

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 388 968**

51 Int. Cl.:
C12N 15/11 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **02790321 .0**
96 Fecha de presentación: **31.10.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1456380**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.09.2004**

54 Título: **Inhibidores de Smad7 para el tratamiento de enfermedades del SNC**

30 Prioridad:
02.11.2001 EP 01126140

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.10.2012

73 Titular/es:
**GIULIANI INTERNATIONAL LIMITED
33 SIR JOHN ROGERSON'S QUAY
DUBLIN 2, IE**

72 Inventor/es:
**STEINBRECHER, Andreas;
GIEGERICH, Gerhard;
KLEITER, Ingo;
HORN, Markus;
APFEL, Rainer;
KREUTZER, Roland;
LIMMER, Stefan y
VORNLOCHER, Hans-Peter**

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

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

ES 2 388 968 T3

DESCRIPCIÓN

Inhibidores de Smad7 para el tratamiento de enfermedades del SNC

La presente invención se refiere a un inhibidor específico de la expresión o función de Smad7 para su uso en la prevención, mejora o tratamiento de esclerosis múltiple o isquemia cerebral, en el que dicho inhibidor específico se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos intracelulares o fragmentos de anticuerpos, aptámeros, intrámeros, ARNi (ARN bicatenario) y moléculas antisentido anti-Smad7.

El presente modelo para la iniciación de enfermedad inflamatoria mediada por linfocitos T del SNC incluye activación de linfocitos T específicos para antígeno periféricos y diferenciación de Th1 (Martin, 1992; Miller, 1994; Zamvil, 1990). Parece que se requiere una etapa de activación de linfocitos T periféricos para que los linfocitos T autorreactivos entren en el SNC por la barrera hematoencefálica (Wekerle, 1986). El proceso de formación de lesiones está adicionalmente gobernado por un complejo patrón de expresión de cito- y quimiocinas tras la reestimulación de linfocitos T autorreactivos *in situ* (Hoffman, 1998; Karpus, 1999). Es ampliamente aceptado que las células Th1, críticas para la inmunidad mediada por células por su producción de IL-2, IFN-gamma, TNF-alfa y linfotóxina, participan en la inmunopatología de enfermedad autoinmunitaria específica de órgano (Liblau, 1995; Raine, 1995; Steinman, 1997). Se ha sugerido una función como reguladores para las células Th2 (Mathisen, 1997; Nicholson, 1995; Racke, 1994) y factor de crecimiento transformante productor de células beta (TGF-beta) (Chen, 1996; 1994; O'Garra, 1997; Weiner, 1994).

El TGF-beta pertenece a una familia de péptidos con efectos pleiotrópicos ampliamente distribuidos por todo el cuerpo (Sporn, 1989) y en particular en el sistema inmunitario (Letterio, 1998). Además de los TGF-beta, las proteínas morfogenéticas óseas (BMP) y la activina representan la superfamilia de BMP (Miyazono, 2001).

Los tres TGF-beta isotípicos están extremadamente muy conservados a través de especies con una identidad superior al 99% entre las secuencias de TGF-beta 1 maduro de diversas especies de mamífero (Derynck, 1986; 1987). Los TGF-beta tienen importantes funciones en el crecimiento y la diferenciación celular, desarrollo de órganos, formación de matrices, reparación de heridas y función inmunitaria (Blobe, 2000; Chen, 2001; Letterio, 2000).

El TGF-beta regula los procesos celulares uniéndose a tres receptores de la superficie de la célula de alta afinidad conocidos como tipos I, II y III. Los receptores de tipo III son el tipo de receptores más abundantes. Se unen a TGF-beta y lo transfieren a sus receptores de señalización, los receptores de tipo I (RI) y II (RII). Tras la unión de un ligando a un receptor de tipo II, las cinasas de receptores de tipo II fosforilan residuos de serina y treonina dentro del dominio GS (rico en glicina-serina) intracelular de receptores de tipo I, conduciendo a la activación del receptor de tipo I. Entonces, el RI de TGF-beta activado interactúa con una molécula de adaptador SARA (anclaje Smad para la activación del receptor) (Tsukazaki, 1998), que facilita el acceso de miembros particulares de la familia Smad de proteínas, llamados Smad regulados por receptor (R-Smad) para receptores de TGF-beta activados. Entonces, las cinasas de receptores de tipo I activadas fosforilan R-Smad diferencialmente en dos residuos de serina en sus extremos C (resumido en Itoh, 2000). R-Smad incluyen proteínas Smad1, 2, 5 y 8. Smad2 y 3 median en la señalización de TGF-beta y activinas; y Smad8 media en la señalización de cinasas de receptores de ALK-2 (Baker, 1996; Lagna, 1996; Liu, 1996; Zhang, 1996, 1997).

Los inhibidores de Smad (I-Smads) consisten en Smad6 y Smad7 de vertebrado e hijas de *Drosophila* contra dpp (Dad). A diferencia de R-Smad, que aumentan la señalización de moléculas de TGF-beta, I-Smads inhiben la señalización de la superfamilia de TGF-beta. Mientras que Smad6 parece que inhibe preferencialmente la señalización de BMP, Smad7 actúa de inhibidor general de la señalización de la familia de TGF-beta (Itoh, 1998; Souchelnytskyi, 1998; Ishisaki, 1999). Los I-Smad pueden unirse establemente al dominio intracelular de receptores de tipo I activados, inhibiendo así adicionalmente la transducción de señales previniendo la fosforilación de R-Smad por el receptor (Imamura, 1997; Inoue, 1998; Souchelnytskyi, 1998).

La expresión de I-Smad parece ser parte de un bucle de retroalimentación negativo. La expresión de Smad6 y 7 puede inducirse rápidamente y en algunos casos directamente por BMP, activina y/o TGF-beta en células cultivadas. Además, Smad3 y 4 pueden unirse directamente al promotor de Smad7 para mediar en la activación de este promotor por activina o TGF-beta. (Nagarajan, 1999; von Gersdorff, 2000). Además de la estimulación por la ruta de TGF-beta-Smad, la expresión de Smad7 también puede inducirse por IFN-gamma mediante la ruta de Jak/Stat (Ulloa, 1999), por TNF-alfa mediante la activación de NF-kappaB (Bitzer, 2000) y por norepinefrina también por NF-kappaB (Kanamaru, 2001).

Además de la función de Smad7 como inhibidor de la fosforilación de R-Smad por receptores de tipo 1 en la frontera citoplasma/membrana celular, también se encontró que Smad7 se producía abundantemente en los núcleos de ciertas células y que era exportado del núcleo tras la estimulación de TGF-beta o un cambio en el sustrato celular (Itoh, 1998; Zhu, 1999). Pulaski (2001) mostró que la mutación en un sitio de fosforilación principal de Smad7 en Ser-249 no afectó el efecto inhibidor de Smad7 sobre la señalización de TGF-beta o BMP7 y no interfirió con la localización nuclear de Smad7. En su lugar, se mostró que la fosforilación de Smad7 en Ser-249 era importante para su capacidad independiente de ligando para regular la transcripción.

Ratones que expresan en exceso Smad7 presentan respuestas de linfocitos T defectuosas para TGF-beta 1, muestran sustancialmente mayor producción de citocinas *in vitro* y muestran inflamación potenciada de las vías respiratorias inducida por antígeno (Nakao, 2000). Se ha mostrado que Smad7 se expresa en exceso en enfermedad inflamatoria del intestino (EII), mucosa y linfocitos T de la mucosa purificados. En un sistema *in vitro*, oligonucleótidos antisentido específicos para Smad7 redujeron la expresión de proteínas Smad7 en células aisladas de pacientes con EII, permitiendo que las células respondieran a TGF-beta exógeno (Monteleone, 2001).

El documento WO 97/30065 identifica un ADNc (fchd540) que codifica Smad7 y trata la regulación por incremento de Smad7 en estados de enfermedad cardiovascular. Las enfermedades elegidas como diana mediante los procedimientos descritos en el documento WO 97/30065 se refieren a trastornos cardiovasculares, en particular a arterosclerosis, isquemia/reperfusión, hipertensión, reestenosis e inflamación arterial, además de a trastornos oncogénicos fibroproliferativos que incluyen retinopatía diabética, cáncer, tumorigénesis, vascularización de tumores, angiogénesis, arterosclerosis, inflamación y fibrosis.

El documento WO 98/53068 también describe moléculas de ácidos nucleicos que codifican Smad7 y proporciona procedimientos para disminuir o aumentar la transducción de señales de la superfamilia de TGF-beta en células de mamífero basándose en la elección como diana de genes smad7, productos génicos o componentes de interacción. Además, se describen procedimientos para tratar un sujeto que padece cáncer de pulmón caracterizado por elevada expresión de un gen de Smad6 o un gen de Smad7. Estos procedimientos implican administrar al sujeto una cantidad de un ácido nucleico antisentido que se une al producto de expresión del gen de Smad 6 o Smad7 eficaz para reducir la expresión del gen.

Además, se desvelan procedimientos médicos para reducir defectos oculares en un embrión de mamífero en desarrollo. Estos procedimientos incluyen poner en contacto las células del embrión con un agente que reduce la expresión o actividad de una molécula de ácido nucleico de Smad7 o un producto de expresión de la misma.

El documento WO 01/53313 describe compuestos antisentido, se proporcionan composiciones y procedimientos para modular la expresión de Smad7. La invención describe un procedimiento para tratar un ser humano que tiene una enfermedad o afección asociada a Smad7 que comprende administrar a dicho animal una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz del compuesto antisentido de manera que se inhiba la expresión de Smad7. En las siguientes "sub-reivindicaciones", dicha enfermedad o afección es un trastorno del desarrollo, un trastorno cardiovascular, un trastorno hiperproliferativo o un trastorno de cicatrización.

El documento WO 01/21794 describe polipéptidos que se asocian a Smad identificados por cribado de levadura de dos híbridos. Se dice que la presente invención proporciona además procedimientos para reducir o aumentar la transducción de señales de la familia de TGF-beta en una célula. Se menciona que, *in vivo*, tales procedimientos son útiles para modular el crecimiento, por ejemplo, para tratar cáncer y fibrosis. Además, se establece que tales procedimientos también son útiles en el tratamiento de afecciones que resultan de una transducción de señales de TGF excesiva o deficiente. En el documento WO 00/77168 se desvelan antagonistas de las rutas de señalización de BMP y TGF- β por lo que estos antagonistas están relacionados con Smurf1 y Smurf2, que pueden interaccionar con Smad1, 5 y 7. Smurf1 y Smurf2 son ubiquitina ligasas de tipo E3 de HECT, que contienen el dominio C2 del extremo N, seguido de dominios WW y el dominio HECT del extremo C. El dominio HECT es responsable de las actividades de E3 ligasa de Smurf. La interacción de Smurf con I-Smad conduce a la exportación nuclear del último. En el citoplasma, el dominio C2 podría elegir como diana I-Smad para la membrana celular, y facilitar la interacción de I-Smad con receptores de TGF-beta. Los Smurf no sólo reconocen I-Smad como sustratos, sino que también capturan receptores de TGF-beta como sus dianas, conduciendo así a la degradación de tanto I-Smad como de los complejos de receptor (Ebisawa, 2001, Kavsak, 2000, Suzuki, 2002).

El documento WO 00/77168 describe una proteína Smurf2 que induce la degradación de receptores de TGF-beta y Smad7. Según dicha aplicación, Smurf2 interactúa directamente con Smad7 por un motivo PPXY en Smad7. Smurf2 participa en la degradación de receptores de TGF-beta que actúa en asociación con Smad7 como antagonista o regulador nativo de la señalización de TGF-beta. La activación de la señalización de TGF-beta produce el reclutamiento de Smurf2 dependiente de Smad7 para el complejo de receptor de TGF-beta. En ausencia de complejo de receptor de TGF-beta activados, Smurf2 no altera el nivel de estado estacionario y reposición de Smad7. El reclutamiento de Smurf2 para el receptor de TGF-beta por Smad7 promueve la degradación del complejo de Smad7-receptor de TGF-beta por rutas tanto proteasómicas como lisosómicas. Se establece que la expresión en exceso de Smurf por terapia génica puede usarse para corregir estados clínicos que resultan de señalización de Smad excesiva.

Otras proteínas que se encuentran que interfieren con Smad7 comprenden YAP65 y TIEG. La proteína asociada a Yes (YAP65) es una fosfoproteína rica en prolina originalmente identificada como proteína de unión al dominio SH3 del producto proto-oncogénico Yes (Sudol, 1994). Ferrigno y col. identificaron YAP65 como una proteína de interacción novedosa con Smad7 mediante cribado de levadura de dos híbridos (Ferrigno, 2002). Mostraron en células COS-7 que YAP65 potencia la actividad inhibidora de Smad7 contra la transactivación de genes inducidos por TGF-beta, dependiente de Smad3/4. Además, se mostró que YAP65 aumentaba la asociación de Smad7 con moléculas de tipo 1 del receptor de TGF-beta activado. El gen temprano inducible de TGF-beta (TIEG) es un factor de transcripción similar a Krappel de dedo de cinc (KLF) y se induce por TGF-beta en muchos tipos de células

(Subramaniam, 1995, Subramaniam, 1998). La expresión en exceso de TIEG imita efectos de TGF-beta en muchos tipos de células (Chaloux, 1999, Hefferan, 2000, Ribeiro, 1999, Tachibana, 1997). Se ha mostrado que TIEG modula la ruta de señalización de TGF-beta/Smad uniéndose al promotor de Smad7 y así reprime la transcripción de Smad7. Además, TIEG aumenta la transcripción del gen de Smad2. Una ligasa E3 de ubiquitina, siete en homólogo de Absentia 1 (SIAH1), actúa de proteína de interacción con TIEG1 e induce la degradación de TIEG1, limitándose así la duración y/o magnitud de respuestas de TGF-beta (Johnsen, 2002a, Johnsen, 2002b, Johnsen, 2002c).

Otros genes de la ruta de TGF- β se describen en el documento WO 98/45467 y el documento WO 01/16604 describe un procedimiento para cribar agentes que pueden modular la señalización de células de TGF- β .

Relevantes para la enfermedad autoinmunitaria en el sistema nervioso central (SNC) tal como esclerosis múltiple (EM), los efectos inmunosupresores de TGF-beta se investigaron exhaustivamente *in vitro* usando linfocitos T autoinmunes específicos de mielina e *in vivo* aprovechando la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), que es el modelo principal para la enfermedad humana EM.

La EAE puede inducirse en cepas de animales susceptibles (por ejemplo roedores y primates) tanto por inmunización (= EAE activa) con un antígeno de mielina en adyuvante completo o incompleto de Freund (CFA) como por transferencia sistémica adoptiva de linfocitos T autorreactivos obtenidos de animales previamente inmunizados y activados *in vitro* con el autoantígeno respectivo (at-EAE) (Brocke, 1996; Zamvil, 1990).

La mayoría de los autores mostraron que la producción de TGF-beta endógeno se regulaba por incremento en el SNC y supuestamente desempeñaba una función moduladora por disminución durante la fase de recuperación de EAE aguda (Khoray, 1992; Racke, 1992; Issazadeh, 1995; Issazadeh, 1998). Okuda (1995) no encontró regulación por incremento de TGF-beta. Sin embargo, en el último trabajo, se encontró una reducción de la expresión de TGF-beta en la fase preclínica y aguda en células de ganglio linfático de ratones inmunizados con antígeno de mielina en CFA (adyuvante completo de Freund) con respecto a ratones de control tratados con CFA solo (Okuda, 1998). La inmunización de ratas DA (ratas agouti morenas) con médula espinal de rata en adyuvante incompleto de Freund produce una evolución crónica y recurrente prolongada de EAE que caracteriza la desmielinización extensiva. Aunque se describió que la expresión de TGF-beta se regulaba por incremento en el SNC de ratas Lewis durante la fase de remisión de EAE (monofásica), no se encontró una expresión significativa de citocinas reguladoras tales como TGF-beta 1 (y IL-4 y IL-10) en el SNC de rata DA o tejidos linfoides en diversos momentos de tiempo (Issazadeh, 1996). El análisis de citocinas demuestra que la expresión de ARNm de IL-10 y TGF-beta 1 fue generalmente baja tanto en EAE aguda como en el primer ataque de EAE crónica y regulada por incremento en fases tardías de EAE crónica. Se sugirió que las citocinas antiinflamatorias sólo desempeñaban una función menor en la recaída (Tanuma, 2000).

La recuperación de enfermedad en ratones transgénicos para un receptor de linfocitos T específico de MBP inducido para desarrollar EAE se asoció a una desviación inmunitaria de linfocitos T Th1 hacia células que secretaron IL-4, IL-10 y TGF-beta tanto en el periférico como en el SNC [Chen, 1998]. Kiefer y colaboradores llevaron a cabo un estudio sistemático de la expresión de TGF-beta (Kiefer, 1998). En EAE monofásica activamente inducida en la rata Lewis, la hibridación *in situ* reveló una fuerte expresión de TGF-beta 1 en infiltrados mononucleares meníngeos y perivasculares en la aparición de la enfermedad, expresión continuada en infiltrados perivasculares y células mononucleares difusas en la máxima gravedad de la enfermedad y expresión en células parenquimatosas difusas durante la recuperación. La expresión celular de TGF-beta 1 por linfocitos T, macrófagos y la microglía se resumió en una elevación de larga duración de ARNm de TGF-beta 1 que se extiende bien en la fase de recuperación. Aunque se pensó que el TGF-beta 1 expresado tempranamente en la enfermedad por linfocitos T contribuía al desarrollo de lesión inflamatoria, se sugirió que su expresión por células de la microglía contribuía potencialmente a la recuperación (Kiefer, 1998).

El TGF-beta 1 humano recombinante administrado a 2 μ g diariamente i.p. durante dos semanas después de varias inmunizaciones de ratones SJL con homogeneizado de médula espinal en CFA retrasó, pero no previno ni mejoró significativamente, la gravedad del primer episodio de enfermedad en este modelo de EAE. El tratamiento después del primer ataque durante un protocolo de inmunización repetida redujo la gravedad de segundos episodios inducidos por inmunización de refuerzo. Las inyecciones de TGF-beta 1 iniciadas después de la aparición de un episodio agudo de EAE no influyeron sensiblemente en la evolución de ese episodio (Kuruvilla, 1991). Sin embargo, en el mismo modelo, recaídas espontáneas fueron muy eficientemente bloqueadas por el tratamiento diario iniciado 35 días después de la aparición del primer ataque y se mantuvieron durante 4 semanas (Kuruvilla, 1991). Usando TGF-beta 1 purificado a partir de plaquetas humanas, posteriormente se mostró que 1 μ g de TGF-beta 1 administrado i.v. en los días 1-5 después de la transferencia de células encefalitogénicas del ganglio linfático en ratones SJL previnieron parcialmente la EAE y mejoraron significativamente las puntuaciones de enfermedad principalmente durante el primer y segundo ataques de enfermedad (Racke, 1991). La histología de ratones tratados con TGF-beta 1 sacrificados en el día 7 después de la transferencia reveló inflamación sustancialmente reducida y ausencia de desmielinización a diferencia de ratones tratados con placebo. Si el tratamiento con TGF-beta 1 se inició a los signos más tempranos de enfermedad clínica y continuó durante 5 días, se redujo la gravedad de recaídas posteriores (Racke, 1991; Johns 1991). El tratamiento con TGF-beta 2 simio recombinante produjo inhibición similar de la activación y proliferación de linfocitos T *in vitro*.

Estudios recientes mostraron que la transferencia adoptiva de clones de Th1 específicos para MBP activados transducidos para secretar TGF-beta 1 latente retardó y mejoró los signos de EAE en ratones inmunizados con PLP (Chen, 1998). Esta estrategia permitió la administración local específica para sitio de TGF-beta 1 activo terapéutico a los infiltrados inflamatorios del SNC, fue específica para antígeno, sin embargo aparentemente permitió la inmunosupresión de células inocentes por linfocitos T activados *in situ* (Chen, 1998; Thorbecke, 2000).

La EAE también se inhibió satisfactoriamente por una única inyección de un complejo de ADN de citocina (IL-4, IFN-beta o TGF-beta)-liposoma catiónico directamente en el sistema nervioso central (Croxford, 1998). En otro estudio se consiguió una administración de TGF-beta continua prolongada mediante inyección de un vector de expresión de ADN de plásmido desnudo que codifica TGF-beta 1 intramuscularmente. Esto produjo la producción de TGF-beta 1 y la protección de signos clínicos e histopatológicos de EAE inducida por MBP (Piccirillo y Prud'homme, 1999). La baja dosis de TGF-beta 1 administrada nasalmente inhibió el desarrollo y las recaídas de EAE recurrente crónica en ratas DA.

El tratamiento con anticuerpo anti-TGF-beta 1 *in vivo* agravó la gravedad de EAE (Miller, 1992; Racke, 1992; Santambrogio, 1993; Johns, 1993; Santambrogio, 1998).

La expresión de ARNm de TGF-beta 1 y 2 en tejido del SNC de casos de EM, demostrada por hibridación *in situ*, se encontró principalmente en células perivasculares en vez de parenquimatosas, sugiriendo a las células inflamatorias en circulación como la principal fuente (Woodroffe, 1993). En resumen, encontraron tanto una expresión más fuerte como una distribución celular diferentemente localizada en EM (lesiones desmielinizantes activas y activas e inactivas crónicas) a diferencia del tejido de control.

En un bioensayo de cultivos de sangre periférica se encontró que la actividad similar a TGF-beta aumentaba en pacientes con enfermedad activa a diferencia de en aquellos con enfermedad inactiva y donantes sanos y se encontró en particular en el subgrupo probado durante la regresión de síntomas (Beck, 1991). La disminución de la producción de TGF-beta por linfocitos de pacientes con EM guardó una relación directa con actividad de enfermedad. Los pacientes con EM con enfermedad activa produjeron menos TGF-beta que los pacientes con EM con enfermedad estable. Las células que producen TGF-beta fueron principalmente linfocitos T CD8+ y linfocitos T CD45RA+ (Mokhtarian, 1994).

Usando una PCR semicuantitativa, se informó que la expresión de TGF-beta e IL-10 se reducía antes de una recaída, mientras que aumentaba la expresión de TNF-alfa y linfoxina (Rieckmann, 1995).

La seguridad de TGF-beta 2 activo recombinante se evaluó en un ensayo de fase 1 de etiqueta abierta de 11 pacientes con EM progresiva secundaria (PS) (Calabresi, 1998).

Hay cada vez más pruebas de que las poderosas propiedades antiinflamatorias de TGF-beta como regulador nativo de la respuesta inmunitaria de linfocitos T desempeñan una función clave en la patofisiología de isquemia cerebral y otras patologías del SNC (Benveniste, 1998, Kulkarni, 1993). El aumento de la expresión de TGF-beta se demostró en tejido de cerebro cadavérico de víctimas de accidente cerebrovascular humano (Krupinski, 1996) y en biopsias de cerebro de pacientes que padecían diversos trastornos neurodegenerativos agudos o crónicos incluyendo accidente cerebrovascular, enfermedad de Parkinson o enfermedad de Alzheimer (Mattson, 1997, Pratt, 1997). Por tanto, esta citocina se considera como un péptido relacionado con lesión y una posible diana para intervención terapéutica (Kriegstein, 1998).

Los datos *in vitro* soportan una función neuroprotectora de la ruta de TGF-beta con referencia particular a muerte neuronal inducida por NMDA en paradigmas excitotóxicos tales como hipoxia-isquemia (Buisson, 1998, Choi, 1996, Prehn, 1993). Por el contrario, los hallazgos de estudios *in vivo* describen coherentemente la inducción de la expresión de ARNm de TGF-beta 1 en el plazo de horas después de isquemia cerebral focal y regulación por incremento persistente durante varias semanas después de la lesión (Lehrmann, 1998, Ruocco, 1999, Wang, 1995). Datos más detallados por Ali y colaboradores (Ali, 2001) localizaron la expresión significativamente potenciada de TGF-beta 1 en la penumbra isquémica, es decir, en la zona metabólica transicional entre el núcleo isquémico y la zona peri-infarto. Como el aumento de la actividad biológica de TGF-beta por un antagonista específico disminuyó tanto las lesiones excitotóxicas como isquémicas, los datos derivados de modelos de accidente cerebrovascular de roedor sugieren que la activación de la ruta de señalización de TGF-beta puede asociarse a neuroprotección (Ali, 2001, Ruocco, 1999).

Los datos *in vivo* de un modelo de accidente cerebrovascular en rata que identifican la fuente celular de la producción de TGF-beta 1 después de isquemia cerebral focal demostraron la inducción temprana, además de la regulación por incremento a largo plazo de la expresión de ARNm de TGF-beta 1 confinada en la microglía activa y macrófagos. Por tanto, las funciones mediadas por TGF-beta 1 representan una respuesta inmediata y persistente en la lesión cerebral isquémica aguda y participan en la fase de remodelado de tejido después de accidente cerebrovascular (Lehrmann, 1998). Más detallado, se ha informado de una expresión bifásica de TGF-beta 1 con un primer pico a las 12 horas y a los 7 días después de la oclusión de la ACM permanente en el tejido infartado, lo último lo más probablemente ligado a la regulación por disminución de respuesta de tejido inflamatorio, la inducción de neoangiogénesis y cicatrización de la glía (Logan, 1994, Yamashita, 1999). La regulación por incremento de la

expresión génica de TGF-beta 1 se extiende de 3 horas a 4 días después de isquemia prosencefálica transitoria (Zhu, 2000) hasta 15 días después de oclusión de la ACM permanente (Wang, 1995), y de 6 horas a 21 días después de la isquemia cerebral global (Lehrmann, 1995), respectivamente.

Los datos de estudios *in vivo* referentes a la administración intraarterial o intracerebroventricular de TGF-beta 1 mostraron que tanto el tratamiento antes (Gross, 1993) como después de la inducción de patología (Gross, 1994, McNeill, 1994) se asociaba a una reducción significativa de pérdida neuronal y tamaño del infarto de un modelo de conejo de accidente cerebrovascular tromboembólico o un modelo de rata de lesión cerebral hipóxica-isquémica grave, respectivamente. En isquemia global transitoria en ratas, Henrich-Noack y colaboradores pudieron mostrar una protección significativa de células CA1 piramidales por inyección intrahipocámpica de TGF-beta 1 antes de isquemia (Henrich-Noack, 1996). En ratones que expresan en exceso TGF-beta 1 después de la transferencia de genes adenovíricos, Pang y colaboradores (2001) demostraron una reducción del volumen de infarto asociada a una inhibición de la respuesta inflamatoria a la inclusión de la ACM en términos de infiltración reducida de leucocitos y monocitos/macrófagos en el tejido cerebral isquémico (Pang, 2001).

También se informaron niveles altamente elevados de ARNm de TGF-beta 1 para la penumbra isquémica en muestras de cerebro de víctimas de accidente cerebrovascular humano (Krupinski, 1996). Además, la potenciada expresión de varias isoformas de TGF-beta y de la proteína del receptor de tipo I en procesos reactivos que rodean lesiones cerebrales isquémicas se demostró en autopsia y material de biopsia humanos (Ata, 1997). Aunque los niveles en suero de TGF-beta 1 no fueron significativamente diferentes en pacientes con accidente cerebrovascular y voluntarios sanos, se ha informado de una estrecha correlación entre niveles de TGF-beta 1 y parámetros tanto clínicos como neurorradiológicos de lesión cerebral (Kim, 1996, Slevin, 2000, Stanzani, 2001).

