının elde edilmiş olduğu bir dozlama
35 evresidir.

"Süre", o esnada bir aktivitenin veya olayın devam ettiği zaman periyodu anlamına gelmektedir. Örneğin, bir indükleme evresinin süresi, o esnada indükleme dozlarının verildiği zaman periyodudur.

"İdame dozu", idame evresi esnasında bir tekli verilişte verilen bir doz anlamına gelmektedir. Burada kullanıldığı şekliyle, "indükleme dozu", indükleme evresi esnasında bir tekli verilişte verilen bir doz anlamına gelmektedir.

"Eş-veriliş", iki ya da daha fazla farmasötik ajanın bir süjeye verilişi anlamına gelmektedir. İki ya da daha fazla farmasötik ajan bir tekli farmasötik bileşim olabilir veya ayrı farmasötik bileşimlerde olabilir. İki ya da daha fazla ajanın her biri, aynı veya farklı veriliş yolu üzerinden verilebilir. Eş-veriliş, paralel veya sıralı verilişi kapsar.

"Terapi", bir hastalık tedavi periyodu anlamına gelmektedir. Belirli durumlarda, terapiye, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, kimyasal terapiler ve destekli solunum, besleme sondaları gibi fiziksel müdahaleler ve direncin arttırılması amacıyla fiziksel terapi dahildir.

"Tedavi", bir hastalığın çaresinin bulunması veya iyileştirilmesi için kullanılan bir ya da daha fazla spesifik prosedürün uygulanması anlamına gelmektedir. Belirli durumlarda, spesifik prosedür, bir ya da daha fazla farmasötik ajanın verilişidir.

"İyileştirme", bir durum ya da hastalığın en az bir endikatörünün ciddiyetinin bir azaltılması anlamına gelmektedir. Belirli durumlarda, iyileştirme, bir durum ya da hastalığın bir ya da daha fazla endikatörünün ilerlemesinde bir gecikmeyi veya yavaşlamayı içerir. Endikatörlerin

ciddiyeti, teknikte uzman kişilerce bilinen sübjektif veya objektif ölçümlerle belirlenebilir.

“Başlamasını engellemek”, hastalığa veya duruma yakalanma riski olan bir süjedeki bir durumun ya da hastalığın gelişmesini engellemek anlamına gelmektedir. Belirli durumlarda, hastalığa ya da duruma yakalanma riskindeki bir süje, çoktan hastalığı ya da durumu olan bir süje tarafından alınan tedaviye benzer tedavi alır.

10

“Başlamasını geciktirmek”, hastalığa veya duruma yakalanma riski olan bir süjedeki bir durumun ya da hastalığın gelişmesini geciktirmek anlamına gelmektedir.

15 “İlerlemesini yavaşlatmak”, bir hastalık ya da durumla ilişkili en az bir semptomun ciddiyetinin daha az hızlı kötüleşmesi anlamına gelmektedir.

“Ekson 7 amino asitleri”, bir SMN proteininin, SMN RNA’nın ekson 7’sine karşılık gelen kısmı anlamına gelmektedir. Ekson

20 7 amino asitleri, ekson 7’nin uç birleştirme esnasında hariç bırakılmamış olduğu SMA RNA’dan eksprese edilen SMN proteininde mevcuttur.

“SMN proteini”, normal tam boy sağkalım motor nöronu proteini anlamına gelmektedir. SMN, ekson 7’nin olgun mRNA’da mevcut olması ve ekson 7 amino asitlerinin SMN proteininde mevcut olması şartıyla ya bir SMN1 geninden ya da bir SMN2 geninden eksprese edilebilir.

30 “Doz”, bir tekli verilişte veya belirlenmiş bir zaman miktarı boyunca sağlanan bir farmasötik ajanın belirlenmiş bir miktarı anlamına gelmektedir. Belirli durumlarda, bir doz iki ya da daha fazla bolusta, tablette veya enjeksiyonda verilebilir. Örneğin, subkütan ya da intratekal veya ICV verilişin arzu edildiği belirli durumlarda, arzu edilen doz, bir tekli

35

enjeksiyon tarafından kolayca barındırılmayan bir hacim gerektirir. Bu tip durumlarda, iki ya da daha fazla enjeksiyon, arzu edilen dozun elde edilmesi için kullanılabilir. Kesintisiz infüzyonun ayarlanmasında, doz, zaman birimi başına aktarılan bir farmasötik ajanın miktarı olarak ifade edilebilir.

"Dozaj ünitesi", bir farmasötik ajanın sağlandığı bir form anlamına gelmektedir. Belirli durumlarda, bir dozaj ünitesi, liyofilize oligonükleotid ihtiva eden bir flakondur. Belirli durumlarda, bir dozaj ünitesi, sulandırılmış oligonükleotid ihtiva eden bir flakondur.

"Terapötik olarak etkili miktar", bir hayvana terapötik bir fayda sağlayan bir farmasötik ajanın bir miktarı anlamına gelmektedir.

"Farmasötik bileşim", bir bireye veriliş için uygun olan maddelerin, farmasötik bir ajan içeren bir karışımı anlamına gelmektedir. Örneğin, bir farmasötik bileşim bir modifiye oligonükleotid ve bir steril sulu solüsyon içerebilir.

"Kabul edilir güvenlik profili", klinik olarak kabul edilen sınırlar dahilindeki yan etkilerin bir paterni anlamına gelmektedir.

"Yan etki", arzu edilen etkilerin dışında bir tedaviye atfedilebilen bir fizyolojik yanıt anlamına gelmektedir.

1. Belirli Modifiye Oligonükleotidler

Belirli durumlarda, mevcut açıklama, DNA veya RNA gibi doğal oluşumlu oligomerlerin oligonükleotidlerine kıyasla bir ya da daha fazla modifikasyon içeren antisens oligonükleotidleri içeren yöntemler ve bileşimler sağlamaktadır. Bu tip modifiye

antisens oligonükleotidler, bir ya da daha fazla arzu edilen özelliğe haiz olabilir. Bu tip belirli modifikasyonlar, antisens oligonükleotidin antisens aktivitesini, örneğin antisens oligonükleotidin hedef nükleik asidine afinitesini arttırarak, bir ya da daha fazla nükleaza direncini arttırarak ve/veya oligonükleotidin farmakokinetiklerini veya doku dağılımını değiştirerek değiştirir. Belirli durumlarda, bu tip modifiye antisens oligonükleotidler bir ya da daha fazla modifiye nükleosit ve/veya bir ya da daha fazla modifiye nükleosit bağlantısı ve/veya bir ya da daha fazla konjugat grubu içerir.

a. Belirli Modifiye Nükleositler

Belirli durumlarda, antisens oligonükleotidler bir ya da daha fazla modifiye nükleosit içerir. Bu tip modifiye nükleositler bir modifiye şeker ve/veya bir modifiye nükleobaz içerebilir. Belirli durumlarda, bu tip modifiye nükleositlerin bir oligonükleotide katılması, bir hedef nükleik aside artan afiniteyle ve/veya, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, nükleaz degradasyonuna artan direnç ve/veya gelişmiş toksisite ve/veya modifiye oligonükleotidin tutulum özellikleri dahil olmak üzere artan kararlılıkla sonuçlanır.

i. Belirli Nükleobazlar

Nükleositlerin doğal oluşumlu baz proteini heterosiklik baz, tipik olarak pürinler ve pirimidinlerdir. Pürin nükleobazları olan adenin (A) ve guanin (G) ve pirimidin nükleobazları olan timin (T), sitozin (C) ve urasil (U) gibi "modifiye edilmemiş" veya "doğal" nükleobazlara ek olarak, teknikte uzman kişilerce bilinen birçok modifiye nükleobaz veya nükleobaz mimetikleri, burada tarif edilen bileşiklerin içine katılmak için uygundur. Belirli durumlarda, modifiye bir nükleobaz, örneğin bir 7-deaza pürin, bir 5-metil sitozin veya bir G-kenetleme gibi ana

nükleobaza yapı olarak oldukça benzer bir nükleobazdır. Belirli durumlarda, nükleaz mimetiği, örneğin bir trisiklik fenoksazin nükleobaz mimetiği gibi daha komplike yapılar içerir. Yukarıda kaydedilen modifiye nükleobazların hazırlanması için yöntemler, teknikte uzman kişilerce iyi bilinmektedir.

ii. Belirli Modifiye Şekerler ve Şeker Vekilleri

- 10 Mevcut açıklamanın antisens oligonükleotidleri opsiyonel olarak, bir doğal şekere kıyasla şeker bölütünün modifiye edildiği bir ya da daha fazla nükleosit ihtiva edebilir. Bu tip şekeri modifiye edilmiş nükleositleri içeren oligonükleotidler güçlendirilmiş nükleaz kararlılığına, artan
- 15 bağlanma afinitesine veya bazı diğer faydalı biyolojik özelliğe sahip olabilir. Bu tip modifikasyonlara sınırlama olmadan, ornatık gruplarının eklenmesi, bir bisiklik nükleik asit (BNA) oluşturmak için ikiz-olmayan halka oksijen atomunun köprülenmesi, ribosil halkası oksijen atomunun S, N(R) veya
- 20 $C(R_1)(R)_2$ ($R = H, C_1-C_{12}$ alkil veya bir koruyucu grup) ile değiştirilmesi ve bunların, örneğin bir 2'-F-5'-metil ikameli nükleosit gibi kombinasyonları (diğer açıklanan 5',2'-bis ikameli nükleositler için bakınız 21/8/08 tarihinde yayınlanan PCT Uluslararası Başvurusu WO 2008/101157) veya ribosil
- 25 halkası oksijen atomunun, 2'-konumunda diğer ikameyle S ile (bakınız 16 Haziran 2005 tarihinde yayınlanan U.S. Patent Başvurusu US2005-0130923) ya da alternatif olarak bir BNA'nın 5'-ikamesiyle (bakınız, LNA'nın örneğin bir 5'-metil veya bir 5'-vinil grubuyla ikame edildiği, 22/11/07 tarihinde
- 30 Yayınlanan PCT Uluslararası Başvurusu WO 2007/134181) S ile değiştirilmesi dahildir.

Modifiye şeker bölütlerine sahip nükleositlerin örneklerine, sınırlama olmadan, 5'-vinil, 5'-metil (R veya S), 4'-S, 2'-F, 2'-OCH₃ ve 2'-O(CH₂)₂OCH₃ ornatık grupları içeren nükleositler

dahildir. 2' konumundaki ornatık ayrıca, alil, amino, azido, tiyo, O-alil, O-C₁-C₁₀ alkil, OCF₃, O(CH₂)₂SCH₃, O(CH₂)₂-O-N(R_m)(R_n) ve O-CH₂-C(=O)-N(R_m)(R_n)'den de seçilebilecek olup, burada her bir R_m ve R_n, bağımsız olarak, H veya ikameli ya da ikamesiz C₁-C₁₀ alkildir.

Bisiklik nükleik asitlerin (BNA'ların) örneklerine, sınırlama olmadan, 4' ila 2' ribosil halkası atomları arasında bir köprü içeren nükleositler dahildir. Belirli durumlarda, burada sağlayan antisens bileşikler, köprünün şu formüllerden birini içerdiği bir ya da daha fazla BNA nükleosidi içerir: 4'-β-D-(CH₂)-O-2' (β-D-LNA); 4'-(CH₂)-S-2'; 4'-α-L-(CH₂)-O-2' (α-L-LNA); 4'-(CH₂)₂-O-2' (ENA); 4'-C(CH₃)₂-O-2' (bakınız WO 2009/006478 olarak yayınlanan PCT/US2008/068922); 4'-CH(CH₃)-O-2' ve 4'-CH(CH₂OCH₃)-O-2' (bakınız 15 Temmuz 2008 tarihinde verilen U.S. Patent 7.399.845); 4'-CH₂-N(OCH₃)-2' (bakınız WO 2008/150729 olarak yayınlanan PCT/US2008/064591); 4'-CH₂-O-N(CH₃)-2' (bakınız 2 Eylül 2004 tarihinde yayınlanmış olan U.S. Patent Başvurusu US2004-0171570); 4'-CH₂-N(R)-O-2' (bakınız 23 Eylül 2008 tarihinde verilen U.S. Patent 7.427.672); 4'-CH₂-C(CH₃)-2' ve 4'-CH₂-C(=CH₂)-2' (bakınız WO 2008/154401 olarak yayınlanan PCT/US2008/066154); ve burada R, bağımsız olarak, H, C₁-C₁₂ alkil veya bir koruyucu gruptur.

Belirli durumlarda, mevcut açıklama, bisiklik şeker bölütleri olmayan modifiye şeker bölütleri içeren modifiye nükleositler sağlamaktadır. Bu tip belirli modifiye nükleositler bilinmektedir. Belirli durumlarda, bir nükleosidin şeker halkası herhangi bir konumda modifiye edilebilir. Bu açıklamada faydalı olan şeker modifikasyonlarının örneklerine, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, şunlardan seçilen bir şeker ornatık grubu içeren bileşikler dahildir: OH, F, O-alkil, S-alkil, N-alkil veya O-alkil-O-alkil olup, burada alkil, alkenil ve alkinil ikameli ya da ikamesiz C₁ ila C₁₀

alkil ya da C₂ ila C₁₀ alkenil ve alkinil olabilir. Bu tip belirli durumlarda, bu tip ornatıklar şekerin 2' konumundadır.

5 Belirli durumlarda, modifiye nükleositler, şekerin 2' konumunda bir ornatık içerir. Belirli durumlarda, bu tip ornatıklar şunların arasından seçilir: (F dahil olmak üzere ancak bununla sınırlı kalmamak kaydıyla) bir halojenür, alil, amino, azido, tiyo, O-alil, O-C₁-C₁₀ alkil, -OCF₃, O-(CH₂)₂-O-CH₃, 2'-O(CH₂)₂SCH₃, O-(CH₂)₂-O-N(R_m)(R_n) veya O-CH₂-C(=O)-N(R_m)(R_n) olup, burada her bir R_m ve R_n, bağımsız olarak, H veya ikameli ya da ikamesiz C₁-C₁₀ alkildir.

15 Belirli durumlarda, mevcut açıklamada kullanım için faydalı modifiye nükleositler şunlardır: 2-metoksietoksi, 2'-O-metil (2'-O-CH₃), 2'-floro (2'-F).

Belirli durumlarda, modifiye nükleositler 2' konumunda şunlardan seçilen bir ornatık grubuna sahiptir: O[(CH₂)_nO]_mCH₃, O(CH₂)_nNH₂, O(CH₂)_nCH₃, O(CH₂)_nONH₂, OCH₂C(=O)N(H)CH₃ ve 20 O(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂ olup, burada n ve m 1 ila yaklaşık 10 arasındadır. Diğer 2'-şeker ornatık gruplarına şunlar dahildir: C₁ ila C₁₀ alkil, ikameli alkil, alkenil, alkinil, alkaril, aralkil, O-alkaril veya O-aralkil, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, 25 heterosikloalkil, heterosikloalkaril, aminoalkilamino, polialkilamino, ikameli silil, bir RNA yarma grubu, bir haberci grubu, bir araya ekleyici, farmakoniketik özelliklerin geliştirilmesi için bir grup veya bir oligomerik bileşiğin farmakodinamik özelliklerinin geliştirilmesi için bir grup ve 30 benzer özelliklere sahip diğer ornatıklar.

Belirli durumlarda, modifiye nükleositler bir 2'-MOE yan zincir içerir (Baker et al., J. Biol. Chem., 1997, 272, 11944-12000). Bu tip 2'-MOE ikamesi, modifiye edilmemiş 35 nükleositlere ve 2'-O-metil, O-propil ve O-aminopropil gibi

diğer modifiye nükleositlere kıyasla gelişmiş bağlanma afinitesine sahip olarak tarif edilmiştir. 2'-MOE ornatıkına sahip oligonükleotidlerin ayrıca, gen ekspresyonunun, *in vivo* kullanım için umut vaat eden özelliklere sahip antisens inhibitörleri olduğu da gösterilmiştir (Martin, P., *Helv. Chim. Acta*, 1995, 78, 486-504; Altmann et al., *Chimia*, 1996, 50, 168-176; Altmann et al., *Biochem. Soc. Trans.*, 1996, 24, 630-637 ve Altmann et al., *Nucleosides Nucleotides*, 1997, 16, 917-926).

10

Belirli durumlarda, 2'-şeker ornatık grupları ya arabino (yukarı) konumdadır ya da ribo (aşağı) konumdadır. Bu tip belirli durumlarda, bir 2'-arabino modifikasyonu 2'-F arabinodur (FANA). Benzer modifikasyonlar ayrıca şeker üzerindeki diğer konumlarda da, özellikle bir 3' terminal nükleosit üzerindeki veya 2'-5' bağlı oligonükleotidlerdeki 3' konumunda ve 5' terminal nükleotidin 5' konumunda yapılabilir.

15

Belirli durumlarda, mevcut açıklamada kullanım için uygun nükleositler, ribofuranosil şekerin yerine siklobütil gibi şeker vekillerine sahiptir. Bu tip modifiye şeker yapılarının hazırlanmasını öğreten örnek niteliğindeki U.S. Patentlerine, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, U.S. 4.981.957; 5.118.800; 5.319.080; 5.359.044; 5.393.878; 5.446.137; 5.466.786; 5.514.785; 5.519.134; 5.567.811; 5.576.427; 5.591.722; 5.597.909; 5.610.300; 5.627.053; 5.639.873; 5.646.265; 5.658.873; 5.670.633; 5.792.747 ve 5.700.920 dahildir.

20

25

Belirli durumlarda, mevcut açıklama, şekerin 2'-konumunda bir modifikasyon içeren nükleositler sağlar. Belirli durumlarda, açıklama, şekerin 5'-konumunda bir modifikasyon içeren nükleositler sağlar. Belirli durumlarda, açıklama, şekerin 2'-konumunda ve 5'-konumunda modifikasyonlar içeren nükleositler sağlar. Belirli durumlarda, modifiye nükleositler oligonükleotidlerin içine katılmak için faydalı olabilir.

30

35

Belirli durumlarda, modifiye nükleositler oligonükleotidlerin içine, oligonükleotidin 5'-ucunda katılır.

b. Belirli Nükleosit Arası Bağlantılar

5

Mevcut açıklamanın antisens oligonükleotidleri opsiyonel olarak, bir ya da daha fazla modifiye nükleosit arası bağlantı ihtiva edebilir. Bağlayıcı grupların iki ana sınıfı, bir fosfor atomunun varlığı ya da yokluğuyla tanımlanır. Temsilci fosfor ihtiva eden bağlantılara, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, fosfodiesterler ($P=O$), fosfotriesterler, metilfosfonatlar, fosforamidat ve fosforotioatlar ($P=S$) dahildir. Temsilci fosfor ihtiva etmeyen bağlayıcı gruplara, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, metilenmetilimino ($-CH_2-$ 10 $N(CH_3)-O-CH_2-$), tiyodiester ($-O-C(O)-S-$), tiyonokarbamat ($-O-C(O)(NH)-S-$); siloksan ($-O-Si(H)_2-O-$) ve N,N'-dimetilhidrazin ($-CH_2-N(CH_3)-N(CH_3)-$) dahildir. Fosfor-olmayan bağlayıcı gruplara sahip oligonükleotidler, oligonükleositler olarak ifade edilir. Modifiye bağlantılar, doğal fosfodiester 15 bağlantılarına kıyasla, oligonükleotidlerin nükleaz direncini değiştirmek, tipik olarak arttırmak için kullanılabilir. Belirli durumlarda, bir kiral atomuna sahip bağlantılar rasemik karışımlar olarak, ayrı enantiomerler olarak hazırlanabilir. Temsilci kiral bağlantılara, bunlarla sınırlı 20 kalmamak kaydıyla, alkilfosfonatlar ve fosforotioatlar dahildir. Fosfor-ihtiva eden ve fosfor-ihtiva etmeyen bağlantıların hazırlanma yöntemleri teknikte uzman kişilerce iyi bilinmektedir.

30 Burada tarif edilen antisens oligonükleotidler, bir ya da daha fazla asimetrik merkez ihtiva eder ve böylelikle enantiomerlere, diastereomerlere ve mutlak stereokimya açısından, şeker anomerleri gibi (R) ya da (S) olarak veya amino asitler et al. gibi (D) ya da (L) olarak tanımlanabilen 35 diğer stereoizomerik yapılandırmalara sebebiyet verir. Burada

sağlanan antisens bileşiklere, tüm bu tip olası izomerlerin yanı sıra bunların rasemik ve optik olarak saf formları dahildir.

- 5 Belirli durumlarda, antisens oligonükleotidler en az bir modifiye nükleosit arası bağlantıya sahiptir. Belirli durumlarda, antisens oligonükleotidler en az 2 modifiye nükleosit arası bağlantıya sahiptir. Belirli durumlarda, antisens oligonükleotidler en az 3 modifiye nükleosit arası
- 10 bağlantıya sahiptir Belirli durumlarda, antisens oligonükleotidler en az 10 modifiye nükleosit arası bağlantıya sahiptir. Belirli durumlarda, bir antisens oligonükleotidin her bir nükleosit arası bağlantısı, bir modifiye nükleosit arası bağlantıdır. Belirli durumlarda, bu tip modifiye
- 15 nükleosit arası bağlantılar fosforotioat bağlantılardır.

c. Uzunluklar

- Belirli durumlarda, mevcut açıklama, çeşitli aralıklarda
- 20 uzunlukların herhangi birinde antisens oligonükleotidler sağlamaktadır. Belirli durumlarda, açıklama, X-Y bağlı nükleositler içeren ya da bunlardan oluşan antisens bileşikler ya da antisens oligonükleotidler sağlamakta olup, burada X ve Y'nin her biri bağımsız olarak, $X < Y$ olması şartıyla, 8, 9, 10,
- 25 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 ve 50'den seçilir. Örneğin, belirli durumlarda, açıklama, aşağıdakileri içeren veya onlardan oluşan antisens bileşikler veya antisens
- 30 oligonükleotidler sağlamaktadır: 8-9, 8-10, 8-11, 8-12, 8-13, 8-14, 8-15, 8-16, 8-17, 8-18, 8-19, 8-20, 8-21, 8-22, 8-23, 8-24, 8-25, 8-26, 8-27, 8-28, 8-29, 8-30, 9-10, 9-11, 9-12, 9-13, 9-14, 9-15, 9-16, 9-17, 9-18, 9-19, 9-20, 9-21, 9-22, 9-23, 9-24, 9-25, 9-26, 9-27, 9-28, 9-29, 9-30, 10-11, 10-12,
- 35 10-13, 10-14, 10-15, 10-16, 10-17, 10-18, 10-19, 10-20, 10-21,

10-22, 10-23, 10-24, 10-25, 10-26, 10-27, 10-28, 10-29, 10-30, 11-12, 11-13, 11-14, 11-15, 11-16, 11-17, 11-18, 11-19, 11-20, 11-21, 11-22, 11-23, 11-24, 11-25, 11-26, 11-27, 11-28, 11-29, 11-30, 12-13, 12-14, 12-15, 12-16, 12-17, 12-18, 12-19, 12-20, 12-21, 5 12-22, 12-23, 12-24, 12-25, 12-26, 12-27, 12-28, 12-29, 12-30, 13-14, 13-15, 13-16, 13-17, 13-18, 13-19, 13-20, 13-21, 13-22, 13-23, 13-24, 13-25, 13-26, 13-27, 13-28, 13-29, 13-30, 14-15, 14-16, 14-17, 14-18, 14-19, 14-20, 14-21, 14-22, 14-23, 14-24, 14-25, 14-26, 14-27, 14-28, 14-29, 14-30, 15-16, 15-17, 15-18, 10 15-19, 15-20, 15-21, 15-22, 15-23, 15-24, 15-25, 15-26, 15-27, 15-28, 15-29, 15-30, 16-17, 16-18, 16-19, 16-20, 16-21, 16-22, 16-23, 16-24, 16-25, 16-26, 16-27, 16-28, 16-29, 16-30, 17-18, 17-19, 17-20, 17-21, 17-22, 17-23, 17-24, 17-25, 17-26, 17-27, 17-28, 17-29, 17-30, 18-19, 18-20, 18-21, 18-22, 18-23, 18-24, 15 18-25, 18-26, 18-27, 18-28, 18-29, 18-30, 19-20, 19-21, 19-22, 19-23, 19-24, 19-25, 19-26, 19-27, 19-28, 19-29, 19-30, 20-21, 20-22, 20-23, 20-24, 20-25, 20-26, 20-27, 20-28, 20-29, 20-30, 21-22, 21-23, 21-24, 21-25, 21-26, 21-27, 21-28, 21-29, 21-30, 22-23, 22-24, 22-25, 22-26, 22-27, 22-28, 22-29, 22-30, 23-24, 20 23-25, 23-26, 23-27, 23-28, 23-29, 23-30, 24-25, 24-26, 24-27, 24-28, 24-29, 24-30, 25-26, 25-27, 25-28, 25-29, 25-30, 26-27, 26-28, 26-29, 26-30, 27-28, 27-29, 27-30, 28-29, 28-30 veya 29-30 bağlı nükleositler.

25 Belirli durumlarda, mevcut açıklamanın antisens bileşikleri veya antisens oligonükleotidleri 15 nükleosit uzunluğundadır. Belirli durumlarda, mevcut açıklamanın antisens bileşikleri veya antisens oligonükleotidleri 16 nükleosit uzunluğundadır. Belirli durumlarda, mevcut açıklamanın antisens bileşikleri 30 veya antisens oligonükleotidleri 17 nükleosit uzunluğundadır. Belirli durumlarda, mevcut açıklamanın antisens bileşikleri veya antisens oligonükleotidleri 18 nükleosit uzunluğundadır. Belirli durumlarda, mevcut açıklamanın antisens bileşikleri veya antisens oligonükleotidleri 19 nükleosit uzunluğundadır.

Belirli durumlarda, mevcut açıklamanın antisens bileşikleri veya antisens oligonükleotidleri 20 nükleosit uzunluğundadır.

d. Belirli Oligonükleotid Motifleri

5

Belirli durumlarda, antisens oligonükleotidler, uzunlukları boyunca spesifik yönlendirmelerde düzenlenen kimyasal olarak modifiye alt birimlere sahiptir. Belirli durumlarda, açıklamanın antisens oligonükleotidleri tamamen modifiyedir.

10

Belirli durumlarda, açıklamanın antisens oligonükleotidleri eşit olarak modifiyedir. Belirli durumlarda, açıklamanın antisens oligonükleotidleri eşit olarak modifiyedir ve her bir nükleosit bir 2'-MOE şeker bölütü içerir. Belirli durumlarda, açıklamanın antisens oligonükleotidleri eşit şekilde

15

modifiyedir ve her bir nükleosit bir 2'-OMe şeker bölütü içerir. Belirli durumlarda, açıklamanın antisens oligonükleotidleri eşit şekilde modifiyedir ve her bir nükleosit bir morfolino şeker bölütü içerir.

20

Belirli durumlarda, açıklamanın oligonükleotidleri bir değişen motif içerir. Bu tip belirli durumlarda, değişen modifikasyon tipleri, 2'-MOE, 2'-F, bir bisiklik şekeri-modifiye nükleosit ve DNA (modifiye edilmemiş 2'-deoksi) arasından seçilir. Bu tip belirli durumlarda, her bir değişen bölge bir tek

25

nükleosit içerir.

Belirli durumlarda, açıklamanın oligonükleotidleri, bir birinci tipteki nükleositlerin bir ya da daha fazla bloğunu ve bir ikinci tipteki nükleositlerin bir ya da daha fazla bloğunu

30

içerir.

Belirli durumlarda, bir değişen motifteki bir ya da daha fazla değişen bölge, bir tipteki bir tek nükleositten daha fazlasını içerir. Örneğin, mevcut açıklamanın oligomerik bileşikleri,

aşağıdaki nükleosit motiflerin herhangi birinden bir ya da daha fazla bölge içerebilir:

- 5 $Nu_1 Nu_1 Nu_2 Nu_2 Nu_1 Nu_1$;
 $Nu_1 Nu_2 Nu_2 Nu_1 Nu_2 Nu_2$;
 $Nu_1 Nu_1 Nu_2 Nu_1 Nu_1 Nu_2$;
 $Nu_1 Nu_2 Nu_2 Nu_1 Nu_2 Nu_1 Nu_1 Nu_2 Nu_2$;
 $Nu_1 Nu_2 Nu_1 Nu_2 Nu_1 Nu_1$;
 $Nu_1 Nu_1 Nu_2 Nu_1 Nu_2 Nu_1 Nu_2$;
 $Nu_1 Nu_2 Nu_1 Nu_2 Nu_1 Nu_1$;
10 $Nu_1 Nu_2 Nu_2 Nu_1 Nu_1 Nu_2 Nu_2 Nu_1 Nu_2 Nu_1 Nu_2 Nu_1 Nu_1$;
 $Nu_2 Nu_1 Nu_2 Nu_2 Nu_1 Nu_1 Nu_2 Nu_2 Nu_1 Nu_2 Nu_1 Nu_2 Nu_1 Nu_1$ veya
 $Nu_1 Nu_2 Nu_1 Nu_2 Nu_2 Nu_1 Nu_1 Nu_2 Nu_2 Nu_1 Nu_2 Nu_1 Nu_2 Nu_1 Nu_1$
 olup;

- 15 burada Nu_1 bir birinci tipte bir nükleosittir ve Nu_2 bir ikinci tipte bir nükleosittir. Belirli durumlarda, Nu_1 ve Nu_2 'nin biri bir 2'-MOE nükleosittir ve Nu_1 ve Nu_2 'nin diğeri şunlardan seçilir: bir 2'-OME modifiye nükleosit, BNA ve bir modifiye edilmemiş DNA veya RNA nükleosidi.

20 2. Oligomerik Bileşikler

- Belirli durumlarda, mevcut açıklama oligomerik bileşikler sağlamaktadır. Belirli durumlarda, oligomerik bileşikler yalnızca bir oligonükleotidden oluşur. Belirli durumlarda, bir oligomerik bileşik bir oligonükleotid ve bir ya da daha fazla konjugat ve/veya terminal grubu içerir. Bu tip konjugat ve/veya terminal grupları, yukarıda müzakere edilen kimyasal motiflerin herhangi birine sahip oligonükleotidlere eklenebilir. Böylelikle, örneğin, değişen nükleositlerin bölgesine sahip bir oligonükleotid içeren bir oligomerik bileşik bir terminal grubu içerebilir.

a. Belirli Konjugat Grupları

Belirli durumlarda, mevcut açıklamanın oligonükleotidleri bir ya da daha fazla konjugat grubunun eklenmesiyle modifiye edilir. Genel olarak, konjugat grupları eklenen oligomerik bileşiğin, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, farmakodinamikleri, farmakokinetikleri, kararlılığı, bağlanması, emilimi, hücresel dağılımı, hücresel tutulumu, yüklenmesi ve klirensi dahil olmak üzere bir ya da daha fazla özelliğini modifiye eder. Konjugat grupları kimyasal tekniklerde rutin olarak kullanılır ve bir oligonükleotid gibi bir oligomerik bileşik gibi bir ana bileşiğe doğrudan veya bir opsiyonel konjugat bağlantı bölütü vasıtasıyla bağlanır. Konjugat gruplarına, sınırlama olmadan, araya ekleyiciler, haberci moleküller, poliaminler, poliamidler, polietilen glikoller, tiyoeterler, polieterler, kolesteroller, tiyokolesteroller, kolik asit bölütleri, folat, lipitler, fosfolipitler, biyotin, fenazin, fenantridin, antrakınon, adamantan, akridin, floresinler, rodaminler, kumarinler ve boyalar dahildir. Belirli konjugat grupları daha önce tarif edilmiştir, örneğin: kolesterol bölütü (Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 6553-6556), kolik asit (Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4, 1053-1060), bir tiyoeter, örneğin heksil-S-tritiltiol (Manoharan et al., Ann. N.Y. Acad. Sci., 1992, 660, 306-309; Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1993, 3, 2765-2770), bir tiyokolesterol (Oberhauser et al., Nucl. Acids Res., 1992, 20, 533-538), bir alifatik zincir, örneğin do-dekan-diol veya undesil kalıntıları (Saison-Behmoaras et al., EMBO J., 1991, 10, 1111-1118; Kabanov et al., FEBS Lett., 1990, 259, 327-330; Svinarchuk et al., Biochimie, 1993, 75, 49-54), bir fosfolipit, örneğin di-heksadesil-ras-gliserol veya trietilamonyum 1,2-di-O-heksadesil-ras-gliserol-3-H-fosfonat (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654; Shea et al., Nucl. Acids Res., 1990, 18, 3777-3783), bir poliamin veya bir polietilen glikol zinciri (Manoharan et al., Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14, 969-973) veya adamantan

asetik asit (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654), bir palmitil bölütü (Mishra et al., Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264, 229-237) veya bir oktadesilamin veya heksilamino-karbonil-oksikolesterol bölütü (Crooke et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277, 923-937).

Belirli durumlarda, bir konjugat grubu bir etken ilaç maddesi, örneğin, aspirin, varfarin, fenilbütazon, ibuprofen, suprofen, fen-büfen, ketoprofen, (S)-(+)-pranoprofen, karprofen, dansilsarkozin, 2,3,5-triiodobenzoik asit, flufenamik asit, folinik asit, bir benzotiadiazid, klorotiazid, bir diazepin, indo-metisin, bir barbitürat, bir sefalosporin, bir sülf ilaç, bir antidiyabetik, bir antibakteriyel veya bir antibiyotik içerir. Oligonükleotid-ilac konjugatları ve bunların hazırlanması, US 6.656.730 olarak yayınlanan U.S. Patent Başvurusu 09/334.130'da tarif edilmektedir.

Oligonükleotid konjugatların hazırlanmasını öğreten örnek niteliğindeki U.S. Patentlerine, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, U.S.: 4.828.979; 4.948.882; 5.218.105; 5.525.465; 5.541.313; 5.545.730; 5.552.538; 5.578.717. 5.580.731; 5.580.731; 5.591.584; 5.109.124; 5.118.802; 5.138.045; 5.414.077; 5.486.603; 5.512.439; 5.578.718; 5.608.046; 4.587.044; 4.605.735; 4.667.025; 4.762.779; 4.789.737; 4.824.941; 4.835.263; 4.876.335; 4.904.582; 4.958.013; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.245.022; 5.254.469; 5.258.506; 5.262.536; 5.272.250; 5.292.873; 5.317.098; 5.371.241. 5.391.723; 5.416.203. 5.451.463; 5.510.475; 5.512.667; 5.514.785; 5.565.552; 5.567.810; 5.574.142; 5.585.481; 5.587.371; 5.595.726; 5.597.696; 5.599.923; 5.599.928 ve 5.688.941 dahildir.

Konjugat grupları ya bir oligonükleotidin her iki ucuna (terminal konjugat grupları) ve/veya herhangi bir dahili konuma eklenebilir.

5 b. Terminal Grupları

Belirli durumlarda, oligomerik bileşikler bir ya da her iki uçta terminal grupları içerir. Belirli durumlarda, bir terminal grubu, yukarıda müzakere edilen konjugat gruplarının herhangi birini içerebilir. Belirli durumlarda, terminal grupları ilave nükleositler ve/veya evirtik abazik nükleositler içerebilir. Belirli durumlarda, bir terminal grubu bir dengeleyici gruptur.

Belirli durumlarda, oligomerik bileşikler, örneğin nükleaz kararlılık gibi özellikleri güçlendiren bir ya da daha fazla terminal dengeleyici grup içerir. Dengeleyici gruplara başlık yapıları dahildir. Burada kullanıldığı şekliyle "başlık yapısı" ya da "terminal başlık bölütü" terimleri, bir oligomerik bileşiğin bir ya da her iki ucuna eklenebilen kimyasal modifikasyonları ifade etmektedir. Bu tip belirli terminal modifikasyonları, terminal nükleik asit bölütlerine sahip oligomerik bileşikleri eksonükleaz degradasyonundan korur ve bir hücre içerisinde aktarıma ve/veya lokalizasyona yardım edebilir. Başlık 5'-ucunda (5'-başığı) veya 3'-ucunda (3'-başığı) mevcut olabilir veya her iki uçta mevcut olabilir. (Daha fazla ayrıntı için bakınız, Wincott et al., Uluslararası PCT yayını. WO 97/26270; Beaucage and Tyer, 1993, Tetrahedron 49, 1925; U.S. Patent Başvurusu Yayını US 2005/0020525 ve WO 03/004602).

Belirli durumlarda, bir ya da daha fazla ilave nükleosit, bir oligomerik bileşiğin bir oligonükleotidinin bir ya da her iki terminal ucuna eklenir. Bu tip ilave terminal nükleositler burada, terminal-grubu nükleositleri olarak ifade

edilmektedir. Bir çift-sarmallı bileşikte, bu tip terminal-grubu nükleositleri terminal (3' ve/veya 5') sarmalarıdır. Çift-sarmallı antisens bileşiklerin ayarlanmasında, bu tip terminal-grubu nükleositler bir hedef nükleik aside tamamlayıcı olabilir ya da olmayabilir. Belirli durumlarda, terminal grubu bir nükleosit-olmayan terminal grubudur. Bu tip terminal-olmayan gruplar, bir nükleositten farklı herhangi bir terminal grubu olabilir.

10 c. Oligomerik Bileşik Motifleri

Belirli durumlarda, mevcut açıklamanın oligomerik bileşikleri bir motif içerir: $T_1-(Nu_1)_{n1}-(Nu_2)_{n2}-(Nu_1)_{n3}-(Nu_2)_{n4}-(Nu_1)_{n5}-T_2$, burada:

- 15 Nu_1 , bir birinci tipte bir nükleosittir;
 Nu_2 , bir ikinci tipte bir nükleosittir;
 $n1$ ve $n5$ 'in her biri, bağımsız olarak 0 ila 3 arasındadır;
 $n2$ artı $n4$ toplamı 10 ila 25 arasındadır;
20 $n3$ 0 ila 5 arasındadır ve
her bir T_1 ve T_2 , bağımsız olarak, H, bir hidroksil koruyucu grup, bir opsiyonel olarak bağlı konjugat grubu veya bir başlıklama grubudur.
- 25 Bu tip belirli durumlarda, $n2$ ve $n4$ 'ün toplamı 13 ya da 14'tür; $n1$ 2'dir; $n3$ 2 ya da 3'tür ve $n5$ 2'dir. Bu tip belirli durumlarda, mevcut açıklamanın oligomerik bileşikleri, Tablo A'dan seçilen bir motif içerir.

Tablo A

$n1$	$n2$	$n3$	$n4$	$n5$
2	16	0	0	2
2	2	3	11	2
2	5	3	8	2

Tablo A

n1	n2	n3	n4	n5
2	8	3	5	2
2	11	3	2	2
2	9	3	4	2
2	10	3	3	2
2	3	3	10	2
2	4	3	9	2
2	6	3	7	2
2	7	3	6	2
2	8	6	2	2
2	2	2	12	2
2	3	2	11	2
2	4	2	10	2
2	5	2	9	2
2	6	2	8	2
2	7	2	7	2
2	8	2	6	2
2	9	2	5	2
2	10	2	4	2
2	11	2	3	2
2	12	2	2	2

Tablo A'nın amacı, mevcut açıklamayı örneklemek ancak sınırlamamaktır. Tablo A'da gösterilen oligomerik bileşiklerin her biri 20 nükleosit içerir. Daha fazla ya da daha az nükleosit içeren oligomerik bileşikler, n1-n5'in biri ya da daha fazlası için farklı sayılarda nükleosit seçerek kolayca tasarlanabilir. Belirli durumlarda, Nu₁ ve Nu₂'nin her biri

şunlar arasından seçilir: 2'-MOE, 2'-OMe, DNA ve bir bisiklik nükleosit.

3. Antisens

5

Belirli durumlarda, mevcut açıklamanın oligomerik bileşikleri antisens bileşiklerdir. Dolayısıyla, bu tip durumlarda, oligomerik bileşikler bir hedef nükleik asitle melezlenir ve bu da bir antisens aktivitesiyle sonuçlanır.

10

a. Melezleme

Belirli durumlarda, açıklama, antisens bileşiğin özgül bağlanmanın arzu edildiği koşullar, yani, in vivo tayinler veya terapötik tedavi durumundaki fizyolojik koşullar altında ve tayinlerin in vitro tayinler durumunda gerçekleştirildiği koşullar altında hedef-olmayan nükleik asit dizilerine özgül-olmayan bağlanmasını önlemek için yeterli tamamlayıcılık derecesi olduğunda bir hedef nükleik aside özgül olarak melezlenen antisens bileşikler sağlamaktadır.

20

Böylelikle, "sıkı melezleme koşulları" veya "sıkı koşullar", bir antisens bileşiğin bir hedef diziye, ancak minimal sayıda diğer dizilere melezlendiği koşullar anlamına gelmektedir. Sıkı koşullar dizi-bağımlıdır ve farklı durumlarda farklı olacaktır ve antisens oligonükleotidlerin bir hedef diziye melezlendiği "sıkı koşullar", antisens oligonükleotidlerin yapısı ve bileşimiyle ve incelendikleri tayinlerle belirlenir.

25

Teknikte, nükleotid afinite modifikasyonlarının katılmasının, modifiye edilmemiş bir bileşiğe kıyasla daha çok sayıda uyumsuzluğa neden olabileceği anlaşılmaktadır. Benzer şekilde, belirli nükleobaz dizileri uyumsuzluklara karşı diğer nükleobaz dizilerinden daha toleranslı olabilir. Teknikte normal uzmanlığa sahip bir kişi oligonükleotidlerin arasındaki

35

veya bir antisens oligonükleotid ile bir hedef nükleik asit arasındaki uyumsuzlukların uygun bir sayısını, mesela erime sıcaklığını (T_m) belirleyerek belirleyebilir. T_m veya ΔT_m , teknikte normal uzmanlığa sahip bir kişiye aşına olan tekniklerle hesaplanabilir. Örneğin, Freier et al. (Nucleic Acids Research, 1997, 25, 22: 4429-4443)'te tarif edilen teknikler, teknikte normal uzmanlığa sahip bir kişinin, nükleotid modifikasyonlarını, bir RNA:DNA ikilisinin erime sıcaklığını arttırabilme yetilerini değerlendirmesine olanak sağlar.

b. ön-mRNA işleme

Belirli durumlarda, burada sağlanan antisens bileşikler bir ön-mRNA'ya tamamlayıcıdır. Belirli durumlarda, bu tip antisens bileşikler ön-mRNA'nın uç birleştirmesini değiştirebilir. Bu tip belirli durumlarda, bir hedef ön-mRNA'ya karşılık gelen bir olgun mRNA'nın bir varyantının o olgun mRNA'nın bir başka varyantına oranı değiştirilir. Bu tip belirli durumlarda, hedef ön-mRNA'dan eksprese edilen bir proteinin bir varyantının proteinin bir başka varyantına oranı değiştirilir. Bir ön-mRNA'nın uç birleştirmesini değiştirmek için kullanılabilen belirli oligomerik bileşikler ve nükleobaz dizileri, örneğin, US 6.210.892; US 5.627.274; US 5.665.593; 5.916.808; US 5.976.879; US2006/0172962; US2007/002390; US2005/0074801; US2007/0105807; US2005/0054836; WO 2007/090073; WO2007/047913, Hua et al., PLoS Biol 5(4):e73; Vickers et al., J. Immunol. 2006 Mar 15; 176(6):3652-61 ve Hua et al., American J. of Human Genetics (April 2008) 82, 1-15'te bulunabilir. Belirli durumlarda, uç birleştirmeyi değiştiren antisens dizileri, mevcut açıklamanın motiflerine göre modifiye edilir.

Antisens, bir ya da daha fazla spesifik gen ürününün ekspresyonunun modüle edilmesi için etkili bir araçtır ve bir

dizi terapötik, tanısal ve araştırma uygulamalarında benzersiz şekilde faydalıdır. Burada, gen ekspresyonunu, hedef işgaline dayalı antisens mekanizmaları dahil olmak üzere antisens mekanizmalarının eylemi vasıtasıyla modüle etmek için faydalı antisens bileşikler sağlamaktadır. Bir yönde, burada sağlanan antisens bileşikler bir hedef genin uç birleştirmesini modüle eder. Bu tip modülasyona, ekson inklüzyonunun teşvik edilmesi veya önlenmesi dahildir. Burada ayrıca, eksonik uç birleştirme güçlendiricileri, eksonik uç birleştirme susturucuları, intronik uç birleştirme güçlendiricileri ve intronik uç birleştirme susturucuları dahil olmak üzere, ön-mRNA molekülünde mevcut *cis* uç birleştirme düzenleyici öğelerine hedeflenen antisens bileşikler de sağlanmaktadır. *Cis* uç birleştirme düzenleyici öğelerinin bozulmasının, uç birleştirme ürünlerinin bileşiminde bir değişikliğe yol açabilecek şekilde uç birleştirme alanı seçimini değiştirdiği düşünülmektedir.

Ökaryotik ön-mRNA'ların işlenmesi, uygun mRNA uç birleştirmesini elde etmek için çok sayıda sinyal ve protein faktörü gerektiren karmaşık bir işlemdir. Uç birleştirme-zom tarafından ekson tanımlanması, intron-ekson sınırlarını tanımlayan kanonik uç birleştirme sinyallerinden daha fazlasını gerektirir. Bu tip bir ilave sinyal, *cis*-görevi gören düzenleyici güçlendirici ve susturucu dizileri tarafından sağlanır. Alanlarına ve etki şekillerine bağlı olarak uç birleştirme donör alanlarının veya uç birleştirme alıcı alanların kullanımını ya baskılayan ya da güçlendiren eksonik uç birleştirme güçlendiriciler (ESE), eksonik uç birleştirme susturucular (ESS), intronik uç birleştirme güçlendiriciler (ISE) ve intron uç birleştirme susturucular (ISS) tanımlanmıştır (Yeo et al. 2004, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101(44):15700-15705). Spesifik proteinlerin (*trans* faktörler) bu düzenleyici dizilere bağlanması, ya belirli uç birleştirme alanlarının kullanımını teşvik ederek ya da

5 önleyerek ve böylelikle uç birleştirme ürünlerinin oranını
modüle ederek uç birleştirme işlemini yönetir (Scamborova et
al. 2004, Mol. Cell. Biol. 24(5):1855-1869; Hovhannisyan and
Carstens, 2005, Mol. Cell. Biol. 25(1):250-263; Minovitsky et
al. 2005, Nucleic Acids Res. 33(2):714-724).