La lesión cerebral traumática (LCT) experimental produce una necrosis rápida y significativa de tejido cortical en el sitio de lesión. En las siguientes horas y días, la lesión secundaria agrava la lesión primaria produciendo una significativa destrucción de tejido y disfunción neurológica (Faden, 1993). Las alteraciones en aminoácidos excitadores, el aumento del estrés oxidativo y el aumento de la apoptosis contribuyen a muerte neuronal progresiva tras LCT (resumido en (Sullivan, 2002) y ref. en su interior). Rimaniol y col. escribieron una producción bifásica de TGF-beta tras traumatismo cerebral, con un primer pico después de 30 min y un segundo pico 48 h después de la lesión (Rimaniol, 1995). Lindholm y col. mostraron un aumento de la producción de ARNm de TGF-beta 1 en la corteza cerebral de rata después de una lesión cerebral penetrante (Lindholm, 1992). En este documento argumentan que TGF-beta 1 expresado en el cerebro lesionado puede desempeñar una función en la regeneración nerviosa estimulando la producción de factor de crecimiento nervioso (NGF) y controlando el grado de proliferación de astrocitos y cicatrización. Logan y col. mostraron un aumento difuso de ARNm de TGF-beta 1 y proteína alrededor de herida cerebral por arma blanca a los 1, 2 y 3 días; 7 y 14 d después de la lesión, la distribución fue más localizada a la región de la cicatriz de la glía (Logan, 1992). Sugirieron usar antagonistas de TGF-beta 1 para limitar la patogénesis asociada a la deposición de matriz en la herida del SNC. Kriegelstein y col. mostraron que el efecto promotor de la supervivencia del factor neurotrófico derivado de la línea de células de la glía (GDNF) *in vivo* e *in vitro* requiere la presencia de TGF-beta (Kriegelstein, 1998). En un estudio muy reciente, Peterziel y col. demostraron que la sensibilidad de GDNF inducida por TGF-beta en neuronas es causada por el reclutamiento inducido por TGF-beta del receptor de GDNF anclado a glicosil-fosfatidil-inositol (GFR)alfa1 a la membrana plasmática (Peterziel, 2002).

TGF-beta está presente en placas amiloides seniles encontradas en el SNC y se expresa en exceso en cerebro de enfermedad de Alzheimer en comparación con controles (Finch, J. Cell Biochem 53 (1993), 314-322). TGF-beta participa en la patogénesis de enfermedad de Alzheimer (Wyss-Coray, Nature 389 (1997), 603-606; Flanders, Neurology 45(8) (1995), 1561-1569; van der Wal, Neuroreport 4 (1993), 69-72) por los siguientes motivos: acelera la deposición amiloide en un modelo animal de enfermedad de Alzheimer; es decir, ratones transgénicos que coexpresan TGF-beta 1 de ser humano y proteína precursora amiloide mutada (APP) (Finch, (1993) lugar citado; Wyss-Coray, (1997), lugar citado; Wyss-Coray, Ann. N.Y. Acad. Sci. 903 (2000), 317-323). TGF-beta acciona la expresión en exceso astrocítica de ARNm que codifica APP. A un nivel molecular, la activación de TGF-beta de complejos de proteínas Smad promueve la transcripción del gen de APP (Burton, Biochem. Biophys. Res. Commun. 295 (2002), 702-712; Burton, Biochem. Biophys. Res. Commun. 295 (2002), 713-723). Sin embargo, a diferencia, Wyss-Coray y colaboradores (2001) han mostrado que un aumento modesto en la producción de TGF-beta 1 de la astrogliá en ratones transgénicos ancianos que expresan beta-APP humana reduce significativamente el número de placas amiloides parenquimatosas y la carga de amiloide-beta cortical global y disminuye el número de neuritis distrófica (Wyss-Coray, Nat. Med. 7(5) (2001), 612-618). En ratones que expresan APP/TGF-beta 1 humano, amiloide-beta se acumuló sustancialmente en vasos sanguíneos cerebrales, pero no en placas parenquimatosas (Wyss-Coray, (2001) lugar citado). En casos de Alzheimer humano, la inmunorreactividad de amiloide-beta asociado a placas guardó una relación inversa con niveles de ARNm de amiloide-beta vascular y de TGF-beta 1 cortical. La reducción de placas parenquimatosas en ratones que expresan APP/TGF-beta 1 humano se asoció a una fuerte activación de la microglía y un aumento en mediadores inflamatorios. TGF-beta 1 recombinante estimuló la eliminación de amiloide-beta en cultivos de células de microglía (Wyss-Coray, (2001), lugar citado).

Sin embargo, la investigación sobre TGF-beta no cubrió efectos ambiguos o perjudiciales de TGF-beta, por último lugar, pero no por ello menos importante, desde la perspectiva de la terapia autoinmunitaria; TGF-beta se considera en la materia como una "espada de doble filo". Kiefer (1998), analizando la expresión de TGF-beta en EAE

monofásica de la rata Lewis, encontró pruebas de expresión temprana en linfocitos T, que posiblemente contribuyen al desarrollo de lesión inflamatoria, mientras que lo último que produce la expresión dentro de la microglía se sugirió que desempeñaba una función moduladora por disminución. Cuando líneas de linfocitos T murinos específicos de Ag y clones se cultivaron en presencia de TGF-beta, la función efectora de estas células autorreactivas y la formación de lesión desmielinizante tras la transferencia adoptiva en encefalomiелitis autoinmune experimental fueron sustancialmente potenciadas (Weinberg 1992). En otro modelo de EAE se mostró que los efectos de TGF-beta sobre la expresión de la enfermedad autoinmunitaria varían dependiendo del momento adecuado de tratamiento con respecto a la inducción de enfermedad. Inyecciones i.p. diarias de 0,2-2 µg de TGF-beta 1 o TGF-beta 2 en los días 5 a 9 después de la inmunización fueron altamente protectoras, mientras que inyecciones en los días 1-5 ó 9-13 no lo fueron. El tratamiento con TGF-beta en los días 5-9 previno la acumulación de linfocitos T en el cerebro y la médula espinal, como se ensayó en los días 15 a 20. Anti-TGF-beta aceleró y agravó EAE cuando se administró en los días 5 y 9, pero no en el día 12. Se concluyó que el efecto protector de TGF-beta es ejercido al nivel del órgano diana, SNC y/o su endotelio vascular, y que hubo una pequeña ventana de 4 días en los que TGF-beta ejerce su efecto protector (Santambrogio, 1993).

Se informó que ratones genéticamente elegidos como diana para expresar en exceso TGF-beta 1 bioactivo específicamente dentro de astrocitos mostraban un fenotipo con patología del SNC grave a altos niveles de expresión. Aunque los ratones transgénicos heterocigóticos sin manipular de una línea de bajo expresor no mostraron tales alteraciones, el aumento de la expresión de TGF-beta 1 en esta línea por activación de la astrogliа inducida por lesión o generación de descendencia homocigótica produjo el fenotipo anormal (Wyss-Coray, 95). La expresión en exceso de la astrogliа de TGF-beta 1 no se asoció a infiltración obvia del SNC por células hematógenas (Wyss-Coray, 1995). Sin embargo, estos ratones fueron más susceptibles a la inducción por EAE con inflamación del SNC más temprana y más grave. Por tanto, la expresión local de TGF-beta 1 dentro de la parénquima del SNC puede potenciar la infiltración de células inmunitarias e intensificar la alteración del SNC resultante de respuestas autoinmunitarias periféricamente desencadenadas (Wyss-Coray 1997). Una patología similar a enfermedad de Alzheimer con astrocitosis perivascular y deposición de amiloide en vasos sanguíneos cerebrales se observó en ratones mayores que expresan bajos niveles de TGF-beta activo transgénico (Wyss-Coray, 2000).

Diversas estrategias que fueron satisfactorias en modular EAE y que sugirieron TGF-beta como parte del efecto protector no demostraron ser eficaces o mostraron toxicidad considerable en ensayos clínicos. En un ensayo de fase 1 de etiqueta abierta de 11 pacientes con EM progresiva secundaria (PS) se evaluó la seguridad de TGF-beta 2 activo recombinante (Calabresi, 1998). Grupos de pacientes se trataron en un esquema de aumento de la dosis con 0,2 µg/kg, 0,6 µg/kg o 2,0 µg/kg. El tratamiento se administró i.v. tres veces a la semana durante cuatro semanas, a menos que se retirara antes. Una disminución reversible en la tasa de filtración glomerular se desarrolló en cinco pacientes (tres con 0,6 µg/kg, ambos con 2,0 µg/kg), anemia leve a moderada transitoria en siete, hipertensión en dos y una maculopatía en un paciente. La nefrotoxicidad y la anemia estuvieron probablemente relacionadas con el tratamiento con TGF-beta. No se observó ni un efecto beneficioso ni un efecto sobre los parámetros clínicos o de obtención de imágenes (Calabresi, 1998).

Estas indicaciones de efectos secundarios sistémicos redujeron considerablemente el interés en TGF-beta como herramienta terapéutica para EM (Calabresi 1998; Wiendl 2000). Además, en un ensayo clínico de fase III de inducción de terapia inmunológica de mielina oral en RRMS, ni los parámetros de desenlace clínico ni de RMN fueron significativamente diferentes entre pacientes tratados con mielina y con placebo (Panitch 97, Francis 97).

Sin embargo, también se ha mostrado que es considerablemente más difícil tratar EAE en curso por inducción de terapia inmunológica de la mucosa (discusión en Xu 2000) o el propio TGF-beta (discusión en Thorbecke 2000) que prevenir la enfermedad.

Aunque TGF-beta es una de las sustancias inhibidoras del crecimiento más potentes conocidas para la mayoría de los tipos de células, estimula la proliferación de fibroblastos y osteoblastos. También es un potente estimulador de la producción de matriz extracelular por fibroblastos y osteoblastos (Massague, 1987; Sporn, 1987), inhibe la degradación de matriz y regula por incremento receptores para la interacción con la matriz. TGF-beta 1 participa como factor causante clave en la patogénesis de fibrosis hepática (Border, 1994; Friedman, 1993) y al menos como un mediador crucial en los efectos tanto beneficiosos como perjudiciales de la ciclosporina A sobre el sistema inmunitario y el riñón (revisado en (Khanna, 1999)). Además, se ha mostrado que diversos trastornos de riñón fibrótico progresivos crónicos en seres humanos y modelos experimentales - glomerulares o tubulointersticiales - se asocian a estimulación del sistema de TGF-beta (Bitzer, 1998). La administración de un anticuerpo anti-TGF-beta neutralizante produjo la prevención de insuficiencia renal, el exceso de expresión génica de la matriz y la expansión de la matriz mesangial glomerular en ratones diabéticos db/db (Ziyadeh, 2000).

La regulación por incremento de TGF-beta crónica desempeña una función central en la acumulación progresiva de matriz e insuficiencia renal observada en nefropatía diabética (revisado en Sharma y McGowan, 2000). La patología de la administración sistémica multidosis de TGF-beta 1 humano recombinante en ratas y conejos se describió por Terrell (1993): se realizó un estudio piloto de 14 días en ratas usando rhTGF-beta 1 producido en células A293 humanas. Después de la administración de 1000 µg/kg i.v. dos ratas murieron después de 5 días. Las ratas restantes se sacrificaron en ese momento. Los grupos de dosis media y dosis baja recibieron 100 µg/kg y 10 µg/kg

i.v. diariamente durante 14 días, respectivamente. Los acontecimientos adversos fueron más sorprendentes en el grupo de dosis alta, pero se observaron cambios cualitativamente similares al nivel de dosis medio si bien es cierto que fueron menos graves y de aparición retardada. Además de ciertos cambios histopatológicos, las ratas mostraron una reducción del peso corporal (a partir del día 3) y un aumento de hematocrito en el día 3 con una disminución posterior. En la discusión de sus hallazgos, Terrell y asociados establecen que fue sorprendente la gravedad relativa y la rapidez con la que se producen algunos de los cambios observados - tanto clínicos como histopatológicos tales como la involución hepática y la enostosis - en las preparaciones de alta dosis (Terrell, 1993).

El uso de TGF-beta para la inmunomodulación en seres humanos está gravemente limitado por su toxicidad, que incluye estimulación excesiva de la producción de matriz, nefrotoxicidad y otros efectos perjudiciales. TGF-beta tiene potencial oncogénico y participa en glomerulopatías, fibrosis pulmonar, esclerodermia y enfermedad crónica de injerto frente a huésped. Además, aunque TGF-beta es una citocina inmunosupresora extremadamente potente, varias líneas de evidencia indica que la estimulación crónica de la expresión de TGF-beta - tanto en modelos animales relacionados con enfermedad como en transgénicos - puede conducir paradójicamente a o potenciar la inflamación autoinmunitaria.

Recientemente se ha presentado una posible explicación sugiriendo que la modulación por incremento de Smad7 conduce a una parálisis de la señalización de TGF-beta (Monteleone, 2001). El análisis *in vitro* llevado a cabo por Monteleone 2001 propone que el bloqueo de Smad7 puede ser beneficioso en enfermedad inflamatoria crónica del intestino, un trastorno ni relacionado con ni asociado a trastornos del SNC. Sin embargo, la enfermedad inflamatoria del intestino inmunológicamente crónica (EIIIC) se diferencia en muchos aspectos importantes de la inflamación autoinmunitaria del SNC. Mientras que el SNC está anatómicamente separado y protegido de la mayoría de las células en circulación y agentes exógenos por la barrera hematoencefálica que traspasan el llamado "privilegio inmunológico" del SNC, el intestino normal contiene un compartimento linfoide rico que mantiene una inflamación fisiológica inducida y sostenida por la flora entérica y los antígenos de la comida. El sistema inmunitario del intestino trabaja constantemente para inducir la terapia inmunológica en el individuo contra la comida ingerida y la flora entérica normal. Esta función está mediada por el tipo especial de reacciones inmunitarias inducidas en el intestino, está relacionada con la notable regulación por incremento de TGF-beta después de una exposición oral específica para antígeno (Gonnella 1998) y representa los antecedentes inmunológicos de "la inducción por tolerización oral" contra antígenos que inducen autoinmunidad de otros tejidos (tales como componentes de mielina) (Garside 2001). La inflamación fisiológica del intestino se transforma en inflamación destructiva persistente en enfermedad inflamatoria del intestino crónica (Fiocchi 1998). Por consiguiente, aunque las enfermedades inflamatorias del intestino crónicas se desarrollan en la superficie de separación regular entre el mundo externo y el sistema inmunitario y frecuentemente producen más manifestaciones sistémicamente (tales como trastornos de la coagulación) o en otros órganos tales como enfermedad de las articulaciones o de la piel, la inflamación autoinmunitaria y las manifestaciones de esclerosis múltiple están limitadas a un órgano más bien aislado, el SNC. Además, en ratones con genes inactivados de TGF-beta 1 se encontraron lesiones inflamatorias masivas en varios órganos, que incluyen colon, pero se observaron lesiones histológicas no significativas en cerebro (Kulkarni, 1993).

Steinbrecher y col., (2001, J. Immunol. vol. 166, páginas 2041-2048) se refiere a la elección como diana de dipeptidil-peptidasa IV (CD26) para suprimir la encefalomielitis autoinmune y regular por incremento la secreción de TGF-B1 *in vivo*.

Por tanto, mientras que la técnica anterior ha propuesto el uso de TGF-beta o una regulación por incremento de las rutas de señalización de TGF-beta para el tratamiento de infecciones, inflamaciones, o incluso la formación de tumores, una regulación por incremento sistémica correspondiente de TGF-beta tiene graves efectos secundarios como se han descrito en este documento anteriormente.

Hay una necesidad en la materia de desarrollar fármacos eficaces para el tratamiento de trastornos del SNC para terapia *in vivo*.

La solución a dicho problema técnico se logra por las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un inhibidor específico de la expresión o función de Smad7 para su uso en la prevención, mejora o tratamiento de esclerosis múltiple o isquemia cerebral, en el que dicho inhibidor específico se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos intracelulares o fragmentos de anticuerpos, aptámeros, intrámeros, ARNi (ARN bicatenario) y moléculas antisentido anti-Smad7.

La presente invención también se refiere al uso de un inhibidor específico de la expresión o función de Smad7 para la preparación de una composición farmacéutica para la prevención, mejora o tratamiento de esclerosis múltiple o isquemia cerebral, en el que dicho inhibidor específico se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos intracelulares o fragmentos de anticuerpos, aptámeros, intrámeros, ARNi (ARN bicatenario) y moléculas antisentido anti-Smad7.

Según la presente invención, se ha encontrado sorprendentemente que la neutralización o antagonización de Smad7 restaura y/o modifica positivamente las rutas de señalización de TGF-beta en células en el sistema nervioso sin los efectos secundarios del tratamiento con TGF-beta. Por tanto, una intervención médica que comprende

antagonistas/inhibidores de Smad7 como se describen en este documento es terapéuticamente beneficiosa en el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso, en particular de trastornos neurodegenerativos, enfermedades autoinmunitarias como se describen en este documento, traumatismo o de accidente cerebrovascular. La intervención médica y terapéutica como se describe en este documento no está sorprendentemente asociada a la toxicidad perjudicial en diversos órganos que se ha documentado en la técnica anterior que están afectados por el tratamiento sistémico con TGF-beta.

Los ejemplos adjuntos documentan claramente la supresión sistémica beneficiosa de Smad7 que conduce a una mejora significativa de enfermedades del SNC, en particular de enfermedades autoinmunitarias, como esclerosis múltiple (EM), además de afecciones en las que una respuesta inflamatoria hace una contribución secundaria a la lesión de tejido o reparación tal como traumatismo o accidente cerebrovascular (isquémico).

Sin quedar ligado a teoría, se prevé que rutas como la transducción de señales de TGF-beta (BMP)-Smad, la elección como diana de receptores de TGF-beta (BMP) para la degradación proteolítica por rutas de Smurf/ubiquitina ligasa o la modulación nuclear (o citoplásmica) de eventos de transcripción estén positivamente moduladas por el uso de inhibidores/antagonistas de Smad7 como se describe en este documento.

Los términos "tratamiento", "tratar" y similares se usan en este documento para significar generalmente obtener un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir completamente o parcialmente una enfermedad o síntoma de la misma y/o puede ser terapéutico en términos de curar parcialmente o completamente una enfermedad y/o efecto adverso atribuido a la enfermedad. El término "tratamiento" como se usa en este documento cubre cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, particularmente un ser humano, e incluye: (a) prevenir que se produzca la enfermedad en un sujeto que puede tener predisposición a la enfermedad, pero al que todavía no se le ha diagnosticado que la tiene; (b) inhibir la enfermedad, es decir, detener su desarrollo; o (c) aliviar la enfermedad, es decir, causando la regresión de la enfermedad.

El inhibidor/antagonista específico que va a emplearse en el contexto de la presente invención puede comprender moléculas de Smad7 truncadas y/o mutadas que interfieren con Smad7 y que así inhiben la función de Smad7.

Las moléculas inhibitoras para Smad7 pueden deducirse mediante procedimientos en la materia. Tales procedimientos comprenden, por ejemplo, pero no se limitan a, procedimientos en los que una colección de sustancias se prueba para la interacción con Smad7 o con (a) fragmento(s) de la misma y en los que las sustancias que dan positivo para la interacción en un sistema de lectura correspondiente se prueban adicionalmente *in vivo*, *in vitro* o por ordenador para sus efectos inhibidores sobre la expresión o función de Smad7.

Dicha "prueba para la interacción de Smad7" del procedimiento anteriormente descrito puede llevarse a cabo por ensayos inmunológicos, de biología molecular y/o bioquímicos específicos que son muy conocidos en la técnica y que comprenden, por ejemplo, ensayos homogéneos y heterogéneos como se describen en este documento más adelante.

Dichos ensayos de interacción empleando sistemas de lectura son muy conocidos en la técnica y comprenden, entre otros, cribados de dos híbridos (como se describe, entre otros, en los documentos EP0 963 376, WO 98/25947, WO 00/02911), columnas de captura GST, ensayos de co-precipitación de extractos de células como se describen, entre otros, en Kasus-Jacobi, Oncogene 19 (2000), 2052-2059, sistemas de "trampa de interacción" (como se describen, entre otros, en el documento US 6.004.746), clonación de la expresión (por ejemplo lambda gt10), expresión en fago (como se describe, entre otros, en el documento US 5.541.109), ensayos de unión *in vitro* y similares. Otros procedimientos de ensayo de interacción y sistemas de lectura correspondientes se describen, entre otros, en los documentos US 5.525.490, WO 99/51741, WO 00/17221, WO 00/14271, WO 00/05410, o ensayos de cuatro híbridos de levadura como se describen en Sandrok & Egly, JBC 276 (2001), 35328-35333.

Dichos ensayos de interacción para Smad7 también comprenden ensayos para ensayos de FRET, TR-FRET (en "A homogeneous time resolved fluorescence method for drug discovery" en: High throughput screening: the discovery of bioactive substances. Kolb, (1997) J. Devlin. NY, Marcel Dekker 345-360) o ensayos comercialmente disponibles como "Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay", BioSignal Packard. Además, el sistema de 2 híbridos de levadura (Y2H) puede emplearse para elucidar interacción más particular y específica, componentes de asociación de Smad7. Dichos componentes de interacción/asociación se criban adicionalmente para sus efectos inhibidores.

Similarmente, las moléculas interactuantes, (por ejemplo), (poli)péptidos pueden deducirse por técnicas basadas en células muy conocidas en la técnica. Estos ensayos comprenden, entre otros, la expresión de construcciones de indicadores o ensayos de "inactivación de genes" como se describen, por ejemplo, para la identificación de fármacos/compuestos pequeños que influyen en la expresión (génica) de Smad7. Dichos ensayos de "inactivación" pueden comprender "la inactivación de genes" de Smad7 (o (un) fragmento(s) de los mismos) en células de cultivo de tejido, además de en animales (transgénicos). Ejemplos de "inactivaciones" satisfactorias se conocen en la técnica (véanse, entre otros, Tanaka, J. Neurobiol. 41 (1999), 524-539 o Monroe, Immunity 11 (1999), 201-212). Además, pueden emplearse ensayos bioquímicos que comprenden, pero no se limitan a, unión de Smad7 (o (un) fragmento(s) de la misma) a otras moléculas/(poli)péptidos, péptidos o unión de Smad7 (o (un) fragmento(s) de la

misma) consigo mismo (dimerizaciones, oligomerizaciones, multimerizaciones) y ensayar dichas interacciones por, entre otros, ensayo de proximidad de centelleo (SPA) o ensayo de fluorescencia resuelta en el tiempo homogénea (HTRFA).

Dicha "prueba de interacción" también puede comprender la medición de una formación de complejo. La medición de una formación de complejo es muy conocida en la técnica y comprende, entre otros, ensayos heterogéneos y homogéneos. Los ensayos homogéneos comprenden ensayos en los que los componentes de unión permanecen en disolución y comprenden ensayos como ensayos de aglutinación. Los ensayos heterogéneos comprenden ensayos como, entre otros, inmunoensayos, por ejemplo, ELISA, RIA, IRMA, FIA, CLIA o ECL.

Como se trata más adelante, la interacción de las moléculas de inhibición de proteína Smad7 ARNm y Smad7 o fragmentos de las mismas también puede probarse por procedimientos de biología molecular como ensayos de dos, tres o cuatro híbridos, ensayos de protección de ARN, transferencias Northern, transferencias Western, matrices de micromatrices, macromatrices y matrices de proteínas o anticuerpos, ensayos de transferencia puntual, hibridación e inmunohistoquímica *in situ*, PCR cuantitativa, coprecipitación, transferencia Western usando una proteína marcada, clonación de expresión basada en fago, mediciones de resonancia de plasmones superficiales, cribado de un híbrido de levadura, ADNsa I, análisis de huellas dactilares, ensayos de unión a ADN con desplazamiento de la movilidad, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de afinidad, inmunoprecipitación, electroforesis en gel uni- o bidimensional, tecnologías de aptámeros, además de síntesis de alto rendimiento y procedimientos de cribado.

Se espera que los compuestos identificados y/u obtenidos según el (los) procedimiento(s) anteriormente descrito(s), en particular inhibidores de Smad7 o (un) fragmento(s) de la misma, sean muy beneficiosos como agentes en entornos farmacéuticos desvelados en este documento y que van a usarse para fines médicos, en particular, en el tratamiento de los trastornos del SNC descritos en este documento.

Los compuestos que pueden funcionar como inhibición específica de Smad7 también comprenden compuestos orgánicos (pequeños), como los compuestos que pueden usarse según la presente invención que incluyen, entre otros, péptido, proteínas, ácidos nucleicos que incluyen bibliotecas de expresión de ADNc, compuestos orgánicos pequeños, ligandos, PNA y similares. Dichos compuestos también pueden ser derivados o análogos funcionales. Los procedimientos para la preparación de derivados y análogos químicos son muy conocidos para aquellos expertos en la materia y se describen en, por ejemplo, Beilstein, "Handbook of Organic Chemistry", Springer Edition New York, o en "Organic Synthesis", Wiley, New York. Además, dichos derivados y análogos pueden probarse para sus efectos, es decir, sus efectos inhibidores de Smad7 según procedimientos conocidos en la técnica. Además, pueden usarse peptidomiméticos y/o el diseño asistido por ordenador de inhibidores apropiados de Smad7. Sistemas por ordenador apropiados para el diseño asistido por ordenador de, por ejemplo, proteínas y péptidos se describen en la técnica anterior, por ejemplo, en Berry, Biochem. Soc. Trans. 22 (1994), 1033-1036; Wodak, Ann. N. Y. Acad. Sci. 501 (1987), 1-13; Pabo, Biochemistry 25 (1986), 5987-5991. Los resultados obtenidos del análisis por ordenador anteriormente descrito pueden usarse en combinación con el procedimiento de la invención para, por ejemplo, optimizar compuestos, sustancias o moléculas conocidas. Compuestos apropiados también pueden identificarse por la síntesis de bibliotecas combinatorias de peptidomiméticos mediante modificación química sucesiva y prueba de los compuestos resultantes, por ejemplo, según los procedimientos descritos en este documento. Los procedimientos para la generación y uso de bibliotecas combinatorias de peptidomiméticos se describen en la técnica anterior, por ejemplo, en Ostresh, Methods in Enzymology 267 (1996), 220-234 y Dorner, Bioorg. Med. Chem. 4 (1996), 709-715. Además, la estructura tridimensional y/o cristalográfica de inhibidores de Smad7 puede usarse para el diseño de inhibidores (de peptidomiméticos) de Smad7 (Rose, Biochemistry 35 (1996), 12933-12944; Rutenber, Bioorg. Med. Chem. 4 (1996), 1545-1558).

Como se ha mencionado anteriormente en este documento, el inhibidor de la expresión o función de Smad7 también puede comprender un aptámero.

En el contexto de la presente invención, el término "aptámero" comprende ácidos nucleicos tales como ARN, ADNmc (mc = monocatenario), ARN modificado, ADNmc modificado o PNA que se unen a una pluralidad de secuencias diana que tienen una alta especificidad y afinidad. Los aptámeros son muy conocidos en la técnica y, entre otros, se describen en Famulok, Curr. Op. Chem. Biol. 2 (1998), 320-327. La preparación de aptámeros es muy conocida en la técnica y puede implicar, entre otros, el uso de bibliotecas de ARN combinatorias para identificar sitios de unión (Gold, Ann. Rev. Biochem. 64 (1995), 763-797).