4. Farmasötik Bileşimler

10 Belirli durumlarda, mevcut açıklama, bir ya da daha fazla
antisens bileşik içeren farmasötik bileşimler sağlamaktadır.
Belirli durumlarda, bu tip farmasötik bileşimler bir steril
salin solüsyonu ve bir ya da daha fazla antisens bileşik
içerir. Belirli durumlarda, bu tip farmasötik bileşimler, bir
steril salin solüsyonundan ve bir ya da daha fazla antisens
15 bileşikten oluşur.

Belirli durumlarda, antisens bileşikler, farmasötik
bileşimlerin ya da formülasyonların hazırlanması için
farmakolojik olarak kabul edilen etken ve/veya etkisiz
20 maddelerle eklenerek karıştırılabilir. Farmasötik bileşimlerin
formülasyonu için bileşimler ve yöntemler, bunlarla sınırlı
kalmamak kaydıyla, veriliş yolu, hastalığın derecesi veya
verilecek olan doz dahil olmak üzere bir dizi kriterlere
bağlıdır.

25 Belirli durumlarda antisens bileşikler, bu tip oligomerik
bileşikleri uygun bir farmakolojik olarak kabul edilen
seyreltici veya taşıyıcıyla birleştirilerek farmasötik
bileşimler içinde kullanılabilir. Farmakolojik olarak kabul
30 edilen bir seyrelticiye fosfat-tamponlu salin (PBS) dahildir.
PBS, parenteral olarak aktarılacak olan bileşimlerde kullanım
için faydalı bir seyreltici. Dolayısıyla, belirli
durumlarda, burada tarif edilen yöntemlerde, bir antisens
bileşik ve farmakolojik olarak kabul edilen bir seyreltici
35 içeren bir farmasötik bileşim kullanılmaktadır. Belirli

durumlarda, farmakolojik olarak kabul edilen seyreltici PBS'tir.

Antisens bileşikler içeren farmasötik bileşimler, farmakolojik olarak kabul edilen herhangi tuzları, esterleri veya bu tip esterlerin tuzlarını kapsar. Belirli durumlarda, antisens bileşikler içeren farmasötik bileşimler, bir insan dahil olmak üzere bir hayvana verilişi üzerine, (doğrudan ya da dolaylı olarak) biyolojik olarak aktif metaboliti veya bunun kalıntısını sağlayabilen bir ya da daha fazla oligonükleotid içerir. Dolayısıyla, örneğin, açıklama ayrıca, antisens bileşiklerin farmakolojik olarak kabul edilen tuzlarına, prodroglara, bu tip prodrogların farmakolojik olarak kabul edilen tuzlarına ve diğer biyomuadillerine de yakındır. Uygun farmakolojik olarak kabul edilen tuzlara, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, sodyum ve potasyum tuzları dahildir.

Bir prodrog, etken antisens oligomerik bileşik oluşturmak için ilave nükleositlerin, bir oligomerik bileşiğin vücut içerisindeki endojen nükleazlar tarafından yarılan bir ya da her iki ucunda katılmasını içerebilir.

Lipit-bazlı vektörler nükleik asit terapilerinde çeşitli yöntemlerle kullanılmıştır. Örneğin, bir yöntemde, nükleik asit önceden oluşturulmuş lipozomların veya katyonik lipitlerin ve nötr lipitlerin karışımlarından yapılan lipoplekslerin içine eklenir. Bir başka yöntemde, mono- veya poli-katyonik lipitlere sahip DNA kompleksleri, bir nötr lipidin varlığı olmadan oluşturulur.

Belirli preparasyonlar, Akinc et al., Nature Biotechnology 26, 561 - 569 (01 Mayıs 2008)'de tarif edilmektedir.

5. Bir Süjeye Veriliş

Belirli durumlarda, bir ya da daha fazla antisens bileşik içeren farmasötik bileşimler bir süjeye verilir. Belirli durumlarda, bu tip farmasötik bileşimler enjeksiyonla verilir. Belirli durumlarda, bu tip farmasötik bileşimler infüzyonla verilir.

Belirli durumlarda, farmasötik bileşimler CSF'nin içine enjeksiyonla ya da infüzyonla verilir. Bu tip belirli durumlarda, farmasötik bileşimler omurganın içine doğrudan enjeksiyon ya da infüzyonla verilir. Belirli durumlarda, farmasötik bileşimler beynin içine enjeksiyon ya da infüzyonla verilir. Belirli durumlarda, farmasötik bileşimler omurilik dokusunun kendisinden ziyade intratekal enjeksiyon ya da infüzyonla verilir. Teoriyle sınırlı kalmaksızın, belirli durumlarda, antisens bileşik çevreleyen CSF'nin içine salınır ve omurilik parankimasının içine nüfuz edebilir. İntratekal aktarımın ek bir avantajı, intratekal rutinin, insanlarda halihazırda rutin kullanım olan lomber ponksiyon verililişini (yani, omurilikten sıvı alma) taklit etmesidir.

Belirli durumlarda, farmasötik bileşimler intraserebroventriküler (ICV) enjeksiyon veya infüzyonla verilir. Bir ya da daha fazla antisens bileşik içeren bir farmasötik bileşimin intraserebroventriküler ya da intraventriküler aktarılması, beynin, beyin-omurilik sıvısıyla (CSF) dolu karıncıklarının herhangi birinde ya da daha fazlasında gerçekleştirilebilir. CSF, karıncıkları dolduran berrak bir sıvıdır, subaraknoid boşlukta mevcuttur ve beyinle omuriliği çevreler. CSF, koroid damar ağları tarafından ve doku sıvısının beyin tarafından karıncıkların içine akıtılması veya iletilmesi vasıtasıyla üretilir. Koroid damar ağı, lateral karıncığın tabanını ve üçüncü ve dördüncü karıncıkların çatısını kaplayan bir yapıdır. Belirli çalışmalar, bu yapıların, merkezi sinir sistemi boşluklarını günde dört kez doldurmak için bir miktarla tutarlı şekilde

günde 400-600 cc sıvı üretebildiğini göstermiştir. Yetişkin insanlarda, bu sıvının hacmi, 125 ila 150 ml (4-5 ons) olarak hesaplanmıştır. CSF kesintisiz oluşum, dolaşım ve emilim içindedir. Belirli çalışmalar, her gün CSF'nin yaklaşık 430
5 ila 450 ml'sinin (neredeyse 2 bardak) üretilebildiğini göstermiştir. Belirli hesaplamalar, üretimin yetişkinlerde yaklaşık dakikada 0,35 ml'ye ve bebek insanlarda dakikada 0,15 ml'ye eşit olduğunu hesaplamıştır. Lateral karıncıkların koroid damar ağları CSF'nin çoğunluğunu üretir. Monro forameni
10 üzerinden, üretimle üçüncü karıncığa eklendiği üçüncü karıncığın içine akar ve Silvius kanalı üzerinden dördüncü karıncığa devam eder. Dördüncü karıncık daha fazla CSF ekler; sıvı daha sonra Magendie ve Luschak forameni üzerinden subaraknoid boşluğun içine gider. Daha sonra beynin tabanı
15 çevresinde, omurilik çevresinde aşağı ve serebral yarıkürelerin üzerinde yukarı doğru devridaim yapar. CSF, araknoid kılıklı çıkıntılar ve intrakraniyal vasküler sinüsler vasıtasıyla kana boşalır.

20 Belirli durumlarda, bu tip farmasötik bileşimler sistemik olarak verilir. Belirli durumlarda, farmasötik bileşimler subkütan olarak verilir. Belirli durumlarda, farmasötik bileşimler intravenöz olarak verilir. Belirli durumlarda, farmasötik bileşimler intramusküler enjeksiyonla verilir.

25 Belirli durumlarda, farmasötik bileşimler hem doğrudan CSF'ye (örneğin IT ve/veya ICV enjeksiyonu ve/veya infüzyonu) hem sistemik olarak verilir.

Belirli durumlarda, sistemik olarak verilen bir antisens
30 bileşik nöronlara girer. Belirli durumlarda, sistemik olarak verilen antisens bileşikler, özellikle kan-beyin bariyerinin tamamen oluşmadığı genç süjelerde (örneğin in utero süjelerde ve/veya yenidoğan süjelerde) kan-beyin bariyerine nüfuz edebilir. Belirli durumlarda, sistemik olarak verilen antisens
35 bileşiğin bir miktarı, kan-beyin bariyerinin tam olarak

oluştugu süjelerde bile sinir hücreleri tarafından alınabilir. Örneğin, antisens bileşikler bir nörona, nöromusküler kavşakta ya da yakınında girebilir (retrograd tutulum). Belirli durumlarda, bu tip retrograd tutulum, bununla sınırlı kalmamak kaydıyla, bir motor nöronu dahil olmak üzere nöronun içinde antisens aktivitesiyle sonuçlanır ve nöron içinde antisens aktiviteyle terapötik bir fayda sağlar.

Belirli durumlarda, sistemik veriliş, nöronlardan farklı hücrelerde ve/veya dokularda meydana gelen antisens aktiviteyle terapötik fayda sağlar. Kanıtlar, nöronların içindeki fonksiyonel SMN'nin normal nöron fonksiyonu için gerekli olduğunu ortaya koyarken, diğer hücrelerde ve dokularda indirgenmiş fonksiyonel SMN'nin sonuçları iyi karakterize değildir. Belirli durumlarda, nöronal-olmayan hücrelerdeki antisens aktivite, o nöronal-olmayan hücrelerde SMN fonksiyonunun restorasyonu ile sonuçlanır ve bu da terapötik faydayla sonuçlanır.

Belirli durumlarda, nöronal-olmayan hücrelerdeki gelişmiş SMN fonksiyonu, nöronların içindeki SMN fonksiyonu gelişmiş olsun ya da olmasın gelişmiş nöronal hücre fonksiyonu sağlar. Örneğin, belirli durumlarda, mevcut açıklamanın farmasötik bileşimlerin sistemik verilişi, kas hücrelerinde antisens aktiviteyle sonuçlanır. Kas hücrelerindeki bu tip antisens aktivite, o kas hücresiyle ilişkili motor-nöronlara veya genel olarak nöronlara bir fayda sağlayabilir. Bu tip durumlarda, tamir edilmiş SMN fonksiyonuna sahip kas hücresi, nöronal viyabilitiyi ve/veya fonksiyonu geliştiren bir faktör sağlayabilir. Belirli durumlarda, bu tip antisens aktivite, nöronların içindeki antisens bileşiklerden meydana gelen antisens aktivitesinden sağlanan faydadan bağımsızdır. Belirli durumlarda, mevcut açıklamanın farmasötik bileşimlerin sistemik verilişi, nöronlarla yakın ilişkide olmayan hücreler dahil olmak üzere, diğer nöronal-olmayan hücrelerde antisens

aktiviteyle sonuçlanır. Nöronal-olmayan hücrelerdeki bu tip antisens aktivite nöronların fonksiyonunu geliştirebilir. Örneğin, bir nöronal-olmayan hücredeki (örneğin karaciğer hücresi) antisens aktivite, o hücrede nöronların fonksiyonunu geliştiren bir faktör üretilmesiyle sonuçlanabilir. Not: "antisens aktivite" terimi doğrudan ve dolaylı aktiviteleri içerdiğinden, hiç antisens bileşik nörona girmese bile nöronal fonksiyona bir fayda bir "antisens aktivitedir".

- 10 Belirli durumlarda, bir farmasötik bileşimin sistemik verililişi, nöronlarda doğrudan veya dolaylı antisens aktivitelerden bağımsız terapötik faydayla sonuçlanır. Tipik olarak, SMA'nın ayarlanmasında, nöronal fonksiyon, kayda değer semptomlarla sonuçlanacak şekilde azalır. İlave semptomlar
- 15 diğer hücrelerdeki azalan SMN aktivitesinden kaynaklanabilir. Bu tip belirli semptomlar, azalan nöronal fonksiyondan kaynaklanan semptomların bağıl ciddiyetiyle gizlenebilir. Belirli durumlarda, sistemik verililiş, nöronal-olmayan hücrelerde tamir edilmiş veya geliştirilmiş SMN fonksiyonuyla
- 20 sonuçlanır. Bu tip belirli durumlarda, nöronal-olmayan hücrelerdeki bu tip tamir edilmiş veya geliştirilmiş SMN fonksiyonu terapötik faydaya sahiptir. Örneğin, belirli durumlarda, SMA'sı olan süjeler azalmış büyümeye sahiptir. Bu tip azalmış büyüme, nöronal hücrelerdeki azalan fonksiyondan
- 25 kaynaklanmayabilir. Aslında, azalmış büyüme, hipofiz bezi gibi bir başka organdaki hücrelerin bozulmuş fonksiyonuyla ilgili olabilir ve/veya vücudun hücreleri boyunca SMN yetersizliklerinin sonucu olabilir. Bu tip durumlarda sistemik uygulama, hipofiz hücrelerinde ve/veya diğer hücrelerde
- 30 düzelmiş SMN aktivitesi ile sonuçlanabilir, bu da artmış büyüme ile sonuçlanır. Bu tip durumlarda, CSF'ye verililiş, bir süjenin daha uzun yaşamasını sağlamak için yeterli nöronal fonksiyonu tamir eder, ancak süjeler çoğunlukla bu tip semptomlar görünmeden önce öldüğü için daha önceden bilinmeyen
- 35 bir ya da daha fazla semptom ortaya çıkar çünkü süje daha uzun

yaşar. Bu tip ortaya çıkan semptomlar ölümcül olabilir. Belirli durumlarda, ortaya çıkan semptomlar sistemik verilişle tedavi edilir. Mekanizmaya bakılmaksızın, belirli durumlarda, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, bozulmuş nöronal fonksiyonla ilişkili daha ciddi semptomlar tarafından önceden gizlenen semptomlar dahil olmak üzere SMA'nın çeşitli semptomları sistemik verilişle tedavi edilebilir.

Belirli durumlarda, mevcut açıklamanın farmasötik bileşimlerinin sistemik verilişi, kas hücrelerinde artan SMN aktivitesiyle sonuçlanır. Belirli durumlarda, kas hücrelerindeki bu tip gelişmiş SMN aktivitesi terapötik fayda sağlar. Yalnızca kastaki gelişmiş SMN aktivitesinin, terapötik fayda sağlamak için yetersiz olduğu bildirilmiştir (e.g., Gravriline, et al., Hum Mol Genet 2008 17(8):1063-1075). Belirli durumlarda, mevcut açıklama, kasta gelişmiş SMN fonksiyonuyla sonuçlanan ve terapötik fayda sağlayan yöntemler sağlamaktadır. Belirli durumlarda, terapötik fayda, diğer hücrelerdeki (tek başına ya da kas hücreleriyle kombinasyon halinde) gelişmiş SMN fonksiyonuna atfedilebilir. Belirli durumlarda, yalnızca kastaki gelişmiş SMN fonksiyonu fayda sağlayabilir.

Belirli durumlarda, sistemik veriliş gelişmiş sağkalımla sonuçlanır.

6. Spinal Kas Atrofisi (SMA)

SMA, spinal motor nöronlarının dejenerasyonu ile karakterize bir genetik rahatsızlıktır. SMA'ya, SMN1 geninin her iki fonksiyonel kopyasının homozigot kaybı neden olur. Ancak, SMN2 geni, SMN1 ile aynı proteini kodlama potansiyeline sahiptir ve böylelikle SMA hastalarının genetik kusurunun üstesinden gelir. SMN2, ekson 7'nin +6 konumunda translasyonel olarak sessiz bir mutasyon (C→T) ihtiva eder ve bu da SMN2

transkriptlerinde ekson 7'nin etkisiz inklüzyonuyla sonuçlanır. Bu nedenle, SMN2'nin ekson 7'den yoksun olan baskın formu kararsız ve etkisizdir. Böylelikle, SMN2 uç birleştirmeyi, ekson 7 ihtiva eden SMN2 transkriptlerinin

5 yüzdesinin arttığı şekilde modüle edebilen terapötik bileşikler SMA'nın tedavisi için faydalı olacaktır.

Belirli durumlarda, mevcut açıklama, SMN2 kodlayan bir ön-mRNA'ya tamamlayıcı antisens bileşikler sağlar. Bu tip belirli

10 durumlarda, antisens bileşik SMN2'nin uç birleştirmesini değiştirir. SMN2'nin uç birleştirmesinin değiştirilmesi için faydalı belirli diziler ve bölgeler, WO 2007/002390 olarak yayınlanan PCT/US06/024469'da bulunabilir. Belirli durumlarda, burada tarif edilen herhangi bir motife sahip oligomerik

15 bileşikler, SMN2'nin intron 7'sine tamamlayıcı bir nükleobaz dizisine sahiptir. Bu tip belirli nükleobaz dizileri, aşağıdaki sınırlayıcı-olmayan tabloda örneklenmektedir.

Dizi	Uzunluk	SEQ ID
TGCTGGCAGACTTAC	15	3
CATAATGCTGGCAGA	15	4
TCATAATGCTGGCAG	15	5
TTCATAATGCTGGCA	15	6
TTTCATAATGCTGGC	15	2
ATTCACCTTTCATAATGCTGG	20	7
TCACCTTTCATAATGCTGG	18	1
CTTTCATAATGCTGG	15	8
TCATAATGCTGG	12	9
ACTTTCATAATGCTG	15	10
TTCATAATGCTG	12	11
CACTTTCATAATGCT	15	12

Dizi	Uzunluk	SEQ ID
TTTCATAATGCT	12	13
TCACCTTTCATAATGC	15	14
CTTTCATAATGC	12	15
TTCACCTTTCATAATG	15	16
ACTTTCATAATG	12	17
ATTCACTTTCATAAT	15	18
CACCTTTCATAAT	12	19
GATTCACCTTTCATAA	15	20
TCACCTTTCATAA	12	21
TTCACCTTTCATA	12	22
ATTCACTTTCAT	12	23
AGTAAGATTCACTTT	15	24

Mevcut açıklamanın antisens bileşikleri, bir insan gibi bir süjedeki SMN2 ekspresyonunu modüle etmek için kullanılabilir. Belirli durumlarda, süjenin spinal kas atrofisi vardır. Bu tip

5 belirli süjelerde, SMN1 geni yoktur ya da fonksiyonel SMN proteininin yeterli miktarlarını üretmekte başarısızdır. Belirli durumlarda, mevcut açıklamanın antisens bileşikleri SMN2'nin uç birleştirmesini etkili olarak modüle eder ve bu da SMN2 mRNA'daki ve nihayetinde ekson 7'ye karşılık gelen amino

10 asitler içeren SMN2 proteinindeki ekson 7 inklüzyonunda bir artışla sonuçlanır. Bu tip değişen SMN2 proteini doğal-tip SMN proteinine benzer. Mevcut açıklamanın, SMN2 mRNA'nın ekspresyonunu veya ekspresyonun protein ürünlerini etkili şekilde modüle eden antisens bileşikleri aktif antisens

15 bileşikler olarak değerlendirilmektedir.

SMN2'nin ekspresyonunun modülasyonu, hayvanın hücrelerini, dokusunu veya organını ihtiva edebilen ya da etmeyen bir vücut

sıvısında ölçülebilir. Analiz için vücut sıvıları (örneğin tükürük, serum, CSF), dokular (örneğin biyopsi) veya organlar gibi numunelerin alınmasının yöntemleri ve analize olanak sağlamak için numunelerin hazırlanmasının yöntemleri, teknikte uzman kişilerce iyi bilinmektedir. RNA ve protein seviyelerinin analizi için yöntemler yukarıda müzakere edilmiştir ve teknikte uzman kişilerce iyi bilinmektedir. Tedavinin etkileri, açıklamanın bir ya da daha fazla bileşiğiyle temas etmiş bir hayvandan alınan yukarıda belirtilmiş sıvılardaki, dokulardaki veya organlardaki hedef gen ekspresyonu ile ilişkili biyo-belirteçlerin, teknikte bilinen rutin klinik yöntemlerle ölçülmesiyle tayin edilebilir.

Vücut sıvılarının, organların veya dokuların, açıklamanın antisens bileşiklerinin ya da bileşimlerinin birinin ya da daha fazlasının etkili bir miktariyle temas ettiği yöntemler de düşünülmüştür. Vücut sıvıları, organlar veya dokular, vücut sıvılarının, organların veya dokuların hücrelerindeki SMN2 ekspresyonunun modülasyonu ile sonuçlanacak şekilde açıklamanın bileşiklerinin biri ya da daha fazlasıyla temas edebilir. Etkili bir miktar, antisens bileşiğin ya da bileşiklerin veya bileşimlerin hedef nükleik asitler veya bunların ürünleri üzerindeki modüle edici etkisinin, teknikte uzman kişi için rutin olan yöntemlerle izlenmesiyle belirlenebilir.

Açıklama ayrıca, burada tarif edilen şekilde yöntemlerin herhangi birinde kullanım için, burada tarif edildiği üzere bir antisens bileşik sağlar. Örneğin, açıklama, spinal kas atrofisi (SMA) gibi sağkalım motor nöron proteini (SMN) ile ilişkili bir hastalığın ya da durumun tedavisinde kullanım için, insan SMN2 kodlayan bir nükleik aside tamamlayıcı bir antisens oligonükleotid içeren bir antisens bileşik sağlar. Bir diğer örnek olarak, açıklama, sağkalım motor nöron proteini (SMN) ile ilişkili bir hastalığın ya da durumun

antisens bileşiğın doğrudan merkezi sinir sisteminin (CNS) veya CSF'nin içine verililişyle tedavisinde kullanım için, insan SMN2 kodlayan bir nükleik aside tamamlayıcı bir antisens oligonükleotid içeren bir antisens bileşik sağlar.

5

Açıklama ayrıca, burada tarif edilen şekildeki bir antisens bileşiğın, burada tarif edilen şekildeki yöntemlerin herhangi birinde kullanım için bir ilacın üretiminde kullanımını da sağlamaktadır. Örneğın, açıklama, insan SMN2 kodlayan bir nükleik aside tamamlayıcı bir antisens oligonükleotid içeren bir antisens bileşiğın, spinal kas atrofi (SMA) gibi sağkalım motor nöron proteini (SMN) ile ilişkili bir hastalığın ya da durumun tedavi edilmesi için bir ilacın üretiminde kullanımını sağlar. Bir diğerk örnek olarak, açıklama, insan SMN2 kodlayan bir nükleik aside tamamlayıcı bir antisens oligonükleotid içeren bir antisens bileşiğın, sağkalım motor nöron proteini (SMN) ile ilişkili bir hastalığın ya da durumun, ilacın doğrudan merkezi sinir sisteminin (CNS) ya da CSF'nin içine verililişyle tedavi edilmesi için bir ilacın üretiminde kullanımını sağlar.