Por consiguiente, los aptámeros son oligonucleótidos derivados de un procedimiento de evolución *in vitro* llamado SELEX (evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial). Los conjuntos de ARN aleatorizado o secuencias de ADN monocatenario se seleccionan contra ciertas dianas. Las secuencias de unión más estrecha con las dianas se aíslan y se amplifican. La selección se repite usando el conjunto enriquecido derivado de la primera ronda de selección. Varias rondas de este procedimiento conducen a la obtención de secuencias que se llaman 'aptámeros' o 'ligandos'. Se han desarrollado aptámeros para unirse a proteínas que están asociadas a varios estados de enfermedad. Usando este procedimiento pueden encontrarse muchos poderosos antagonistas de tales proteínas. Normalmente es necesario modificar los aptámeros con el fin de que estos antagonistas funcionen en modelos animales de enfermedad y en seres humanos. En primer lugar, las modificaciones de azúcares de trifosfatos de nucleósidos son necesarias para hacer que los aptámeros resultantes sean resistentes a nucleasas

encontradas en el suero. El cambio de los grupos 2'OH de ribosa a grupos 2'F o 2'NH₂ da aptámeros que tienen larga vida en la sangre. El peso molecular relativamente bajo de los aptámeros (8000-12000) conduce a una rápida eliminación de la sangre. Los aptámeros pueden mantenerse en la circulación de horas a días conjugándolos con vehículos de mayor peso molecular. Cuando se modifican, los aptámeros conjugados se inyectan en animales, inhiben las funciones fisiológicas conocidas por asociarse a sus proteínas diana. Los aptámeros pueden administrarse sistémicamente a animales y seres humanos para tratar enfermedades específicas de órgano (Ostendorf, 2001). El primer aptámero que ha avanzado a estudios clínicos de fase I es NX-1838, un inhibidor de la angiogénesis inyectable que puede usarse posiblemente para tratar ceguera inducida por degeneración macular (Sun, 2000). La expresión citoplasmática de aptámeros ("intrámeros") puede usarse para inhibir dianas intracelulares (Blind, 1999; Mayer, 2001). También se prevé que dichos intrámeros se empleen en el contexto de la presente invención.

Dichos (otros) receptores de Smad7 pueden derivarse, por ejemplo, de (un) anticuerpo(s) contra Smad7 por peptidomiméticos. La especificidad del reconocimiento implica que otras proteínas conocidas, moléculas no estén unidas. Además, los receptores de Smad7 que pueden funcionar en el contexto de la presente invención son SARA (Wu, 2000), STRAP (Datta, 2000), receptores de TGF-beta o BMP o Smad2 (Kavasaki, 2000). En particular se prevé que se empleen los fragmentos de péptidos de tales receptores de Smad7 "naturales".

El enfoque de ARNi también se prevé en el contexto de la presente invención para su uso en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedades del SNC desveladas en este documento.

El término ARN interferente (ARNi) describe el uso de ARN bicatenario para elegir como diana ARNm específicos para la degradación, silenciándose así su expresión. El ARN bicatenario (ARNbc) que coincide con una secuencia génica se sintetiza *in vitro* y se introduce en una célula. El ARNbc se alimenta en un proceso natural, pero sólo parcialmente entendido, que incluye la nucleasa altamente conservada Dicer (Hutvagner, 2001; Grishok, 2001), que escinde moléculas precursoras de ARNbc en ARN interferente pequeño (ARNip). La generación y preparación de ARNip, además del procedimiento para inhibir la expresión de un gen diana, se describe, entre otros, en el documento WO 02/055693, Wei (2000) Dev. Biol. 15, 239-255; La Count (2000), Biochem. Paras. 111, 67-76, Baker (2000) Curr. Biol. 10, 1071-1074, Svoboda (2000), Development 127, 4147-4156 o Marie (2000) Curr. Biol. 10, 289-292. Estos ARNip forman entonces la parte de secuencia específica de un complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC), una nucleasa multicomplejo que destruye ARN mensajero homólogo al desencadenante de silenciamiento. Una parte de proteína del complejo de ribonucleoproteína se ha identificado como Argonaute2 (Hammond, 2001). Elbashir (2001) mostró que los dúplex de ARN de 21 nucleótidos pueden usarse en cultivo celular para interferir con la expresión génica en células de mamífero.

Los procedimientos para deducir y construir ARNip están en la materia y se describen en Elbashir y col., 2002, en los sitios web de internet de vendedores comerciales de ARNip, por ejemplo Xeragon Inc. (www.xeragon.com/siRNAsupport.html); Dharmacon (www.dharmacon.com); Xeragon Inc. (www.xeragon.com) y Ambion (www.ambion.com), o en el sitio web del grupo de investigación de Tom Tuschl (<http://www.mpibpc.gwdg.de/abteilungen/100/105/sirna.html>). Además, están disponibles programas en línea para deducir ARNip de una secuencia de ARNm dada (por ejemplo <http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNAfinder.html> o <http://katahdin.cshl.org:9331/RNAi/>). Estos se usaron para deducir las moléculas de ARNip enumeradas más adelante (ARNi 1-20, SEC ID N°: 44-83). Los residuos de uridina en el nucleótido protuberante de 3' de 2 nt pueden reemplazarse por 2'-desoxitimidina sin pérdida de actividad, que reduce significativamente los costes de la síntesis de ARN y también pueden potenciar la resistencia de dúplex de ARNip cuando se aplican a células de mamífero (Elbashir, 2001). Esta modificación también se incorpora en citar la SEC ID 44-83 (véase más adelante) de la presente solicitud. Los ARNip también pueden sintetizarse enzimáticamente usando T7 u otras ARN polimerasas (Donze, 2002). Los dúplex de ARN pequeño que median en el ARN interferente eficaz (ARNipe) también pueden producirse mediante hidrólisis con ARNasa III de *Escherichia coli* (Yang, 2002) Además, se han desarrollado vectores de expresión para expresar ARNip bicatenarios conectados por pequeños bucles de ARN de horquilla en células eucariotas (por ejemplo (Brummelkamp, 2002)). Todas estas construcciones pueden desarrollarse con la ayuda de los programas nombrados anteriormente. Además, las herramientas de predicción de secuencias comercialmente disponibles incorporadas en los programas de análisis de secuencias o vendidas por separado, por ejemplo, la herramienta siRNA Design ofrecida por www.oligoEngine.com (Seattle, WA), pueden usarse para la predicción de secuencias de ARNip.

Por consiguiente, la presente invención también proporciona el uso de ARN interferentes específicos como inhibidores de la expresión y/o función de Smad7. Preferentemente, dichos ARN interferentes (pequeños) (ARNip) comprenden al menos 10, más preferentemente al menos 12, más preferentemente al menos 14, más preferentemente al menos 16, más preferentemente al menos 18 nucleótidos. En una realización preferida particular, estos ARNip se seleccionan del grupo que consiste en

ARNi1:	nt 298-318	5'-GUUCAGGACCAAACGAUCUGC-3', (SEC ID N°: 44)
	nt 318-296	5'-GCAGAUCCGUUUGGUCCUGAACAU-3', (SEC ID N°: 45)
ARNi2:	nt 578-598	5'-CUCACGCACUCGGUGCUCAAG-3', (SEC ID N°: 46)
	nt 598-576	5'-CUUGAGCACCGAGUGCGUGAGCG-3', (SEC ID N°: 47)
ARNi3:	nt 209-227	5'-CUCGGCGCCCGACUUCUUCuu-3', (SEC ID N°: 48)
	nt 227-207	5'-GAAGAAGUCGGGCGCCGAGUU-3', (SEC ID N°: 49)
ARNi4:	nt 266-284	5'-ACGACUUUUCUCCUCGCCUuu-3', (SEC ID N°: 50)
	nt 284-264	5'-AGGCGAGGAGAAAAGUCGUUU-3', (SEC ID N°: 51)
ARNi5:	nt 310-328	5'-ACGAUCUGCGCUCGUCCGGuu-3', (SEC ID N°: 52)
	nt 328-308	5'-CCGGACGAGCGCAGAUCCGUUU-3', (SEC ID N°: 53)
ARNi6:	nt 574-592	5'-GGCGCUCACGCACUCGGUGuu-3', (SEC ID N°: 54)
	nt 592-572	5'-CACCGAGUGCGUGAGCGCCUU-3', (SEC ID N°: 55)
ARNi7:	nt 607-625	5'-GGAGCGGCAGCUGGAGCUGuu-3', (SEC ID N°: 56)
	nt 625-605	5'-CAGCUCCAGCUGCCGCUCCUU-3', (SEC ID N°: 57)
ARNi8:	nt 778-796	5'-AGUGUUCAGGUGGCCGGAUuu-3', (SEC ID N°: 58)
	nt 796-776	5'-AUCCGGCCACCUGAACACUuu-3', (SEC ID N°: 59)
ARNi9:	nt 815-833	5'-GUCAAGAGGCUGUGUUGCUuu-3', (SEC ID N°: 60)
	nt 833-813	5'-AGCAACACAGCCUCUUGACUU-3', (SEC ID N°: 61)
ARNi10:	nt 820-838	5'-GAGGCUGUGUUGCUGUGAAuu-3', (SEC ID N°: 62)
	nt 838-818	5'-UUCACAGACACACAGCCUCUU-3', (SEC ID N°: 63)
ARNi11:	nt 839-857	5'-UCUUACGGGAAGAUAACCUu-3', (SEC ID N°: 64)
	nt 857-837	5'-GGUUGAUUUUCCCGUAAGAUU-3', (SEC ID N°: 65)
ARNi12:	nt 850-868	5'-GAUCAACCCCGAGCUGGUGuu-3', (SEC ID N°: 66)
	nt 868-848	5'-CACCAGCUCGGGUGUUAUCUU-3', (SEC ID N°: 67)
ARNi13:	nt 856-874	5'-CCCCGAGCUGGUGUGCUGuu-3', (SEC ID N°: 68)
	nt 874-854	5'-GCAGCACACCAGCUCGGGGUU-3', (SEC ID N°: 69)
ARNi14:	nt 1008-1026	5'-CGAAUUAUCUGGCCCCUGGuu-3', (SEC ID N°: 70)
	nt 1026-1006	5'-CCAGGGGCCAGAUAAUUCGUU-3', (SEC ID N°: 71)
ARNi15:	nt 1046-1064	5'-CUUCUUCUGGAGCCUGGGGuu-3', (SEC ID N°: 72)
	nt 1064-1044	5'-CCCCAGGCUCCAGAAGAAGUU-3', (SEC ID N°: 73)
ARNi16:	nt 1177-1195	5'-UGGCUUUUGCCUCGGACAGuu-3', (SEC ID N°: 74)
	nt 1195-1175	5'-CUGUCCGAGGCAAAAGCCAUU-3', (SEC ID N°: 75)
ARNi17:	nt 1201-1219	5'-UUCGGACAACAAGAGUCAGuu-3', (SEC ID N°: 76)
	nt 1219-1199	5'-CUGACUCUUGUUGUCCGAAUU-3', (SEC ID N°: 77)
ARNi18:	nt 1297-1315	5'-CCGCAGCAGUUACCCCAUCuu-3', (SEC ID N°: 78)
	nt 1315-1295	5'-GAUGGGGUAACUGCUGCGGUU-3', (SEC ID N°: 79)
ARNi19:	nt 1324-1342	5'-GUCCGCCACACUGGACAACuu-3', (SEC ID N°: 80)
	nt 1342-1322	5'-GUUGUCCAGUGUGCGGACUU-3', (SEC ID N°: 81)
ARNi20:	nt 1342-1360	5'-CCCGGACUCCAGGACGCUGuu-3', (SEC ID N°: 82)
	nt 1360-1340	5'-CAGCGUCCUGGAGUCCGGGUU-3', (SEC ID N°: 83)

Los ARNi se usan en combinaciones por pares. Los pares anteriores comprenden SEC ID N°: 44 combinada con SEC ID N°: 45 (ARNi1), y SEC ID N°: 46 combinada con SEC ID N°: 47 (ARNi2), y son útiles para el tratamiento de pacientes humanos. Pares adicionales previstos son: SEC ID N°: 48 combinada con SEC ID N°: 49, SEC ID N°: 50 combinada con SEC ID N°: 51, SEC ID N°: 52 combinada con SEC ID N°: 53, SEC ID N°: 54 combinada con SEC ID N°: 55, SEC ID N°: 56 combinada con SEC ID N°: 57, SEC ID N°: 58 combinada con SEC ID N°: 59, SEC ID N°: 60 combinada con SEC ID N°: 61, SEC ID N°: 62 combinada con SEC ID N°: 63, SEC ID N°: 64 combinada con SEC ID N°: 65, SEC ID N°: 66 combinada con SEC ID N°: 67, SEC ID N°: 68 combinada con SEC ID N°: 69, SEC ID N°: 70 combinada con SEC ID N°: 71, SEC ID N°: 72 combinada con SEC ID N°: 73, SEC ID N°: 74 combinada con SEC ID N°: 75, SEC ID N°: 76 combinada con SEC ID N°: 77, SEC ID N°: 78 combinada con SEC ID N°: 79, SEC ID N°: 80 combinada con SEC ID N°: 81, SEC ID N°: 82 combinada con SEC ID N°: 83.

Como se ilustra en los ejemplos adjuntos, los ARNi son un potente enfoque en el tratamiento de trastornos del SNC.

Además, los procedimientos novedosos para identificar moléculas útiles para inhibir ARN de smad7 o ARN/proteína de Smad7 (complejos de Smad7-RNP), que incluyen resonancia magnética nuclear (RMN) y ensayos de unión por fluorescencia, se han resumido en (Hermann, 2000) y (DeJong, 2002), y en las referencias citadas en su interior.

El componente de unión o receptor intracelular de la expresión y/o función de Smad7 es un anticuerpo intracelular.

Los anticuerpos intracelulares se conocen en la técnica y pueden usarse para neutralizar o modular la actividad funcional de la molécula diana. Este enfoque terapéutico se basa en la expresión intracelular de fragmentos de anticuerpos recombinantes, tanto Fab como Fv monocatenario, elegidos como diana para el compartimento celular deseado usando secuencias que eligen diana apropiadas (resumido en Teillaud, 1999).

- 5 Como se ha mencionado anteriormente en este documento, el inhibidor de la expresión y/o función de Smad7 es preferentemente una molécula antisentido. Preferentemente, dicha molécula antisentido anti-Smad7 comprende una molécula de ácido nucleico que es la cadena complementaria de una cadena complementaria inversa de la región codificante de Smad7.

- 10 Regiones codificantes de Smad7 se conocen en la técnica y comprenden, entre otras, las entradas en GenBank para Smad7 para Smad7 de ratón NM_008543, AJ00551, AJ000550, las secuencias de rata de Smad7 NM_030858, AH008243, AF156730, AF156729, AF156728, AF156727, AF156726, AF042499 o las entradas de secuencias de Smad7 humana en GenBank como XM_033746, XM_008803, AF015261 o AF010193. El experto en la materia puede deducir fácilmente la región codificante relevante de Smad7 en estas entradas de GenBank, que también pueden comprender la entrada de ADN genómico, además de ARNm/ADNc.

- 15 Además, también se prevé que las moléculas antisentido contra la expresión o función de Smad7 interfieran específicamente con regiones promotoras de Smad7. Tales regiones promotoras se conocen en la técnica y comprenden, entre otras, las entradas de GenBank AF254791 (humano), AF156731 (humano) o AF188834 (ratón).

- 20 Se prevé que las moléculas antisentido que van a usarse según la presente invención inhiban la expresión o función de Smad7, en particular de Smad7 humana, e interaccionen con Smad7 como se expresa por las regiones codificantes, ARNm/ADNc como se deposita bajo los números de acceso de GenBank anteriormente mencionados, además de con Smad7 como se expresa por isoformas y variantes de dicha Smad7. Dichas isoformas o variantes pueden comprender, entre otras, variantes alélicas o variantes de corte y empalme.

- 25 El término "variante" significa en este contexto que la secuencia de nucleótidos de Smad7 y la secuencia de aminoácidos de Smad7 codificada, respectivamente, se diferencian de las distintas secuencias disponibles bajo dichos números de acceso de GenBank por mutaciones, por ejemplo, delección, adiciones, sustituciones, inversiones etc.

- 30 Por tanto, la molécula antisentido que va a emplearse según la presente invención interactúa específicamente con/se hibrida con una o más moléculas de ácidos nucleicos que codifican Smad7. Preferentemente, dicha molécula de ácido nucleico es ARN, es decir, pre-ARNm o ARNm. El término "interactúa específicamente con/se hibrida con una o más moléculas de ácidos nucleicos que codifican Smad7" se refiere a, en el contexto de la presente invención, moléculas antisentido que pueden interferir con la expresión de Smad7. Como se ilustra en los ejemplos adjuntos, construcciones antisentido como "Smad7-mut4-as" (una construcción antisentido que comprende 4 mutaciones) no puede interaccionar específicamente con y/o hibridarse con una o más secuencias de ácidos nucleicos que codifican Smad7. Por consiguiente, construcciones antisentido anti-Smad7 altamente mutadas, que no pueden hibridarse con o interaccionar específicamente con moléculas de ácidos nucleicos que codifican Smad7, no van a emplearse en los usos de la presente invención. El experto en la materia puede deducir fácilmente si una construcción antisentido interactúa específicamente con/se hibrida con secuencias codificantes de Smad7. Estas pruebas comprenden, pero no se limitan a, ensayos de hibridación, ensayos de protección de RNasa, transferencias Northern, transferencias North-Western, resonancia magnética nuclear y ensayos de unión por fluorescencia, transferencias puntuales, micro y macromatrices y PCR cuantitativa. Además, un cribado tal puede no limitarse a moléculas de ARNm de Smad7, pero también puede incluir complejos de ARNm/proteína de Smad7 (RNP) (Hermann, 2000; DeJong y col., 2002). Además, se prevé que las pruebas funcionales que se han proporcionado en los ejemplos adjuntos prueben si una construcción antisentido particular puede interaccionar específicamente con/hibridarse con las moléculas de ácidos nucleicos que codifican Smad7. Estos ensayos funcionales comprenden ensayos de activación de linfocitos T *in vitro*; véase, entre otros, el Ejemplo 11. Estas pruebas funcionales también pueden incluir transferencias Western, inmunohistoquímica, ensayo de inmunoprecipitación y bioensayos basados en promotores sensibles a TGF-beta.

- 45 Sin embargo, como también se ha documentado en los ejemplos adjuntos, construcciones antisentido mutadas y/o modificadas también pueden emplearse según la presente invención, siempre que dichas construcciones antisentido mutadas y/o modificadas puedan interaccionar específicamente con y/o hibridarse con las secuencias codificantes de Smad7.

- 55 Las moléculas antisentido de Smad7 se han descrito en la técnica anterior. Por ejemplo, el documento US 6.159.697 describe compuestos antisentido que comprenden tales moléculas antisentido. Sin embargo, el documento US 6.159.697 emplea dichos compuestos en el tratamiento de enfermedades que están asociadas a la expresión de Smad7. A diferencia, la presente invención proporciona una intervención médica/terapéutica específica en la que no va a tratarse ninguna enfermedad/afección asociada a la expresión de Smad7, pero sí trastornos específicos del sistema nervioso central en los que se mostró que la administración sistémica de TGF-beta era perjudicial.

El término "molécula antisentido" como se usa en este documento comprende en particular oligonucleótidos antisentido. Dichos oligonucleótidos antisentido también pueden comprender nucleótidos modificados, además de

enlace internucleosídico modificado, como se ha descrito, entre otros, en el documento US 6.159.697.

Lo más preferentemente, los oligonucleótidos antisentido de la presente invención comprenden al menos 8, más preferentemente al menos 10, más preferentemente al menos 12, más preferentemente al menos 14, más preferentemente al menos 16 nucleótidos. La deducción, además de la preparación, de moléculas antisentido es muy conocida en la técnica. La deducción de moléculas antisentido se ha descrito, entre otros, en Smith, 2000. Procedimientos usuales son "desplazamiento a través del gen", mapeo con ARNasa H, mapeo con ARNasa L (Leaman y Cramer, 1999), matrices de oligonucleótidos combinatorias sobre soporte sólido, determinación del análisis de estructuras secundarias por procedimientos computacionales (Walton, 2000), oligonucleótidos de aptámeros elegidos como diana para ácidos nucleicos estructurados (aptastruc), sondas de oligonucleótidos unidas, oligonucleótidos formadores de tríplex de repliegue (FTFO) (Kandimalla, 1994) y selección de secuencias con unión no específica minimizada (Han, 1994).

Preferentemente, las moléculas antisentido de la presente invención están estabilizadas contra la degradación. Tales procedimientos de estabilización se conocen en la técnica y se han descrito, entre otros, en el documento US 6.159.697. Más procedimientos descritos para proteger los oligonucleótidos de la degradación incluyen oligonucleótidos unidos por puentes por ligadores (Vorobjev, 2001), moléculas mínimamente modificadas según la actividad de nucleasa celular (Samani, 2001), oligonucleótidos 2'O-DMAOE (Prakash, 2001), 3'5'-dipeptidiloligonucleótidos (Schwope, 1999), H-fosfonatos y fosfonamiditos de metiluridina y 5-metiluridina/citidina en 3' (An, 2001), además de encapsulación en liposomas aniónicos (De Oliveira, 2000) o aminolípidos ionizables (Semple, 2001).

En una realización preferida de la invención, la molécula antisentido es una molécula de ácido nucleico que es la cadena complementaria de una cadena complementaria inversa de la región codificante de Smad7 seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 3 o SEC ID N°: 5. Las secuencias como se representa en SEC ID N°: 1, 3 ó 5 representan regiones codificantes ilustrativas (ARNm) de Smad7 humana, de ratón o de rata. Las SEC ID N°: 2, 4 y 6 representan Smad7 traducida de humano, ratón o rata, respectivamente. Por consiguiente, en el contexto de la presente invención y como se ha enfatizado en este documento anteriormente, los inhibidores de Smad7 que van a emplearse en los usos descritos en este documento interactúan preferentemente con regiones promotoras y/o codificantes de moléculas de ácidos nucleicos que codifican o conducen a la expresión de moléculas de Smad7 o mostradas en SEC ID N°: 2, 4 ó 6. También se prevé que, por ejemplo, las construcciones antisentido diseñadas y usadas según la presente invención inhiban la expresión de homólogos, variantes (por ejemplo, variantes alélicas) o isoformas funcionales de moléculas de Smad7 como se muestra en SEC ID N°: 2, 4 ó 6.

En el contexto de la presente invención, el término "región codificante de Smad7" comprende no sólo la región traducida de CDS de Smad7, sino que también comprende regiones sin traducir. Por consiguiente, la molécula antisentido anti-Smad7 que va a usarse y emplearse según la presente invención puede ser moléculas antisentido que se unen a/interactúan con secuencias de ARNm que comprenden región sin traducir. Por consiguiente, la "región codificante de Smad7" como se representa en SEC ID N°: 1, 3 y 5 comprende las secuencias de ARNm completas de Smad7.

En una realización más preferida de la presente invención, la molécula antisentido anti-Smad7 que va a emplearse en los usos de la invención o los procedimientos descritos en este documento se selecciona de una molécula de ácido nucleico como se muestra en la siguiente Tabla:

Preferentemente, los oligonucleótidos antisentido para Smad7, derivados de secuencias de ratón (dirección 5'-3'), son:

cttcggctgccccaccg	(SEC ID N°: 7)	NM_008543, nt 1179-1196, 5'UT
atcggttggtcctgaacat	(SEC ID N°: 8)	NM_008543, nt 1437-1455, cds
ccctcctcctcgtcctcg	(SEC ID N°: 9)	NM_008543, nt 1499-1516, cds
gtcgcccttctccccgcag	(SEC ID N°: 10)	NM_008543, nt 1545-1564, cds
gccgtccgtcgcccccttc	(SEC ID N°: 11)	NM_008543, nt 1554-1571, cds
agcaccgagtgctgagc	(SEC ID N°: 12)	NM_008543, nt 1718-1735, cds
agttcacagagtcgacta	(SEC ID N°: 13)	NM_008543, nt 2030-2047, cds
ggcaaaagccattcccct	(SEC ID N°: 14)	NM_008543, nt 2311-2328, cds
gccgatcttgctccgcac	(SEC ID N°: 15)	NM_008543, nt 2373-2430, cds, cds

Entradas de Genbank para Smad7 de ratón relevantes son NM_008543 (secuencia de ARNm) y AJ000551 (ARNm, Smad7B de variación, carece de "cag" (nt 2104-2106 en NM_008543).

Lo más preferentemente, oligonucleótidos antisentido para Smad7 de secuencias humanas (dirección 5'-3') son:

ctccggctgccccacccc	(SEC ID Nº: 16)	AF010193, nt 38-54, 5'UT
cgaacatgacctccgcac	(SEC ID Nº: 17)	AF010193, nt 243-250, 5'UT
atcgtttgctcgaacat	(SEC ID Nº: 18)	AF010193, nt 296-314, cds
ccctcctcctcgtcctcg	(SEC ID Nº: 19)	AF010193, nt 358-375, cds
gtcgcccttctccccgcag	(SEC ID Nº: 20)	AF010193, nt 404-423, cds
gctgtccgtcgcccttc	(SEC ID Nº: 21)	AF010193, nt 413-430, cds
agcaccgagtgctgagc	(SEC ID Nº: 22)	AF010193, nt 577-594, cds
agttcgagagtcggcta	(SEC ID Nº: 23)	AF010193, nt 889-906, cds
ggcaaaagccattcccct	(SEC ID Nº: 24)	AF010193, nt 1170-1187, cds
gccgatttgctccgcac	(SEC ID Nº: 25)	AF010193, nt 1232-1249, cds
ctgccccttctccaaaa	(SEC ID Nº: 26)	AF010193, nt 1790-1807, 3'UT
actcacacacactcctga	(SEC ID Nº: 27)	AF010193, nt 1905-1928, 3'UT
tgccaggtactgcctct	(SEC ID Nº: 28)	AF010193, nt 2076-2093, 3'UT
gagatccaggagcagatg	(SEC ID Nº: 29)	AF010193, nt 2310-2327, 3'UT

Aquí, las entradas de Genbank para Smad7 humana más relevantes son AF010193 (ARNm de Smad7, CDS completas), XM_033746 (ARNm de MADH7, variación 1213: /alelo="C" /alelo="T") y XM_008803 (ARNm de MADH7, variación 1500: /alelo="C" /alelo="T")

- 5 Los oligonucleótidos antisentido para Smad7 de rata (dirección 5'-3') que se prefieren son:

cttcggctgccccacccg	(SEC ID Nº: 30)	NM_030858, nt 1164-1181, 5'UT
atcgtttgctcgaacat	(SEC ID Nº: 31)	NM_030858, nt 1422-1440, cds
ccctcctcctcgtcctcg	(SEC ID Nº: 32)	NM_030858, nt 1484-1501, cds
gtcgcccttctccccgcag	(SEC ID Nº: 33)	NM_030858, nt 1530-1549, cds
gccgtcgtcgcccttc	(SEC ID Nº: 34)	NM_030858, nt 1539-1556, cds
agcaccgagtgctgagc	(SEC ID Nº: 35)	NM_030858, nt 1703-1720, cds
agttcacagagtcgacta	(SEC ID Nº: 36)	NM_030858, nt 2015-2032, cds
ggcaaaagccattcccct	(SEC ID Nº: 37)	NM_030858, nt 2296-3013, cds
gccgatctgtcctcac	(SEC ID Nº: 38)	NM_030858, nt 2358-2375, cds

Aquí, la entrada de Genbank para Smad7 de rata relevante es NM_030858 (ARNm, cds completas).

Además, como se ha documentado en los ejemplos adjuntos y explicado en este documento, se prevén oligonucleótidos modificados y/o mutados según la presente invención, un ejemplo de un oligonucleótido tal (dirección 5'-3') es gtcgccccttctccccgcag (SEC ID Nº: 39).

- 10 Preferentemente, las moléculas antisentido que van a emplearse según la presente invención son 100% complementarias al ARNm (región codificante y/o no codificante) de Smad7 como se muestra en este documento; por ejemplo, SEC ID Nº: 1, 3 ó 5 o como se muestra en los números de acceso de GenBank NM_008543 (ratón), AF010193 (humano), NM_030858 (rata). Sin embargo, también se prevé que dicha molécula antisentido comprenda nucleótidos adicionales, nucleótidos sustituidos, intercambios de nucleótidos, inversiones de nucleótidos o
- 15 deleciones de nucleótidos. Sin embargo, como se ha documentado en los ejemplos adjuntos, moléculas antisentido funcionales que van a emplearse en la presente invención tienen preferentemente más del 85%, más preferentemente más del 90%, lo más preferentemente más del 95% de complementariedad con el ARNm de Smad7 (región codificante y/o región no codificante). Por ejemplo, las moléculas/moléculas antisentido anti-Smad7 más eficaces comprenden nucleótidos que son el 100% complementarios al ARNm correspondiente. Sin embargo,
- 20 como también se muestra en los ejemplos adjuntos, moléculas antisentido que comprenden, entre otros, uno o dos nucleótidos adicionales, son funcionales en el contexto de la invención.