20

Belirli durumlarda, burada tarif edilen herhangi bir motife sahip oligomerik bileşikler, SMN2'nin ekson 7'sine tamamlayıcı bir nükleobaz dizisine sahiptir.

25

Belirli durumlarda, burada tarif edilen herhangi bir motife sahip oligomerik bileşikler, SMN2'nin intron 6'sına tamamlayıcı bir nükleobaz dizisine sahiptir.

30

Belirli durumlarda, bir antisens bileşik, şu dizinin en az 10 nükleobazını içeren bir nükleobaz dizisine sahip bir antisens oligonükleotid içerk: TCACTTTCATAATGCTGG (SEQ ID NO: 1). Belirli durumlarda, bir antisens oligonükleotid, bu dizinin en az 11 nükleobazını içeren bir nükleobaz dizisine sahiptir.

35

Belirli durumlarda, bir antisens oligonükleotid, bu dizinin en

az 12 nükleobazını içeren bir nükleobaz dizisine sahiptir. Belirli durumlarda, bir antisens oligonükleotid, bu dizinin en az 13 nükleobazını içeren bir nükleobaz dizisine sahiptir. Belirli durumlarda, bir antisens oligonükleotid, bu dizinin en az 14 nükleobazını içeren bir nükleobaz dizisine sahiptir. Belirli durumlarda, bir antisens oligonükleotid, bu dizinin en az 15 nükleobazını içeren bir nükleobaz dizisine sahiptir. Belirli durumlarda, bir antisens oligonükleotid, bu dizinin en az 16 nükleobazını içeren bir nükleobaz dizisine sahiptir. Belirli durumlarda, bir antisens oligonükleotid, bu dizinin en az 17 nükleobazını içeren bir nükleobaz dizisine sahiptir. Belirli durumlarda, bir antisens oligonükleotid, bu dizinin nükleobazlarını içeren bir nükleobaz dizisine sahiptir. Belirli durumlarda, bir antisens oligonükleotid, bu dizinin nükleobazlarından oluşan bir nükleobaz dizisine sahiptir. Belirli durumlarda, bir antisens oligonükleotid 10-18 bağlı nükleositten oluşur ve şu dizinin bir eşit-boy kısmına %100 özdeş bir nükleobaz dizisine sahiptir: TCACTTTCATAATGCTGG (SEQ ID NO: 1).

20

7. Belirli Süjeler

Belirli durumlarda, bir süje SMA'nın bir ya da daha fazla endikatörüne sahiptir. Belirli durumlarda, süje, bir ya da daha fazla kasın azalmış elektriksel aktivitesine sahiptir. Belirli durumlarda, süje bir mutant SMN1 genine sahiptir. Belirli durumlarda, süjenin SMN1 geni yoktur ya da fonksiyonel SMN proteini üretemez. Belirli durumlarda, süjeye genetik bir testle tanı konur. Belirli durumlarda, süje kas biyopsisiyle tanımlanır. Belirli durumlarda, bir süje dik oturamaz. Belirli durumlarda, bir süje nefes alman ve/veya yemek yemek için yardıma ihtiyaç duyar. Belirli durumlarda, bir süje, kasın elektrofizyolojik ölçümüyle ve/veya kas biyopsisiyle tanımlanır.

35

Belirli durumlarda, süjenin tip I SMA'sı vardır. Belirli durumlarda, süjenin tip II SMA'sı vardır. Belirli durumlarda, süjenin tip III SMA'sı vardır. Belirli durumlarda, süje in utero SMA'sı var olarak tanı konur. Belirli durumlarda, süje 5 doğumdan sonra bir hafta içinde SMA'sı var olarak tanı konur. Belirli durumlarda, süje doğumun bir ayı içinde SMA'sı var olarak tanı konur. Belirli durumlarda, süje 3 aylıkken SMA'sı var olarak tanı konur. Belirli durumlarda, süje 6 aylıkken SMA'sı var olarak tanı konur. Belirli durumlarda, süje 10 süje 1 yaşındayken SMA'sı var olarak tanı konur. Belirli durumlarda, süje 1 ila 2 yaşındayken SMA'sı var olarak tanı konur. Belirli durumlarda, süje 1 ila 15 yaşındayken SMA'sı var olarak tanı konur. Belirli durumlarda, süje 15 yaşından büyükken SMA'sı var olarak tanı konur.

15

Belirli durumlarda, mevcut açıklamaya göre bir farmasötik bileşimin birinci dozu in utero verilir. Bu tip belirli durumlarda, birinci doz, kan-beyin-bariyerinin tam gelişiminden önce verilir. Belirli durumlarda, birinci doz 20 süjeye sistemik olarak in utero verilir. Belirli durumlarda, birinci doz kan-beyin-bariyerinin oluşumundan sonra in utero verilir. Belirli durumlarda, birinci doz CSF'ye verilir.

Belirli durumlarda, mevcut açıklamaya göre bir farmasötik 25 bileşimin birinci dozu, süje bir haftalıktan küçükken verilir. Belirli durumlarda, mevcut açıklamaya göre bir farmasötik bileşimin birinci dozu, süje bir aylıktan küçükken verilir. Belirli durumlarda, mevcut açıklamaya göre bir farmasötik bileşimin birinci dozu, süje 3 aylıktan küçükken verilir. 30 Belirli durumlarda, mevcut açıklamaya göre bir farmasötik bileşimin birinci dozu, süje 6 aylıktan küçükken verilir. Belirli durumlarda, mevcut açıklamaya göre bir farmasötik bileşimin birinci dozu, süje bir yaşından küçükken verilir. Belirli durumlarda, mevcut açıklamaya göre bir farmasötik 35 bileşimin birinci dozu, süje 2 yaşından küçükken verilir.

Belirli durumlarda, mevcut açıklamaya göre bir farmasötik bileşimin birinci dozu, süje 15 yaşından küçükken verilir. Belirli durumlarda, mevcut açıklamaya göre bir farmasötik bileşimin birinci dozu, süje 15 yaşından büyükken verilir.

5

8. Belirli Dozlar

Belirli durumlarda, mevcut açıklama doz miktarlarını ve sıklıklarını sağlamaktadır. Belirli durumlarda, farmasötik bileşimler bir bolus enjeksiyon olarak verilir. Bu tip belirli durumlarda, bolus enjeksiyonun dozu, süjenin vücut ağırlığının kilogramı başına 0,01 ila 25 miligram arasında antisens bileşiktir. Bu tip belirli durumlarda, bolus enjeksiyonun dozu, süjenin vücut ağırlığının kilogramı başına 0,01 ila 10 miligram arasında antisens bileşiktir. Belirli durumlarda, doz süjenin vücut ağırlığının kilogramı başına 0,05 ila 5 miligram arasında antisens bileşiktir. Belirli durumlarda, doz süjenin vücut ağırlığının kilogramı başına 0,1 ila 2 miligram arasında antisens bileşiktir. Belirli durumlarda, doz süjenin vücut ağırlığının kilogramı başına 0,5 ila 1 miligram arasında antisens bileşiktir. Belirli durumlarda, bu tip dozlar ayda iki kez verilir. Belirli durumlarda, bu tip dozlar her ay verilir. Belirli durumlarda, bu tip dozlar 2 ayda bir verilir. Belirli durumlarda bu tip dozlar, 6 ayda bir verilir. Belirli durumlarda, bu tip dozlar CSF'nin içine bolus enjeksiyonla verilir. Belirli durumlarda, bu tip dozlar intratekal bolus enjeksiyonla verilir. Belirli durumlarda, bu tip dozlar bolus sistemik enjeksiyonla (örneğin subkütan, intramusküler veya intravenöz enjeksiyon) verilir. Belirli durumlarda süjeler, CSF'ye bolus enjeksiyonlar ve bolus sistemik enjeksiyonlar alır. Bu tip durumlarda, CSF bolus ve sistemik bolusun dozları aynı ya da birbirinden farklı olabilir. Belirli durumlarda, CSF ve sistemik dozlar farklı sıklıklarda verilir. Belirli durumlarda, açıklama, en az bir bolus intratekal enjeksiyon ve en az bir bolus subkütan enjeksiyon içeren bir dozlama rejimi sağlamaktadır.

35

Belirli durumlarda, farmasötik bileşimler kesintisiz infüzyonla verilir. Bu tip kesintisiz infüzyon, farmasötik bileşimleri CSF'ye aktaran bir infüzyon pompasıyla
5 başarılılabılır. Belirli durumlarda, bu tip infüzyon pompası farmasötik bileşimi IT veya ICV aktarır. Bu tip belirli durumlarda, verilen doz, günde süjenin vücut ağırlığının kilogramı başına 0,05 ila 25 miligram arasında antisens bileşiktir. Belirli durumlarda, verilen doz, günde süjenin
10 vücut ağırlığının kilogramı başına 0,1 ila 10 miligram arasında antisens bileşiktir. Belirli durumlarda, verilen doz, günde süjenin vücut ağırlığının kilogramı başına 0,5 ila 10 miligram arasında antisens bileşiktir. Belirli durumlarda, verilen doz, günde süjenin vücut ağırlığının kilogramı başına
15 0,5 ila 5 miligram arasında antisens bileşiktir. Belirli durumlarda, verilen doz, günde süjenin vücut ağırlığının kilogramı başına 1 ila 5 miligram arasında antisens bileşiktir. Belirli durumlarda, açıklama, CNS'nin içine infüzyon ve en az bir bolus sistemik enjeksiyon içeren bir
20 dozlama rejimi sağlamaktadır. Belirli durumlarda, açıklama, CNS'nin içine infüzyon ve en az bir bolus subkütan enjeksiyon içeren bir dozlama rejimi sağlamaktadır. Belirli durumlarda, bolus ya da infüzyon olan doz, antisens bileşiğin CNS dokusunun gramı başına 0,1 ila 100 mikrogram arasında bir
25 konsantrasyonunu elde etmek ya da idame etmek için ayarlanır. Belirli durumlarda, bolus ya da infüzyon olan doz, antisens bileşiğin CNS dokusunun gramı başına 1 ila 10 mikrogram arasında bir konsantrasyonunu elde etmek ya da idame etmek için ayarlanır. Belirli durumlarda, bolus ya da infüzyon olan
30 doz, antisens bileşiğin CNS dokusunun gramı başına 0,1 ila 1 mikrogram arasında bir konsantrasyonunu elde etmek ya da idame etmek için ayarlanır.

Belirli durumlarda, bir süjenin dozlanması bir indükleme
35 evresine ve bir idame evresine bölünür. Bu tip belirli

durumlarda, indükleme evresi esnasında verilen doz, idame evresi esnasında verilen dozdan daha çoktur. Belirli durumlarda, indükleme evresi esnasında verilen doz, idame evresi esnasında verilen dozdan daha azdır. Belirli durumlarda, indükleme evresi bolus enjeksiyonla elde edilir ve idame evresi kesintisiz infüzyonla elde edilir.

Belirli durumlarda, açıklama, antisens bileşiklerin ya tek başına ya da CSF'nin içine aktarımla kombinasyon halinde sistemik verililişini sağlar. Belirli durumlarda, sistemik verililiş için doz, 0,1 mg/kg ila 200 mg/kg arasındadır. Belirli durumlarda, sistemik verililiş için doz, 0,1 mg/kg ila 100 mg/kg arasındadır. Belirli durumlarda, sistemik verililiş için doz, 0,5 mg/kg ila 100 mg/kg arasındadır. Belirli durumlarda, sistemik verililiş için doz, 1 mg/kg ila 100 mg/kg arasındadır. Belirli durumlarda, sistemik verililiş için doz, 1 mg/kg ila 50 mg/kg arasındadır. Belirli durumlarda, sistemik verililiş için doz, 1 mg/kg ila 25 mg/kg arasındadır. Belirli durumlarda, sistemik verililiş için doz, 0,1 mg/kg ila 25 mg/kg arasındadır. Belirli durumlarda, sistemik verililiş için doz, 0,1 mg/kg ila 10 mg/kg arasındadır. Belirli durumlarda, sistemik verililiş için doz, 1 mg/kg ila 10 mg/kg arasındadır. Belirli durumlarda, sistemik verililiş için doz, 1 mg/kg ila 5 mg/kg arasındadır. Hem sistemik hem CSF aktarımını içeren belirli durumlarda, bu iki yol için dozlar bağımsız olarak belirlenir.

a. Uygun İnsan Dozlarının Hesaplanması

Belirli durumlarda, süje bir insandır. Belirli durumlarda, bir insan dozu, burada tarif edilenler gibi hayvan deneylerinden gelen verilerden hesaplanır veya tahmin edilir. Belirli durumlarda, bir insan dozu, burada tarif edilenler gibi maymun ve/veya fare deneylerinden gelen verilerden hesaplanır veya tahmin edilir. Belirli durumlarda, bir insan dozu, burada tarif edilenler gibi fare deneylerinden gelen verilerden

hesaplanır veya tahmin edilir. Belirli durumlarda, uygun insan dozları, beyin ağırlığı ve/veya beyin-omurilik sıvısı (CSF) devir hızları bilgisiyle birlikte fareden elde edilen farmakokinetik veriler kullanılarak hesaplanabilir. Örneğin, fare beyin ağırlığı, vücut ağırlığının yaklaşık %2'si olarak yaklaşık 0,4 g'dır. İnsanlarda, ortalama beyin ağırlığı, vücut ağırlığının yaklaşık %2,5'i olan 1,5 kg'dır. Belirli durumlarda, CSF'nin içine verilmiş, beyin dokusunda tutulum ve müteakip metabolizma yoluyla bileşiğin bir kısmının ayrılmasıyla sonuçlanır. Ek olarak, CSF devir hızı, bileşiğin CSF'den kana ayrılmasını tahmin etmek için kullanılabilir. Fare CSF devir hızı yaklaşık günde 10-12 kezdir (0,325 µl/dakikada üretilen 0,04 mL). İnsan CSF devir hızı yaklaşık günde 4 kezdir (350-400 µl/dakikada üretilen 100-160 mL).

Klirens ve dolayısıyla dozlama gereklilikleri, beyin ağırlığı ayırma ölçeklemeye ve/veya CSF devir ölçeklemeye dayalı olabilir. Tahmin edilmiş insan CSF klirensi, insanlarda, farelerdeki yaklaşık dozlara eşdeğer dozları tahmin etmek için kullanılabilir. Bu şekilde, insan dozları, beyin ağırlığına ve CSF devir hızlarına dayalı doku metabolizmasındaki farkları hesaba katarak tahmin edilebilir. Hesaplamanın ve tahmin etmenin bu tip yöntemleri teknikte uzman kişilerce bilinmektedir.

Sınırlayıcı-olmayan örnek yoluyla, belirli durumlarda, bir eşdeğer insan dozu istenen bir fareden mg/kg fare dozunun, belirlenen klirens ve belirli bir bileşiğin ayrılmasına bağlı olarak yaklaşık 0,25 ila yaklaşık 1,25 arasında değişen bir faktörle çarpılmasıyla tahmin edilebilir. Böylelikle, örneğin, belirli durumlarda, 20 gramlık bir fare için 0,01 mg'lık bir dozuna eşdeğer bir insan dozu, 70 kiloluk bir insan için yaklaşık 8,75 mg ila yaklaşık 43,75 mg toplam doz arasında değişecektir. Benzer şekilde, belirli durumlarda, 4 gramlık bir yenidoğan fare için 0,01 mg'lık bir doza eşdeğer bir insan dozu, 3 kiloluk bir yenidoğan insan için yaklaşık 1,9 mg ila

yaklaşık 9,4 mg toplam doz arasında değişecektir. Bu örnek dozlar yalnızca, teknikte uzman bir kişinin uygun bir insan dozunu nasıl belirleyebileceğini örneklemek içindir ve mevcut açıklamayı sınırlama amacıyla değildir.

5

Belirli durumlarda, (tek başına veya CSF aktarımıyla kombinasyon halinde olsun ya da olmasın) sistemik aktarım için bir insan dozu, burada tarif edilenler gibi hayvan deneylerinden gelen verilerden hesaplanır veya tahmin edilir.

10

Tipik olarak, sistemik doz için uygun bir insan dozu (mg/kg olarak, hayvanlardaki etkili bir dozun 0,1 ila 10 kat arasındadır. Böylelikle, yalnızca örnek amacıyla, 2 gramlık bir yenidoğan fare için 50µg'lık bir subkütan doz, 25mg/kg'lık bir dozdur. Bir insan için karşılık gelen dozun, 2,5mg/kg ila

15

250mg/kg arasında olduğu öngörülmektedir. 3 kiloluk bir bebek için, karşılık gelen doz 7,5 mg ila 750 mg arasındadır. 25 kiloluk bir çocuk için, karşılık gelen doz 62,5 mg ila 6250 mg arasındadır.

20

9. Tedavi Rejimleri

Belirli durumlarda, yukarıdaki doz miktarları, doz sıklıkları, veriliş yolları, indükleme ve idame evreleri ve birinci dozun zamanlaması, SMA'sı olan süjeler için dozlama rejimlerinin

25

sağlanması amacıyla birleştirilir. Bu tip dozlama rejimleri, SMA'nın bir ya da daha fazla semptomunun iyileştirilmesini sağlamak ve/veya farmasötik bileşimin verilişine atfedilebilen toksisitenin veya yan etkilerin indirgenmesi ya da önlenmesi için seçilebilir ve ayarlanabilir. Belirli durumlarda, süjeler

30

in utero veya yenidoğandır. Bu tip durumlarda, farmasötik bileşimlerin, özellikle kesintisiz infüzyonla verilişi, belirli zorluklar arz eder. Dolayısıyla, belirli durumlarda, mevcut açıklama, süje rahimdeyken yada çok genç olduğunda bolus verilişle, ardından süje daha büyük olduğunda ve bu tip

35

bir pompanın yerleştirilmesi daha pratik olduğunda bir

implante infüzyon pompası vasıtasıyla kesintisiz infüzyonla verilmesini sağlar. Ayrıca, belirli durumlarda, bir süje büyüdükçe, aynı veya benzer doz:vücut-ağırlı oranının elde edilmesi için mutlak doz arttırılır. Aşağıdaki tablonun amacı 5 tedavi rejimlerini örneklemektir ve tedavilerin, teknikte uzman bir kişi tarafından kolaylıkla başarılabilecek olası kombinasyonları sınırlama amacıyla değildir.

<u>Dozlama periyodu</u>	<u>Birinci</u>	<u>İkinci</u>	<u>Üçüncü</u>	<u>Dördüncü</u>	<u>Beşinci</u>
Rejim 1				ü	
<u>Süje Yaşı</u>	İn utero, kan-beyin-bariyeri nin oluşumu öncesinde	İn utero, > 1 kan-beyin-bariyeri n oluşumu sonrasında	> 1 hafta bariyerini oluşumu	6 ay	1,5 yıl
<u>Doz Miktarı</u>	50 µg	50 µg	100 µg	10 µg/gün	50 µg/gün
<u>Sıklık</u>	Tek veriliş	Tek veriliş	Aylık	Kesinti siz	Kesintisiz
<u>Veriliş Yolu</u>	Sistemik enjeksiyon	IT enjeksiyon	IT enjeksiyonları	IT infüzyonu	IT infüzyonu
<u>Süre</u>	N/A	N/A	6 ay	1 yıl	Sürüyor
Rejim 2					
<u>Süje Yaşı</u>	İn utero, kan-	> 1 hafta	6 ay	1,5 yıl	N/A

<u>Dozlama</u> <u>periyodu</u>	<u>Birinci</u>	<u>İkinci</u>	<u>Üçüncü</u>	<u>Dördüncü</u>	<u>Beşinci</u>
-----------------------------------	----------------	---------------	---------------	-----------------	----------------

Rejim 1

beyin-
bariyeri
nin
oluşumu
sonrasın
da

<u>Doz</u> <u>Miktarı</u>	50 µg	100 µg	5 mg/gün	10 mg/gün	N/A
------------------------------	-------	--------	----------	-----------	-----

<u>Sıklık</u>	Tek veriliş	Aylık	Kesintisiz	Kesinti siz	N/A
---------------	----------------	-------	------------	----------------	-----

<u>Veriliş</u> <u>Yolu</u>	ICV enjeksiy on	ICV enjeksiyon	ICV infüzyon u	ICV infüzyo nu	N/A
-------------------------------	-----------------------	-------------------	----------------------	----------------------	-----

<u>Süre</u>	N/A	6 ay	1 yıl	Sürüyor	N/A
-------------	-----	------	-------	---------	-----

Rejim 3

<u>Süje Yaşı</u>	> 1 hafta	6 ay	1,5 yıl	2,5 yıl*
------------------	--------------	------	---------	----------

<u>Doz</u> <u>Miktarı</u>	100 µg	500 µg/gün	20 mg/gün	20 mg/gün	100 mg
------------------------------	--------	------------	-----------	-----------	--------

<u>Sıklık</u>	2xAylık	Kesintisiz	Kesintisiz	Kesintisiz	2xAylık
---------------	---------	------------	------------	------------	---------

<u>Veriliş</u> <u>Yolu</u>	ICV enjeksiy on	ICV infüzyonu	ICV infüzyon u	ICV infüzyon u	IP
-------------------------------	-----------------------	------------------	----------------------	----------------------	----

<u>Süre</u>	6 ay	1 yıl	1 yıl	Sürüyor	Sürüyor
-------------	------	-------	-------	---------	---------

* Not: rejim 3'teki 4. dozlama periyodu, periyodik sistemik verilişle birleştirilmiş kesintisiz CSF infüzyonunu örneklemektedir. Bu tedavi rejimlerinin amacı

<u>Dozlama</u>	<u>Birinci</u>	<u>İkinci</u>	<u>Üçüncü</u>	<u>Dördüncü</u>	<u>Beşinci</u>
<u>periyodu</u>				<u>ü</u>	

Rejim 1

örnek oluşturmak ve mevcut açıklamayı sınırlamamaktır.

Belirli durumlarda, dozlama rejimi, ya tek başına ya da CSF'nin içine verilisle kombinasyon halinde bir sistemik verilis içerir (örneğin, yukarıdaki rejim 3). Aşağıdaki tablo

5 bu tip rejimleri örneklemektedir.