Los inhibidores específicos de la expresión o función de Smad7 desvelada anteriormente son útiles en un procedimiento para prevenir, mejorar y/o tratar esclerosis múltiple o isquemia cerebral en un sujeto. Preferentemente, dicho sujeto es un mamífero, lo más preferentemente dicho mamífero es un ser humano.

- 25 Un "paciente" o "sujeto" para los fines de la presente invención incluye tanto seres humanos como otros animales, particularmente mamíferos, y otros organismos. Por tanto, los procedimientos son aplicables tanto a terapia humana como a aplicaciones de veterinaria. En la realización preferida, el paciente es un mamífero, y en la realización más preferida el paciente es un ser humano.

- 30 Los ejemplos adjuntos ilustran el uso satisfactorio e inventivo de inhibidores de Smad7 como se define en este documento en el tratamiento de las enfermedades/trastornos anteriormente definidos. Preferentemente, dicha enfermedad autoinmunitaria es esclerosis múltiple. Dicha esclerosis múltiple puede seleccionarse del grupo que consiste en esclerosis múltiple recurrente-remitente, esclerosis múltiple progresiva secundaria, esclerosis múltiple

progresiva crónica primaria, neuromielitis óptica (síndrome de Devic), encefalomielitis diseminada aguda, esclerosis múltiple fulminante (variante de Marburg), neuritis óptica autoinmune aislada, mielitis transversa autoinmune aislada, esclerosis concéntrica de Balo. Todas las enfermedades anteriormente mencionadas se consideran subtipos de EM o son enfermedades autoinmunitarias del SNC relacionadas con EM o fases tempranas comunes de EM antes del diagnóstico definitivo clínico de EM según la materia. El accidente cerebrovascular isquémico y el traumatismo del SNC implican mecanismos patológicos que son compartidos con EM y subtipos, por ejemplo, fuga de la barrera hematoencefálica, flujo de entrada de células inmunitarias y activación de la microglía, conduciendo a una lesión secundaria mediada por inflamación al tejido cerebral que puede regularse por disminución por la administración de moléculas antiinflamatorias como TGF-beta. El accidente cerebrovascular, por ejemplo, lesión hipóxica-isquémica focal del cerebro se caracteriza por una lesión de tejido necrótico central y una "penumbra" de alrededor que puede describirse como "tejido en riesgo". Las células neuronales dentro de estas zonas son todavía propensas a morir durante un periodo de tiempo prolongado. Se informó que la expresión de TGF-beta era significativamente elevada en la penumbra (Slevin, Günsilius, 2001), y se interpretó como una indicación de la cantidad de cerebro reanimable (Ali, 2001). Se cree que la respuesta inflamatoria local aguda tras isquemia cerebral produce parte de la lesión cerebral perifocal. La expresión en exceso mediada por adenovirus de TGF-beta 1 cinco días antes de la oclusión de la ACM produjo la inhibición de las quimiocinas MCP-1 y MIP1-alfa y un volumen de infarto significativamente reducido (Pang, 2001). Sin embargo, cuando se administra después de la inducción de isquemia cerebral por la arteria carótida contralateral en un modelo de conejo de accidente cerebrovascular tromboembólico, TGF-beta no tuvo efecto significativo en lo referente al tamaño del infarto o producción de niveles de aminoácidos excitadores (Gross, 1994). Sin embargo, TGF-beta tiene aparentemente efectos neuroprotectores *in vivo*, ya que el bloqueo de la interacción de TGF-beta con su receptor agravó el volumen de infarto en un modelo de rata de accidente cerebrovascular (Ruocco, 1999). Por tanto, puede estimarse que la amplificación de la señalización por TGF-beta tiene un efecto beneficioso en accidente cerebrovascular salvando las células de alrededor no letalmente lesionadas y reduciendo finalmente el volumen de infarto. Con respecto a la isquemia cerebral global, la regulación por incremento de la expresión génica de TGF-beta 1 en tejido cerebral se extiende de 6 horas a 21 días (Lehrmann, 1995). Se demostró que el máximo de la inducción de genes de TGF-beta 1 se produjo entre 5 y 7 días después de la isquemia (Zhu, 2000). La inyección intraparenquimatosa total de TGF-beta 1 atenuó la apoptosis y mejoró el desenlace neurológico postisquémico (Zhu, 2002). En isquemia global transitoria en ratas, Henrich-Noack y colaboradores pudieron mostrar protección significativa de células CA1 piramidales por inyección intrahipocámpica de TGF-beta 1 antes de isquemia. Varios estudios *in vivo* analizaron el efecto de la administración intraarterial o intracerebroventricular de TGF-beta 1 antes (Gross, 1993) o después de la inducción de isquemia (Gross, 1994, McNeill, 1994) en un modelo de conejo de accidente cerebrovascular tromboembólico o un modelo de rata de lesión cerebral hipóxica-isquémica grave, respectivamente. Estos estudios mostraron que cualquier pauta de tratamiento se asoció a una reducción significativa de pérdida neuronal y tamaño de infarto. En isquemia global transitoria en ratas, Henrich-Noack y colaboradores pudieron mostrar protección significativa de células CA1 piramidales por inyección intrahipocámpica de TGF-beta 1 antes de isquemia (Henrich-Noack, 1996). Efectos similares de tamaños de lesión elevados después de la aplicación de antagonistas de TGF-beta en modelos animales de lesión excitotóxica al cerebro sugieren que los enfoques que regulan por incremento los efectos de TGF-beta podrían usarse para proteger de lesión excitotóxica aguda que se produce en lesión del SNC traumática (Hailer, 2001). En algunos pacientes con lesión cerebral traumática aguda se informó de una producción intracerebral de TGF-beta que alcanza un pico en el primer día después del traumatismo y que posiblemente confiere una protección contra lesión cerebral inducida por inflamación secundaria (Morganti-Kossmann, 1999).

Lo más preferentemente, la composición farmacéutica que va a prepararse según la presente invención y que comprende un inhibidor (inhibidores) de la expresión y/o función de anti-Smad7 va a administrarse por uno o varios de los siguientes modos: la administración puede ser oral, intravenosa, intraarterial, intratraqueal, intranasal, subcutánea, intramuscular, intracraneal (es decir, intraventricular) o intraespinal (intratecal), epidérmica o transdérmica, pulmonar (por ejemplo, inhalación o insuflación de aerosol o polvo), por administración a la mucosa oral o rectal, además de administración oftálmica.

Se prevé, entre otros, que los inhibidores de Smad7, como las construcciones/moléculas antisentido o ARNip como se describen en este documento, se administren en combinación con otros compuestos/medicamentos. Dicho compuesto/medicamento adicional o molécula puede inducir, por ejemplo, una modulación por incremento de TGF-beta o puede activar TGF-beta latente. Dicho compuesto/medicamento/molécula adicional también puede ser un fármaco inmunomodulador o inmunosupresor. Tales inmunomoduladores se conocen en la técnica y comprenden, entre otros, interferón-beta 1a humano (recombinante), interferón-beta 1b humano (recombinante) o acetato de glatiramer y otros fármacos/compuestos que modulan la activación, migración, función efectora y/o supervivencia de células inmunitarias. Tales compuestos pueden ser anticuerpos o fragmentos de anticuerpos dirigidos contra moléculas expresadas sobre superficies celulares (tales como moléculas de adhesión, receptores de citocinas o quimiocinas, o receptores para ligandos que contribuyen a la activación de células inmunitarias o funciones efectoras de células inmunitarias) o contra moléculas en circulación tales como citocinas, quimiocinas, o ligandos para receptores que median en la activación de células inmunitarias o funciones efectoras de células inmunitarias. Tales compuestos también pueden comprender agonistas o inhibidores sintéticos para receptores de citocinas y quimiocinas u otras moléculas endógenas tales como moléculas de adhesión o moléculas moduladoras de la transcripción o activación intracelular. Tales compuestos también pueden comprender moléculas que tienen como objetivo modular las respuestas inmunitarias específicas para antígeno (por ejemplo, ligandos de péptidos alterados,

vacunación con receptores de linfocitos T, vacunación con ADN u otras estrategias para modificar respuestas inmunitarias). Las sustancias/fármacos que van a administrarse con compuestos anti-Smad7/inhibidores de Smad7 descritas en este documento pueden comprometer adicionalmente sustancias que suprimen el crecimiento o activación de células inmunitarias como azatioprina, mitoxantrona, ciclofosfamida, ciclosporina A, micofenolato mofetilo, rapamicina, minociclina o metotrexato. Otros fármacos/compuestos previeron células inmunitarias y/o la activación, migración, función efectora y/o supervivencia de células inmunitarias. Las sustancias/fármacos inmunosupresores que van a administrarse con los compuestos anti-Smad7/inhibidores de Smad7 descritos en este documento pueden comprender azatioprina, mitoxantrona, ciclofosfamida, ciclosporina A, micofenolato mofetilo, ciclosporina A, rapamicina, minociclina o metotrexato.

El médico puede establecer pautas de dosificación y administración para los inhibidores de Smad7. Por ejemplo, para compuestos antisentido, como nucleótidos antisentido se han establecido pautas de dosificación específicas. Tales pautas comprenden una dosificación de 1 mg/kg hasta 200 mg/m² y se describen, entre otros, en Schreibner (2001), Gastroenterology 120, 1399-1345; Andrews (2001), J. Clin. Oncol. 19, 2189-2200; Blay (2000), Curr. Op. Mol. Ther. 2, 468-472; Cunningham (2000), Clin. Cancer Res. 6, 1626-1631; Waters (2000), J. Clin. Oncol. 18, 1809-1811 o Yacyshyn (1998), Gastroenterology 114, 1133-1142. Se prevé, por ejemplo, que los inhibidores de Smad7 descritos en este documento, por ejemplo, compuestos antisentido o ARNi y similares, se administren en dosis únicas de 0,1 a 25 mg/kg/día (por ejemplo i.v. durante 2 a 8 horas), como dosis únicas o múltiples cada dos días o por infusión (infusiones) continua(s) de 0,5 a 10 mg/kg/día durante 14 a 21 días con 7 días de descanso. Es de particular observación que en ciertas indicaciones clínicas o médicas podría desearse administrar los inhibidores de Smad7 como se han desvelado en este documento en una dosis única. Por ejemplo, en un incidente traumático agudo (traumatismo de cerebro o médula espinal) o en un evento isquémico en el cerebro (por ejemplo, accidente cerebrovascular), una administración única de los inhibidores de Smad7 puede ser suficiente para mejorar la afección del paciente afectado, preferentemente paciente humano. En otros trastornos del SNC, como trastornos inmunológicos (por ejemplo EM), puede desearse una pauta de tratamiento de múltiples administraciones. Sin embargo, se prevén pautas de dosificación adicionales y pueden ser fácilmente establecidas por un médico.

Las figuras muestran:

FIGURA 1.

El tratamiento preventivo con Smad7-as-ODN retrasa la aparición y alivia la gravedad clínica de EAE. Ratones sin tratamiento previo se inyectaron con 30×10^6 LNC específicas para PLP como se describe en Materiales y procedimientos. En un entorno preventivo, 100 µg de Smad7-as-ODN (5 mg/kg/d) en PBS o un volumen igual de PBS se inyectaron i.p. diariamente desde el día de la transferencia hasta la aparición de signos clínicos en el grupo de control (día 8). La aparición de enfermedad se retrasó significativamente desde el día $14,29 \pm 1,10$ (media ± EE) hasta el día $27,43 \pm 4,28$ ($p = 0,029$; Tabla 1).

FIGURA 2.

El efecto del tratamiento con Smad7-as-ODN es posiblemente de larga duración y puede depender de la dosis. Ratones sin tratamiento previo se inyectaron con 30×10^6 LNC específicas para PLP como se describe en Materiales y procedimientos. 100 µg de Smad7-as-ODN (5 mg/kg/d) en PBS o un volumen igual de PBS se inyectaron i.p. diariamente desde el día de la transferencia durante 3 semanas, cada dos días durante las 2 siguientes semanas y dos veces a la semana durante las 5 semanas restantes. La diferencia en la mediana de las puntuaciones clínicas entre los grupos experimentales fue estadísticamente significativa entre los días 15 y 26, en los días 28, 40, 41, 50, 53 y entre los días 60 y 64 ($p \leq 0,05$). En el día 40, la prevalencia de EAE en el grupo de tratamiento fue 0/6, sugiriendo que un tratamiento continuo de 5 mg/kg tres veces a la semana es suficiente para la supresión de enfermedad.

FIGURA 3.

El tratamiento con Smad7-as2-ODN retrasa la aparición y alivia el desarrollo clínico de EAE. Ratones sin tratamiento previo se inyectaron con 5×10^6 LNC específicas para PLP como se describe en Materiales y procedimientos. 100 µg de oligonucleótidos antisentido (5 mg/kg/d) en PBS o un volumen igual de PBS se inyectaron i.p. diariamente desde el día de la transferencia hasta el final del experimento. La aparición de enfermedad se retrasó en el grupo de Smad7-as2-ODN desde el día $10,4 \pm 1,66$ (media ± EE) hasta el día $15,8 \pm 3,69$ (Tabla 3). Smad7-as2-ODN tuvo un efecto más potente que Smad7-as-ODN, mientras que Smad7-mut4-as-ODN (una construcción antisentido que no puede hibridarse específicamente con la molécula de ácido nucleico que codifica Smad7 relevante) deterioró el desarrollo clínico.

FIGURA 4.

Smad7-as-ODN suprime la gravedad clínica de EAE de un modo terapéutico. Ratones sin tratamiento previo se inyectaron con 30×10^6 LNC específicas para PLP como se describe en Materiales y procedimientos. Los ratones se dividieron en grupos de tratamiento de igual incidencia de EAE y puntuación acumulada en el pico de enfermedad (día 12). 100 µg de Smad7-as-ODN (5 mg/kg/d) en PBS o un volumen igual de PBS se inyectaron i.p. diariamente desde el día 12 hasta el día 28 y posteriormente cada dos días desde el día 29 hasta el día 45. La diferencia en la puntuación de EAE media entre los dos grupos fue estadísticamente significativa entre los días 18 y 20 y entre los días 26 y 32 ($p \leq 0,05$).

FIGURA 5.

La enfermedad autoinmunitaria del SNC es prevenible exponiendo LNC autorreactivas a tratamiento con Smad7-as *in vitro*. Se obtuvieron LNC de ratones inmunizados con PLP como se describe en Materiales y procedimientos y se

reestimularon durante 96 horas con 10 µg/ml de PLP y Smad7-as-ODN 20 µM o PBS, respectivamente. La proliferación se redujo aproximadamente el 30% como se mide por la ingesta de ³H-citidina (no mostrado). 5 x 10⁶ LNC viables se inyectaron en ratones receptores sin tratamiento previo i.p. y la puntuación clínica se examinó durante 20 días hasta que se alcanzó claramente el pico de enfermedad en el grupo de control. Ratones que recibieron LNC tratadas con Smad7-as-ODN no desarrollaron signos clínicos de EAE. Esto sugiere que el tratamiento con Smad7-as-ODN puede prevenir la reactivación de linfocitos T autorreactivos cebadas y bloquear sus propiedades inductoras de enfermedad.

FIGURA 6.

Smad7-as2-ODN suprime la proliferación de LNC activadas *in vitro*. LNC específicas para PLP se obtuvieron y se cultivaron como se describe en Materiales y procedimientos durante 96 horas y concentraciones crecientes de Smad7-as2-ODN o Smad7-mut4-as-ODN, respectivamente. Los pocillos sin oligonucleótido antisentido o PLP sirvieron de controles. La proliferación de LNC se muestra como la media ± error estándar de cultivos cuádruples. A, Smad7-as2-ODN redujo estadísticamente la proliferación de LNC reestimuladas por PLP altamente significativamente a concentraciones de 20 µM (* p < 0,05, ** p < 0,005). B, Smad7-mut4-as-ODN no tuvo efecto sobre la proliferación de LNC.

FIGURA 7.

Smad7-as-ODN disminuye la proliferación de LNC activadas *in vitro*. Se obtuvieron LNC específicas para PLP y se cultivaron como se describe en Materiales y procedimientos. LNC se reestimularon con 10 µg/ml de PLP o 0,2 µg/ml de Con A y diversas concentraciones de Smad7-as-ODN durante 96 horas. Los pocillos sin oligonucleótido antisentido o PLP sirvieron de controles. La proliferación de LNC se muestra como la media ± error estándar de cultivos cuádruples. El efecto de Smad7-as-ODN fue estadísticamente significativo a una concentración de 1 µM (p < 0,05).

FIGURA 8.

Smad7-as-ODN no son tóxicos contra LNC activadas. Se obtuvieron LNC específicas para PLP y se cultivaron como se describe en Materiales y procedimientos. LNC se reestimularon con 10 µg/ml de PLP y concentraciones crecientes de Smad7-as-ODN (inicialmente 8 x 10⁵ LNC) o Smad7-as2-ODN (inicialmente 4 x 10⁵ LNC) durante 96 horas, respectivamente. Los pocillos sin oligonucleótido antisentido sirvieron de controles. La viabilidad de LNC se muestra como la media ± error estándar de cultivos triplicados. La viabilidad celular se midió por exclusión con azul de tripano.

FIGURA 9.

Ausencia de toxicidad de Smad7-as2-ODN contra LNC activadas. Se obtuvieron LNC específicas para PLP y se cultivaron como se describe en Materiales y procedimientos. 4 x 10⁵ LNC se reestimularon con 10 µg/ml de PLP y concentraciones crecientes de Smad7-as2-ODN durante 96 horas. Los pocillos sin oligonucleótido antisentido sirvieron de controles. La viabilidad celular se midió por tinción con yoduro de propidio en análisis de citometría de flujo (2 x 10⁴ LNC cada uno). La viabilidad de LNC se muestra como la media ± error estándar de cultivos triplicados.

FIGURA 10.

El tratamiento con Smad7-as-ODN *in vivo* inhibe el cebado de linfocitos T autorreactivos. Se inmunizaron ratones con 200 µg de PLP s.c. como se ha descrito anteriormente. En los días 7, 8 y 9 después de la inmunización, los ratones se trataron i.p. con tanto 100 µg de Smad7-as-ODN como Smad7-as2-ODN en PBS, 100 µg de un oligonucleótido de PTO al azar de control 5'-atg gac aat atg tct a-3' en PBS, o un volumen igual de PBS. Ganglios linfáticos de ratones tratados se recogieron en el día 10 y la proliferación de cultivos de LNC se determinó como se ha descrito anteriormente. Células de ratones tratados con PBS muestran una fuerte proliferación específica para antígeno a diferencia de la respuesta proliferativa rotunda de células de ratones tratados con moléculas antisentido (Figura 11). Las células de los ratones tratados con ODN al azar proliferaron en cultivo incluso sin añadir antígeno de péptido.

Figura 11.

RMN *in vivo* 7 días después de accidente cerebrovascular (oclusión de 90 minutos de la arteria cerebral media derecha) en dos animales individuales tratados tanto con 400 pmoles de oligonucleótidos antisentido Smad7-as2-ODN por kg de peso corporal (Fig. 11 a, b) como con la misma cantidad de los oligonucleótidos sentido respectivos (Fig. 11 c, d; control de tratamiento). RMN de recuperación por inversión demuestra una reducción distinta del volumen de infarto, especialmente por preservación de la corteza cerebral, en el animal tratado con antisentido para Smad7. Se obtuvieron hallazgos de RMN similares en estos animales cuatro semanas después de la isquemia.

Figura 12

El tratamiento con Smad7-as2-ODN reduce la inflamación del SNC. Ratones representativos del experimento representado en la Figura 3 se sacrificaron en el día 49; secciones de parafina del cerebro y médula espinal se prepararon, se tiñeron para H.-E. y se evaluaron como se describe en Materiales y procedimientos. (a) Animal tratado con PBS, grado de EAE 2: sección axial de la médula espinal (aumento objetivo 20x). (b) Animal tratado con Smad7-mut4-as-ODN, grado de EAE 2,5: sección longitudinal de la médula espinal torácica inferior (aumento objetivo 10x). (c) Animal tratado con Smad7-as2-ODN, grado de EAE 0: sección axial de la médula espinal lumbar (aumento objetivo: 5x).

En (a) y (b) pueden observarse infiltrados perivasculares típicos de EAE que consisten principalmente en linfocitos y monocitos; en (c) no se observa inflamación.

Figura 13

No se detecta toxicidad para órganos por evaluación histopatológica de ratones tratados con Smad7-as2-ODN: ratones seleccionados del experimento representado en la Figura 3 se sacrificaron en el día 49; secciones de parafina de varios órganos se prepararon, se tiñeron y se evaluaron como se describe en Materiales y

procedimientos. La figura muestra secciones representativas de órganos susceptibles a toxicidad inducida por TGF-beta de un animal tratado con Smad7-as2-ODN; hígado (H.-E., aumento objetivo 40x), bazo (H.-E. (aumento objetivo 10x) y riñón (Masson-Goldner, (aumento objetivo 20x). En particular, no se detectó aumento significativo en la producción de tejido conjuntivo. En el riñón, una dilatación de los túbulos renales proximales y un ensanchamiento de los espacios capsulares glomerulares se observó en ratones de todos los grupos de tratamiento y representa un artefacto de perfusión. En el bazo se observaron macrófagos multinucleados prominentes como típicos para animales con EAE en todos los ratones independientemente del tratamiento. Además de los órganos aquí mostrados se examinaron la piel, ganglio linfático, colon, corazón y pulmón.

Figura 14

Smad7-as2-ODN disminuye la proliferación de células del bazo mitogénicamente activadas.

Se obtuvieron células del bazo de ratones no inmunizados y se cultivaron como se describe en Materiales y procedimientos usando 2 µg/ml de ConA para activar policlonalmente linfocitos T y diversas concentraciones de Smad7-as2-ODN o Smad7-mut4-as-ODN durante 96 horas. Los pocillos sin ODN antisentido o ConA sirvieron de controles. La proliferación de células del bazo se muestra como la media ± error estándar de cultivos cuádruples.

Figura 15

Smad7-as2-ODN suprime la proliferación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ esplénicos. 10 días después de la inmunización con 200 µg de PLP₁₃₉₋₁₅₁, los bazos se diseccionaron y los linfocitos se aislaron por Ficoll-Paque Plus. Los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ se clasificaron en columnas positivas para EM usando microperlas magnéticas acopladas a anticuerpos monoclonales para CD4 o CD8, respectivamente. Las poblaciones de linfocitos T (Figura 15a), linfocitos T CD4⁺ (Figura 15b) y CD8⁺ (Figura 15c) enriquecidas resultantes se estimularon por anticuerpos anti-CD3 de ratón unidos a placa durante 72 horas en presencia de concentraciones variables de Smad7-as2-ODN o Smad7-mut4-as-ODN como se describe en Materiales y procedimientos. Los pocillos sin recubrir o los pocillos sin ODN de PTO antisentido, respectivamente, sirvieron de controles. Los resultados se facilitan como medias aritméticas ± error estándar a partir de los cultivos establecidos al menos por triplicado. Se observa un fuerte efecto supresor de Smad7-as2-ODN sobre la proliferación a concentraciones de 10 µM (linfocitos T enriquecidos) o 20 µM (las subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ fueron pronunciadas a concentraciones de 20 µM).

Figura 16

Los efectos del tratamiento con antisentido para Smad7 sobre la proliferación de células T *in vitro* no predicen la eficacia *in vivo*. Se obtuvieron LNC específicas para PLP y se cultivaron como se describe en Materiales y procedimientos durante 96 horas y concentraciones crecientes de Smad7-as2-ODN, Smad7-as3-ODN y Smad7-as4-ODN, respectivamente. Los pocillos sin ODN antisentido o PLP sirvieron de controles. La proliferación de LNC se muestra como la media ± error estándar de cultivos al menos triplicados. Todos los ODN suprimieron la proliferación dependientemente de la dosis (Figura 16a). Entonces, se compararon Smad7-as2-ODN y Smad7-as3-ODN con respecto al efecto del tratamiento (Figura 16b): ratones sin tratamiento previo se inyectaron con 5 x 10⁶ LNC específicas para PLP como se describe en Materiales y procedimientos. 100 µg (5 mg/kg/d) de Smad7-as2-ODN o Smad7-as3-ODN o Smad7-mut4-as-ODN en PBS o un volumen igual de PBS se inyectaron diariamente desde el día de la transferencia. Smad7-as2-ODN tiene un efecto beneficioso más fuerte sobre el desarrollo clínico que Smad7-as3-ODN, mientras que Smad7-mut4-as-ODN más bien empeora los signos de EAE (Figura 16b). En el grupo tratado con Smad7-mut4-as, tres ratones murieron en momentos tempranos durante el experimento. Por convención se les dio un grado 5 en la puntuación de gravedad de enfermedad hasta el final del experimento.

Figura 17

El tratamiento con Smad7-as2-ODN *in vivo* inhibe respuestas de cebado antigénicas. Ratones inmunizados con péptido PLP como se describe en Materiales y procedimientos se trataron con 100 µg (5 mg/kg) de Smad7-as2 o Smad7-mut4-as-ODN o una cantidad igual de PBS diariamente i.p. desde el día 6 hasta el día 9 después de la inmunización. LNC de estos grupos de ratones se reestimularon con antígeno durante 96 horas y se usaron para ensayos de proliferación como se describe en Materiales y procedimientos. LNC de ratones tratados con Smad7-as2-ODN durante el cebado antigénico proliferaron menos vigorosamente tras la reestimulación de péptidos específicos con respecto a LNC de ratones tratados con Smad7-mut4-as-ODN. Esto sugiere que una respuesta inmunitaria primaria rotunda es la causa de la encefalitogenicidad de LNC reducida observada en los experimentos de la Figura 18.

Figura 18

El tratamiento con Smad7-as2-ODN *in vivo* suprime la inducción de linfocitos T encefalitogénicos autorreactivos. Ratones inmunizados con péptido de PLP como se describe en Materiales y procedimientos se trataron con 100 µg (5 mg/kg) de Smad7-as2 o Smad7-mut4-as-ODN o una cantidad igual de PBS diariamente i.p. desde el día 6 hasta el día 9 después de la inmunización. LNC de estos grupos de ratones se reestimularon posteriormente con antígeno durante 96 horas y se usaron para la transferencia adoptiva (5 x 10⁶ LNC por ratón receptor) como se describe en Materiales y procedimientos. Se muestran dos experimentos separados. LNC de ratones tratados con Smad7-as2-ODN tanto indujeron un desarrollo clínico altamente atenuado (Figura 18a, comparar el número de muertes) como no indujeron EAE en absoluto (Figura 18b).

Figura 19

El tratamiento preventivo con ARN interferente pequeño (ARNip) específico para Smad7 alivia los signos clínicos de at-EAE. 5 x 10⁶ LNC específicas para PLP₁₃₉₋₁₅₁, generadas como se describe en Materiales y procedimientos, se transfirieron adoptivamente a ratones sin tratamiento previo. Los ratones receptores se trataron dos veces diariamente con 20 pmoles de ARNi1 o ARNi2 o un volumen igual de PBS i.p. Los ratones tratados con ARNi1 y ARNi2 muestran una evolución de la enfermedad aguda mejorada con respecto a ratones tratados con PBS.