Sistemik verilis			CSF verilisi		
Doz	Yol	Sıklık	Doz	Yol	Sıklık
1-5 mg/kg	subkütan	haftalık	5-10 mg/kg	bolus IT	aylık
1-5 mg/kg	subkütan	aylık	1-5 mg/kg	bolus ICV	2 ay
10-50 mg/kg	subkütan	aylık	0,5-1 mg/kg	bolus IT	6 ay
0,5- 25 mg/kg	subkütan	aylık	10 mg/kg/gün	IT infüzyonu	her 6 ayda bir 7 gün süreyle kesintisiz
0,1- 10 mg/kg	subkütan	aylık	yok		
yok			0,5-1 mg/kg	bolus IT	6 ay

Bu tedavi rejimlerinin amacı örnek vermektir ve mevcut açıklamayı sınırlamak değildir. Teknikte uzman bir kişi, dozların ve aktarımların uygun bir kombinasyonunu, mevcut

10

genel sağlığı ve yaşı gibi çeşitli faktörlere dayalı olarak seçebilecektir.

10. Eş-veriliş

5

Belirli durumlarda, mevcut açıklamanın farmasötik bileşimleri, SMA'nın tedavisi için ve/veya SMA ile ilişkili bir ya da daha fazla semptomun tedavisi için en az bir diğerk farmasötik bileşimle eş-verilir. Belirli durumlarda, bu tip diğerk farmasötik bileşim trikostatın-A'dan, valproik asitten, riluzolden, hidroksiüreden bir bütirat ya da bütirat türevinden seçilir. Belirli durumlarda, mevcut açıklamanın farmasötik bileşimleri trikostatın A ile eş-verilir. Belirli durumlarda, mevcut açıklamanın farmasötik bileşimleri, örneğın

10 Thurmond, et al., J. Med Chem. 2008, 51, 449-469'da tarif edildiğı üzere, kuinazolinin bir türeviyle eş-verilir. Belirli durumlarda, mevcut açıklamanın bir farmasötik bileşimi ve en az bir diğerk farmasötik bileşim aynı zamanda eş-verilir. Belirli durumlarda, mevcut açıklamanın bir farmasötik bileşimi

15 ve en az bir diğerk farmasötik bileşim farklı zamanlarda eş-verilir.

20

Belirli durumlarda, mevcut açıklamanın farmasötik bileşimleri bir gen terapisi ajanıyla eş-verilir. Bu tip belirli

25 durumlarda, gen terapisi ajanı CSF'ye verilir ve mevcut açıklamanın farmasötik bileşimi sistemik olarak verilir. Bu tip belirli durumlarda, gen terapisi ajanı CSF'ye verilir ve mevcut açıklamanın farmasötik bileşimi CSF'ye ve sistemik olarak verilir. Belirli durumlarda, mevcut açıklamanın bir

30 farmasötik bileşimi ve bir gen terapisi ajanı aynı zamanda eş-verilir. Belirli durumlarda, mevcut açıklamanın bir farmasötik bileşimi ve bir gen terapisi ajanı farklı zamanlarda eş-verilir. SMA tedavisine belirli gen terapisi yaklaşımları bildirilmiştir (örn., Coady et al., PLoS ONE 2008 3(10): e3468;

35 Passini et al., J Clin Invest 2010 Apr 1, 120(4): 1253-64).

Belirli durumlarda, mevcut açıklamanın farmasötik bileşimleri, SMA için en az bir diğer terapiyle eş-verilir. Belirli durumlarda, SMA için bu tip diğer terapi ameliyattır. Belirli durumlarda, bu tip diğer terapi, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, nefes almak için gerekli kasları güçlendirmek için tasarlanan egzersizler dahil olmak üzere, öksürük terapisi gibi fiziksel terapidir. Belirli durumlarda, diğer terapi, bir besleme sondası veya destekli nefes alma için cihaz gibi fiziksel bir müdahaledir.

Belirli durumlarda, mevcut açıklamanın farmasötik bileşimleri, mevcut açıklamanın farmasötik bileşimlerinin istenmeyen bir yan-etkisini indirgeyen bir ya da daha fazla diğer farmasötik bileşimle eş-verilir.

11. Fenotipik Etkiler

Belirli durumlarda, mevcut açıklamanın en az bir farmasötik bileşiminin verilişi, süjede bir fenotip değişiklikle sonuçlanır. Belirli durumlarda, bu tip fenotipik etkilere, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, ekson 7 içeren SMN mRNA'nın mutlak miktarında artış; ekson 7 içeren SMN mRNA'nın ekson 7'den yoksun SMN mRNA'ya oranında artış; ekson 7 içeren SMN proteininin mutlak miktarında artış; ekson 7 içeren SMN proteininin ekson 7'den yoksun SMN proteinine oranında artış; iyileşen kas kuvveti, en az bir kasta iyileşen elektriksel aktivite; iyileşen soluma; kilo alma ve sağkalım dahildir. Belirli durumlarda, en az bir fenotip değişiklik süjenin bir motonöronunda saptanır. Belirli durumlarda, mevcut buluşun en az bir farmasötik bileşiminin verilişi, bir süjenin dik oturabilmesiyle, ayağa kalkabilmesiyle ve/veya yürüyebilmesiyle sonuçlanır. Belirli durumlarda, mevcut açıklamanın en az bir farmasötik bileşiminin verilişi, süjenin yemek yiyebilmesiyle, içebilmesiyle ve/veya yardım olmadan

nefes alabilmesiyle sonuçlanır. Belirli durumlarda, tedavinin etkililiği, kasın elektrofizyolojik değerlendirilmesiyle tayin edilir. Belirli durumlarda, mevcut açıklamanın en az bir farmasötik bileşiminin verilmesi SMA'nın en az bir semptomunu iyileştirir ve çok az ya da sıfır enflamatuar etkiye sahiptir. Bu tip belirli uygulamalarda, enflamatuar etkinin yokluğu, tedavi üzerine Aifl seviyelerinde kayda değer artışın yokluğuyla belirlenir.

- 10 Belirli durumlarda, mevcut açıklamanın en az bir farmasötik bileşiminin verilmesi, SMA'nın en az bir semptomunun başlamasını geciktirir. Belirli durumlarda, mevcut açıklamanın en az bir farmasötik bileşiminin verilmesi, SMA'nın en az bir semptomunun ilerleyişini yavaşlatır. Belirli durumlarda, 15 mevcut açıklamanın en az bir farmasötik bileşiminin verilmesi, SMA'nın en az bir semptomunun ciddiyetini indirir.

Belirli durumlarda, mevcut açıklamanın en az bir farmasötik bileşiminin verilmesi, istenmeyen bir yan-etkiyle sonuçlanır.

- 20 Belirli durumlarda, istenmeyen yan-etkileri önlerken semptomların arzu edilen iyileşmesiyle sonuçlanan bir tedavi rejimi tanımlanır.

12. Dozaj üniteleri

25

Belirli durumlarda, mevcut açıklamanın farmasötik bileşimleri, verilmesi için dozaj üniteleri olarak hazırlanır. Bu tip belirli dozaj üniteleri, 0,01 mg ila 100mg arasından seçilir. Bu tip belirli durumlarda, mevcut açıklamanın farmasötik bir bileşimi, 0,01 mg, 0,1 mg, 0,5 mg, 1 mg, 5 mg, 10 mg, 20 mg, 25 mg, 50 mg, 75 mg, 100 mg, 150 mg ve 200 mg'dan seçilen bir antisens bileşik dozu içerir. Belirli durumlarda, farmasötik bir bileşim, 0,1 mg, 0.5 mg, 1 mg, 5 mg, 10 mg, 25 mg ve 50 mg'dan seçilen bir oligonükleotid dozu içerir.

35

13. Kitler

Belirli durumlarda, mevcut açıklama en az bir farmasötik bileşim içeren kitler sağlamaktadır. Belirli durumlarda, bu tip kitler ayrıca bir aktarım aracı, örneğin bir şırınga veya infüzyon pompası içerir.

Sınırlayıcı olmayan açıklama

- 10 Burada tarif edilen belirli bileşikler, bileşimler ve yöntemler belirli durumlara göre spesifik olarak tarif edilmiş olsa da, aşağıdaki örnekler yalnızca burada tarif edilen bileşikleri örnekleme görevi görmektedir ve bunları sınırlama
- 15 listesi her diziyi gerektiği şekilde ya "RNA" ya da "DNA" olarak tanımlasa da, gerçekte, bu diziler, kimyasal modifikasyonların herhangi bir kombinasyonuyla modifiye edilebilir. Teknikte uzman bir kişi, modifiye oligonükleotidlerin tarif edilmesi için "RNA" veya "DNA"
- 20 şeklindeki bu tip göstermenin rastgele seçilmiş olduğunu kolayca anlayacaktır. Örneğin, bir 2'-OH şeker bölütü ve bir timin bazı içeren bir nükleosit içeren bir oligonükleotid, modifiye bir şekere (DNA'nın doğal 2'-H'si için 2'-OH) sahip bir DNA veya modifiye bir baza (RNA'nın doğal urasili için
- 25 timin (metilatlı urasil)) sahip bir RNA olarak tarif edilebilir.

- Dolayısıyla, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla dizi listesindekiler dahil olmak üzere, burada sağlanan nükleik asit dizileri, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla modifiye nükleobazlara sahip nükleik asitler dahil olmak üzere doğal veya modifiye RNA ve/veya DNA'nın herhangi bir kombinasyonunu
- 30 ihtiva eden nükleik asitleri kapsama amacındadır. Diğer örnek yoluyla ve sınırlama olmadan, "ATCGATCG" nükleobaz dizisine
- 35 sahip bir oligomerik bileşik, modifiye ya da modifiye

edilmemiş olsun ya da olmasın, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, "AUCGAUCG" dizisine sahip olanlar ve bazı DNA bazlarına sahip olanlar ve "AUCGATCG" gibi bazı RNA bazları ve ^{me}C'nin 5-konumunda bir metil grubu içeren bir sitozin bazını gösterdiği "AT^{me}CGAUCG" gibi bazı RNA bazları içerenler gibi RNA bazları içeren bu tip bileşikler dahil olmak üzere bu tip nükleobaz dizisine sahip herhangi bir oligomerik bileşiği kapsar.

10 Örnek 1 - SMN2'yi hedefleyen antisens bileşikleri

Aşağıdaki oligonükleotidler, önceden bildirilen standart teknikler kullanılarak sentezlendi.

Referans #	Dizi	Boy	Kimya	SEQ ID
ISIS396443	TCACTTTCATAATGCTGG	18	Tam 2'-MOE; tam PS	1
ISIS396449	TTTCATAATGCTGGC	15	Tam 2'-MOE; tam PS	2

PS = fosforotioat nükleosit arası bağlantılar

15 Örnek 2 - Smn-/- SMN Transjenik Fareler

Yukarıda tarif edildiği şekilde antisens bileşikler kullanılarak terapötik etkililik ve güvenlik uygun bir hayvan modelinde test edilebilir. Örneğin, insan hastalığına en benzer görünen hayvan modellerine ya kendiliğinden belirli hastalığın yüksek bir insidansını geliştiren ya da bunu yapmak için indüklenmiş olan hayvan türleri dahildir.

Özellikle, SMA için hayvan modelleri bilinmektedir. Yukarıda açıklandığı üzere, bir otozomal çekinik nöromusküler rahatsızlık olan SMA'nın moleküler tabanı, sağkalım motor geni

1'in (SMN1) benzer genli kaybıdır. SMN2 adlı, SMN1 geninin neredeyse özdeş bir kopyası insanlarda bulunur ve hastalık ciddiyetini modüle eder. İnsanların aksine, fareler SMN1'e eşdeğer tek bir gene (Smn) sahiptir. Bu genin benzer genli kaybı embriyolar için ölümcüldür ve Smn gen ürününün hücresel sağkalım ve fonksiyonu için gerekli olduğunu gösterir şekilde büyük çapta hücre ölümüyle sonuçlanır. SMN2'nin 2 kopyasının SMN'den yoksun farelere eklenmesi, SMA fenotipine sahip farelerle sonuçlanacak şekilde embriyonik ölümcüllüğü kurtarır (Monani et al., Hum. Mol. Genet. (2000) 9:333-339). SMN2'nin yüksek bir kopya sayısı fareleri kurtarır çünkü yeterli SMN proteini motor nöronlarında üretilir. Bakınız, ayrıca, insan SMN2'sini eksprese eden transjenik fare çizgilerinin üretimini bildiren Hsieh-Li, et al., Nat. Genet. (2000) 24:66-70. Özellikle, Smn-/- arka planında SMN2 barındıran transjenik fareler omurilikte ve iskelet kaslarında, SMA hastalarınıninkine benzer patolojik değişiklikler göstermiştir. Bu farelerdeki patolojik değişikliklerin ciddiyeti, ekson 7 tarafından kodlanan bölgeyi ihtiva etmiş olan SMN proteininin miktarıyla ilişkili olmuştur. Smn'nin bir kopyasından yoksun farklı genli fareler Smn +/- olarak ifade edilir ve SMA'nın daha az ciddi biçimi olan tip III için bir modeldir.

SMA fenotipinin ciddiyeti, farelerdeki insan SMN2'nin kopyalarının sayısının bir fonksiyonudur. "Tayvan" suşu insan SMN2'sinin 4 kopyasına sahiptir ve bu da Tip I veya Tip II'ye benzer şekilde ortaya ciddi arası SMA fenotipine sahip farelerle sonuçlanır.

Delta-7 fareleri de (Smn^{-/-}, hSMN2^{+/+}, SMNΔ7^{+/+}) fare Smn'sinden yoksundur ve insan SMN2'si eksprese eder. Delta 7 fareleri daha ciddi bir fenotipe sahiptir ve doğumdan kısa süre sonra, tipik olarak doğumdan yaklaşık 15-20 gün sonra ölürlür.

Örnek 3 - Smn -/- SMN2'de (Tayvan Suşu) Antisens bileşiklerin in vivo Sistemik Verilişi

Tayvan fareleri intraperitoneal enjeksiyon yoluyla, salinle veya 35 mg/kg ISIS396443 ile ya da uyumsuz bir antisens oligonükleotid kontrolüyle 5 gün süreyle her gün bir kez tedavi edildi ve 2 gün sonra 7. günde öldürüldü. Karaciğer ve böbrek alındı ve RNA standart teknikler kullanılarak izole edildi. Ekson 7'li veya ekson 7'siz SMN2 RT-PCR ile görselleştirildi. ISIS396443 ile veriliş, böbrekten ve karaciğerden SMN2'de, salinle ve uyumsuz kontrolle tedavi edilen hayvanlara kıyasla ekson 7 inklüzyonunda önemli bir artışla sonuçlandı.

Örnek 4 - Smn -/- SMN2'de (Tayvan Suşu) Antisens bileşiklerin in vivo İntraserebroventriküler (ICV) Verilişi

Tayvan farelerine ICV yoluyla ya salin ya da 150 µg ISIS396443, 7 gün süreyle her gün enjekte edildi. Fareler 8. günde öldürüldü ve beyin ve omurilikten RNA ekstrakte edildi. RT-PCR analizi, ISIS396443 ile tedavi edilen hayvanlardan elde edilen beyin ve omurilik numunelerindeki SMN2'deki ekson 7 inklüzyonunda önemli artış gösterdi. Bu sonuçlar, SMN hedefleyen antisens oligonükleotidle ICV tedavisinin SMA durumunu kurtarabildiğini çünkü ekson 7'nin inklüzyonunun SMA fenotipiyle ilişkili olduğunu göstermiştir.

Doz-Yanıtı

Tayvan farelerine ICV yoluyla ya salin ya da 10, 50, 100 veya 150 µg ISIS396443, 7 gün süreyle her gün enjekte edildi (her bir tedavi grubunda 5 fare) ve 8. günde öldürüldü. RNA izole edildi ve RT-PCR ile analiz edildi. 10 µg tedavi grubu orta ekson 7 inklüzyonu gösterdi. 50 µg, 100 µg ve 150 µg gruplarının tamamı önemli ekson 7 inklüzyonu gösterdi.

Yanıt Süresi

Etki süresinin belirlenmesi için, 24 fareye ICV yoluyla 50 µg ISIS396443, 7 gün süreyle her gün enjekte edildi. Dört fare son doz zamanında (0 zaman) öldürüldü ve dört farenin her biri son dozdan sonra 1. haftada, 2. haftada, 4. haftada ve 8. haftada öldürüldü. Tedavi edilen farelerin tamamı, Şekil 1'de gösterildiği üzere, 8. haftada diğer gruplarla hiç fark göstermeme etkisiyle RT-PCR ile önemli ekson 7 inklüzyonu gösterdi.

Bu sonuçlar ISIS396443'ün 7 gün süreyle günde 50 µg ICV verililişinin, tedavinin ardından en az 8 hafta süreyle etkili olduğunu göstermektedir.

Deney daha uzun zaman noktalarını test etmek için tekrarlandı. Tip III fareler 7 gün süreyle 50 µg/gün olan ISIS396443'ün ICV infüzyonuyla muamele edildi. Fareler 7 günlük infüzyon periyodunun bitiminden sonraki 0, 0,5, 1, 2, 4, ve 6 aylarda öldürüldü. RNA omuriliklerden toplandı ve northern lekelemeyle analiz edildi. Grafikte gösterildiği üzere, ISIS396443 infüzyonunun etkisi, Şekil 2'de gösterildiği üzere infüzyondan sonra 6 ay devam etti. Bu uzun etki süresi birçok olası açıklamaya sahiptir. ISIS396443'ün kararlılığını, düzeltilen SMN proteininin kararlılığını ve/veya doz metabolizmaya bileşik kaybından sonra bile yeterince yüksek olduğunu, kalan dozun fayda sağlamaya devam ettiğini yansıtabilir. Böylelikle, bu veriler daha düşük dozların yanı sıra seyrek dozların verililişini destekleyebilir.

Örnek 5 - Antisens Bileşiklerin Kesintisiz İntraserebroventriküler (ICV) İnfüzyonla Verilişi

Bir mikro-ozmotik pompa (Azlet Osmotic Pumps, Cupertino, CA, ABD) kullanılarak ISIS396443 beyin-omurilik sıvısının (CSF) içine, bir insan SMN2 transgenine sahip yetişkin tip-III

Smn+/- veya Smn-/- SMA farelerinde (Tayvan suşu) sağ yanal karıncık yoluyla verildi. Doz-yanıtı çalışmaları, ISIS396443'ün intraserebroventriküler (ICV) infüzyonunun, omurilikte SMN2 ekson 7 inklüzyonunu, salinle-tedavili farelerdeki ~%10'a kıyasla ~%90 arttırdığını ortaya çıkardı. Western lekeleme ve immünohistokimyasal analizler, omurilik motor nöronlarındaki insan transjenik SMN protein seviyelerinin sağlam bir artışını ortaya koydu. Bu sonuçlar, antisens oligonükleotid ISIS396443'in CNS infüzyonunun SMA durumunu kurtarabildiğini çünkü ekson 7 inklüzyonunun SMA fenotipiyle ilişkili olduğunu göstermektedir.

Örnek 6 - Embriyonik Veriliş

Ya 20 µg ya da 10 µg ISIS396443'ün bir tekli ICV enjeksiyonu, gebeliğin 15. gününde (E15) embriyonik Tayvan farelerine verildi. Hayvanlar doğumdan sonraki 7. günde (P7) öldürüldü. RNA lomber omurilikten izole edildi ve RT-PCR ile analiz edildi. ISIS 396443'ün tekli embriyonik verilişi önemli ekson 7 inklüzyonuyla sonuçlandı. Bu sonuçlar, antisens oligonükleotid ISIS396443'ün in utero tedavisinin SMA durumunu kurtarabildiğini çünkü ekson 7 inklüzyonunun SMA fenotipiyle ilişkili olduğunu göstermektedir.

Yukarıdaki deney tekrarlandı ve hayvanlar 11. haftada öldürüldü. Tedavi edilmemiş Tayvan fareleri, zamanla kısalan nekrotik kuyruklar geliştirdi. 20 µg ISIS396443'ün tekli embriyonik enjeksiyonu, Şekil 3A'da gösterildiği üzere kuyruk bozulmasının başlamasını kayda değer şekilde geciktirdi. Bu sonuçlar, SMN'yi hedefleyen antisens oligonükleotidle embriyonik tedavinin SMA'nın başlamasını geciktirdiğini göstermektedir.

Bu sonuçlar, test edilen dozların 20 µg ve 10 µg ISIS396443 olması ve çalışmanın kıyaslama için normal fareleri içermesi dışında aynı koşullar kullanılarak bir başka çalışmada onaylandı. Bu deneyden alınan sonuçlar Şekil 3B'de gösterilmektedir.

Örnek 7 - Delta-7 fare modelinde in vivo veriliş

Heterozigot (SMN^{+/-}, hSMN2^{+/+}, SMNΔ7^{+/+}) damızlık çiftleri eşleştirildi ve doğum gününde (P0), yenidoğan yavrulara ISIS396443 (18-mer, SEQ ID NO. 1), ISIS396449 (15-mer, SEQ ID NO. 2), ISIS387954 (20-mer, SEQ ID NO.7) veya karıştırılmış bir kontrol ASO (ISIS439273; 18-mer) ile muamele edildi. Farelere iki taraflı olarak serebral yanıl karıncıkların içine toplam 8 µg'lık (her bir yanıl karıncıkta 4 µg) bir doz enjekte edildi. Enjeksiyonların tamamı, tarif edildiği şekilde (Passini et al, J. Virol. (2001) 75:12382-12392) ince çekilmiş bir cam mikropipet iğneyle gerçekleştirildi. Enjeksiyonları takiben, SMA (SMN^{-/-}, hSMN2^{+/+}, SMNΔ7^{+/+}), heterozigos ve doğal tip (SMN^{+/+}, hSMN2^{+/+}, SMNΔ7^{+/+}) farelerin tanımlanması için yavruların ayak parmakları kesildi ve genotiplendi (Le et al., Hum. Mol. Genet. (2005) 14:845-857). Tüm yavrular, sağkalımda yavru boyunu kontrol etmek için 7 yavruya ayrıldı. Yavruların bazılarına, tedavi edilmemiş kontrol grupları oluşturmak amacıyla enjeksiyon yapılmadı.

18-mer'in geniş çaplı dağılımı, omuriliğin torasik, lomber ve servikal bölgeleri dahil olmak üzere omurilikte, SMA farelerinde enjeksiyondan-sonra 14. günde saptandı. Dahası, ChAT ile eş-lokalizasyon çalışmaları, omurilikte ISIS396443 tarafından hedeflenen hücrelerin büyük çoğunluğunun motor nöronlar olduğunu onayladı. Kontrol, tedavi edilmemiş farelerde hiç sinyal saptanmadı.

14. gündeki Western lekeleme analizi, beyindeki ve omurilikteki SMN miktarının, tedavi edilmemiş SMA kontrollerindeki %10'a kıyasla %40-60 doğal tip seviyelerinde olduğunu gösterdi. ASO'nun karıştırılmış bir versiyonuyla tedavi edilen kontrol farelerinde, arka planın üzerinde hiç sinyal saptanmadı. Western lekelerin sonuçları Şekil 4'te sunulmaktadır.