Figura 20

El tratamiento preventivo con antisentido para Smad7 mejora el desarrollo clínico en un segundo modelo de enfermedad relevante para esclerosis múltiple: EAE indujo MOG en ratas. Ratas DA hembra se inmunizaron con 65 µg de MOG₁₋₁₂₅ recombinante en CFA i.c. como se describe en Materiales y procedimientos. Las ratas se trataron i.p. con 5 mg/kg de Smad7-as2-ODN o Smad7-mut4-as-ODN o una cantidad igual de PBS (250 µl) diariamente empezando en el día -2 antes de la inmunización. El desarrollo de signos clínicos se retrasa en ratas tratadas con Smad7-as2-ODN con respecto a ratas tratadas con PBS.

Figura 21

El tratamiento local con Smad7-as2-ODN reduce el volumen de infarto como se mide por volumetría por RM después de oclusión transitoria de la arteria cerebral media en rata. La volumetría de infarto por RM se realizó para medir volúmenes de infarto en ratas. La oclusión de la arteria cerebral media se realizó como se describe en Materiales y procedimientos. La infusión del ODN en la arteria carótida interna se inició empezando con reperusión después de 90 min de la isquemia; las ratas se trataron con 400 pmoles de Smad7-as2-ODN por kg de peso corporal (n=8) o ODN sentido para Smad7 (n=8) como se describe en Materiales y procedimientos. La volumetría de infarto *in vivo* por RMN se realizó 7 días y 3 meses después de la cirugía como se describe en Materiales y procedimientos. En ambos momentos de tiempo, el volumen de infarto en las ratas tratadas con Smad7-as2-ODN con respecto a Smad7-sentido-ODN fue significativamente reducido (7 días: $1,18 \pm 0,26 \text{ cm}^3$ frente a $0,49 \pm 0,25 \text{ cm}^3$ ($p < 0,001$); 3 meses: $1,36 \pm 0,42 \text{ cm}^3$ frente a $0,60 \pm 0,28 \text{ cm}^3$, ($p < 0,001$ prueba de la *t* de Student)).

Figura 22

El tamaño del infarto como se visualiza por RMN y por histopatología es considerablemente reducido por tratamiento local con Smad7-as2-ODN después de la oclusión transitoria de la arteria cerebral media en rata. La RMN (secuencias de recuperación invertidas; orientación coronal y axial) 7 días y 3 meses después de la isquemia y la histología cadavérica que incluye inmunotinción para GFAP (proteína ácida fibrilar de la glía) se realizaron como se describe en Materiales y procedimientos en dos ratas individuales tanto tratadas con ODN sentido para Smad7 (a, b, e, f, i, j) como con Smad7-as-ODN (c, d, g, h, k, l), respectivamente. Las partes de esta figura se corresponden con la Figura 11. (Figura 22a = 11 c; 22b = 11 d; 22c = 11 a; 22d = 11b).

Figura 23

SEC ID N°: 1, ARNm de Smad7 humana

Las secuencias diana de oligonucleótidos antisentido para Smad7 humana de SEC ID N°: 16-29 están subrayadas, una secuencia parcialmente solapante, correspondiente a SEC ID N°: 21, se muestra en cursiva.

Figura 24:

SEC ID N°: 2, secuencia de nucleótidos de Smad7 humana

```
cds 296..1576
/gen="SMAD7"
/codón_iniciación=1
/producto="gen SMAD7 relacionado con MAD"
```

Figura 25:

SEC ID N°: 3, ARNm de Smad7 de ratón

Las secuencias diana de oligonucleótidos antisentido para Smad7 de ratón de SEC ID N°: 7-15 están subrayadas, una secuencia parcialmente solapante, correspondiente a SEC ID N°: 11, se muestra en cursiva.

Figura 26:

SEC ID N°: 4, secuencia de aminoácidos de Smad7 de ratón

```
cds 1437..2717
/gen="Madh7"
/codón_iniciación=1
```

Figura 27

SEC ID N°: 5, ARNm de Smad7 de rata

Las secuencias diana de oligonucleótidos antisentido Smad7 de rata de SEC ID N°: 30-38 están subrayadas, una secuencia parcialmente solapante, correspondiente a SEC ID N°: 34, se muestra en cursiva.

Figura 28

SEC ID N°: 6, secuencia de aminoácidos de Smad7 de rata

```
cds 1422..2702
/gen="Madh7"
/codón_iniciación=1
```

Figura 29

El tratamiento con Smad7-as2-ODN, pero no con Smad7-mut4-as-ODN, suprime la expresión de ARNm de Smad7 inducida por TGF-beta en linfocitos T de Jurkat. Linfocitos T de Jurkat se trataron con Smad7-as2-ODN, Smad7-mut4-AS-ODN o PBS durante 4 horas y luego se incubaron con o sin TGF-beta durante 30 minutos. Las cantidades relativas normalizadas de la expresión de ARNm de Smad7 se estimaron como se describe en Materiales y procedimientos (Ejemplo 19).

Los ejemplos ilustran la invención.

Ejemplo 1: Parte metodológica de los ejemplos adicionales

Materiales y procedimientos

Animales

- 5 Ratones SJUJ hembra se obtuvieron de Harlan Winkelmann (Borchen, Alemania) y de Charles River (Sulzfeld, Alemania). Los ratones tenían 8-20 semanas de edad cuando se iniciaron los experimentos. Todos los procedimientos se realizaron según protocolos autorizados por la comisión de protección animal de la Universidad de Regensburg. Los ratones se alojaron en jaulas normales con acceso libre a comida y agua; a los ratones paralizados se les permitió un acceso más fácil a la comida y el agua.

10 *Antígenos*

Un péptido 139-151 sustituido con serina de la proteína de proteolípido (PLP), PLP₁₃₉₋₁₅₁, se preparó por síntesis en fase sólida de flujo continuo según la secuencia para PLP murina (HSLGKWLGHDPKF SEC ID N°: 40) por el Instituto de Microbiología, Universidad de Regensburg, Alemania. La composición de aminoácidos del péptido se verificó por el análisis de aminoácidos y la pureza se confirmó por espectroscopía de masas.

15 *Inducción de la EAE por transferencia adoptiva*

- Cada ratón receptor se inyectó i.v. con 5 a 30 x 10⁶ células del ganglio linfático (LNC) específicas para PLP₁₃₉₋₁₅₁ activadas como se indica para los experimentos individuales. Se generaron líneas de células T específicas para PLP₁₃₉₋₁₅₁ a corto plazo inmunizando ratones SJUJ s.c. en cuatro sitios a través del flanco con 200 µg de PLP₁₃₉₋₁₅₁ emulsionado 1:1 con CFA que contenía 800 µg de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, EE.UU.) en un volumen total de 200 µl/animal. Después de diez a once días, las células del ganglio linfático (LNC) derivadas de los ganglios linfáticos auxiliares drenantes e inguinales se recogieron y se cultivaron con 10 µg/ml de PLP₁₃₉₋₁₅₁ en placas de 24 pocillos. El medio de cultivo se basó en RPMI 1640 (Life Technologies Inc.), complementado con 10% de suero bovino fetal inactivado por calor (Biochrom KG, Berlín, Alemania), L-glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, 2-ME 5 x 10⁻⁵ M, piruvato de sodio 1 mM, HEPES 12,5 mM y 1% de aminoácidos no esenciales (todos de Life Technologies Inc.) según un protocolo previamente descrito [Rajan, 2000]. Después de 96 horas, las LNC se recogieron y se inyectaron en receptores SJUJ sin tratamiento previo.

Evaluación clínica

- Los ratones se examinaron diariamente para signos de enfermedad y se clasificaron en una escala de gravedad creciente de 0 a 5 del siguiente modo: 0 sin signos; 0,5 debilidad parcial de la cola; 1 la cola se mueve con dificultad o ligera ralentización del enderezamiento desde la posición supina; 1,5 la cola se mueve con dificultad y ligera ralentización del enderezamiento; 2 debilidad parcial de las extremidades traseras o marcada ralentización del enderezamiento; 2,5 arrastre de la(s) extremidad(es) trasera(s) sin parálisis completa; 3 parálisis completa de al menos una extremidad trasera; 3,5 parálisis de las extremidades traseras y ligera debilidad de las extremidades delanteras; 4 grave debilidad de las extremidades delanteras; 5 moribundo o muerto. Los ratones que alcanzaron una puntuación de 5 se sacrificaron. Una recaída se definió como un leve aumento de al menos un punto completo durante 2 o más días después de que el animal hubiera mejorado previamente al menos un punto y se hubiera estabilizado durante al menos 2 días. El día de la aparición de signos clínicos, la puntuación máxima media en cada grupo de tratamiento que promedia la puntuación máxima de cada animal se alcanzó en todo tiempo y las puntuaciones acumuladas de todos los animales de cada grupo de tratamiento durante periodos de tiempo definidos se determinaron como mediciones de la gravedad de la enfermedad. El número de recaídas en un grupo dividido entre el número de los ratones de ese grupo se determinó como la tasa de recaída.

Oligonucleótidos de PTO antisentido y tratamiento

- Se usaron los siguientes oligonucleótidos (ODN) de fosforotioato (PTO) antisentido para Smad7 monocatenarios derivados de ARNm de Smad-7 humana, GenBank AF010193 empezando en la posición 404 desde el extremo 5' de ARNm: Smad-7-as-ODN, 5'-gtc gcc cct tct ccc ccg cag-3' (SEC ID N°: 39), Smad7-antisentido2-ODN 5'-gtc gcc cct tct ccc ccg ag-3' (SEC ID N°: 20) y el Smad7-mut4-antisentido-ODN de control 5'-gtc gca ccg tct cac ag cag-3' (SEC ID N°: 41) se sintetizaron por MWG-Biotech (Ebersberg, Alemania) y se proporcionaron en forma liofilizada. Los ODN de PTO se purificaron con HPSF[®]. La composición de aminoácidos y la pureza se confirmaron por MALDI-TOF (por desorción con láser asistida por matrices - tiempo de vuelo)-espectrometría de masas. Para los experimentos descritos, los oligonucleótidos de PTO se disolvieron en PBS a 0,4 µg/µl y se ajustaron a pH neutro. En experimentos de tratamiento, 100 µg de oligonucleótidos de PTO antisentido para Smad7 se inyectaron i.p. diariamente (5 mg/kg/d), cada dos días o dos veces por semana como se indica en los experimentos. La distribución a grupos de tratamiento se realizó por aleatorización. Los ratones inyectados con cantidades iguales de PBS o oligonucleótido de PTO antisentido para Smad7-mut4 sirvieron de controles.

Transferencia de LNC tratadas con oligonucleótido de PTO in vitro

Se inmunizaron ratones con 200 µg de PLP s.c. como se ha descrito anteriormente. En el día 10, los ganglios linfáticos se recogieron y se cultivaron LNC con 20 µM de oligonucleótido de PTO antisentido para Smad7 y 10 µg/ml de PLP como se indica anteriormente. Después de 96 horas, las LNC se recogieron y se inyectaron en receptores SJUJ sin tratamiento previo.

Ensayos de proliferación de linfocitos T in vitro

Células del bazo y de ganglios linfáticos drenantes se diseccionaron de animales inmunizados con 200 µg de PLP₁₃₉₋₁₅₁ emulsionado en 200 µl de CFA que contenía 250 µg de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra 10-11 días antes. Las LNC se cultivaron en placas de 96 pocillos (Corning-Costar, Cambridge, MA, EE.UU.) a 4×10^5 células viables/pocillo en un volumen total de 200 µl de medio basado en RPMI 1640, como se ha descrito anteriormente. Las células se cultivaron a 37°C en 100% de humedad y 5% de CO₂ en presencia o ausencia de PLP₁₃₉₋₁₅₁ a una concentración de 10 µg/ml. Se usó concanavalina A (Sigma Chemical Co.) a una concentración de 0,2-0,5 µg/ml. Para determinar el efecto de los oligonucleótidos de PTO antisentido, concentraciones variables se añadieron a una concentración antigénica fija. Como controles se usaron los pocillos sin oligonucleótidos de PTO antisentido o péptido antigénico, respectivamente. Las LNC se pulsaron con 1 µCi de ³H-timidina (NEN Life Science Products, Boston, MA, EE.UU.) después de 72 horas, se recogieron a las 96 horas y la captación de ³H-timidina se detectó usando un contador de centelleo de microplacas Packard (Packard Instrument Co., Meriden, Connecticut, EE.UU.). Los resultados se facilitan como medias aritméticas ± error estándar de cultivos establecidos al menos por triplicado.

Estudios de cebado

Se inmunizaron ratones con 200 µg de PLP s.c. como se ha descrito anteriormente. En los días 7, 8 y 9 después de la inmunización, los ratones se trataron i.p. con tanto 100 µg de Smad7-as-ODN como Smad7-as2-ODN en PBS, 100 µg de un oligonucleótido de PTO al azar de control 5'-atg gac aat atg tct a-3' (SEC ID N°: 42) en PBS, o un volumen igual de PBS. Los ganglios linfáticos de ratones tratados se recogieron en el día 10 y la proliferación de cultivos de LNC se determinó como se ha descrito anteriormente.

Ensayos de toxicidad y análisis de citometría de flujo

LNC cebadas con PLP₁₃₉₋₁₅₁ se derivaron como se ha descrito anteriormente y se cultivaron con o sin 10 µg/ml de péptido de PLP en placas de microtitulación de 96 pocillos a 4 u 8×10^5 células viables/pocillo en 200 µl de medio RPMI 1640, como se ha descrito anteriormente. Los oligonucleótidos de PTO antisentido para Smad7 se añadieron en concentraciones crecientes. Después de 96 horas, la viabilidad de las células se midió tanto por exclusión con azul de tripano como por citometría de flujo usando yoduro de propidio (10^4 células/muestra), respectivamente. La recogida de datos y el análisis se realizaron en un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, EE.UU.). Los resultados se facilitan como medias aritméticas ± error estándar de cultivos establecidos al menos por triplicado.

Histología

Ratones seleccionados se sacrificaron con CO₂. Los tejidos de cerebro, médula espinal, ganglio linfático, bazo, hígado, riñón, colon, corazón, pulmón y piel se fijaron en PFA al 4%. Se prepararon secciones de parafina (4-6 µm) y se tiñeron con hematoxilina-eosina, luxol fast blue, y por las tinciones de Bielschowsky y Masson-Goldner, según protocolos convencionales. Al menos 2 secciones coronales de tres niveles cerebrales rostro-caudales y al menos 2 secciones longitudinales y coronales de los niveles cervical, torácico y lumbosacro de la médula espinal se evaluaron de un modo ciego. Para el cribado para la toxicidad del tratamiento, un veterinario experimentado evaluó de un modo ciego al menos 2 secciones coronales de todos los otros tejidos.

Análisis estadístico

Las diferencias en las puntuaciones clínicas de ratones y la proliferación celular entre grupos se analizaron por la prueba de la *t* de Student para muestras independientes. Los valores de *P* inferiores a 0,05 se consideraron significativos. Para las representaciones se calcularon el valor medio y el error estándar de la media (EE).

Ejemplo 2: El tratamiento preventivo con antisentido para Smad7 retrasa la aparición y alivia el desarrollo clínico en at-EAE

La transferencia adoptiva de EAE se indujo en ratones SJL mediante inyección de LNC activadas específicas para PLP₁₃₉₋₁₅₁. La enfermedad clínica empezó después de 8-15 días, seguido de recuperación parcial y una o más recaídas (Fig. 1-4). En tres experimentos consecutivos se probó el efecto de oligonucleótidos de PTO antisentido para Smad7 (Smad7-as-ODN) *in vivo* sobre el desarrollo de at-EAE. Tras la transferencia de LNC, los ratones se trataron inicialmente con 100 µg de Smad7-as-ODN diariamente desde el día 0 (5 mg/kg/d) hasta la aparición de signos clínicos en cada grupo de control (Fig. 1). De forma interesante, la aparición de enfermedad se retrasó casi dos semanas (Tabla 1). Posteriormente, aunque no hubo diferencia en la incidencia de EAE, la puntuación máxima por animal y la tasa de recaída, el desarrollo clínico se mitigó, como se ha documentado por las puntuaciones de

enfermedad acumuladas, en particular durante la fase crónica de EAE (días 61-90, Tabla 1, Fig. 1).

TABLA 1.

	Smad7-as	PBS
tamaño del grupo	n=7	n=7
incidencia de EAE	7/7	7/7
prevalencia de EAE (día 16)	1/7	6/7
prevalencia de EAE (día 43)	5/7	7/7
prevalencia de EAE (día 90)	1/7	4/7
día de aparición (media $\pm$ EE)	27,43 $\pm$ 4,28	14,29 $\pm$ 1,10
puntuación máx. (media $\pm$ EE)	2,86 $\pm$ 0,24	3,0 $\pm$ 0,59
puntuación acumulada (d 1-30)	101,5	209
puntuación acumulada (d 31-60)	220	307,5
puntuación acumulada (d 61-90)	103,5	300,5
tasa de recaída (media $\pm$ EE)	0,71 $\pm$ 0,33	0,57 $\pm$ 0,19
recaída (número/animales)	5/3	4/4

- 5 Efectos del tratamiento preventivo con Smad7-as-ODN sobre el desarrollo clínico de EAE (I). Grupos de siete ratones se trataron con 100 μ g de Smad7-as-ODN (5 mg/kg/d) en PBS o un volumen igual de PBS i.p. diariamente desde el día de la transferencia hasta la aparición de signos clínicos en el grupo de control. El desarrollo clínico se mitigó por Smad7-as-ODN, como se indica por la puntuación de EAE (véase la Figura 1), las puntuaciones de enfermedad acumulada y la prevalencia de EAE en los días 16, 43 y 90. No hubo diferencia en la incidencia de EAE, puntuación máxima media y tasa de recaída.
- 10 El inicio del tratamiento en el día de la transferencia, pero superando el periodo de tratamiento a través de la fase de enfermedad crónica como se indica en Fig. 2, reveló que el efecto del tratamiento es posiblemente de larga duración y puede ser dependiente de la dosis o la frecuencia de aplicación, respectivamente (Fig. 2, Tabla 2). Sólo cuando las administraciones se estrecharon de inicialmente diariamente a por último lugar dos veces a la semana durante las 6 últimas semanas de observación pareció que había un ligero aumento en la actividad de enfermedad (Fig. 2) con el
- 15 ratón inicialmente enfermo que tenía 2 recaídas y otra primera exacerbación. En conjunto, se observó una sorprendente reducción en la incidencia de EAE, puntuación máxima media, número absoluto de recaídas (2 frente a 10) y tasa de recaída (0,33 $\pm$ 0,30 frente a 1,67 $\pm$ 0,30) (Tabla 2).

TABLA 2.

	Smad7-as	PBS
tamaño del grupo	n=6	n=6
incidencia de EAE	2/6	6/6
prevalencia de EAE (día 14)	1/6	5/6
prevalencia de EAE (día 35)	0/6	2/6
prevalencia de EAE (día 60)	2/6	6/6
puntuación máx. (media $\pm$ EE)	0,67 $\pm$ 0,45	2,42 $\pm$ 0,14
tasa de recaída (media $\pm$ EE)	0,33 $\pm$ 0,30	1,67 $\pm$ 0,30
recaída (número/animales)	2/1 -	10/6

- 20 Efectos del tratamiento preventivo con Smad7-as-ODN sobre el desarrollo clínico de EAE (II). Grupos de seis ratones se trataron con 100 μ g de Smad7-as-ODN (5 mg/kg/d) o PBS diariamente y luego se estrecharon hasta por último lugar dos veces a la semana como se indica en la Figura 2. No se observaron diferencias significativas entre los grupos para puntuación máxima media ($p = 0,015$) y tasa de recaída ($p = 0,018$).

- 25 Este experimento sugirió que una pauta de tratamiento de 5 mg/kg tres veces a la semana es suficiente para obtener la supresión a largo plazo de signos clínicos.

- 30 Mientras que Smad7-as-ODN contuvo una citidina adicional entre la posición 124 y 125 de ARNm del Smad7 humana, el 20-mero Smad7-as2-ODN carece de esta citidina. Pareció que el tratamiento con la molécula de Smad7-as2-ODN completamente complementaria era mucho más eficaz en posteriores momentos de tiempo en comparación con Smad7-as-ODN. Sin embargo, la molécula antisentido que comprende un nucleótido adicional todavía pareció ser un reactivo valioso durante momentos de tiempo tempranos; véase la Fig. 3. Sin embargo, el Smad7-as2-ODN documentado demostró tener un efecto de tratamiento más poderoso con respecto a la incidencia de EAE, día de aparición y puntuación máxima media que el vehículo o Smad7-as-ODN (Tabla 3). Sin embargo, la Tabla 3 adjunta documenta claramente el poderoso efecto de moléculas antisentido mutadas, además de "naturales". El oligonucleótido de PTO de control Smad7-mut4-as, que está alterado en 4 nucleótidos en

comparación con Smad7-as2-ODN, no tuvo un efecto protector sobre el desarrollo de enfermedad aguda (Figura 3). La administración de 100 µg de Smad7-mut4-as diariamente produjo más bien una primera exacerbación temprana, más grave y prolongada en comparación con los grupos que recibieron Smad7-as2-ODN, Smad7-as-ODN o PBS (Tabla 3).

5

TABLA 3.

	Smad7-as	Smad7-as2	PBS	Smad7-mut4-as
tamaño del grupo	n=7	n=6	n=6	n=6
incidencia de EAE	6/7	5/6	5/6	5/6
prevalencia de EAE (día 12)	5/7	3/6	4/6	5/6
prevalencia de EAE (día 30)	6/7	2/6	4/6	5/6
día de aparición (media ± EE)*	10,67 ± 0,81	15,80 ± 3,69	10,40 ± 1,66	8,33 ± 1,12
puntuación máx. (media ± EE)	2,36 ± 0,37	1,67 ± 0,35	2,58 ± 0,61	3,25 ± 0,68
muerres	0	0	1	2

* sólo animales enfermos

10 Efectos del tratamiento preventivo con Smad7-as-ODN sobre el desarrollo clínico de EAE (III). Grupos de seis a siete ratones se trataron con 100 µg de Smad7-as-ODN, Smad7-as2-ODN, Smad7-mut4-as-ODN de control mutado (5 mg/kg/d cada uno) o PBS diariamente desde el día de la transferencia como se muestra en la Figura 3. La puntuación máxima media y la prevalencia de EAE en los días 12 y 30 se redujeron sorprendentemente en el grupo de Smad7-as2-ODN. El tratamiento con Smad7-as-ODN produjo una puntuación máxima media ligeramente reducida produciéndose muertes no relacionadas con EAE.

Histología

15 El cerebro y la médula espinal de ratones representativos del experimento representado en la Figura 3 se evaluaron histológicamente. Los ratones tratados con PBS mostraron infiltrados mononucleares típicos en médula espinal y cerebro. El grado de inflamación del SNC guardó relación con las puntuaciones clínicas asociándose altas puntuaciones a muchos infiltrados densos que se extendían desde la profundidad submeníngea en la materia blanca. Los ratones tratados con Smad7-as2-ODN mostraron menos inflamación del SNC que los ratones tratados con Smad7-mut4-as-ODN o PBS.

20 *El tratamiento con Smad7-as en el pico de enfermedad alivia el desarrollo clínico en at-EAE*

Se realizó un experimento adicional para examinar si la administración de ODN antisentido para Smad7 es terapéuticamente eficaz (Fig. 4). El tratamiento con 100 µg de Smad7-as-ODN iniciado en el pico de enfermedad aguda y administrado una vez diariamente durante 17 días y luego cada dos días durante 17 días disminuyó parcialmente la gravedad de la enfermedad clínica. Después de 18 días de tratamiento, tres de cuatro ratones se habían recuperado completamente de la enfermedad clínica (Tabla 4). La puntuación de EAE disminuyó significativamente entre los días 18-20 (es decir, aproximadamente 1 semana después del inicio del tratamiento) y los días 26-32 después de la transferencia. El mejor desenlace de ratones tratados con Smad7-as-ODN se confirma comparando las puntuaciones de enfermedad acumulada de los días 12-60, es decir, el final del periodo de observación (Tabla 4). Esto documenta el potencial terapéutico de oligonucleótidos de PTO Smad7-as para la enfermedad del SNC autoinmunitaria en curso.

30

TABLA 4.

	Smad7-as	PBS
tamaño del grupo	n=5	n=5
incidencia de EAE	5/5	5/5
prevalencia de EAE (día 12)	4/5	3/5
prevalencia de EAE (día 30)	1/5	5/5
prevalencia de EAE (día 50)	1/5	3/5
puntuación acumulada (d 1-12)	24	24,5
puntuación acumulada (d 12-60)	137,5	239,5
tasa de recaída (media ± EE)	0,4 ± 0,22	0,4 ± 0,22
recaída (número/animales)	2/2	2/2

35 Efectos del tratamiento terapéutico con Smad7-as-ODN sobre el desarrollo clínico de EAE. Grupos de cinco ratones se trataron con 100 µg de Smad7-as-ODN o PBS empezando en el pico de enfermedad (Figura 4). Después de 18 días de tratamiento, 3 de los 4 ratones enfermos se habían recuperado clínicamente completamente. La puntuación de enfermedad acumulada mostró una reducción sorprendente en el grupo de Smad7-as-ODN.

Ejemplo 3: La transferencia de LNC tratadas con antisentido para Smad7 *in vitro* fracasa en inducir at-EAE

También se investigó si el tratamiento con Smad7-as-ODN interfería o no con la reactivación de linfocitos T específicos para PLP *in vitro* y alteraba la encefalitogenicidad de estas células. Por tanto, LNC recientemente aisladas de ratones SJL inmunizados con PLP se reestimularon con PLP(139-151) durante 96 horas añadiendo 20 μM de Smad7-as-ODN. La proliferación de células cultivadas en presencia de Smad7-as-ODN se redujo aproximadamente el 30% con respecto a las células tratadas con PBS (datos no mostrados). Mientras que la inyección de 5×10^6 LNC tratadas con PBS en receptores sin tratamiento previo indujo signos de EAE típica inducida empezando en el día 9, la transferencia de LNC tratadas con Smad7-as-ODN fracasó en inducir signos clínicos durante el periodo de observación de 3 semanas (Fig. 5). Esto sugiere que el tratamiento con Smad7-as-ODN puede prevenir la reactivación de linfocitos T autorreactivos cebados y bloquear sus propiedades inductoras de enfermedad.

Ejemplo 4: El tratamiento con antisentido para Smad7 disminuye la proliferación de LNC activadas *in vitro*

Para analizar los posibles mecanismos del efecto del tratamiento, los presentes inventores examinaron el efecto de Smad7-as-ODN sobre la reestimulación con antígeno de LNC cebadas con PLP *in vitro*. La coincubación de LNC cebadas y antígeno con Smad7-as2-ODN durante 96 horas suprimió independientemente de la dosis la proliferación (Fig. 6a), mientras que la presencia de Smad7-mut4-as-ODN que sólo tiene el 80% de complementariedad con el ARNm de Smad7 no tuvo en absoluto un efecto sobre la proliferación de LNC (Fig. 6b). La reducción de la proliferación por Smad7-as2-ODN fue estadísticamente altamente significativa ($p < 0,005$) a concentraciones de 20 μM . Smad7-as-ODN también inhibió posiblemente la proliferación de LNC reestimuladas con PLP, además de estimuladas con ConA, a una concentración de tan sólo 1 μM (Fig. 7). Smad7-as-ODN no tuvo efectos pro- o antiproliferativos sobre LNC en reposo a bajas concentraciones (Fig. 7).