SMA ASO'lar tedavi edilen SMA fareleri ayrıca, ASO'nun uzunluğuna bakılmaksızın, ağırlıkta, gezinme fonksiyonunda (doğrulma refleksi ve kavrama kuvveti) ve koordinasyonda (arka bacak ayrılma), tedavi edilmemiş SMA farelerine veya karıştırılmış bir ASO ile tedavi edilmiş SMA farelerine kıyasla kayda değer bir artış sergiledi. Tedavi edilmemiş SMA farelerine kıyasla karıştırılmış bir ASO ile tedavi edilen SMA farelerinde, vücut ağırlığında, gezinme fonksiyonunda (doğrulma refleksi ve kavrama kuvveti) veya koordinasyonda kayda değer bir artış gözlemlenmedi. Sonuçlar Şekiller 5 ve 6'ta sunulmaktadır.

Önemli şekilde, ASO'nun boyuna bakılmaksızın ASO'larla tedavi edilen SMA fareleri, Şekil 7'de gösterildiği üzere medyan sağkalımda kayda değer bir artış gösterdi. Sağkalım, tedavi edilmemiş SMA kontrollerindeki 16,0 güne kıyasla doğumdan 31,5 (15-mer), 27,0 (18-mer) ve 28,0 (20-mer) gün oldu. Bunun aksine, bir 18-mer karıştırılmış kontrol ile tedavi edilen SMA farelerinde sağkalım iyileşmedi. Bu sonuçlar, SMN tedavisini hedefleyen antisens oligonükleotidle tedavinin SMA etkili süjelerde yaşam süresini arttırdığını ortaya koymaktadır.

SMA ASO'lar ayrıca, Şekil 8'de gösterildiği üzere omurilikteki motor nöron hücre sayımlarını arttırdı.

SMN RNA, RT-PCR ile ölçüldü. SMA ASO'larla tedavi edilen hayvanlar, tedavi edilmemiş SMA farelerine kıyasla artan SMN

RNA seviyelerine sahip oldu. Tedavi edilmemiş SMA farelerine kıyasla 20-mer ASO ile tedavi edilen farelerden alınan sonuçlar Şekil 9'da gösterilmektedir.

- 5 Sağkalımın bir ikinci dozun verilmesiyle daha da arttırılıp arttırılamayacağını belirlemek için, yukarıdaki deney, 21. günde 20 µg'lık ilave bir dozla tekrarlandı. Sonuçları Şekil 10'da gösterilmektedir. Grafik, 0. günde 8 µg'lık birinci dozun etkisini göstermektedir. P21. günde, tedavi edilen
10 farelerin yarısına bir ikinci tedavi verildi.

- Yalnızca birinci tedaviyi alan farelere kıyasla ikinci tedavinin etkisi Şekil 11'de gösterilmektedir. Bu sonuçlar, antisens oligonükleotidle bir ikinci ICV tedavisinin sağkalımı
15 daha da arttırdığını göstermektedir.

Örnek 8 - SMA tip III farelerde Aktivite

- İki antisens bileşik ve bir kontrol bileşiği SMA'nın bir fare
20 modelinde test edildi. Bileşikler aşağıdaki tabloda tarif edilmektedir.

Tayvan Suşu SMA Farelerinde Test Edilen Bileşikler

ISIS#	Dizi	Tarif	SEQ ID
396443	TCACTTTCATAATGCTGG	Düzgün 2'-MOE, tam PS; 18-mer; insan SMN2'sinin intron 7'sine tamamlayıcı	1
449220	ATTCACCTTTCATAATGCTGG	Düzgün 2-OMe; tam PS; 20-mer; insan SMN2'sinin intron 7'sine tamamlayıcı	3

ISIS#	Dizi	Tarif	SEQ ID
		Düzgün 2'-MOE; tam	
439272	TTAGTTTAATCACGCTCG	PS; 18-mer; kontrol dizisi	4

SMA tip III farelerinin Tayvan suşu The Jackson Laboratory'den (Bar Harbor, Maine) elde edildi. Bu fareler fare SMN'sinden yoksundur ve insan SMN2'si için benzer genlidir (mSMN -/-; hSMN2 +/+). Bu fareler Hsieh-Li HM, et al., Nature Genet. 24, 66-70 2000'de tarif edilmiştir.

Fareler, günde 3, 10, 30 veya 100 µg ISIS396443 ya da ISIS449220 ile veya fosfat tamponlu salin (PBS) içinde günde 30 ya da 100 µg kontrol bileşiği ISIS439272 ile tedavi edildi. Kontrol farelerine yalnızca PBS ile (0 dozu) muamele edildi. Tedavilerin tamamı, bir Azlet 1007D ozmotik pompa kullanılarak intraserebroventriküler (ICV) infüzyonla verildi. Her bir doz için beş hayvan vardı, ancak, ISIS449220'nin en yüksek dozundan farelerin ikisi, çalışmanın tamamlanmasından önce öldü. Hayvanlar 9. günde (son dozdan iki gün sonra) öldürüldü ve omuriliklerin beyin ve lomber kısımları her bir hayvandan alındı. Ekson 7 içeren ((+)ekson 7) insan SMN2 mesajının miktarını ve ekson 7'den yoksun ((-)ekson 7) insan SMN2 mesajının miktarını belirlemek için her bir numune üzerinde gerçek zamanlı PCR gerçekleştirildi. Gerçek zamanlı PCR ayrıca, allograft enflamatuar faktörünün (AIF1) ve gliseraldehid 3-fosfat dehidrojenazın (GADPH) ekspresyon seviyelerini belirlemek için de gerçekleştirildi.

(+)Ekson 7 ve (-)ekson 7 için ekspresyon seviyeleri GADPH seviyelerine normalize edildi. Bu normalize edilmiş ekspresyon seviyeleri daha sonra PBS tedavili kontrol farelerinden gelen GADPH-normalize seviyelerine bölündü. Ortaya çıkan kat-kontrol

değerleri aşağıdaki Tablo 17’te bildirilmektedir. Veriler, 3 sağkalan fareyi temsil eden ISIS449220’nin en yüksek dozu hariç, her bir gruptaki beş farenin tamamı için kontrolün ortalama katını temsil etmektedir.

5

ISIS396443’ün verilişi, ekson 7’nin inklüzyonunda çarpıcı bir artışla sonuçlandı. 10 µg/günde, ISIS396443 neredeyse iki kat (1,8 kat) beyindeki SMN2 mesajında tutulan ekson 7 ile sonuçlandı ve lomber omurilikte, tedavi edilmemiş kontrol

10

**Antisens Bileşiklerin SMA Farelerinde Uç Birleştirmeyi
Değiştirme Yetisi**

Bileşik	Doz (µg/gün)	Beyin		Lomber Kord	
		(+)ekson 7	(-)ekson 7	(+)ekson 7	(-)ekson 7
396443	0	1,0	1,0	1,0	1,0
(2’-MOE)	3	1,3	1,0	1,4	1,0
	10	1,8	0,7	2,1	0,6
	30	2,4	0,6	3,4	0,3
	100	3,0	0,3	3,8	0,1
449220	0	1,0	1,0	1,0	1,0
(2’-OMe)	3	0,9	1,1	1,0	1,1
	10	1,0	1,1	1,0	1,2
	30	1,0	1,2	1,1	1,2
	100*	1,0	1,0	1,2	1,1
439272	0	1,0	1,0	1,0	1,0
Kontrol	30	1,0	1,1	0,9	1,1
	100	1,0	1,0	1,0	1,0

Bileşik	Doz	Beyin	Lomber Kord
	(µg/gün)	(+)ekson (-	(+)ekson (-
		7)ekson	7)ekson
		7	7

* bu doz için yalnızca 3 fareden veri

Allograft enflamatuar faktörün (AIF1) ekspresyonu, enflamasyonun bir ölçüsü olarak test edildi. Tüm numunelerin (GADPH'ye) normalleştirilmesinden sonra, her bir tedavi grubu için AIF1 oranı, PBS kontrol için değere bölündü. ISIS396443, en yüksek dozda bile AIF1'de sıfır artışla sonuçlandı. ISIS449220, hem beyinde hem lomber omurilikte artan AIF1 ile sonuçlandı. Tablo 18'deki veriler, 3 sağkalan fareyi temsil eden ISIS449220'nin en yüksek dozu hariç, her bir gruptaki beş farenin tamamı için kontrolün ortalama katını temsil etmektedir.

SMA Farelerinde antisens bileşiklerin toksisitesi

Bileşik	Doz (µg/gün)	AIF-1/GAPDH	
		Beyin	Lomber
396443 (2'-MOE)	0	1,0	1,0
	3	10	1,0
	10	1,1	1,2
	30	1,0	1,0
	100	0,9	1,0
449220 (2'-OMe)	0	1,0	1,0
	3	1,0	1,0
	10	1,0	1,8
	30	1,2	2,9
	100*	1,8	3,3

Bileşik	Doz (µg/gün)	AIF-1/GAPDH	
		Beyin	Lomber
439272 Kontrol	0	0,9	0,9
	30	0,9	1,0
	100	0,9	1,2

* bu doz için yalnızca 3 fareden veri

Örnek 9 - Farelere Veriliş

5 ISIS395443'ün farklı dozlarda ve veriliş yollarındaki dağıtımını tayin etmek için sinomolgus maymunları kullanıldı. ISIS396443 2 maymuna verildi. Bir maymun ICV infüzyonla 3 mg'lık bir doz aldı ve diğer maymun IT infüzyonla 3 mg'lık bir doz aldı. Her iki infüzyon da 24 saatlik bir süre boyunca aktarıldı. Maymunlar öldürüldü ve dokular infüzyon periyodunun 10 bitiminden 96 saat sonra hasat edildi. ISIS396443 konsantrasyonu, omuriliğin Servikal, Torasik ve Lomber kısımlarından alınan numunelerde ölçüldü. Sonuçlar aşağıdaki tabloda özetlenmektedir.

Hayvan #	Doz	Yol	Doku	ISIS396443 Konsantrasyonu (µg/g)
1	24 saat süreyle 3 mg	ICV	Servikal	21,5
			Torasik	9,4
			Lomber	23,9
2	24 saat süreyle 3 mg	IT	Servikal	12,5
			Torasik	22,6
			Lomber	42,6

15 Sinomolgus maymunları yaklaşık 3 kg olduğundan, bu doz yaklaşık 1 mg/kg'dir.

ISIS39644'ün dağıtımının ileri tayin edilmesi için, yirmi-altı maymun, aşağıdaki tabloda sunulduğu şekilde altı gruba bölündü.

Grup Doz Yol Bileşik			İnfüzyon Öldürme Maymunların		
konsantrasyonu süresi günü sayısı					
(mg/ml)					
1	0	ICV 0	14 gün	Gün 19	2M/2F
2	3	ICV 0,09	14 gün	Gün 19	2M/2F
		mg			
3	3	IT 1,25	1 gün	Gün 6	3M/2F
		mg			
4	3	IT 0,42	3 gün	Gün 8	2M/2F
		mg			
5	3	IT 0,18	7 gün	Gün 12	3M/2F
		mg			
6	3	IT 0,09	14 gün	Gün 19	2M/2F
		mg			

5 Tüm gruplar için infüzyon oranı 100 µL/saatti. Tüm maymunlar, yalnızca salın alan grup 1 hariç, salın içinde toplamda 3 mg ISIS39644 aldı. Maymunlar öldürüldü ve dokular infüzyonun bitiminden 5 gün sonra hasat edildi.

10 Farelerden alınan doku numunelerindeki ISIS39644 konsantrasyonları standart teknikler kullanılarak değerlendirildi. Sonuçlar, Şekil 12'deki grafiklerde sunulmaktadır. Numuneler ayrıca histolojiyle de değerlendirildi. Histoloji tedavinin herhangi bir advers etkisini göstermedi ve ISIS396443 varlığını onayladı. Purkinje hücre kaybı için hiç kanıt yoktu.

Hızlı infüzyon yavaş infüzyondan daha fazla ISIS396443'e sahip gibi göründü. Bu sonuçlar, belirli durumlarda daha hızlı

infüzyon hızlarının veya bolus enjeksiyonun tercih edilebileceğini ortaya koymaktadır. Bolus verilmiş, belirli durumlarda, infüzyona göre belirli pratik avantajlara sahip olduğundan, CSF içine tercih edilen verilmiş yöntemidir.

5 Belirli durumlarda, CSF içine tercih edilen verilmiş yöntemi bolus IT enjeksiyonuyla.

Örnek 10 - Ciddi SMA'nın bir fare modelinin oluşturulması ve ICV tedavi

10

Ciddi bir SMA fenotipine sahip fareler (sSMA fareler) üretildi. Homozigot sSMA fareler insan SMN2'sinin 2 kopyasını taşımaktadır ve hiç fare SMN'si taşımamaktadır. Ortalama yaşam süresi yaklaşık 10 gündür. Ek olarak, SMA fareleri daha

15 küçüktür ve daha kısa kuyruklara sahiptir. heterozigotlar SMN taşır ve normal şekilde gelişir.

Bu sSMA farelerinde antisens bileşiklerin etkisini çalışmak için, 20µg ISIS396443 P1 günde ICV enjekte edildi. Tedavi

20 ortalama sağkalımda 9,9 günden (salin tedavili kontrol) 16,7 güne bir artışla sonuçlandı. RT-PCR analizi, tedavi edilen farelerden gelen dokularda artan tam-boy SMN RNA gösterdi.

Örnek 11 - ISIS 396443'ün sistemik verilmesi

25

sSMA fareleri ve sağlıklı heterozigot kontrol fareleri, bolus ICV enjeksiyonla ve/veya bolus subkütan enjeksiyonla (SC) ISIS396443'ün etkisini çalışmak için aşağıdaki gibi bölündü:

Grup 1 - ICV+SC

30

P1 veya P2'de (doğumdan sonra 1. veya 2. gün) 20 µg'lik bir adet ICV enjeksiyonu ve P0 ile P3 arasında aktarılan 50 µg/g'lik iki subkütan enjeksiyon.

Grup 2 - SC+SC

35

P0 ile P3 arasında aktarılan 50 µg/g'lik iki SC enjeksiyon ve P5 ile P6 arasında aktarılan 50 µg/g'lik

bir adet subkütan enjeksiyon ve P9 ila P10 arasında aktarılan 50 µg/g'lik subkütan enjeksiyon.

Grup 3 - SC

5

P0 ila P3 arasında aktarılan 50 µg/g'lik iki SC enjeksiyon.

Grup 4 - SMA salin kontrolü

P1 veya P2'de bir adet salin ICV enjeksiyonu ve P0 ila P3 arasında aktarılan iki subkütan salin enjeksiyonu.

Grup 5 - Farklı genli kontrol

10

P1 veya P2'de 20 µg'lik bir adet ICV enjeksiyonu ve farklı genli farelerin P0 ila P3 arasında aktarılan 50 µg/g'lik iki subkütan enjeksiyon.

15

Her bir grup 14 ila 22 arasında fare içerdi. Her bir gruptaki münferit fareler için (gün olarak) sağkalım aşağıdaki tabloda sunulmaktadır. Bu çalışmadaki birçok fare, bu başvurunun hazırlanmakta olduğu zamanda canlı kalmıştır. Böylelikle, bir ">" tarafından gösterilen bir değer, farenin o sayıda gün yaşamış olduğunu ve halen canlı olduğunu göstermektedir.

Fare	Grup 1 ICV+SC	Grup 2 SC+SC	Grup 3 SC	Grup 4 Salin	Grup 5 Het
1	> 141	> 130	> 103	8	> 146
2	> 141	127	94	8	> 146
3	22	> 114	61	8	> 146
4	> 140	73	> 103	8	> 146
5	117	27	> 103	8	> 145
6	> 124	27	> 103	8	> 145
7	> 111	18	34	8	> 145
8	> 111	> 102	26	8	> 145
9	> 111	>98	31	8	> 145
10	> 111	> 98	69	9	> 144

Fare Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5
ICV+SC	SC+SC	SC	Salin	Het
11 29	> 102	69	9	> 144
12 > 110	> 102	67	9	> 144
13 > 110	> 102	> 91	9	> 144
14 > 110	> 102	> 90	9	> 143
15 > 110	ND	> 90	9	> 143
16 > 108	ND	> 90	9	> 143
17 > 108	ND	> 90	10	> 129
18 > 109	ND	86	10	> 129
19 18	ND	> 75	10	> 129
20 ND	ND	69	10	ND
21 ND	ND	18	11	ND
22 ND	ND	> 71	12	ND
23 ND	ND	ND	12	ND
24 ND	ND	ND	13	ND
25 ND	ND	ND	13	ND
26 ND	ND	ND	14	ND

Örnek 12 – SC verililişin Doz-Yanıtı

Farklı dozlarda subkütan ISIS396443 alan sSMA farelerinin sağkalımı, aşağıdaki dozlam gruplarınca tayin edildi.

Grup 1-SC400 (80 mg/kg ila 180 mg/kg arasında doz aralıkları)

P0 ila P3 arasında fare başına toplamda 400 µg iki SC enjeksiyon, birinci doz P0 veya P1’de 150 µg idi (3 µl hacim) ve ikincisi P2 veya P3’te aktarılan 250 µg idi (5 µl hacim).

Grup 2-SC200 (40 mg/kg ila 90 mg/kg arasında doz aralıkları)

P0 ila P3 arasında fare başına toplamda 200 µg iki SC enjeksiyon, birinci doz P0 veya P1'de 75 µg idi (1,5 µl hacim) ve ikincisi P2 veya P3'te aktarılan 125 µg idi (2,5 µl hacim).

Grup 3-SC100 (20 mg/kg ila 45 mg/kg arasında doz aralıkları)

P0 ila P3 arasında fare başına toplamda 100 µg iki SC enjeksiyon, birinci doz P0 veya P1'de 40 µg idi (2 µl hacim) ve ikincisi P2 veya P3'te aktarılan 60 µg idi (3 µl hacim).

Grup 4-SMA salin (negatif kontroller)

P0 ila P3 arasında iki salin SC enjeksiyonu, birincisi P0 veya P1'de (5 µl hacim) ve ikincisi P2 veya P3'te aktarıldı (5 µl hacim).

Grup 5 - Farklı genli kontrol (pozitif kontroller)

Herhangi bir tedavi almayan fareler.

Her bir grup 14 ila 26 arasında fare içerdi. Her bir gruptaki münferit fareler için (gün olarak) sağkalım aşağıdaki tabloda sunulmaktadır. Bu çalışmadaki birçok fare, bu başvurunun hazırlanmakta olduğu zamanda canlı kalmıştır. Böylelikle, bir ">" tarafından gösterilen bir değer, farenin o sayıda gün yaşamış olduğunu ve halen canlı olduğunu göstermektedir.

Fare	Grup	1 Grup	2 Grup	3 Grup	4 Grup	5
	SC400	SC200	SC100	Salin	Het	
1	> 82	>93	11	8	> 87	
2	> 82	>91	11	8	> 87	
3	> 82	>91	11	9	> 87	
4	> 82	> 91	11	9	> 87	
5	> 82	14	11	9	> 87	

Fare Grup	1 Grup	2 Grup	3 Grup	4 Grup	5
SC400	SC200	SC100	Salin	Het	
6 > 82	25	12	9	> 87	
7 > 82	92	18	9	> 86	
8 > 82	>93	19	9	> 86	
9 > 82	>93	22	9	> 86	
10 > 82	> 90	69	9	> 86	
11 > 82	> 90	> 77	9	> 86	
12 > 80	> 91	> 77	10	> 86	
13 > 80	> 91	> 77	10	> 86	
14 25	> 90	> 77	10	> 86	
15 ND	> 90	> 75	10	> 85	
16 ND	> 90	> 74	11	> 85	
17 ND	86	> 74	11	> 85	
18 ND	> 90	> 74	12	ND	
19 ND	> 52	> 74	12	ND	
20 ND	ND	> 74	13	ND	
21 ND	ND	> 74	13	ND	
22 ND	ND	>71	13	ND	
23 ND	ND	>49	13	ND	
24 ND	ND	>49	14	ND	
25 ND	ND	>49	15	ND	
26 ND	ND	23	ND	ND	

Örnek 13 - ICV İnfüzyon vs ICV Bolus

Intraserebroventriküler bolus enjeksiyonla (ICV bolus) verilmiş, kesintisiz intraserebroventriküler infüzyonla (ICV infüzyon) karşılaştırıldı. SMA tip III transjenik fareler ISIS387954 ile dozlandı. ICV infüzyon farelerine 7 gün boyunca

toplamda 0 (PBS kontrolü), 87,5 µg, 175 µg, 350 µg veya 700 µg infüze doz verildi ve fareler 2 gün sonra öldürüldü. ICV bolus farelerine tek bir ICV enjeksiyonunda aynı toplam dozlar, 0 (PBS kontrolü), 87,5 µg, 175 µg, 350 µg veya 700 µg verildi ve 5 9 gün sonra öldürüldü. Her bir grupta 5 fare vardı. RNA lomber omurilikten toplandı ve gerçek zamanlı PCR ile analiz edildi. İntron 7 inklüzyonu salin-tedavili kontrollere normalize edildi. Sonuçlar aşağıdaki tabloda özetlenmektedir.

Grup	Doz	PBS'e göre intron 7 inklüzyonunda kat artışı
1	PBS (kontrol)	1,0
2	7 gün boyunca ICV infüzyonla 87,5 µg	2,1
3	7 gün boyunca ICV infüzyonla 175 µg	2,4
4	7 gün boyunca ICV infüzyonla 350 µg	3,2
5	7 gün boyunca ICV infüzyonla 700 µg	3,6
6	PBS (kontrol)	1,0
7	ICV bolusla 87,5 µg	3,1
8	ICV bolusla 175 µg	3,7
9	ICV bolusla 350 µg	3,8
10	ICV bolusla 700 µg	3,8

10

Bu deneyde, ICV bolus enjeksiyonla aktarılan aynı doz, 7 gün boyunca ICV infüzyonla aktarılan dozdan daha büyük aktiviteyle sonuçlandı.

15 Enflamasyonun tayin edilmesi için allograft enflamatuar faktörün (AIF1) ekspresyon seviyelerini belirlemek amacıyla

gerçek zamanlı PCR de gerçekleştirildi. Tedavi edilen farelerden alınan numunelerin hiçbirisi kontrol farelerinde anlamlı bir fark göstermedi.

5 Örnek 14 – ICV Bolusla Doz-Yanıtı

İntraserebroventriküler bolusla verilmiş ilave dozlarda test edildi. Transjenik farelere tekli bolus ICV enjeksiyonla 0, 10,9 µg, 21,9 µg, 43,4 µg, 87,5 µg veya 175 µg ISIS387954 verildi ve fareler Örnek 13'te tarif edildiği şekilde 9 gün sonra öldürüldü. Numuneler beyinden ve lomber omurilikten alındı. RNA hazırlandı ve intron 7 inklüzyonundaki değişiklik için ve AIF1'deki değişiklik için RT-PCR ile analiz edildi. Numunelerin hiçbirisi, kontrole kıyasla AIF1'de bir değişiklik göstermedi. İntron 7 inklüzyonundan sonuçlar aşağıdaki tabloda özetlenmektedir. ED50 yaklaşık 22µg civarındadır.