Ejemplo 5: Ausencia de toxicidad de oligonucleótidos antisentido para Smad7 contra LNC activadas *in vitro*

Para excluir un efecto tóxico de Smad7-as-ODN contra LNC como una posible explicación para la tasa de proliferación altamente reducida se realizaron ensayos de toxicidad *in vitro* con tinción con azul de tripano. Comparando Smad7-as-ODN 20 μM con PBS añadido a cultivos de LNC reestimulados con péptido no se observó disminución en la proporción de células viables. Cuando las LNC cebadas con PLP se reestimularon con PLP y se coincubaron con Smad7-as-ODN en concentraciones crecientes durante 96 horas no se observó pérdida significativa de la viabilidad celular en concentraciones de hasta 100 μM (Fig. 8 y 9). Usando Smad7-as2-ODN sólo se observó una reducción de células viables a $> 50 \mu\text{M}$ (100 μM). Este resultado se confirmó por análisis de FACS y tinción con yoduro de propidio. La viabilidad de LNC no se afectó significativamente incluso a concentraciones de Smad7-as2-ODN 50 μM que suprimen posiblemente la proliferación de linfocitos T.

Ejemplo 6: El tratamiento con antisentido para Smad7 a largo plazo no conduce a efectos secundarios adversos localmente o sistémicamente

Ratones tratados con Smad7-as-ODN o Smad7-as2-ODN no mostraron cambios obvios de comportamiento y no parecieron diferentes de ratones de control, excepto por signos producidos por la propia EAE. La autopsia de los animales inmediatamente después de la dislocación cervical no mostró signos de cambios patológicos. La evaluación histológica que incluye tinción con HE y Masson-Goldner no dio pistas de aumento de la producción de tejido conjuntivo en todos los órganos examinados (cerebro, médula espinal, hígado, riñón, bazo, pulmón, corazón, piel). Se observaron una dilatación de los túbulos renales proximales y un ensanchamiento del espacio capsular glomerular en riñones de animales de todos los grupos de tratamiento, que incluían ratones tratados con PBS. Además, se detectaron macrófagos multinucleados prominentes en bazos, como es típico para EAE, sin diferencia entre grupos de tratamiento.

Ejemplo 7: Cebado

El tratamiento con Smad7-as-ODN *in vivo* inhibe la inducción de una respuesta de linfocitos T autorreactiva. Células de ratones tratados con PBS muestran una fuerte proliferación específica para antígeno a diferencia de la respuesta proliferativa rotunda de células de ratones tratados con moléculas antisentido (Figura 10). Las células de los ratones tratados con ODN al azar proliferaron en cultivo incluso sin añadir antígeno de péptido.

Ejemplo 8: El tratamiento con antisentido para Smad7 atenúa la lesión isquémica en un modelo de isquemia cerebral focal (accidente cerebrovascular)

Los efectos biológicos de la administración de oligonucleótido antisentido para Smad7 también se probaron en un modelo de roedor de isquemia cerebral focal. Después de 90 minutos de oclusión por filamento intraluminal de la arteria cerebral media derecha en ratas adultas, tanto 400 pmoles de oligonucleótidos antisentido Smad7-as2-ODN (SEC ID N°: 20) por kg de peso corporal o la misma cantidad del oligonucleótido sentido para Smad7 respectivo 5'-ctgcggggagaaagggcgac-3'(SEC ID N°: 43) como de tratamiento de control, respectivamente, se infundieron en la arteria carótida interna derecha continuamente durante los 60 primeros minutos de reperusión. Las ratas se sometieron a resonancia magnética nuclear (RMN) después de 7 días y 4 semanas para la volumetría de infarto *in vivo*. Después, los animales se sacrificaron para la evaluación histológica de la lesión cerebral isquémica.

Los datos de una serie de experimentos mostraron una reducción del volumen de infarto en ratas tratadas con antisentido para Smad7 con respecto a controles. El infarto isquémico en ratas tratadas con antisentido para Smad7 se restringió predominantemente a los ganglios basales, mientras que la corteza cerebral de recubrimiento se preservó bien (Fig. 11). Como este patrón de lesión isquémica es muy similar al observado en experimentos recientes, usando compuestos antiapoptóticos, la interpretación provisional de estos resultados con la administración de antisentido para Smad7 en isquemia cerebral focal soporta fuertemente la idea de que la inhibición de Smad7, es decir, el refuerzo de los efectos del factor de crecimiento tumoral-beta (TGF-beta), caracteriza efectos neuroprotectores antiinflamatorios y antiapoptóticos en la penumbra isquémica.

Ejemplo 9: Parte metodológica de los otros ejemplos relacionados con experimentos de EAE en ratones.

Se describen Material y procedimientos para los Ejemplos 10 a 14 y sólo si no se han detallado dentro del Ejemplo 1. Todos los procedimientos se realizaron según protocolos autorizados por la comisión de protección animal en la Universidad de Regensburg.

ODN antisentido para Smad7

Además de Smad7-as2-ODN (SEC ID N°: 20) y Smad7-as-ODN (SEC ID N°: 39) usados en los Ejemplos 2-8, Smad7-as3-ODN (SEC ID N°: 21) y Smad7-as4-ODN (SEC ID N°: 9) se usaron para los experimentos de tratamiento y/o ensayos de proliferación de linfocitos T.

Ensayos proliferación de linfocitos T:

Se diseccionaron los bazo y los linfocitos se aislaron por Ficoll-Paque Plus (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia). Los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ se seleccionaron positivamente en columnas para EM usando microperlas magnéticas acopladas a anti-CD4 de ratón o anti-CD8 de ratón, respectivamente (todos de Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania). Los linfocitos T enriquecidos resultantes (Figura 17a), poblaciones de linfocitos T CD4⁺ (Figura 17b) y CD8⁺ (Figura 17c) se estimularon en placas de microtitulación recubiertas con anticuerpos anti-CD3 de ratón (Becton Dickinson, Two Oak Park, Bedford MA, EE.UU.) durante 72 horas en presencia de concentraciones variables de Smad7-as2-ODN o Smad7-mut4-as-ODN como se describe en Materiales y procedimientos. Los pocillos sin recubrir o pocillos sin ODN de PTO antisentido, respectivamente, sirvieron de controles. La proliferación se midió por captación de ³H-timidina como se ha descrito anteriormente. Los resultados se facilitan como medias aritméticas ± error estándar de cultivos establecidos al menos por triplicado.

Estudios de cebado

Los estudios de cebado descritos en las Figuras 18 y 19 y el Ejemplo 17, respectivamente, se realizaron similarmente a aquellos descritos en la Figura 10 / Ejemplo 7. El tratamiento de ratones inmunizados se realizó entre los días 6 a 9 después de la inmunización con 100 µg de Smad7-as2-ODN o Smad7-mut4-as-ODN o una cantidad igual de PBS, respectivamente. Se inmunizaron ratones con 200 µg de PLP s.c. como se ha descrito anteriormente. Los cultivos de LNC, la transferencia adoptiva y los ensayos de proliferación se realizaron como se ha descrito anteriormente.

Tratamiento con ARN interferente pequeño (ARNip) específico para Smad7

Se usaron los siguientes oligonucleótidos de ARN de Smad7 (AF015260):

ARNi1: nt 3-23 5'-GUUCAGGACCAAACGAUCUGC-3', (SEC ID N°: 44)
 nt 23-1 5'-GCAGAUUGUUGGUCCUGAACAU-3'. (SEC ID N°: 45)
 ARNi2: nt 283-303 5'-CUCACGCACUCGGUGCUCAAG-3', (SEC ID N°: 46)
 nt 303-281 5'-CUUGAGCACCGAGUGCGUGAGCG-3' (SEC ID N°: 47).

Los oligonucleótidos de ARN se sintetizaron químicamente en un sintetizador de Applied Biosystems (Expedite 8909) usando protocolos convencionales por Ribopharma AG, Kulmbach. Para la hibridación de ARNip, cadenas sencillas 20 µM se incubaron en tampón de hibridación durante 1 min a 90°C seguido de 1 h a 37°C (Elbashir, 2001 a, Elbashir, 2001 b). Empezando con el día de la transferencia, los ratones SJL inducidos con EAE se inyectaron dos veces diariamente i. p. con 20 pmoles de moléculas ARNi hibridadas solubilizadas en PBS (100 pmol/ml, pH 7,4).

Ejemplo 10: Histopatología del tratamiento preventivo con antisentido para Smad7 *in vivo*

La histopatología del tratamiento con antisentido para Smad7 como se observa en la Figura 13 *in vivo* ya se ha descrito en el Ejemplo 2. La evaluación histopatológica de órganos fuera del SNC, como se observa en la Figura 14, se describe en el Ejemplo 6. Las Figuras ilustran que el tratamiento con Smad7-as2-ODN suprime la inflamación dentro del SNC sin inducir efectos secundarios en órganos no del SNC que se sabe que son afectados por la administración sistémica de TGF-beta activo.

Ejemplo 11: El tratamiento con antisentido para Smad7 suprime la proliferación de linfocitos T policlionalmente activados *in vitro*.

Este ejemplo proporciona pruebas de que el ODN antisentido específico para Smad7 inhibe dependientemente de la dosis la respuesta proliferativa asociada a la activación de linfocitos T mediada por la Con A de lectina y anticuerpos anti-CD3 unidos a placa.

En el primer experimento, poblaciones de células del bazo completas se estimularon durante 96 horas con la Con A de lectina (que media en la activación de linfocitos T policlonales) en presencia de concentraciones variables de Smad7-as2-ODN (SEC ID N°: 20) o Smad7-mut4-as-ODN (Figura 14). Sólo Smad7-as2-ODN (SEC ID N°: 20) redujo significativamente la proliferación. En el segundo experimento, los anticuerpos anti-CD3 unidos a placa se usaron para estimular linfocitos T enriquecidos sobre Ficoll, confirmando este resultado (Figura 15a). Para determinar si este efecto está limitado a linfocitos T CD4+ o CD8+, las subpoblaciones respectivas se aislaron y se estimularon con anti-CD3; el efecto antiproliferativo de Smad7-as2-ODN se extiende a tanto linfocitos T CD4+ como CD8+ (Figuras 15b y 15c).

Ejemplo 12: Efectos del tratamiento con antisentido para Smad7 *in vivo*

Para cribar para más ODN antisentido específicos para Smad7 posiblemente eficaces para el tratamiento de enfermedad autoinmunitaria, Smad7-as3-ODN (SEC ID N°: 21) y Smad7-as4-ODN (SEC ID N°: 9) se probaron en paralelo con Smad7-as2-ODN (SEC ID N°: 20) para su efecto sobre la proliferación de LNC específicas para PLP₁₃₉₋₁₅₁ (Figura 16a). Todos los ODN probados suprimieron dependientemente de la dosis la proliferación, aunque con alguna variabilidad entre experimentos (compárese el efecto de Smad7-as2-ODN en las Figuras 6, 14, 15, 16). Smad7-as3-ODN fue algo menos eficaz que Smad7-as2-ODN en prevenir el desarrollo de signos de EAE cuando se administró i.p. a una dosis de 5 mg/kg diariamente desde el día de la transferencia adoptiva como se describe en Materiales y procedimientos (Figura 16b, Tabla 5). Este ejemplo complementa los resultados del Ejemplo 2 (Tabla 3) y el Ejemplo 4 en los que se muestran que diversos ODN específicos para Smad7 suprimen la proliferación de linfocitos T a un grado similar, mientras que el efecto del tratamiento sobre la EAE por transferencia adoptiva varía entre ODN de diferente secuencia.

Tabla 5

	Smad7-as2	Smad7-as3	Smad7-mut4-as	PBS
tamaño del grupo	n=7	n=7	n=7	n=7
incidencia de EAE	7/7	7/7	7/7	7/7
prevalencia de EAE (día 11)	2/7	3/7	7/7	7/7
día de aparición (media ± EE)	12,86 ± 0,84	11,86 ± 0,91	9,29 ± 0,60	9,29 ± 0,30
puntuación máx. (media ± EE)	2,36 ± 0,17	2,5 ± 0,17	3,93 ± 0,36	2,71 ± 0,14
puntuación acumulada (d 1-28)	167,0	234,0	467,5	280,0
muerres	0	0	3 (d7, 9, 11)	0

Efectos del tratamiento preventivo con diversos ODN antisentido para Smad7. En el grupo tratado con Smad7-mut4-as (una molécula antisentido que no puede interaccionar específicamente con o hibridarse con un producto de expresión (ARNm) de Smad7 o interaccionar específicamente con/hibridarse con una o más moléculas de ácidos nucleicos que codifican Smad7), tres ratones murieron en momentos tempranos durante el experimento. Por convención se les dio un grado 5 en la puntuación de gravedad de enfermedad hasta el final del experimento.

Ejemplo 13: El tratamiento con antisentido para Smad7 suprime *in vivo* respuestas de cebado

Este ejemplo se suma a los datos del Ejemplo 7 en demostrar que las respuestas de cebado antigénicas *in vivo* de linfocitos T autorreactivos son rotundas durante el tratamiento con Smad7-as2-ODN y producen linfocitos T de encefalitogenicidad reducida.

Ratones inmunizados con péptido de PLP se trataron con 100 µg (5 mg/kg) de Smad7-as2 o Smad7-mut4-as-ODN o una cantidad igual de PBS diariamente i.p. desde el día 6 hasta el día 9 después de la inmunización. Las LNC de estos grupos de ratones se reestimularon posteriormente con antígeno durante 96 horas y se usaron para ensayos de proliferación (Figura 17) e inducción de EAE por transferencia adoptiva (5×10^6 LNC por ratón receptor) (Figura 18).

Las LNC de ratones tratados con Smad7-as2-ODN durante el cebado antigénico proliferan menos vigorosamente tras la reestimulación de péptidos específicos con respecto a LNC de ratones sin tratar o de ratones tratados con Smad7-mut4-as-ODN (Figura 17).

En la Figura 18 se muestran dos experimentos separados. A diferencia de LNC derivadas de ratones tratados con Smad7-mut4-as-ODN o PBS, las LNC de ratones tratados con Smad7-as2-ODN tanto indujeron un desarrollo clínico altamente atenuado (Figura 18a, compárese el número de muertes) como no indujeron EAE en absoluto (Figura 18b). Los resultados *in vitro* de las Figuras 10 (Ejemplo 7) y 17 sugieren que esto es debido a la inhibición parcial de respuestas primarias inmunitarias en ratones tratados con ODN antisentido para Smad7 con la consecuencia de que, tras la estimulación antigénica, la capacidad inductora de enfermedad de los linfocitos T resultantes está

considerablemente comprometida.

Ejemplo 14: El tratamiento preventivo con ARN interferente pequeño (ARNip) específico para Smad7 alivia el desarrollo clínico en at-EAE

La eficacia del tratamiento con ODN antisentido para Smad7 sugiere que los enfoques que eligen ARNm de Smad7 o proteína Smad7 como diana, produciendo una reducción de ARNm y/o proteína o su inhibición funcional, pueden ser similarmente eficaces para el tratamiento *in vivo* de enfermedad. Por tanto, los ARN interferentes pequeños (ARNip) específicos para Smad7 se sintetizaron y se usaron para el tratamiento de EAE por transferencia adoptiva (Figura 19, Tabla 6). El tratamiento preventivo con dos de estos ARNip específicos para Smad7 (ARNi1, ARNi2) produjo una mejora de signos clínicos de EAE durante la fase aguda de la enfermedad con respecto a ratones tratados con PBS.

Tabla 6

	Smad7-ARNi1	Smad7-ARNi2	PBS
tamaño del grupo	n=7	n=7	n=7
incidencia de EAE	7/7	7/7	7/7
prevalencia de EAE (día 11)	4/7	5/7	7/7
día de aparición (media $\pm$ EE)	11,29 $\pm$ 0,94	11,14 $\pm$ 0,87	9,29 $\pm$ 0,30
puntuación máx. (media $\pm$ EE)	2,36 $\pm$ 0,19	2,5 $\pm$ 0,2	2,71 $\pm$ 0,14
puntuación acumulada (d 1-31)	241,5	244,5	314,5
muertes	0	0	0

Tratamiento preventivo con ARN interferentes pequeños (ARNip) específicos para Smad7.

Ejemplo 15: Parte metodológica de los ejemplos relacionados con experimentos de EAE en ratas

Animales:

Se obtuvieron ratas agoutí morenas hembra (ratas DA) de Harlan Winkelmann (Borchen, Alemania). Las ratas tuvieron 13 semanas de edad cuando se usaron para procedimientos de inmunización. Las ratas se alojaron en jaulas normales con acceso libre a comida y agua; a las ratas paralizadas se les permitió un acceso más fácil a la comida y el agua.

Antígenos:

El fragmento del extremo N de la glicoproteína de oligodendrocitos de mielina (MOG) de rata que contiene los aminoácidos 1-125 (ADNc obtenido como una amable donación de C. Linington, Munich) se expresó en *Escherichia coli* y se purificó a homogeneidad por cromatografía en quelato como se describe por Amor (Amor, 1994). La secuencia de aminoácidos de la proteína MOG de rata recombinante (AA 1-125) representada en SEC ID N°: 84 comprende además una marca de péptido 6xHis introducida para la facilidad de purificación. La proteína purificada en urea 6 M se dializó contra PBS y las preparaciones obtenidas se almacenaron a -20°C. Para simplicidad, este fragmento de MOG usado se llama "MOG" en el resto de la presente solicitud.

Inducción, tratamiento y evaluación de EAE inducida por MOG:

Se preparó una emulsión que contenía 65 μ g de MOG en PBS y un volumen igual de adyuvante incompleto de Freund complementado con 400 μ g de *Mycobacterium tuberculosis* (H37RA, véase el Ejemplo 1) en un volumen de inoculación de 200 μ l por rata inmunizada. Las inmunizaciones se realizaron en ratas anestesiadas intradérmicamente en la base de la cola.

El tratamiento con Smad7-as2-ODN o Smad7-mut4-as-ODN o una cantidad igual de PBS se realizó como se indica en los Ejemplos 1 y 9. Las ratas se examinaron diariamente para signos de enfermedad y se clasificaron en una escala de gravedad creciente de 0 a 5 del siguiente modo: 0 sin signos; 0,5 debilidad parcial de la cola; 1 la cola se mueve con dificultad; 2 debilidad parcial de las extremidades traseras o hemiparesia; 3 parálisis completa de al menos una extremidad trasera; 4 grave debilidad de las extremidades delanteras; 5 moribunda o muerta.

Ejemplo 16: El tratamiento preventivo con antisentido para Smad7 mejora el desarrollo clínico de EAE activa inducida por MOG en ratas

La EAE por transferencia adoptiva en ratones SJL es un modelo para la enfermedad del SNC autoinmunitaria humana esclerosis múltiple. Por tanto, los resultados del tratamiento como se demuestra en los ejemplos previos sugieren que los tratamientos que inhiben funcionalmente ARNm de Smad7 y/o proteína tal como ODN antisentido específico para Smad7 representan un prometedor enfoque para tratar esclerosis múltiple o enfermedades inflamatorias del SNC autoinmunitarias relacionadas. Para verificar esta hipótesis se eligió un segundo modelo de enfermedad relevante para esclerosis múltiple. En este modelo, la EAE inducida por inmunización con el fragmento

del extremo N de MOG se diferencia significativamente del modelo de transferencia adoptiva. Con la presencia de desmielinización significativa y la contribución putativa de anticuerpos durante la patogénesis de la lesión, probablemente incluso más estrechamente represente la enfermedad humana que la EAE murina (Storch, 1998). De forma interesante, el tratamiento preventivo con antisentido para Smad7 mejoró el desarrollo clínico de EAE inducida por MOG en ratas tratadas i.p. con 5 mg/kg de Smad7-as2-ODN. El desarrollo de signos clínicos se retrasó con respecto a ratas tratadas con PBS (Figura 20, Tabla 7).

Tabla 7

	Smad7-as2	Smad7-mut4-as	PBS
tamaño del grupo	n=8	n=8	n=8
incidencia de EAE	5/8	6/8	6/8
prevalencia de EAE (día 14)	1/8	6/8	6/8
prevalencia de EAE (día 17)	3/8	4/8	6/8
día de aparición (media $\pm$ EE)*	15,20 $\pm$ 1,66	10,20 $\pm$ 1,42	11,50 $\pm$ 0,61
puntuación máx. (media $\pm$ EE)	1,44 $\pm$ 0,49	1,69 $\pm$ 0,54	2,25 $\pm$ 0,62
puntuación acumulada (d 1-17)	23,5	57,0	80,5

* sólo animales enfermos
Tratamiento de EAE activa inducida por MOG

Ejemplo 17: Parte metodológica de los ejemplos relacionados con accidente cerebrovascular experimental

Los siguientes experimentos cumplieron las pautas de la ley alemana que gobierna el cuidado de los animales. Los protocolos animales fueron autorizados por el Comité para el cuidado animal del gobierno bávaro y el comité de ética local.

Animales

Se suministraron ratas Wistar macho adultas (peso corporal 250-270 g) por Charles River (Sulzfeld, Alemania) y se mantuvieron con comida y agua a voluntad a 23°C y 50% de humedad relativa durante al menos 5 días antes de la cirugía.

Cirugía e inducción de isquemia cerebral focal

La anestesia se indujo con inhalación de 4% de isoflurano y luego se mantuvo con 1,5% de isoflurano en una mezcla de gas de 70% de nitrógeno y 30% de oxígeno después de la intubación endotraqueal y ventilación mecánica por un respirador para animales pequeños controlado a presión. La temperatura rectal se monitorizó continuamente durante todo el experimento y se mantuvo a 37,0°C usando una lámpara termostáticamente regulada por retroalimentación y platina. Después de la canulación de la arteria de la cola que proporciona la monitorización de la tensión arterial y los gases en sangre, las ratas se colocaron en un marco estereotáctico. El cráneo se expuso por una incisión media y se taladraron dos agujeros de trépano que medían 2 mm de diámetro para la monitorización bilateral de la circulación sanguínea cortical local (CSCL). Ambos territorios de suministro de la ACM se monitorizaron continuamente por flujometría por láser-Doppler (MBF3D, Moor Instruments, R.U.) y el EEG cortical se registró en ambos lados. Después de llevarse a cabo una incisión media del cuello, la bifurcación carótida derecha se expuso y las ramas extracraneales de la arteria carótida interna (ACI) se ligaron y se electrocoagularon, asistido por un microscopio quirúrgico (Zeiss, Oberkochen, Alemania). Posteriormente, la arteria carótida externa (ACE) se ligó y se cortó distalmente a la arteria tiroidea superior, después de que la arteria carótida común se hubiera ocluido por un microclip (Biomer FD 68, Tuttlingen, Alemania). Entonces, un monofilamento de nailon 4-0 recubierto con silicona (Ethicon) se introdujo en la ACE y se avanzó suavemente por la ACI hasta que su punta ocluyó el origen de la ACM derecha (Schmid-Elsaesser y col. 1998). Como resultado, la CSCL en el territorio de la ACM derecha disminuyó hasta aproximadamente el 20% de los valores de referencia. El filamento endovascular permaneció en ese sitio hasta que se permitió la reperusión mediante la extracción del filamento y la eliminación del microclip en la arteria carótida común después de 90 minutos de isquemia. Dos ratas con operación de referencia se procesaron idénticamente incluyendo la ligación y el corte de la arteria carótida externa, excepto para la oclusión del filamento intraluminal de la ACM. Las variables fisiológicas que incluyen tensión arterial, frecuencia cardíaca, gases en sangre arterial (pO₂, pCO₂, pH, exceso de base, saturación de O₂), glucosa en plasma y hematocrito se registraron 15 min antes de la cirugía y posteriormente cada 15 min durante todo el experimento hasta que los animales se volvieron a colocar en sus jaulas.

Administración intraarterial local de ODN antisentido específico

Se usaron los siguientes ODN de fosforotioato PTO monocatenarios: Smad7-as2-ODN (SEC ID N°: 10) y Smad7-sentido-ODN (SEC ID N°: 43). La infusión de ODN empezando con reperusión después de 90 min de la isquemia se realizó por un catéter de PE introducido por la arteria carótida externa en la arteria carótida interna y se avanzó suavemente hasta que su punta se localizó directamente al principio del canal carotideo. Las ratas se trataron tanto con 400 pmoles de Smad7-as2-ODN por kg de peso corporal disuelto en 0,9% de NaCl a pH 7,4 (100 pmol/0,5 ml

durante 1 h; tratamiento, n=8) como con 400 pmoles de Smad7-sentido-ODN por kg de peso corporal disuelto en 0,9% de NaCl a pH 7,4 (100 pmol/0,5 ml durante 1 h; control, n=8).

- 5 Inmediatamente después de la infusión, el catéter se sacó, seguido de la ligación del muñón de la arteria carótida externa y cierre de la herida por sutura. Después de la eliminación de anestésicos volátiles y la restitución de la respiración espontánea, los animales se desentubaron y se monitorizaron continuamente en lo referente a las constantes vitales, temperatura corporal y rendimiento neurológico, antes de volver a colocarse en sus jaulas.

Evaluación clínica

- 10 Las deficiencias neurológicas se puntuaron según Bederson y col. (1986): 0, asintomáticas; 1, la insuficiencia se extiende a la pata delantera contralateral (leves); 2, trazada de círculos hacia el lado contralateral (moderadas); y 3, pérdida del caminar o reflejo de enderezamiento (graves). Sólo los animales con una puntuación de deficiencias neurológicas de 2 o superiores cuando se desentubaron y se despiertan se incluyeron en las posteriores etapas del protocolo.

Medición del volumen de infarto por RMN in vivo

- 15 Siete días y tres meses después de la isquemia, las ratas se volvieron a anestesiarse para la cuantificación de la lesión isquémica por RMN *in vivo*. Las mediciones se realizaron en un escáner 1,5 T MR (Siemens Magnetom Vision, Erlangen, Alemania) similar al enfoque descrito por (Guzman, 2000). La cabeza de la rata se posicionó en el orificio con una bobina de pequeña superficie (DI 5 cm) que actuaba de bobina de volumen. Se usaron dos tipos de secuencias para escanear el cerebro de la rata: una secuencia de TSE ponderada en T₂ (T₂: TR 2500, TE 96, ETL 7, TA 6:04, Adq 8, SL 2 mm, hueco 0, Ma 128x256, 4/8 RecFOV, FOV 84 mm) y una secuencia de recuperación de la inversión fuertemente ponderada en T₁ (IR: TR 3000, TE 60, TI 150, ETL 11, TA 5:33, Adq 10, SL 1,5 mm, hueco 0, Ma 121x256, 4/8 RecFOV, FOV 109 mm). El escaneo incluyó las series axial y coronal de ambos tipos de secuencias (T₂, IR). Un estudio completo siguiendo este protocolo duró durante aproximadamente 45 min de tiempo de medición total.

- 25 La evaluación morfométrica cuantitativa del área infartada en cada rebanada de RMN fue realizada por un neurorradiólogo experimentado que se cegó a los datos experimentales usando un software de análisis de imágenes semiautomático (Image Analysis, NIH, Bethesda, MD, EE.UU.) en un ordenador Macintosh G3. Como las secuencias de recuperación de la inversión permiten la diferenciación de tejido infartado de tejido cerebral vital más claramente, las secuencias de IR (secciones axiales y coronales) se usaron para la volumetría de infarto. Básicamente, los volúmenes de infarto se calcularon en cm³ calculando la suma de las áreas de tejido infartado de cada plano multiplicado por el espesor de rebanada.

Histología

- 35 Los volúmenes de infarto también se evaluaron semicuantitativamente por evaluación histológica. Posterior a la segunda RMN a los tres meses de supervivencia después de la oclusión de la ACM, las ratas se sacrificaron en anestesia profunda. Después de la decapitación y criofijación, los cerebros se cortaron completamente en secciones coronales de 40 µm. Secciones representativas del territorio de la ACM se montaron y se tiñeron con violeta de cresilo (tinción de Nissl) o se inmunotintaron para la proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP; anticuerpo de mono dirigido contra IgG de conejo 1:1000; detectado con DAB) para la evaluación de la lesión isquémica por microscopía óptica.

Análisis estadístico

- 40 Se hizo una comparación entre grupos (Smad7-as2-ODN, Smad7-sentido-ODN) por un análisis unilateral de la varianza (ANOVA) con una prueba de Bonferroni a posteriori para múltiples comparaciones. Los cálculos se realizaron usando un paquete de software (SigmaStat) en un ordenador IBM.