Grup Doz		PBS'e göre intron 7 inklüzyonunda kat artışı	
		Beyin	Lomber omurilik
1	PBS (kontrol)	1,0	1.0
2	ICV bolusla 10,9 µg	2,4	2.2
3	ICV bolusla 21,9 µg	2,8	2.7
4	ICV bolusla 43,4 µg	3,2	3.4
5	ICV bolusla 87,5 µg	3,5	3.4
6	ICV bolusla 175 µg	4,4	3.7

Açıklama ayrıca bu başvurunun türetildiği, içeriği aşağıdaki numaralandırılmış paragraflar olarak kopyalanan WO 2010/148249'un istemlerinin ana konusunu da içermektedir.

- 5 1. Bir süjeye, insan SMN2 ön-mRNA'sını kodlayan bir nükleik asidin intron 7'sine tamamlayıcı olan bir antisens oligonükleotid içeren bir antisens bileşiğin verilmesini içeren bir yöntem olup, burada antisens bileşik beyin-omurilik sıvısının içine verilir.
- 10 2. Paragraf 1'e göre yöntem olup, burada veriliş intratekal boşluğun içinedir.
3. Paragraf 1'e göre yöntem olup, burada veriliş beyindeki beyin-omurilik sıvısının içinedir.
4. 1-3 arasındaki paragrafların herhangi birine göre yöntem
- 15 olup, burada veriliş bir bolus enjeksiyon içerir.
5. 1-3 arasındaki paragrafların herhangi birine göre yöntem olup, burada veriliş bir aktarma pompasıyla infüzyon içerir.
6. 1-5 arasındaki paragrafların herhangi birine göre yöntem olup, burada antisens bileşik, süjenin vücut ağırlığının
- 20 kilogramı başına 0,01 ila 10 miligram arasında antisens bileşiğinin bir dozunda verilir.
7. Paragraf 6'ya göre yöntem olup, burada doz, süjenin vücut ağırlığının kilogramı başına 0,01 ila 10 miligram arasında antisens bileşiktir.
- 25 8. Paragraf 6'ya göre yöntem olup, burada doz, süjenin vücut ağırlığının kilogramı başına 0,01 ila 5 miligram arasında antisens bileşiktir.
9. Paragraf 6'ya göre yöntem olup, burada doz, süjenin vücut ağırlığının kilogramı başına 0,05 ila 1 miligram arasında
- 30 antisens bileşiktir.
10. Paragraf 6'ya göre yöntem olup, burada doz, süjenin vücut ağırlığının kilogramı başına 0,01 ila 0,5 miligram arasında antisens bileşiktir.

11. Paragraf 6'ya göre yöntem olup, burada doz, süjenin vücut ağırlığının kilogramı başına 0,05 ila 0,5 miligram arasında antisens bileşiktir.
- 5 12. 6-11 arasındaki paragrafların herhangi birine göre yöntem olup, burada doz günlük olarak verilir.
13. 6-11 arasındaki paragrafların herhangi birine göre yöntem olup, burada doz haftalık olarak verilir.
14. 6-11 arasındaki paragrafların herhangi birine göre yöntem olup, burada antisens bileşik kesintisiz olarak
10 verilir ve burada doz günde verilen miktardır.
15. 1-13 arasındaki paragrafların herhangi birine göre yöntem olup, bir indüklemeye evresi esnasında en az bir indüklemeye dozunun verilmesini ve bir idame evresi esnasında en az bir idame dozunun verilmesini içerir.
- 15 16. Paragraf 15'e göre yöntem olup, burada indüklemeye dozu, süjenin vücut ağırlığının kilogramı başına 0,05 ila 5,0 miligram arasında antisens bileşiktir.
17. Paragraf 15 ya da 16'ya göre yöntem olup, burada idame dozu, süjenin vücut ağırlığının kilogramı başına 0,01 ila
20 1,0 miligram arasında antisens bileşiktir.
18. 15-17 arasındaki paragrafların herhangi birine göre yöntem olup, burada indüklemeye evresinin süresi en az 1 haftadır.
19. 15-18 arasındaki paragrafların herhangi birine göre yöntem olup, burada idame evresinin süresi en az 1 haftadır.
25 20. 15-19 arasındaki paragrafların herhangi birine göre yöntem olup, burada her bir indüklemeye dozu ve her bir idame dozu bir tekli enjeksiyon içerir.
21. 15-19 arasındaki paragrafların herhangi birine göre yöntem olup, burada her bir indüklemeye dozu ve her bir idame dozu bağımsız olarak iki ya da daha fazla enjeksiyon içerir.
30 22. 1-21 arasındaki paragrafların herhangi birine göre yöntem olup, burada antisens bileşik en az 1 haftalık bir tedavi periyodu boyunca en az 2 kez verilir.

23. Paragraf 22'ye göre yöntem olup, burada tedavi periyodu en az bir aydır.
24. Paragraf 22'ye göre yöntem olup, burada tedavi periyodu en az 2 aydır.
- 5 25. Paragraf 22'ye göre yöntem olup, burada tedavi periyodu en az 4 aydır.
26. 15-25 arasındaki paragrafların herhangi birine göre yöntem olup, burada indüklenme dozu bir ya da daha fazla bolus enjeksiyonla verilir ve idame dozu bir infüzyon pompasıyla verilir.
- 10 27. 1-26 arasındaki paragrafların herhangi birine göre yöntem olup, antisens bileşiğın tolere edilebilirliğının ve/veya etkililiğının tayin edilmesini içerir.
28. 1-27 arasındaki paragrafların herhangi birine göre yöntem olup, burada antisens bileşiğın doz miktarı veya sıklığı, antisens bileşiğın verilişinin tolere edilmediğıne dair bir endikasyonu takiben indirgenir.
- 15 29. 1-28 arasındaki paragrafların herhangi birine göre yöntem olup, burada antisens bileşiğın doz miktarı veya sıklığı, antisens bileşiğın verilişinin etkili olduğuna dair bir endikasyonu takiben muhafaza edilir veya indirgenir.
- 20 30. 1-29 arasındaki paragrafların herhangi birine göre yöntem olup, burada antisens bileşiğın dozu, antisens bileşiğın verilişinin etkili olmadığına dair bir endikasyonu takiben arttırılır.
- 25 31. 1-30 arasındaki paragrafların herhangi birine göre yöntem olup, burada antisens bileşiğın veriliş sıklığı, antisens bileşiğın verilişinin etkili olduğuna dair bir endikasyonu takiben indirgenir.
- 30 32. 1-31 arasındaki paragrafların herhangi birine göre yöntem olup, burada antisens bileşiğın veriliş sıklığı, antisens bileşiğın verilişinin etkili olmadığına dair bir endikasyonu takiben arttırılır.

33. Yukarıdaki paragrafların herhangi birine göre yöntem olup, antisens bileşiğin ve en az bir adet diğer terapinin eş-verilişini içerir.
- 5 34. Paragraf 33'e göre yöntem olup, burada antisens bileşik ve en az bir adet diğer terapi aynı zamanda eş-verilir.
35. Paragraf 34'e göre yöntem olup, burada antisens bileşik, en az bir adet diğer terapinin verilişi öncesinde verilir.
36. Paragraf 34'e göre yöntem olup, burada antisens bileşik, en az bir adet diğer terapinin verilişinden sonra verilir.
- 10 37. 33-36 arasındaki paragrafların herhangi birine göre yöntem olup, burada en az bir adet diğer terapi, valproik asidin, riluzolun, hidroksiürenin veya bir bütiratın birinin ya da daha fazlasının verilişini içerir.
38. 33-37 arasındaki paragrafların herhangi birine göre yöntem olup, burada en az bir adet diğer terapi, trikostatın-A'nın verilişini içerir.
- 15 39. 33-38 arasındaki paragrafların herhangi birine göre yöntem olup, burada en az bir adet diğer terapi, kök hücrelerin verilişini içerir.
- 20 40. 33-39 arasındaki paragrafların herhangi birine göre yöntem olup, burada en az bir adet diğer terapi gen terapisi'dir.
41. Yukarıdaki paragrafların herhangi birine göre yöntem olup, burada antisens bileşik yaklaşık 0,01 mg/ml'lik, yaklaşık 0,05 mg/ml'lik, yaklaşık 0,1 mg/ml'lik, yaklaşık 0,5 mg/ml'lik, yaklaşık 1 mg/ml'lik, yaklaşık 5 mg/ml'lik, yaklaşık 10 mg/ml'lik, yaklaşık 50 mg/ml'lik veya yaklaşık 100 mg/ml'lik bir konsantrasyonda verilir.
- 25 42. 1-41 arasındaki paragrafların herhangi birine göre yöntem olup, burada süjedeki bir motonörondaki SMN2 mRNA'nın ekson 7'sinin inklüzyonu artar.
- 30 43. 1-42 arasındaki paragrafların herhangi birine göre yöntem olup, burada süjedeki bir motonörondaki SMN2 ekson 7 amino asitlerinin inklüzyonu artar.

44. Bir süjedeki bir motonörondaki SMN2 mRNA'nın ekson 7'sinin inklüzyonunun arttırılması için bir yöntem olup, süjeye, insan SMN2'sini kodlayan bir nükleik asidin intron 7'sine tamamlayıcı bir antisens oligonükleotid verilmesini
5 ve böylelikle süjedeki motonörondaki SMN2 mRNA'nın ekson 7'sinin inklüzyonunun arttırılmasını içerir.
45. Bir süjedeki bir motonörondaki SMN2 polipeptidindeki ekson 7 amino asitlerinin inklüzyonunun arttırılması için bir yöntem olup, süjeye, insan SMN2'sini kodlayan bir
10 nükleik asidin intron 7'sine tamamlayıcı bir antisens oligonükleotid verilmesini ve böylelikle süjedeki motonörondaki SMN2 polipeptidindeki ekson 7 amino asitlerinin inklüzyonunun arttırılmasını içerir.
46. 1-45 arasındaki paragrafların herhangi birine göre
15 yöntem olup, burada süje SMA hastasıdır.
47. 1-45 arasındaki paragrafların herhangi birine göre yöntem olup, burada süje tip I SMA hastasıdır.
48. 1-45 arasındaki paragrafların herhangi birine göre yöntem olup, burada süje tip II SMA hastasıdır.
49. 1-45 arasındaki paragrafların herhangi birine göre
20 yöntem olup, burada süje tip III SMA hastasıdır.
50. 1-49 arasındaki paragrafların herhangi birine göre yöntem olup, burada bir birinci doz in utero verilir.
51. Paragraf 50'ye göre yöntem olup, burada birinci doz,
25 kan-beyin-bariyerinin tam oluşumu öncesinde verilir.
52. 1-49 arasındaki paragrafların herhangi birine göre yöntem olup, burada bir birinci doz süjenin doğumunun 1 haftası içinde verilir.
53. 1-49 arasındaki paragrafların herhangi birine göre
30 yöntem olup, burada bir birinci doz süjenin doğumunun 1 ayı içinde verilir.
54. 1-49 arasındaki paragrafların herhangi birine göre yöntem olup, burada bir birinci doz süjenin doğumunun 3 ayı içinde verilir.

55. 1-49 arasındaki paragrafların herhangi birine göre yöntem olup, burada bir birinci doz süjenin doğumunun 6 ayı içinde verilir.
56. 1-49 arasındaki paragrafların herhangi birine göre yöntem olup, burada bir birinci doz süje 1 ila 2 yaşındayken verilir.
57. 1-49 arasındaki paragrafların herhangi birine göre yöntem olup, burada bir birinci doz süje 1 ila 15 yaşındayken verilir.
58. 1-49 arasındaki paragrafların herhangi birine göre yöntem olup, burada bir birinci doz süje 15 yaşından büyükken verilir.
59. 1-58 arasındaki paragrafların herhangi birine göre yöntem olup, burada süje bir memelidir.
60. Paragraf 59'a göre yöntem olup, burada süje bir insandır.
61. 1-60 arasındaki paragrafların herhangi birine göre yöntem olup, SMA'sı olan bir hastanın tanımlanmasını içerir.
62. Paragraf 61'e göre yöntem olup, burada süje, süjenin bir ya da daha fazla kasının elektriksel aktivitesinin ölçülmesiyle tanımlanır.
63. Paragraf 61'e göre yöntem olup, burada süje, süjenin, süjenin SMN1 geninde bir mutasyona sahip olup olmadığını belirlemek için bir genetik testle tanımlanır.
64. Paragraf 61'e göre yöntem olup, burada süje kas biyopsisiyle tanımlanır.
65. Paragraf 42'ye göre yöntem olup, burada antisens bileşiğinin verilişi, ekson 7'ye sahip SMN2 mRNA miktarında en az %10 bir artışla sonuçlanır.
66. Paragraf 65'e göre yöntem olup, burada ekson 7'ye sahip SMN2 mRNA miktarındaki artış en az %20'dir.
67. Paragraf 65'e göre yöntem olup, burada ekson 7'ye sahip SMN2 mRNA miktarındaki artış en az %50'dir.
68. Paragraf 65'e göre yöntem olup, burada ekson 7'ye sahip SMN2 mRNA miktarındaki artış en az %70'tir.

69. Paragraf 43'e göre yöntem olup, burada antisens bileşiğinin verilişi, ekson 7 amino asitlerine sahip SMN2 polipeptidi miktarında en az %10 bir artışla sonuçlanır.
- 5 70. Paragraf 69'a göre yöntem olup, burada ekson 7 amino asitlerine sahip SMN2 polipeptidi miktarındaki artış en az %20'dir.
71. Paragraf 69'a göre yöntem olup, burada ekson 7 amino asitlerine sahip SMN2 polipeptidi miktarındaki artış en az %50'dir.
- 10 72. Paragraf 69'a göre yöntem olup, burada ekson 7 amino asitlerine sahip SMN2 polipeptidi miktarındaki artış en az %70'tir.
73. 1-72 arasındaki paragrafların herhangi birine göre yöntem olup, burada antisens bileşiğinin verilişi, süjedeki SMA'nın en az bir semptomunu iyileştirir.
- 15 74. Paragraf 73'e göre yöntem olup, burada antisens bileşiğinin verilişi, süjede gelişmiş motor fonksiyonuyla sonuçlanır.
75. Paragraf 73'e göre yöntem olup, burada antisens bileşiğinin verilişi, süjede geciktirilmiş veya indirgenmiş motor fonksiyonu kaybıyla sonuçlanır.
- 20 76. Paragraf 73'e göre yöntem olup, burada antisens bileşiğinin verilişi, gelişmiş solunum fonksiyonuyla sonuçlanır.
- 25 77. Paragraf 73'e göre yöntem olup, burada antisens bileşiğinin verilişi, gelişmiş sağkalımla sonuçlanır.
78. 1-77 arasındaki paragrafların herhangi birine göre yöntem olup, burada antisens nükleotidin en az bir nükleosidi bir modifiye şeker bölütü içerir.
- 30 79. Paragraf 78'e göre yöntem olup, burada en az bir modifiye şeker bölütü bir 2'-metoksietil şeker bölütü içerir.
80. 1-79 arasındaki paragrafların herhangi birine göre yöntem olup, burada antisens oligonükleotidin esasen her bir
- 35 nükleosidi bir modifiye şeker bölütü içerir.

81. Paragraf 80'e göre yöntem olup, burada bir modifiye şeker bölütü içeren nükleositlerin tamamı aynı şeker modifikasyonunu içerir.
- 5 82. Paragraf 81'e göre yöntem olup, burada her bir modifiye şeker bölütü bir 2'-metoksietil şeker bölütü içerir.
83. 1-79 arasındaki paragrafların herhangi birine göre yöntem olup, burada antisens oligonükleotidin her bir nükleosidi bir modifiye şeker bölütü içerir.
- 10 84. Paragraf 83'e göre yöntem olup, burada nükleositlerin tamamı aynı şeker modifikasyonunu içerir.
85. Paragraf 84'e göre yöntem olup, burada her bir modifiye şeker bölütü bir 2'-metoksietil şeker bölütü içerir.
86. 1-85 arasındaki paragrafların herhangi birine göre yöntem olup, burada en az bir nükleosit arası bağlantı bir fosforotioat nükleosit arası bağlantıdır.
- 15 87. Paragraf 86'ya göre yöntem olup, burada her bir nükleosit arası bağlantı bir fosforotioat nükleosit arası bağlantıdır.
88. 1-87 arasındaki paragrafların herhangi birine göre yöntem olup, burada antisens oligonükleotid 10 ila 25 arasında bağlı nükleositten oluşur.
- 20 89. 1-87 arasındaki paragrafların herhangi birine göre yöntem olup, burada antisens oligonükleotid 12 ila 22 arasında bağlı nükleositten oluşur.
- 25 90. 1-87 arasındaki paragrafların herhangi birine göre yöntem olup, burada antisens oligonükleotid 15 ila 20 arasında bağlı nükleositten oluşur.
91. 1-87 arasındaki paragrafların herhangi birine göre yöntem olup, burada antisens oligonükleotid 18 bağlı nükleositten oluşur.
- 30 92. 1-91 arasındaki paragrafların herhangi birine göre yöntem olup, burada antisens oligonükleotid, insan SMN2 kodlayan nükleik aside en az %90 tamamlayıcıdır.

93. Paragraf 92'ye göre yöntem olup, burada antisens oligonükleotid, insan SMN2 kodlayan nükleik aside tamamen tamamlayıcıdır.
- 5 94. 1-93 arasındaki paragrafların herhangi birine göre yöntem olup, burada oligonükleotid, SEQ ID NO: 1 nükleobaz dizisinin en az 10 bitişik nükleobazını içeren bir nükleobaz dizisine sahiptir.
- 10 95. Paragraf 94'e göre yöntem olup, burada oligonükleotid, SEQ ID NO: 1 nükleobaz dizisinin en az 15 bitişik nükleobazını içeren bir nükleobaz dizisine sahiptir.
96. Paragraf 94'e göre yöntem olup, burada oligonükleotid, SEQ ID NO: 1 nükleobaz dizisini içeren bir nükleobaz dizisine sahiptir.
- 15 97. Paragraf 94'e göre yöntem olup, burada oligonükleotid, SEQ ID NO: 1 nükleobaz dizisinden oluşan bir nükleobaz dizisine sahiptir.
98. 1-97 arasındaki paragrafların herhangi birine göre yöntem olup, burada antisens bileşik bir konjugat grubu veya terminal grubu içerir.
- 20 99. 1-97 arasındaki paragrafların herhangi birine göre yöntem olup, burada antisens bileşik antisens oligonükleotidden oluşur.
100. 1-99 arasındaki paragrafların herhangi birine göre yöntem olup, burada antisens bileşik ayrıca sistemik olarak
- 25 verilir.
101. Paragraf 100'e göre yöntem olup, burada sistemik veriliş, intravenöz veya intraperitoneal enjeksiyonlardır.
102. Paragraf 100 ya da 101'e göre yöntem olup, burada sistemik veriliş ve merkezi sinir sisteminin içine veriliş
- 30 aynı zamanda gerçekleştirilir.
103. Paragraf 100 ya da 101'e göre yöntem olup, burada sistemik veriliş ve merkezi sinir sisteminin içine veriliş farklı zamanlarda gerçekleştirilir.
104. İnsan SMN2 kodlayan bir nükleik asidin intron 7'sine
- 35 tamamlayıcı olan bir antisens oligonükleotid içeren bir

antisens bileşik olup, 1-103 arasındaki paragrafların herhangi birine göre bir yöntemde kullanım içindir.

5 105. Paragraf 104'e göre antisens bileşik olup, sağkalım motor nöronu 1'le (SMN1) ilişkili bir hastalığın ya da durumun tedavisinde kullanım içindir.

106. İnsan SMN2 kodlayan bir nükleik asidin intron 7'sine tamamlayıcı bir antisens oligonükleotid içeren bir antisens bileşiğin, önceki paragrafların herhangi birine göre bir yöntemde kullanım için bir ilacın üretiminde kullanımıdır.

10 107. Paragraf 106'ya göre kullanım olup, burada ilaç, sağkalım motor nöronu 1'le (SMN1) ilişkili bir hastalığın veya durumun tedavisi içindir.