Ejemplo 18: El tratamiento local con ODN antisentido para Smad7 produce un volumen de infarto reducido en el día 7 y 3 meses después de la isquemia cerebral focal

- 45 *Resonancia magnética nuclear in vivo*

- 50 Los tamaños de lesión como se miden por la volumetría de infarto por RMN en el día 7 (3 meses) para ratas tratadas por Smad7-sentido-ODN o Smad7-as2-ODN fueron $1,32 \pm 0,33 \text{ cm}^3$ ($1,55 \pm 0,35 \text{ cm}^3$) frente a $0,49 \pm 0,25 \text{ cm}^3$ ($0,60 \pm 0,28 \text{ cm}^3$), respectivamente. Por consiguiente, el grado de neuroprotección en ratas tratadas con Smad7-as2 en comparación con el control fue el 58,47% en el día 7 y el 55,88% a los tres meses después de la isquemia ($p < 0,001$). Por tanto, el tratamiento con Smad7-as se asoció a una espectacular reducción de la lesión isquémica en tanto la fase aguda como crónica de isquemia cerebral focal (Figura 21).

Los hallazgos de RMN *in vivo* secuenciales de dos animales representativos tanto tratados con Smad7-sentido-ODN como Smad7-as2-ODN se ilustran en la Figura 22 a-h. Hubo una estrecha correlación entre el grado de lesión isquémica como se demuestra por la RMN de seguimiento y el aspecto histológico de la lesión. Sorprendentemente,

tanto los ganglios basales como la corteza cerebral estuvieron significativamente más afectados en ratas tratadas con sentido para Smad7 que en el grupo tratado con Smad7-as2-ODN.

Histología

La evaluación histológica semicuantitativa de la lesión isquémica en el espécimen teñido con violeta de cresilo o inmunoteñido para el marcador de astrocitos la proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP) se confirmó en los hallazgos por RMN *in vivo*. Los volúmenes de infarto totales fueron considerablemente más pequeños en ratas tratadas con Smad7-as2-ODN con respecto a ratas tratadas con Smad7-sentido-ODN. El efecto protector de Smad7-as2-ODN incluyó la corteza cerebral y la materia blanca subcortical, y los ganglios basales (Figura 22 i-l). Al nivel del microscopio óptico hubo una pronunciada gliosis que cubría la lesión en el espécimen de ambos grupos de tratamiento, pero no hubo pruebas de inflamación persistente 3 meses después del accidente cerebrovascular.

Por tanto, estos datos indican que el tratamiento local con ODN antisentido específico para Smad7 media en neuroprotección significativa y reduce los volúmenes de infarto después de isquemia cerebral focal. Esta protección ya se ha observado después de la administración de una dosis única de ODN antisentido.

Ejemplo 19

Linfocitos T de Jurkat (ECACC N° 88042803) se cultivaron en medio RPMI con 10% de SBF, penicilina 1 U/ml, estreptomycin 10 µg/ml y glutamina 20 mM. Antes del tratamiento, las células se cambiaron a medio de inanición sin SBF. Después de 3 días, las células se contaron usando la cámara Neubauer y se sembraron en placas de 24 pocillos a 2×10^5 células/pocillo, y luego se trataron con Smad7-as2-ODN (10 µM), Smad7-mut-4-AS-ODN (10 µM) o PBS durante 4 horas. Entonces, las células se incubaron con o sin TGF-beta (5 ng/µl) durante 30 minutos. Las células se centrifugaron, se lavaron y la cantidad de 1×10^7 células se lisaron con 600 µl de tampón RLT según el protocolo de QIAGEN RNeasy mini (n° de catálogo 74104). Se usaron 90 ng de ARN total para la RT-PCR de una etapa usando el kit QuantiTect SYBR Green PCR de QIAGEN (n° de catálogo 204143) usando cebadores de Smad7 y como patrón el par de cebadores de ARNr QuantumRNA Classic 18S de Ambion (n° de catálogo 1716). Los cebadores de Smad7 fueron sentido: 5'-ATG TTC AGG ACC AAA CGA TCT GCG-3' y antisentido: 5'-AGC TGC CGC TCC TTC AGT TTC TT-3'. Para la amplificación se usó el sistema de PCR en tiempo real RotorGene (Corbett Research) con el perfil de temperatura de una etapa: temperatura de transcriptasa inversa 50°, 30 minutos; activación de polimerasa, 95°, 15 minutos; 45 ciclos de: temperatura de desnaturalización 94°, 20 s, temperatura de hibridación 59°, 30 s, temperatura de extensión 72°, 120 s. La medida de fluorescencia se hizo después de cada ciclo. Al final se hizo una curva de fusión (80°-95°), se mantuvo 10 s y la medida de la fluorescencia se hizo para verificar la amplificación del producto de PCR esperado. Para medir la concentración del ADN producido, los presentes inventores usaron una curva patrón producida por amplificación de cantidades dadas de un plásmido de Smad7 producido clonando la región codificante completa del ARNm de Smad7 humana en el vector de clonación pCR4 Blunt TOPO de Invitrogen (n° de catálogo K2875-J10). Para estimar la concentración de ARNr, los presentes inventores usaron el ARN estándar administrado con los cebadores (Qiagen).

Referencias

- Agrawal S (1998) Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 8, 135-139.
- Ali D (2001) J Cereb Blood Flow Metab 21, 820-827.
- Amor S 1994 J. Immunol. 153, 4349-4356.
- An H (2001) J Org Chem, 66, 2789-2801.
- Ata AK 1997 Acta Neuropathol (Berl) 93, 326-33.
- Baker JC (1996) Genes Dev. 10, 1880-1889.
- Beck J (1991) Acta Neurol Scand, 84, 452-455.
- Benveniste EN 1998 Cytokine Growth Factor Rev 9, 259-75.
- Bitzer M (1998) Kidney Blood Press Res, 21, 1-12.
- Bitzer M (2000) Genes Dev. 14, 187-197.
- Blind M (1999). Proc Natl Acad Sci U S A 96, 3606-3610.
- Blobe GC (2000) N Engl J Med 342, 1350-1358.
- Border WA (1994) N Engl J Med 331, 1286-1292.
- Brocke S (1996) Methods 9, 458-462.
- Brummelkamp TR (2002) Science 296, 550-553
- Buisson A 1998 Faseb J 12, 1683-91.
- Calabresi PA (1998) Neurology 51, 289-92.
- Chaloux E 1999 FEBS Lett 457, 478-82.
- Chen Y (1996 Proc Natl Acad Sci USA 93, 388-391.
- Chen LZ (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95, 12516-12521.
- Chen W (2001) J Exp Med 194, 439-453.
- Chen Y (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 93, 388-391.
- Choi DW 1996 Curr Opin Neurobiol 6, 667-72.
- Croxford JL (1998) J Immunol, 160, 5181-5187.
- Datta PK (2000) Mol Cell Biol 20, 3157-3167.

De Groot CJ (1999) *J Neuropathol Exp Neurol* 58, 174-187.
 De Jong ES (2002) *Curr Trop Med Chem* 2, 289-302
 Derynck R (1986) *J Biol Chem* 261, 4377-4379.
 Derynck R (1987) *Nucleic Acids Res* 15, 3188-3189.
 5 De Oliveira MC (2000) *Life Sci* 67, 1625-1637.
 Diab A (1998) *J Neuroimmunol* 85, 146-154.
 Dixon CE 1991 *J Neurosci Methods* 39, 253-62.
 Donze O (2002) *Nucleic Acids Res* 30, e46.
 Dorner (1996) *Bioorg Med Chem* 4, 709-715.
 10 Ebisawa T (2001). *J Biol Chem* 276, 12477-12480.
 Elbashi SM (2002), *Methods* 26:199-213.
 Elbashir SM (2001 a) *Nature* 411, 494-498.
 Elbashir SM (2001 b) *Genes Dev.* 15, 188-200.
 Faden AI 1993 *Crit Rev Neurobiol* 7, 175-86.
 15 Famulok M (1998) *Curr Opin Chem Biol* 2, 320-327
 Ferrigno O 2002 *Oncogene* 21, 4879-84.
 Fiocchi C (1998) *Gastroenterology* 115, 182-205.
 Francis G (1997) *Ann Neurol* 42, 467
 Friedman SL (1993) *N Engl J Med* 328, 1828-1835.
 20 Garside P (2001) *Semin Immunol* 13, 177-185
 Gayo A (2000) *J Neurol Sci* 179, 43-49.
 Gold L (1995) *Annu Rev Biochem* 64, 763-797.
 Gonnella PA (1998) *J Immunol* 160, 4708-4718
 Grishok A (2001) *Cel.* 106, 23-34.
 25 Gross CE 1993 *Stroke* 24, 558-62.
 Gross CE (1994) *Neurol Res.* 16 :465-470.
 Guzman R 2000 *J Neurosci Methods* 97, 77-85.
 Hammond SM (2001) *Science* 293, 1146-1150.
 Hailer NP(2001) *Eur J Neurosci* 14, 315-326.
 30 Han J (1994). *Antisense Res Dev* 4, 53-65.
 Hayashi H (1997) *Cell* 89, 1165-1173.
 Hefferan TE 2000 *J Biol Chem* 275, 20255-9.
 Henrich-Noack P 1996 *Stroke* 27, 1609-14; discusión 1615.
 Hermann T (2000) *Angew Chem Int Ed Engl* 39, 1890-1904.
 35 Hoffman LM (1998) *Res. Immunol.* 149, 790-794.
 Hughes D (1980) *Clin Exp Immunol.* 40, 523-531.
 Hutvagner G (2001) *Science* 293, 834-838.
 Imamura T (1997) *Nature* 389, 622-626.
 Inoue H (1998) *Mol Biol Cell* 9, 2145-2156.
 40 Ishisaki (1999) *J Biol Chem* 274, 13637-13642.
 Issazadeh S (1998) *J Immunol.* 161, 1104-1112.
 Issazadeh S (1995) *J Neuroimmunol.* 61, 205-212.
 Itoh F (2001) *EMBO J* 15, 4132-4142.
 Itoh S (2000) *Eur J Biochem* 267, 6954-6967.
 45 Itoh S (1998) *J Biol Chem.* 273, 29195-29201.
 Johns LD (1991) *J. Immunol* 147, 1792-1796.
 Johns LD (1993) *J Neuroimmunol* 1993; 47, 1-7.
 Johnsen SA 2002a *Oncogene* 21, 5783-90.
 Johnsen SA 2002b *J Cell Biochem* 87, 233-41.
 50 Johnsen SA 2002c *J Biol Chem* 277, 30754-9.
 Kanamaru C (2001) *J Biol Chem* 276, 45636-45641.
 Kandimalla E (1994) *Gene* 149,115-121.
 Karpus WJ (1999) *J Neurovirol* 5, 1-2.
 Kasus-Jacobi A (2000) *Oncogene.* 19, 2052-2059.
 55 Kavsak P (2000) *Mol Cell* 6, 1365-1375.
 Khanna AK (1999) *Transplantation* 67, 882-889.
 Khoury SJ (1992) *J Exp Med.* 176, 1355-1364.
 Kiefer R (1998) *J Neuropathol Exp Neurol* 57, 385-395.
 Kim JS 1996 *Stroke* 27, 1553-7.
 60 Krieglstein K 1998 *J Neurosci* 18, 9822-34.
 Krupinski J 1996 *Stroke* 27, 852-7.
 Kulkarni AB 1993 *Am J Pathol* 143, 3-9.
 Kulkarni AB (1993) *Proc Natl Acad Sci USA*, 90, 770-774.
 Kuruvilla AP (1991) *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 2918-2921.
 65 Lagna G (1996) *Nature* 383, 832-836.
 Leaman DW (1999) *Meth Enzymol* 18, 252-265.

Lehrmann E 1998 *Glia* 24, 437-48.
 Lehrmann E 1995 *Exp Neurol* 131, 114-23.
 Letterio JJ (2000) *Cytokine Growth Factor Rev* 11, 81-87.
 Letterio JL (1998) *Annu. Rev. Immunol.* 16, 137-161.
 5 Li JH 2002 *J Am Soc Nephrol* 13, 1464-72.
 Liblau RS (1995) *Immunol. Today* 16, 34-38.
 Lindholm D 1992 *J Cell Biol* 117, 395-400.
 Liu F (1996). *Nature* 381, 620-623.
 Logan A 1994 *Eur J Neurosci* 6, 355-63.
 10 Logan A 1992 *Brain Res* 587, 216-25.
 Martin R (1992) *Annu. Rev. Immunol* 10, 153-187.
 Massague J (1987) *Cell* 49, 437-438.
 Mathisen PM (1997) *J Exp Med* 186, 159-164.
 Mattson MP 1997 *Brain Res Brain Res Rev* 23, 47-61.
 15 Mayer G (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 4961-4965.
 McNeill H 1994 *Neuroreport* 5, 901-4.
 Miller A (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89, 421-425.
 Miller SD (1994) *Immunol Today* 15, 356-361.
 Miyazono K (2001) *J Cell Physiol* 187, 265-276.
 20 Mokhtarian F (1994) *J Immunol* 152, 6003-10.
 Monteleone G (2001) *J Clin Invest* 108, 601-609.
 Monroe RJ (1999) *Immunity* 11, 201-212.
 Morganti-Kossmann MC (1999) *J Neurotrauma.* 16, 617-622.
 Nagarajan RP (1999) *J Biol Chem* 274, 33412-33418.
 25 Nakao A (2000) *J Exp Med* 192, 151-158.
 Nicholson LB (1995) *Immunity* 3, 397-405.
 O'Garra A (1997) *Curr Opin Immunol* 9, 872-883.
 Okuda Y (1995) *J Neuroimmunol* 62, 103-112.
 Ostresh JM (1996) *Methods Enzymol.* 267, 220-324.
 30 Ostendorf T (2001) *J Am Soc Nephrol.* 12, 909-918.
 Pabo CO (1996) *Bioorg Med Chem.* 4, 1545-1558.
 Pang L 2001 *Stroke* 32, 544-52.
 Panitch H (1997) *Ann Neurol* 42, 459-463.
 Peterziel H 2002 *J Cell Biol.* 159, 157-167
 35 Prakash TP (2001) *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 20, 829-832.
 Pratt BM 1997 *Cytokine Growth Factor Rev* 8, 267-92.
 Prehn JH 1993 *J Cereb Blood Flow Metab* 13, 521-5.
 Pulaski L (2001) *J Biol Chem* 276, 14344-14349.
 Racke MK (1994) *J Exp Med* 180,1961-1966.
 40 Racke MK (1991) *J. Immunol.*, 146, 3012-3017.
 Racke MK (1992). *Int Immunol* 4, 615-620.
 Racke MK (1993) *J Neuroimmunol* 46, 175-183.
 Raine CS (1995) *Nature Medicine* 1, 211-214.
 Ribeiro A 1999 *Hepatology* 30, 1490-7.
 45 Rimaniol AC 1995 *Neuroreport* 7, 133-6.
 Rose RB (1996) *Biochemistry* 35, 12933-12944.
 Ruocco A (1999) *J Cereb Blood Flow Metab* 19, 1345-1353.
 Sandrock B (2001) *J Biol Chem* 276, 35328-35333.
 Santambrogio L (1993) *J. Immunol* 151, 1116-1127.
 50 Santambrogio L (1998) *J Neuroimmunol* 81, 1-13.
 Samani TD (2001) *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, 11, 129-136.
 Schwöpe I (1999) *J Org Chem*, 64:4749-4761.
 Semple SC (2001) *Biochim Biophys Acta*, 10, 152-166.
 Sharma K (2000) *Cytokine Growth Factor Rev* 11, 115-23.
 55 Slevin M (2000) *Stroke* 31, 1863-1870.
 Smith L (2000) *Eur J Pharmacol Sci* 11, 191-198.
 Souchelnytskyi S (1998) *J Biol Chem.* 273, 25364-25370.
 Sporn MB (1989) *Jama* 262, 938-941.
 Sporn MB (1987). *J Cell Biol* 105, 1039-45.
 60 Stanzani L 2001 *Cerebrovasc Dis* 12, 240-4.
 Steinman L (1997) *J Exp Med* 185, 2039-2041.
 Storch MK 1998 *Brain Pathol* 8, 681-94.
 Subramaniam M 1995 *Nucleic Acids Res* 23, 4907-12.
 Subramaniam M 1998 *J Cell Biochem* 68, 226-36.
 65 Suchanek EG (1986) *Biochemistry* 25, 5987-5991.
 Sudol M 1994 *Oncogene* 9, 2145-52.

5 Sullivan P 2002 Brain Res 949, 88-96.
 Sun S (2000) Curr Opin Mol Ther 2, 100-105.
 Suzuki C 2002 J Biol Chem. 29, 1621-1625
 Tachibana I 1997 J Clin Invest 99, 2365-74.
 Tanaka M (1999) J Neurobiol 41, 524-539.
 Tanuma N (2000) J Neuroimmunol 108, 171-180.
 Teillaud JL (1999) Pathol Biol 47, 771-775.
 Terrell TG (1993) Int Rev Exp Pathol 34 Pt B, 43-67.
 Thorbecke GJ (2000) Cytokine Growth Factor Rev 11, 89-96.
 10 Tsukazaki T (1998) Cell 95:779.791.
 Ulloa L (1999) Nature 397, 710-713.
 Verschueren K (2000) J Biol Chem 275, 11320-11326.
 Vorobjev PE (2001) Antisense Nucleic Acid Drug Dev, 11, 77-85.
 Walton PS (1999) Biotechnol Bioeng, 65, 1-9.
 15 Wang X 1995 Brain Res Bull 36, 607-9.
 Weinberg AD (1992) J Immunol 148, 2109-2117.
 Weiner HL (1994) Annu. Rev. Immunol 12, 809-837.
 Wekerle H (1986) Trends Neurosci 9, 271-277.
 Wiendl H (2000) Nervenarzt 71, 597-610.
 20 Winer S (2001) J Immunol 166, 2831-2841.
 Winer S (2001) J Immunol 166, 4751-4756.
 Wodak SJ (1987) Ann N Y Acad Sci. 501, 1-13.
 Wolinsky JS (2000) Neurology, 54, 1734-41.
 Woodroffe MN (1993) Cytokine 5, 583-588.
 25 Wyss-Coray T (1997). J Neuroimmunol, 77, 45-50.
 Wyss-Coray T (1995) Am J Pathol, 147, 53-67.
 Wyss-Coray T (2000). Am J Pathol, 156, 139-150.
 Xu LY (2000) Clin Immunol 95, 70-78.
 Yamashita K 1999 Brain Res 836, 139-45.
 30 Yang D (2002) Proc Natl Acad Sci USA 99, 9942-9947.
 Zhang Y (1996) Nature 383:168-172.
 Zhang Y (1997) Curr Biol. 7, 270-276.
 Zhu H (1999) J Biol Chem 274, 32258-32264.
 Zhu Y 2000 Brain Res 866, 286-98.
 35 Zhu Y (2002) J Neurosci 22, 3898-3909.
 Zamvil SS (1990) Annu. Rev. Immunol. 8, 579-621.
 Ziyadeh FN (2000) Proc Natl Acad Sci U S A 97, 8015-8020.

LISTADO DE SECUENCIAS

40 <110> Ribopharma AG
 STEINBRECHER, Andreas
 <120> Inhibidores de Smad7 para el tratamiento de enfermedades del SNC
 45 <130> F 2339 PCT
 <150> EP 01 12 6140.1
 <151> 02-011-2001
 50 <160> 84
 <170> PatentIn versión 1
 55 <210> 1
 <211> 3111
 <212> ADN
 <213> homo sapiens
 60 <400> 1

ggcacgagcg gagagccgcg cagggcgcgg gccgcgcggg gtggggcagc cggagcgag	60
gcccccgatc ccggcgggc gccccgggc ccccgcgcg gcccggcct ccgggagact	120
ggcgcatgcc acggagcgcc cctcgggcg ccgcgcctc tgccggggcc cctgctgctg	180
ctgctgtcgc ctgcgctgc tgccccaact cggcgcccg cttcttcatg gtgtgcggag	240
gtcatgttcg ctcttagca ggcaaacgac tttctctct gccctctgc cccgatgtt	300
caggaccaa cgatctgcgc tcgtccggcg tctctggagg agcctgcgc ccggcgcgga	360
ggacgaggag gagggcgag ggggaggtg aggaggagg gagctgcggg gagaaggggc	420
gacggacagc cgagcgcatg gggccggtg cggcgcccg gccaggctg gatgctgcct	480
gggcaaggcg gtgcgaggtg ccaaaggtca ccaccatccc cacccgccag ccgcgggcgc	540
cggcgcgcc gggggcgcc aggcggatct gaaggcgctc acgcactcgg tgctcaagaa	600
actgaaggag cggcagctgg agctgctgct ccaggccgtg gagtcccgcg ggggacgcg	660
caccgctgc ctctgctgc ccggccgct ggactgcagg ctgggcccg gggcgccgc	720
cggcgcgag cctgcgcag cgcctctgc ctactcgtc cccctctgc tgtgcaaagt	780
gttcaggtg ccgatctca ggcatctc ggaagtcaag aggtgtgtt gctgtgaatc	840
ttacgggaag atcaaccccg agctggtgt ctgcaacccc catcacctta gcgactctg	900
cgaactagag tctcccccc ctcttactc cagatacccg atggattttc tcaaaccaac	960
tgcaactgt ccagatgctg tgcttctc cgtgaaaca gggggaacga attatctggc	1020
ccctggggg ctttcagatt cccaacttct tctggagcct ggggatcggc cacactggtg	1080
cgtggtggca tactgggagg agaagacgag agtggggagg ctctactgtg tccaggagcc	1140

ES 2 388 968 T3

ctctctggat atcttctatg atctacctca ggggaatggc ttttgectcg gacagctcaa	1200
ttcggacaac aagagtcagc tgggtgcagaa ggtgcggagc aaaatcggct gcggcatcca	1260
gctgaacgcg gaggtggatg gtgtgtgggt gtacaaccgc agcagttacc ccatcttcat	1320
caagtccgcc aacttgaca acccggactc caggacgctg ttggtacaca aggtgttccc	1380
cggttttctcc atcaaggctt tcgactacga gaaggcgtac agcctgcagc ggoccaatga	1440
ccacgagttt atgcagcagc cgtggacggg ctttaccgtg cagatcagct ttgtgaaggg	1500
ctgggggtcag tgctacaccc gccagttcat cagcagctgc ccgtgctggc tagaggtcac	1560
cttcaacagc cggtagccgc gtgcggaggg gacagagcgt gagctgagca ggccacactt	1620
caaaactactt tgctgctaata tttttcctcc tgagtgcctg cttttcatgc aaactctttg	1680
gtcgtttttt ttttgtttgt tggttgggtt tcttcttctc gtctcgttt gtgttctgtt	1740
ttgtttcgtc ctttgagaaa tagcttatga aaagaattgt tgggggtttt tttggaagaa	1800
ggggcaggta tgatcggcag gacaccctga taggaagagg ggaagcagaa atccaagcac	1860
caccaaacac agtgtatgaa ggggggcggc catcatttca cttgtcagga gtgtgtgtga	1920
gtgtgagtg gtggctgtgt gtgcacgcgt gtgcaggagc ggcagatggg gagacaacgt	1980
gctctttgtt ttgtgtctct tatggatgtc ccagcagag aggtttgcag tcccaagcgg	2040
tgtctctctt gcccttggc cacgctcagt ggggcagagg cagtacctgg gcaagctggc	2100
ggctggggtc ccagcagctg ccaggagcac ggctctgtcc ccagcctggg aaagcccctg	2160
cccctctctt cctcatcaa ggacacgggc ctgtccacag gcttctgagc agcagcctg	2220
ctagtggccg aaccagaacc aattattttc atccttgtct tattcccttc ctgccagccc	2280
ctgccattgt agcgtctttc ttttttgccc atctgtcctt ggatctccct gagatgggct	2340
tcccaagggc tgccggggca gcccctcac agtattgtct acccagtgcc ctctcccctc	2400
agcctctccc ctgctgccc tggtgacatc aggtttttcc cggacttaga aaaccagctc	2460
agcactgcct gctcccatcc tgtgtgttaa gctctgctat taggccagca agcggggatg	2520
tccttgggag ggacatgctt agcagtcccc ttccctccaa gaaggatttg gtccgtcata	2580
acccaaggta ccatcctagg ctgacacctt actcttcttt catttcttct acaactcata	2640
cactcgtatg atacttcgac actgttctta gctcaatgag catgtttaga ctttaacata	2700
agctattttt ctaactacaa aggttttaaat gaacaagaga agcattctca ttggaaattt	2760
agcattgtag tgctttgaga gagaaaggac tcctgaaaaa aaacctgaga tttattaaag	2820
aaaaaatgt attttatgtt atatataaat atattattac ttgtaaatat aaagacgttt	2880

tataagcatc attatttatg tattgtgcaa tgtgtataaa caagaaaaat aaagaaaaga 2940
 tgcactttgc tttaatatata atgcaaataa caaatgccaa attaaaaaag ataaacacaa 3000
 gattgggtgtt ttttcctatg ggtgttatca cctagctgaa tgtttttcta aaggagttta 3060
 tgttccatta aacgattttt aaaatgtaca ottgaaaaaa aaaaaaaaaa a 3111

<210> 2
 <211> 426
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 2

Met Phe Arg Thr Lys Arg Ser Ala Leu Val Arg Arg Leu Trp Arg Ser
 1 5 10 15
 Arg Ala Pro Gly Gly Glu Asp Glu Glu Glu Gly Ala Gly Gly Gly Gly
 20 25 30
 Gly Gly Gly Glu Leu Arg Gly Glu Gly Ala Thr Asp Ser Arg Ala His
 35 40 45
 Gly Ala Gly Gly Gly Gly Pro Gly Arg Ala Gly Cys Cys Leu Gly Lys
 50 55 60
 Ala Val Arg Gly Ala Lys Gly His His His Pro His Pro Pro Ala Ala
 65 70 75 80
 Gly Ala Gly Ala Ala Gly Gly Ala Glu Ala Asp Leu Lys Ala Leu Thr
 85 90 95
 His Ser Val Leu Lys Lys Leu Lys Glu Arg Gln Leu Glu Leu Leu Leu
 100 105 110
 Gln Ala Val Glu Ser Arg Gly Gly Thr Arg Thr Ala Cys Leu Leu Leu
 115 120 125
 Pro Gly Arg Leu Asp Cys Arg Leu Gly Pro Gly Ala Pro Ala Gly Ala
 130 135 140
 Gln Pro Ala Gln Pro Pro Ser Ser Tyr Ser Leu Pro Leu Leu Leu Cys
 145 150 155 160
 Lys Val Phe Arg Trp Pro Asp Leu Arg His Ser Ser Glu Val Lys Arg
 165 170 175

Leu Cys Cys Cys Glu Ser Tyr Gly Lys Ile Asn Pro Glu Leu Val Cys
 180 185 190
 Cys Asn Pro His His Leu Ser Arg Leu Cys Glu Leu Glu Ser Pro Pro
 195 200 205
 Pro Pro Tyr Ser Arg Tyr Pro Met Asp Phe Leu Lys Pro Thr Ala Asp
 210 215 220
 Cys Pro Asp Ala Val Pro Ser Ser Ala Glu Thr Gly Gly Thr Asn Tyr
 225 230 235 240
 Leu Ala Pro Gly Gly Leu Ser Asp Ser Gln Leu Leu Leu Glu Pro Gly
 245 250 255
 Asp Arg Ser His Trp Cys Val Val Ala Tyr Trp Glu Glu Lys Thr Arg
 260 265 270
 Val Gly Arg Leu Tyr Cys Val Gln Glu Pro Ser Leu Asp Ile Phe Tyr
 275 280 285
 Asp Leu Pro Gln Gly Asn Gly Phe Cys Leu Gly Gln Leu Asn Ser Asp
 290 295 300
 Asn Lys Ser Gln Leu Val Gln Lys Val Arg Ser Lys Ile Gly Cys Gly
 305 310 315 320
 Ile Gln Leu Thr Arg Glu Val Asp Gly Val Trp Val Tyr Asn Arg Ser
 325 330 335
 Ser Tyr Pro Ile Phe Ile Lys Ser Ala Thr Leu Asp Asn Pro Asp Ser
 340 345 350
 Arg Thr Leu Leu Val His Lys Val Phe Pro Gly Phe Ser Ile Lys Ala
 355 360 365
 Phe Asp Tyr Glu Lys Ala Tyr Ser Leu Gln Arg Pro Asn Asp His Glu
 370 375 380
 Phe Met Gln Gln Pro Trp Thr Gly Phe Thr Val Gln Ile Ser Phe Val
 385 390 395 400
 Lys Gly Trp Gly Gln Cys Tyr Thr Arg Gln Phe Ile Ser Ser Cys Pro
 405 410 415