DİZİ LİSTESİ

- <110> Isis Pharmaceuticals, Inc.
Genzyme Corporation
- 5 Cold Spring Harbor Laboratory
C. Frank Bennett
Gene Hung
Frank Rigo
Adrian R. Krainer
- 10 Yimin Hua
Marco Passini
Lamya Shihabuddin
Seng H. Cheng
Katherine W. Klinger
- 15 <120> SMN2 UÇ BİRLEŞTİRMESİNİN MODÜLASYONU İÇİN BİLEŞİMLER VE
YÖNTEMLER
<130> CORE0086WO
<150> 61/218,031
<151> 2009-06-17
- 20 <160> 24
<170> Windows Versiyonu 4.0 için FastSEQ
<210> 1
<211> 18
<212> DNA
- 25 <213> Yapay Dizi
<220>
<223> Sentetik Oligonükleotit
<400> 1
tcactttcat aatgctgg 18
- 30 <210> 2
<211> 15
<212> DNA
<213> Yapay Dizi
<220>
- 35 <223> Sentetik Oligonükleotit

<400> 2
 tttcataatg ctggc 15
 <210> 3
 <211> 15
 5 <212> DNA
 <213> Yapay Dizi
 <220>
 <223> Sentetik Oligonükleotit
 <400> 3
 10 tgctggcaga cttac 15
 <210> 4
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Yapay Dizi
 15 <220>
 <223> Sentetik Oligonükleotit
 <400> 4
 cataatgctg gcaga 15
 <210> 5
 20 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Yapay Dizi
 <220>
 <223> Sentetik Oligonükleotit
 25 <400> 5
 tcataatgct ggcag 15
 <210> 6
 <211> 15
 <212> DNA
 30 <213> Yapay Dizi
 <220>
 <223> Sentetik Oligonükleotit
 <400> 6
 ttcataatgc tggca 15

<210> 7
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Yapay Dizi
 5 <220>
 <223> Sentetik Oligonükleotit
 <400> 7
 attcacttttc ataatgctgg 20
 <210> 8
 10 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Yapay Dizi
 <220>
 <223> Sentetik Oligonükleotit
 15 <400> 8
 ctttcataat gctgg 15
 <210> 9
 <211> 12
 <212> DNA
 20 <213> Yapay Dizi
 <220>
 <223> Sentetik Oligonükleotit
 <400> 9
 tcataatgct gg 12
 25 <210> 10
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Yapay Dizi
 <220>
 30 <223> Sentetik Oligonükleotit
 <400> 10
 actttcataa tgctg 15
 <210> 11
 <211> 12

<212> DNA
 <213> Yapay Dizi
 <220>
 <223> Sentetik Oligonükleotit
 5 <400> 11
 ttcataatgc tg 12
 <210> 12
 <211> 15
 <212> DNA
 10 <213> Yapay Dizi
 <220>
 <223> Sentetik Oligonükleotit
 <400> 12
 cactttcata atgct 15
 15 <210> 13
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Yapay Dizi
 <220>
 20 <223> Sentetik Oligonükleotit
 <400> 13
 tttcataatg ct 12
 <210> 14
 <211> 15
 25 <212> DNA
 <213> Yapay Dizi
 <220>
 <223> Sentetik Oligonükleotit
 <400> 14
 30 tcactttcat aatgc 15
 <210> 15
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Yapay Dizi

<220>
 <223> Sentetik Oligonükleotit
 <400> 15
 ctttcataat gc 12
 5 <210> 16
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Yapay Dizi
 <220>
 10 <223> Sentetik Oligonükleotit
 <400> 16
 ttcactttca taatg 15
 <210> 17
 <211> 12
 15 <212> DNA
 <213> Yapay Dizi
 <220>
 <223> Sentetik Oligonükleotit
 <400> 17
 20 actttcataa tg 12
 <210> 18
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Yapay Dizi
 25 <220>
 <223> Sentetik Oligonükleotit
 <400> 18
 attcactttc ataata 15
 <210> 19
 30 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Yapay Dizi
 <220>
 <223> Sentetik Oligonükleotit

<400> 19
 cactttcata at 12
 <210> 20
 <211> 15
 5 <212> DNA
 <213> Yapay Dizi
 <220>
 <223> Sentetik Oligonükleotit
 <400> 20
 10 gattcacttt cataa 15
 <210> 21
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Yapay Dizi
 15 <220>
 <223> Sentetik Oligonükleotit
 <400> 21
 tcactttcat aa 12
 <210> 22
 20 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Yapay Dizi
 <220>
 <223> Sentetik Oligonükleotit
 25 <400> 22
 ttcactttca ta 12
 <210> 23
 <211> 12
 <212> DNA
 30 <213> Yapay Dizi
 <220>
 <223> Sentetik Oligonükleotit
 <400> 23
 attcactttc at 12

<210> 24

<211> 15

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

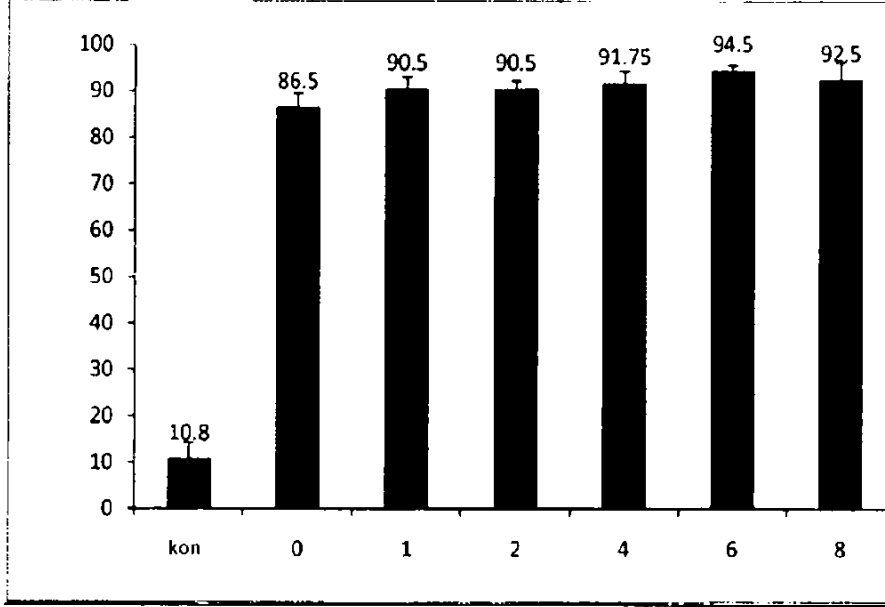
5 <220>

<223> Sentetik Oligonükleotit

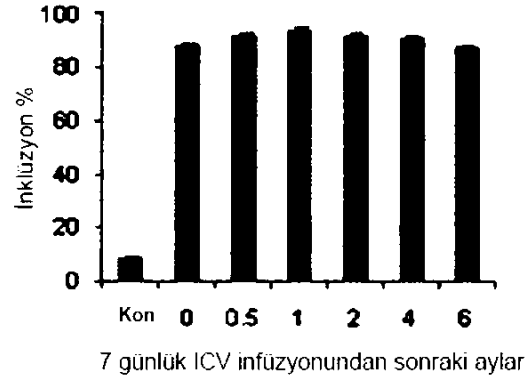
<400> 24

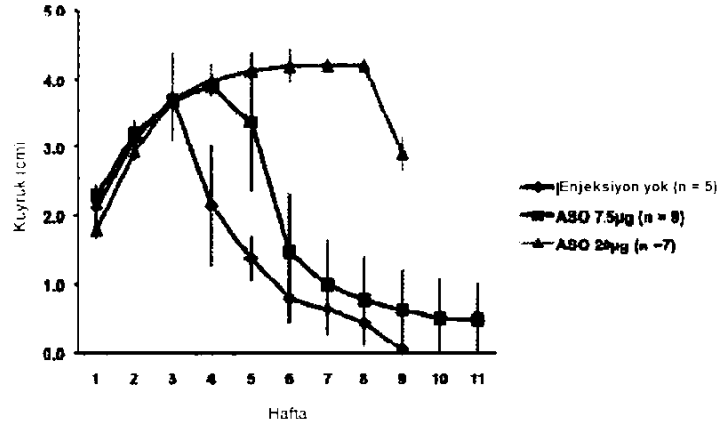
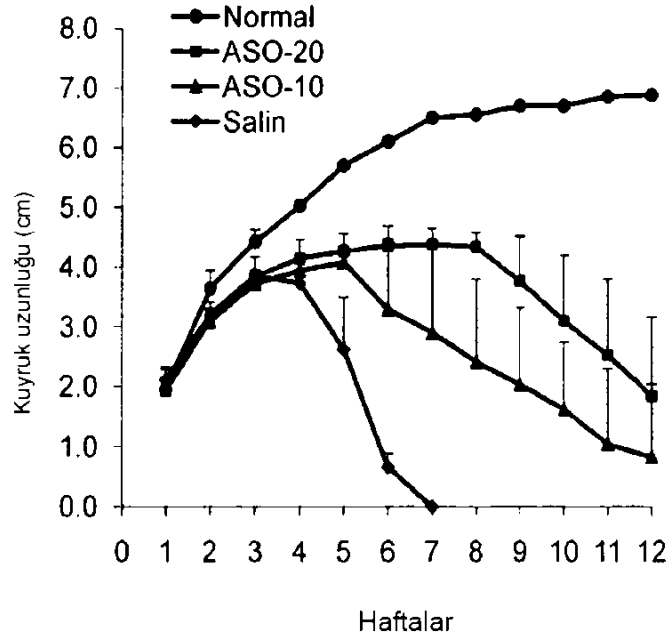
agtaagattc acttt 15

10

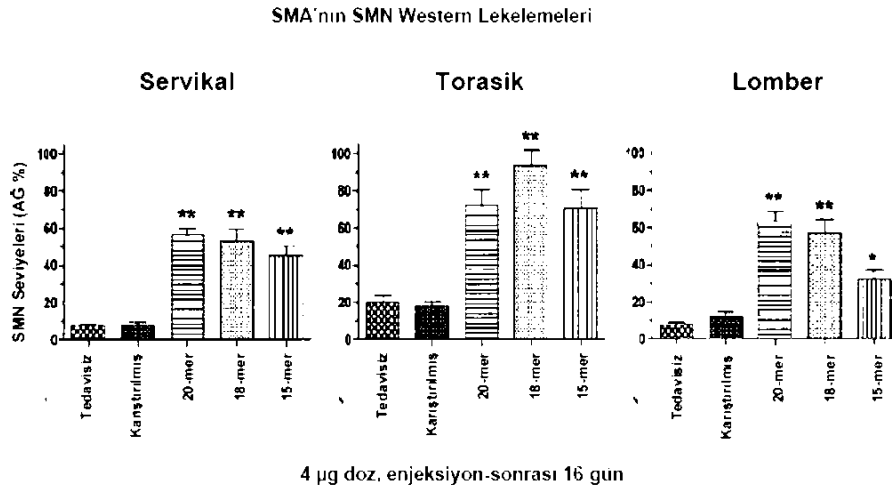


Şekil 1

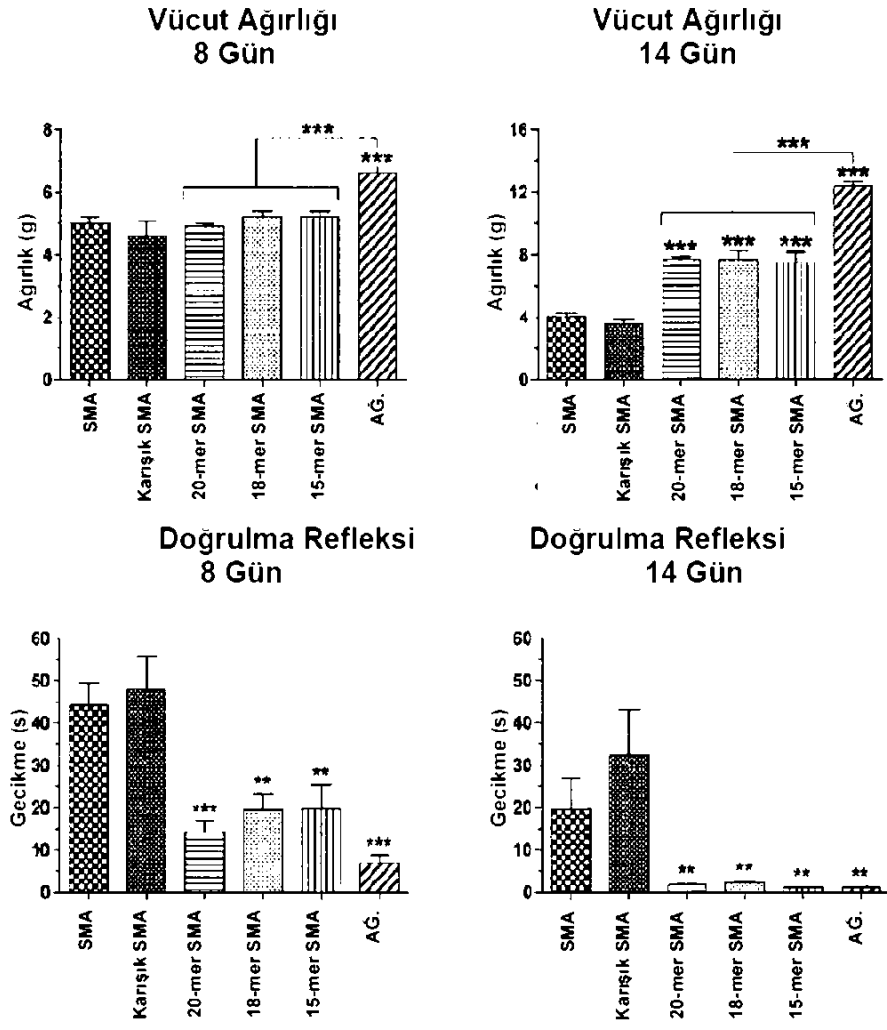
**Şekil 2**

A**B**

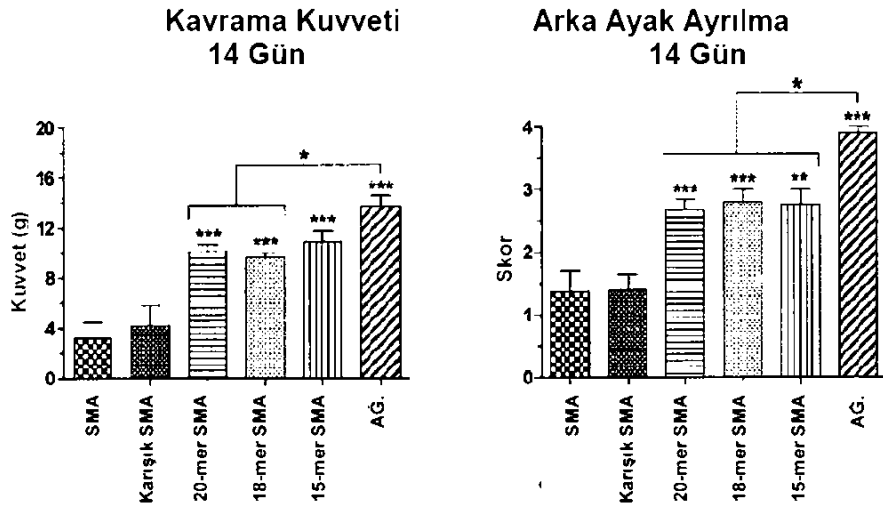
Şekil 3



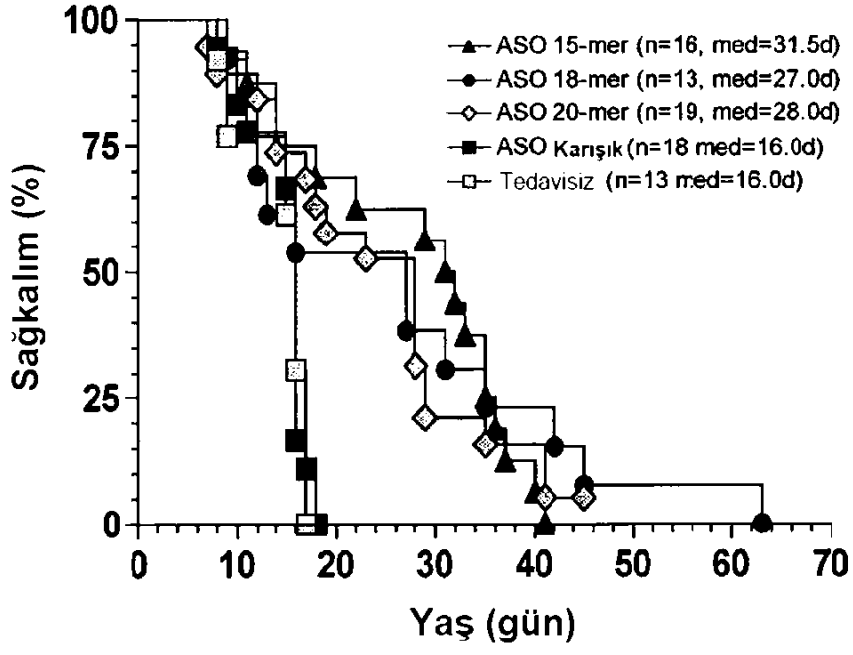
Şekil 4



Şekil 5

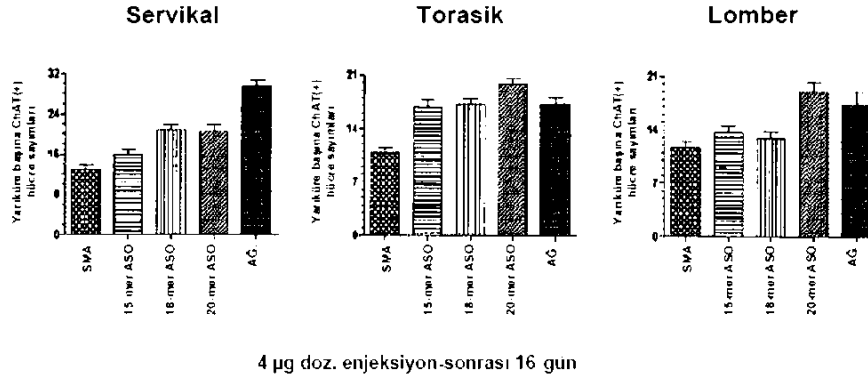


Şekil 6

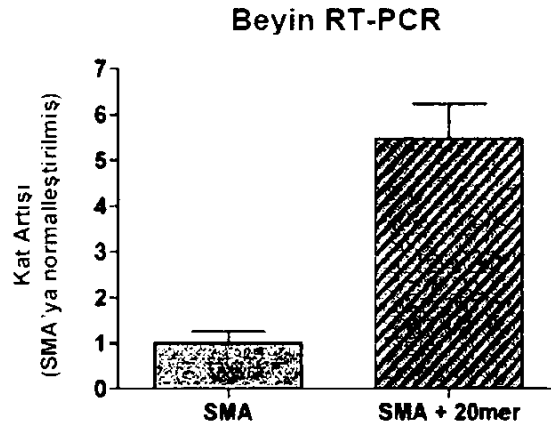


Şekil 7

ASO Tedavisi Omurilikteki Motor Nöron Hücrelerinin Sayılarını Arttırır

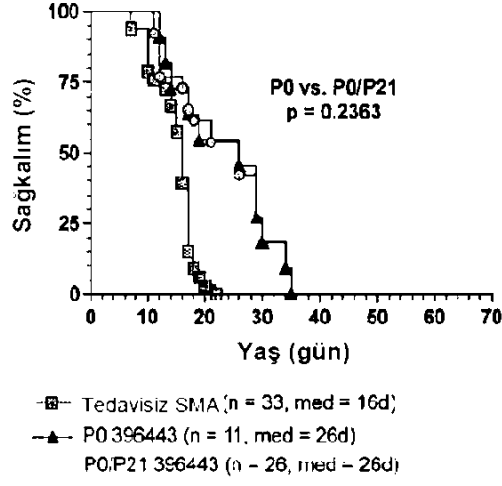


Şekil 8

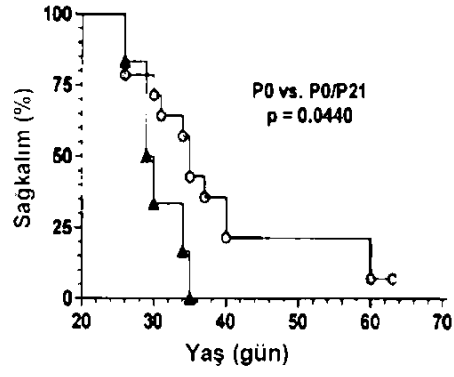


Şekil 9

P0 (8ug) ve P21 (20 ug) vs yalnızca P0 (8 ug) 396443 enjeksiyonları



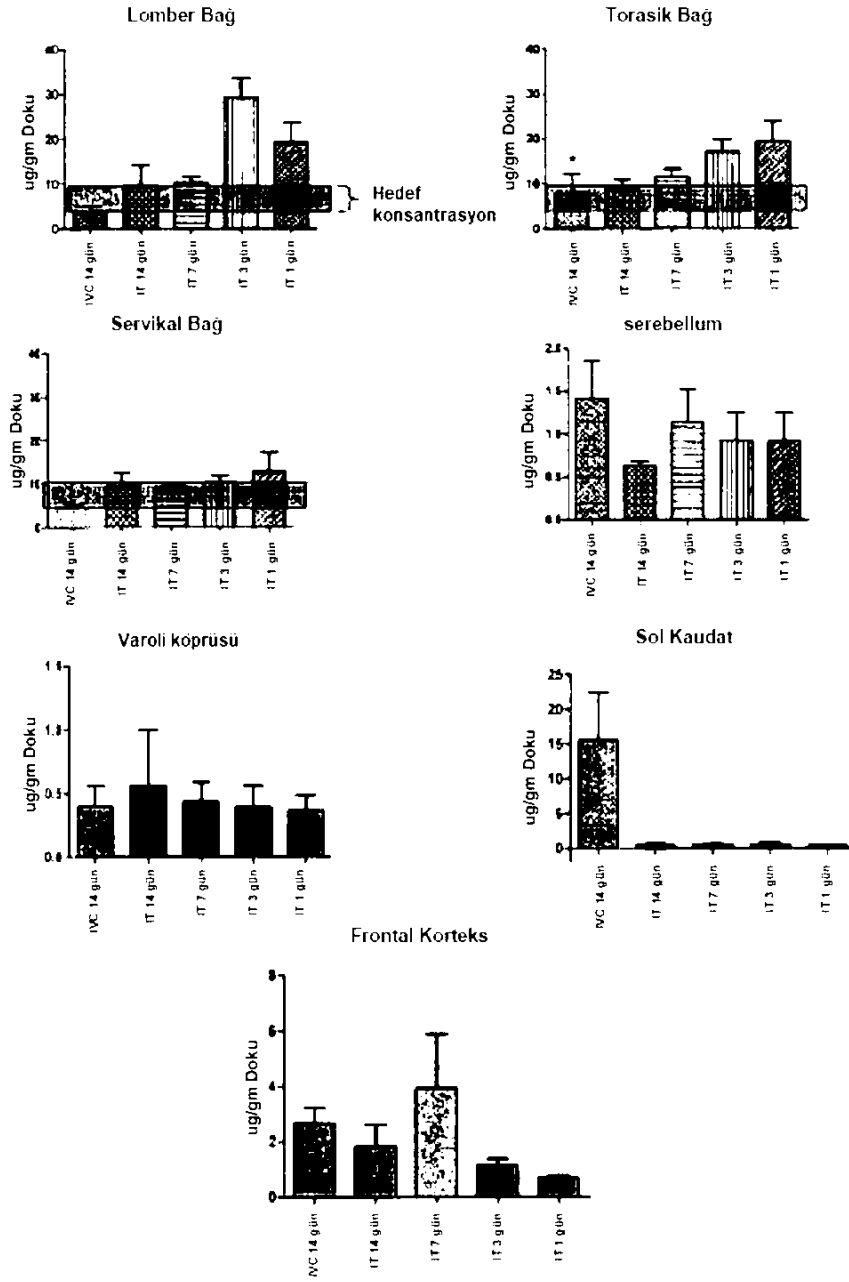
Şekil 10



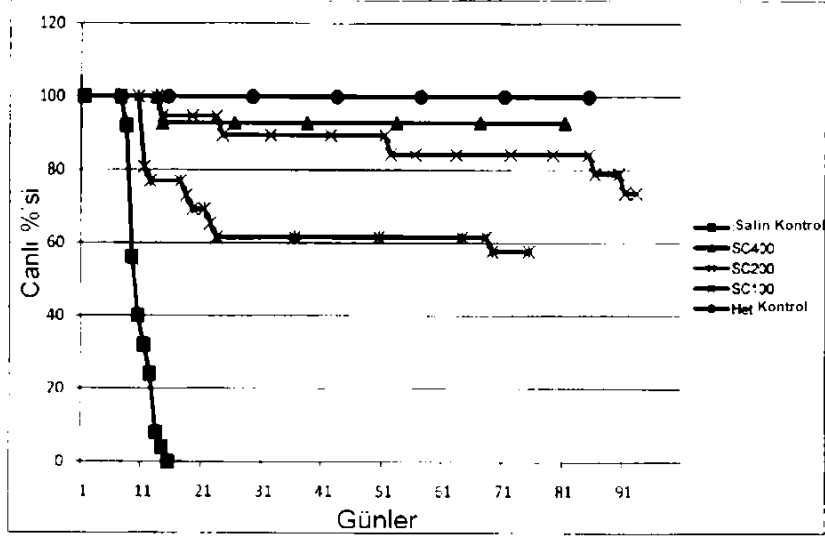
P0 396443 (n = 6, med = 29.5d)

P0/P21 396443 (n = 14, med = 35d)

Şekil 11



Şekil 12



Şekil 13