Cys Trp Leu Glu Val Ile Phe Asn Ser Arg
420 425

5

<210> 3
<211> 3681
<212> ADN
<213> mus musculus

<400> 3

```

cgagtgcggc gcggcgagcc cccagcggcg gcagaaggac tcgagcgcca ggagagggcg      60
gacggggggac gaggaggctc cggggcgoga cgaagagagt ctccgaggaa gaggctgcga      120
gaggacaccc gggcctcctg ccgccactgt cgggtcgggg ccagcagctc atgagagcag      180
cccggcgggc caccgcggc caggagaagg agcaccggag gccccacac tagcctgtgc      240
cctcgggggc gagagcttgc gacccgcggg agcccgccgc cgcgcgcgcc tccccgcgc      300
tgacagcccc ccggggcgca gccgcgcgcg cagcatcttc tgtccctgct tccccagcgc      360
ggaggaagtc ccgcgcgagg acctgagccc ccgggaacgc aggaggaaag accagagact      420
ctaaaacacc cagatacgca agattgaagc agcctagcca gacctttctg tggattaaaa      480
gaaatacgat tttttttttt tttttttggc agaagaaaag gaaaggaaga ccggctgggt      540
tcagcaagga aaaaaagggg gatgtaactc gtggatacgg tttttttccc ccaccttcc      600
aacatcttgt tttattttgt aaacattttc tcttttaaac ccgggctcca tccggtgccc      660
tcagacctc cgaggtgcga ggaggtggtg tgttttttca ttgggggctt tgcataattt      720
ggttttgagg gttttgagag accctccaga catctcacga ggggtgaagt ctactcggtc      780
ccctcccgca agtcttcgcg tgcacagaat tcgaggagat ccggttacta aggatataga      840
agaaaaaaaa taaatcgtgc ctgccttttt tttttaattg cctgcttctc cccaccccca      900
aattaagttg cttagcaagg gggaaagagg ctttttcctc ccttttagtag ctcagcctaa      960
cgtctttcgt tttttttttt tttttttttt ttttgcccc gaggatcttc catgtaggaa     1020
gccgaggctg gcgagcccca cactcgggag ccactgtagg ggggcctttt ttgggggagg     1080
cgtctacagg ggttgccctg gccgccccca gggaagcggc ggccgcgttc ctccagggca     1140
cgccggggcc cgaaagcgc gcagggcgcg ggccgcgcgc ggtggggcag ccgaagcgca     1200
gccccccgat ccccggcagg cgcacctggg ccccgcgcg cgccccggcc tctgggagac     1260
tggcgcatgc caccgagcgc ccctcgggcc gccgcgcgtt ctgcccgggc ccctgctgtt     1320
gctgctgtcg cctgcgcctg ctgccccaac toggcgcccg acttcttcat ggtgtgcgga     1380
ggtcatgttc gctccttagc cggcaaacga cttttctcct cgctcctcg ccccgcatgt     1440

```

10

tcaggaccaa	acgatctgcg	ctcgtccggc	gtctctggag	gagccgtgcg	cccggcggcg	1500
aggacgagga	ggagggcggtg	gggggtggcg	gcggaggagg	cgagctgcgg	ggagaagggg	1560
cgaocgacgg	ccgggcttat	ggggctggtg	gcggcgggtgc	gggcagggct	ggctgctgcc	1620
tgggcaaggc	agtccgaggt	gccaaaggtc	accaccatcc	ccatcccca	acctcggtg	1680
ccggggcggc	cgggggcgcc	gaggcggatc	tgaaggcgct	cacgcaactcg	gtgctcaaga	1740
aactcaagga	gcggcagctg	gagctgctgc	ttcaggccgt	ggagtccgc	ggcgggtacgc	1800
gcaccgcgtg	cctcctgctg	cccggccgcc	tggactgcag	gctgggcccg	ggggcgcccg	1860
ccagcgcgca	gcccgcgcag	cgcacctcgt	cctactcgct	ccccctcctg	ctgtgcaaag	1920
tgttcaggtg	gccgatctc	aggcattcct	cggaagtcaa	gaggctgtgt	tgctgtgaat	1980
cttacgggaa	gatcaacccc	gagctggtgt	gctgcaaccc	ccatcacctt	agtcgactct	2040
gtgaactaga	gtctccccct	cctccttact	ccagataccc	aatggatttt	ctcaaaccaa	2100
ctgcaggctg	tccagatgct	gtaccttct	ccgcggaaac	cgggggaaacg	aattatctgg	2160
ccccggggg	gctttcagat	tcccaacttc	ttctggagcc	tggggatcgg	tcacactggt	2220
gcgtggtggc	atactgggag	gagaagactc	gcgtggggag	gctctactgt	gtccaagagc	2280
cctccctgga	tatcttctat	gatctacctc	aggggaatgg	cttttgctc	ggacagctca	2340
attcggacaa	caagagtcag	ctggtacaga	aagtgcggag	caagatcggc	tgtggcatcc	2400
agctgacgcg	ggaagtggat	ggcgtgtggg	tttacaaccg	cagcagttac	cccatcttca	2460
tcaagtccgc	cacactggac	aaccgggact	ccaggacgct	gttggtgcac	aaagtgttcc	2520
ctggtttctc	catcaaggct	tttgactatg	agaaagccta	cagcctgcag	cggcccaatg	2580
accacgagtt	catgcagcaa	ccatggacgg	gtttcacccgt	gcagatcagc	tttgtgaagg	2640
gctggggcca	gtgctacacc	cgccagttca	tcagcagctg	cccgtgctgg	ctggaggtca	2700
tcttcaacag	ccggtagtgc	gtcgtgtggt	ggggagaaga	ggacagggcg	gatcgtgagc	2760
cgagcaggcc	accgttcaaa	ctacttgctg	ctaatttttc	ccgagtgatt	gcttttcatg	2820
caaaactctt	ggttggtgtt	gttattgcca	ttcattgttg	gttttgtttt	gttctgttct	2880
ggtttgtttt	tttttttttt	cctccccaag	ggctgcgggg	acagccccag	tcacagtatt	2940
gctaccccag	taccctctca	ggcccttcca	ccgggtccca	gccgtgggtg	ttttttcatc	3000
aggttttctc	cagatgtgga	aagtcagctc	agcatcccat	ccccatcct	gtgtgctgag	3060
ctctgtagac	cagcgagggg	catcagggag	ggacctgcgc	agtcccccc	cttctgctg	3120
agaagggtgt	agccccgtca	caacaaagg	accatccctt	ggctggctcc	cagcccttct	3180

```

ctcagctcat acgctcgctc gtatgatact ttgacactgt tcttagctca atgagcatgt 3240
ttagaattta acataagcta tttttctaac tacaaagggt taaatgaaca agagaagcat 3300
tctcattgga aatttagcat tgtagtgtt tgagagagga aaggactcct taaaagaaaa 3360
aaaaagctga gatttattaa agaaaaatgt attttatgtt atatataaat atattattac 3420
ttgtaaatat aaagacgttt tataagcatc attatttatg tattgtgcaa tgtgtataaa 3480
cgagaagaat aaagaaaaga tgcactttgc tttaatataa atgtaaataa catgccaaat 3540
taaaaaaaaa aagataaaca caagattggt gtttttttct atgggtgtta tcacctagct 3600
gaatgttttt ctaaaggagt ttatgttcca ttaaacaatt tttaaaatgt taaaaaaaaa 3660
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a 3681

```

<210> 4
 <211> 426
 <212> PRT
 <213> mus musculus
 <400> 4

```

Met Phe Arg Thr Lys Arg Ser Ala Leu Val Arg Arg Leu Trp Arg Ser
1           5           10           15
.

Arg Ala Pro Gly Gly Glu Asp Glu Glu Glu Gly Val Gly Gly Gly Gly
20           25           30

Gly Gly Gly Glu Leu Arg Gly Glu Gly Ala Thr Asp Gly Arg Ala Tyr
35           40           45

Gly Ala Gly Gly Gly Gly Ala Gly Arg Ala Gly Cys Cys Leu Gly Lys
50           55           60

Ala Val Arg Gly Ala Lys Gly His His His Pro His Pro Pro Thr Ser
65           70           75           80

Gly Ala Gly Ala Ala Gly Gly Ala Glu Ala Asp Leu Lys Ala Leu Thr
85           90           95

His Ser Val Leu Lys Lys Leu Lys Glu Arg Gln Leu Glu Leu Leu Leu
100          105          110

Gln Ala Val Glu Ser Arg Gly Gly Thr Arg Thr Ala Cys Leu Leu Leu
115          120          125

Pro Gly Arg Leu Asp Cys Arg Leu Gly Pro Gly Ala Pro Ala Ser Ala

```

130	135	140
Gln Pro Ala Gln Pro	Pro Ser Ser Tyr Ser	Leu Pro Leu Leu Leu Cys
145	150	155 160
Lys Val Phe Arg Trp	Pro Asp Leu Arg His Ser Ser Glu Val Lys Arg	
	165	170 175
Leu Cys Cys Cys Glu Ser Tyr Gly Lys Ile Asn Pro Glu Leu Val Cys		
	180	185 190
Cys Asn Pro His His Leu Ser Arg Leu Cys Glu Leu Glu Ser Pro Pro		
	195	200 205
Pro Pro Tyr Ser Arg Tyr Pro Met Asp Phe Leu Lys Pro Thr Ala Gly		
	210	215 220
Cys Pro Asp Ala Val Pro Ser Ser Ala Glu Thr Gly Gly Thr Asn Tyr		
225	230	235 240
Leu Ala Pro Gly Gly Leu Ser Asp Ser Gln Leu Leu Leu Glu Pro Gly		
	245	250 255
Asp Arg Ser His Trp Cys Val Val Ala Tyr Trp Glu Glu Lys Thr Arg		
	260	265 270
Val Gly Arg Leu Tyr Cys Val Gln Glu Pro Ser Leu Asp Ile Phe Tyr		
	275	280 285
Asp Leu Pro Gln Gly Asn Gly Phe Cys Leu Gly Gln Leu Asn Ser Asp		
	290	295 300
Asn Lys Ser Gln Leu Val Gln Lys Val Arg Ser Lys Ile Gly Cys Gly		
305	310	315 320
Ile Gln Leu Thr Arg Glu Val Asp Gly Val Trp Val Tyr Asn Arg Ser		
	325	330 335
Ser Tyr Pro Ile Phe Ile Lys Ser Ala Thr Leu Asp Asn Pro Asp Ser		
	340	345 350
Arg Thr Leu Leu Val His Lys Val Phe Pro Gly Phe Ser Ile Lys Ala		
	355	360 365

ES 2 388 968 T3

Phe Asp Tyr Glu Lys Ala Tyr Ser Leu Gln Arg Pro Asn Asp His Glu
370 375 380

Phe Met Gln Gln Pro Trp Thr Gly Phe Thr Val Gln Ile Ser Phe Val
385 390 395 400

Lys Gly Trp Gly Gln Cys Tyr Thr Arg Gln Phe Ile Ser Ser Cys Pro
405 410 415

Cys Trp Leu Glu Val Ile Phe Asn Ser Arg
420 425

<210> 5
<211> 4311
<212> ADN
<213> rattus norvegicus

<400> 5

```

tgagtgcggc gcggcgagcc cccagcggcg gcagaaggac tcgagcgcca ggagagggcg      60
gacgggggac gaggaggtc cggggcgga cgaagagagt ctcggaggaa gaggtgcga      120
gaggacaccc gggcctctg ccgccactgt cgggtcgggg ccagcagctt atgcgagcag      180
ccccagcgac caccctcggc caggagaagg ggcacgggca gccccacgc tagctagcct      240
gcgcctgtg ccctcggggg cgagagcttg cgaccgcgcg gagccgcgcg ccgcgcgcgc      300
ctccccgcg ctgacagccc cccggggcgc agccgcgcgc gcagcatctt ctgtccctgc      360
ttccccagcg cggaggaagt ccccgccgag gacctgggccc cccgggagcg caggaggaaa      420
gaccagagac tctaaaacac ccagatacgc aagattgaag cagcctaacc agaccttct      480
gtggattaaa agaaatacga tttttttttt gacagaagaa aaggaaagga agaccggcgg      540
ggttcagcaa ggaaaaaag gggatgtaac tcgtggatac ggtttttccc cccaccttc      600
caacatcttg ttctacttg taaacatttt ctctttttta accccggtc catcgggtgc      660
cctccagacc tccgaggtgc gagaaggtgg tgtgtttttt cactgggggc tttgcatatt      720
tggttttggg gtttttgaga gacctccag acatctcacg aggggtgaag tctactcggc      780
cccctcctc aagtcttcgc gtgcacagaa ttcgaggaga tccggttact aaggatatag      840
aagaaaaaaa taaatcgtgt gcctgccttt ttttttttta attgcctgct tctcccacc      900
cccaaattaa gttgcttagc aagggggaaa gaggtttttt cctcccttca gtagctcagc      960
ctaacgtctt tcgttttttg cccctgagga tcttccatgt aggaagccga ggctggcgag     1020
cccgacactc gggagccact gtaggggggc ctttttgggg agaggcgctg accggggctg     1080
cctcggccgc cccagggaa gcggcgccg cgttcctcag gggcacgcgc gggcccgaga     1140

```

ES 2 388 968 T3

gccgcgcagg gcgcggggccg cgcgcgggtgg ggcagccgaa gcgcaggccc ccgatccccg 1200
 gcggggcgccc ctggggcccc gcgcgcgccc cggcctccgg gagactggcg catgccacgg 1260
 agcgccccctc gggcgcgcgc cgcttctgcc cgggccccctg ctgttggtgc tgcgcctgc 1320
 gcctgctgcc ccaactcggc gcccgacttc ttcattggtg gcggaggtca tgttcgctcc 1380
 ttagccggca aacgactttt ctctcgcct cctcgccccg catgttcagg accaaacgat 1440
 ctgcgctcgt ccggcgcttc tggaggagcc gtgcgcccgg cggcgaggac gaggaggagg 1500
 gcgtgggggg tggcgcggc ggaggcgacc tgcggggaga aggggcgacg gacggccggg 1560
 cttatggggc tgggtggcgc ggtgcgggca gggctggctg ctgcctgggt aaggcagtc 1620
 gaggtgccaa aggtcaccac catccccatc cccatcctc ggggtgcggg gcggccgggg 1680
 gcgcgcaggc ggatctgaag gcgctcacgc actcgggtgt caagaaactc aaggagcggc 1740
 agctggagct gctgcttcag gccgtggagt cccgcggcgg tacgcgcacc gcgtgcctcc 1800
 tgctgcccgg ccgcctggac tgcaggctgg gcccgggggc gcccgccagc gcgcagcccg 1860
 cgcagccgcc ctgcctctac tcgctcccc tctgctgtg caaagtgttc aggtggccgg 1920
 atctcaggca ttctcggaa gtcaagaggc tgtgttgctg tgaatcttac gggaagatca 1980
 accccgagct ggtgtgctgc aacccccatc acctagtcg actctgtgaa ctgagctctc 2040
 cccctctcc ttactccaga taccgatgg atttctcaa accaactgca gactgtccag 2100
 acgctgtacc ttctccgat gaaacgggg gaacgaatta tctggcccct ggggggcttt 2160
 cagattccca acttctctg gagcctgggg atcggtcaca ctggtgcgtg gtggcatact 2220
 gggaggagaa gactcgagtg gggaggctct actgtgtcca agagccctcc ctggatatct 2280
 tctatgatct acctcagggg aatggctttt gcctcggaca gctcaattcg gacaacaaga 2340
 gtcagctggt acagaaagtg aggagcaaga tcggctgtgg catccagctg acaagggaag 2400
 tggatggcgt gtgggtttac aaccgcagca gttacccat ctcatcaag tccgccacac 2460
 tggacaacct ggactccagg acgctgttg tgcacaaagt gttccctggt ttctccatca 2520
 aggcctttga ctatgaaaag gcctacagcc tgcagcgcc caatgaccac gaggctcatgc 2580
 agcagccatg gacgggcttc accgtgcaga ttagcttcgt gaagggtgg ggccagtgt 2640
 acaccgcga gttcatcagc agttgccctg gctggctgga ggtcatcttc aacagccggt 2700
 agtctcccg tgtggggaga agaggacagg acggaggggt gagccgagca ggccaccgtt 2760
 caaactactt gctgctaata ttcatgcaa aactcttctg tcgggttttg ttgtttgcca 2820
 ttcatgttg gttctgtttt gttttgtttt cttttttttt tttcttctt tcttcttttt 2880

```

cctcctttct tgtcactctt gtgtcctgtg tgtctcgttc tttgagaaaa tatgatgcgg 2940
atTTTTgggt gtgtgttttt ttttttcgtt tgtttgtttg ttgttgttgt ttgtgttttg 3000
aggtgggtggt ggggtgcggtt ggcaggacac cccgatacaa aaacgggaag caagagtcag 3060
cactgccaaag cgtgggtgtgc gaaagtgggt accaccttcc cctttggatc agcatttcag 3120
ttgtcagtgt gtgtgtgtga ggggggtgta cgtgaatgac agatggggga atggcgtgct 3180
tttttttgtgt tttttatgga tgtcccagc tgagaggctt gcagttccaa gctgtgtgtc 3240
tctcactgtg tgtctctctc atgagccttt cggacatgct cgggtggggca gaggctgtac 3300
ctgggcagac tggcagcagg tgtcccagca ggtgccgagc tctgctccgc tgaagctccc 3360
ccgccccgc ccccttcccc acaggacacg ggcctatcca caggcttctg agaagccagc 3420
ctgctagaag gctgaaccag aaccaattgt tttcatccct gtcttactgc ctctgtcac 3480
ccgctgccat tgtcgaagge tgtctttttt ggccatctgc tctggatct ctcttgagat 3540
gggcttccca agggctgccg ggacagcccc agtcacagta ttgctacccc agtaccttct 3600
caggcccttc caccggctcc agccgtgggt tttcatcag gtttctccca gatctggaaa 3660
gtcagctcag caccocatcc cccagcctgt gtgctgagct ctgtagacca gcgaggggca 3720
tcagggaggg acctgctcag tgcccaccca ccccccttc ccgtgagaa ggggtgtagcc 3780
ccgtcataac aaaggtacca tcgtaggctg gctcccagcc cttctctcgg ctcatract 3840
cgtatgatac tctgacactg ttcttggtc aatgagcatg ctcacacttt aatataagct 3900
atTTTTctaa ctacaaaggt ttaaatgaac aagagaggcg ttctcatcgg aaatttagca 3960
tcgtagtgtt ttgagagagg aaaggactcc ttaaaagaga aaaaaaaaag ctgagattta 4020
ttaaagaaaa aaatgtattt tatgttatat ataaatatat tattacttgt aaatataaag 4080
acgttttata agcatcatta tttatgtatt gtgcaatgtg tataaacgag aataaagaaa 4140
agatgcactt tgctttaata taaacgcaa taacatgcca aattaaaaaa aaaaaagata 4200
aacacaagat tgggtgtttt ttctatgggt gttatcacct agctgaatgt ttttctaaag 4260
gagtttatgt tccattaaac aatttttaaa atgtataaaa aaaaaaaaaa a 4311

```

<210> 6
 <211> 426
 <212> PRT
 <213> rattus norvegicus

 <400> 6

Met Phe Arg Thr Lys Arg Ser Ala Leu Val Arg Arg Leu Trp Arg Ser
 1 5 10 15

Arg Ala Pro Gly Gly Glu Asp Glu Glu Glu Gly Val Gly Gly Gly Gly
 20 25 30
 Gly Gly Gly Asp Leu Arg Gly Glu Gly Ala Thr Asp Gly Arg Ala Tyr
 35 40 45
 Gly Ala Gly Gly Gly Gly Ala Gly Arg Ala Gly Cys Cys Leu Gly Lys
 50 55 60
 Ala Val Arg Gly Ala Lys Gly His His His Pro His Pro Pro Ser Ser
 65 70 75 80
 Gly Ala Gly Ala Ala Gly Gly Ala Glu Ala Asp Leu Lys Ala Leu Thr
 85 90 95
 His Ser Val Leu Lys Lys Leu Lys Glu Arg Gln Leu Glu Leu Leu Leu
 100 105 110
 Gln Ala Val Glu Ser Arg Gly Gly Thr Arg Thr Ala Cys Leu Leu Leu
 115 120 125
 Pro Gly Arg Leu Asp Cys Arg Leu Gly Pro Gly Ala Pro Ala Ser Ala
 130 135 140
 Gln Pro Ala Gln Pro Pro Ser Ser Tyr Ser Leu Pro Leu Leu Leu Cys
 145 150 155 160
 Lys Val Phe Arg Trp Pro Asp Leu Arg His Ser Ser Glu Val Lys Arg
 165 170 175
 Leu Cys Cys Cys Glu Ser Tyr Gly Lys Ile Asn Pro Glu Leu Val Cys
 180 185 190
 Cys Asn Pro His His Leu Ser Arg Leu Cys Glu Leu Glu Ser Pro Pro
 195 200 205
 Pro Pro Tyr Ser Arg Tyr Pro Met Asp Phe Leu Lys Pro Thr Ala Asp
 210 215 220
 Cys Pro Asp Ala Val Pro Ser Ser Asp Glu Thr Gly Gly Thr Asn Tyr
 225 230 235 240
 Leu Ala Pro Gly Gly Leu Ser Asp Ser Gln Leu Leu Leu Glu Pro Gly
 245 250 255

ES 2 388 968 T3

Asp Arg Ser His Trp Cys Val Val Ala Tyr Trp Glu Glu Lys Thr Arg
260 265 270

Val Gly Arg Leu Tyr Cys Val Gln Glu Pro Ser Leu Asp Ile Phe Tyr
275 280 285

Asp Leu Pro Gln Gly Asn Gly Phe Cys Leu Gly Gln Leu Asn Ser Asp
290 295 300

Asn Lys Ser Gln Leu Val Gln Lys Val Arg Ser Lys Ile Gly Cys Gly
305 310 315 320

Ile Gln Leu Thr Arg Glu Val Asp Gly Val Trp Val Tyr Asn Arg Ser
325 330 335

Ser Tyr Pro Ile Phe Ile Lys Ser Ala Thr Leu Asp Asn Pro Asp Ser
340 345 350

Arg Thr Leu Leu Val His Lys Val Phe Pro Gly Phe Ser Ile Lys Ala
355 360 365

Phe Asp Tyr Glu Lys Ala Tyr Ser Leu Gln Arg Pro Asn Asp His Glu
370 375 380

Phe Met Gln Gln Pro Trp Thr Gly Phe Thr Val Gln Ile Ser Phe Val
385 390 395 400

Lys Gly Trp Gly Gln Cys Tyr Thr Arg Gln Phe Ile Ser Ser Cys Pro
405 410 415

Cys Trp Leu Glu Val Ile Phe Asn Ser Arg
420 425

<210> 7
<211> 18
<212> ADN
<213> mus musculus

<400> 7
cttcggctgc cccaccgc 18

<210> 8
<211> 19
<212> ADN
<213> mus musculus

<400> 8
atcgtttggt cctgaacat 19

<210> 9
<211> 18

ES 2 388 968 T3

	<212> ADN <213> mus musculus	
5	<400> 9 ccctcctcct cgctctcg	18
10	<210> 10 <211> 20 <212> ADN <213> mus musculus	
15	<400> 10 gtcgcccctt ctccccgcag	20
20	<210> 11 <211> 18 <212> ADN <213> mus musculus	
25	<400> 11 gccgtccgtc gccccctc	18
30	<210> 12 <211> 18 <212> ADN <213> mus musculus	
35	<400> 12 agcaccgagt gcgtgagc	18
40	<210> 13 <211> 18 <212> ADN <213> mus musculus	
45	<400> 13 agttcacaga gtcgacta	18
50	<210> 14 <211> 18 <212> ADN <213> mus musculus	
55	<400> 14 ggcaaaagcc attcccct	18
60	<210> 15 <211> 18 <212> ADN <213> mus musculus	
65	<400> 15 gccgatcttg ctccgcac	18
	<210> 16 <211> 18 <212> ADN <213> homo sapiens	
	<400> 16 ctccggctgc cccacccc	18
	<210> 17 <211> 18 <212> ADN <213> homo sapiens	

ES 2 388 968 T3

	<400> 17 cgaacatgac ctccgcac	18
5	<210> 18 <211> 19 <212> ADN <213> homo sapiens	
10	<400> 18 atcgtttggt cctgaacat	19
15	<210> 19 <211> 18 <212> ADN <213> homo sapiens	
20	<400> 19 ccctcctcct cgctctcg	18
25	<210> 20 <211> 20 <212> ADN <213> homo sapiens	
	<400> 20 gtcgcccctt ctccccgcag	20
30	<210> 21 <211> 18 <212> ADN <213> homo sapiens	
35	<400> 21 gctgtccgtc gcccttc	18
40	<210> 22 <211> 18 <212> ADN <213> homo sapiens	
45	<400> 22 agcaccgagt gcgtgagc	18
50	<210> 23 <211> 18 <212> ADN <213> homo sapiens	
	<400> 23 agttcgaga gtcggcta	18
55	<210> 24 <211> 18 <212> ADN <213> homo sapiens	
60	<400> 24 ggcaaaagcc attcccct	18
65	<210> 25 <211> 18 <212> ADN <213> homo sapiens	
	<400> 25	

	gccgattttg ctccgcac	18
5	<210> 26 <211> 18 <212> ADN <213> homo sapiens	
10	<400> 26 ctgccccttc ttcaaaa	18
15	<210> 27 <211> 18 <212> ADN <213> homo sapiens	
	<400> 27 actcacacac actcctga	18
20	<210> 28 <211> 18 <212> ADN <213> homo sapiens	
25	<400> 28 tgcccaggta ctgcctct	18
30	<210> 29 <211> 18 <212> ADN <213> homo sapiens	
35	<400> 29 gagatccagg agcagatg	18
40	<210> 30 <211> 18 <212> ADN <213> rattus norvegicus	
45	<400> 30 cttcggctgc cccaccg	18
50	<210> 31 <211> 19 <212> ADN <213> rattus norvegicus	
55	<400> 31 atcgtttggc cctgaacat	19
60	<210> 32 <211> 18 <212> ADN <213> rattus norvegicus	
65	<400> 32 ccctcctcct cgtcctcg	18
	<210> 33 <211> 20 <212> ADN <213> rattus norvegicus	
	<400> 33 gtcgcccctt ctccccgag	20

ES 2 388 968 T3

5	<210> 34 <211> 18 <212> ADN <213> rattus norvegicus	
	<400> 34 gccgtccgtc gccccctc	18
10	<210> 35 <211> 18 <212> ADN <213> rattus norvegicus	
15	<400> 35 agcaccgagt gcgtagac	18
20	<210> 36 <211> 18 <212> ADN <213> rattus norvegicus	
	<400> 36 agttcacaga gtcgacta	18
25	<210> 37 <211> 18 <212> ADN <213> rattus norvegicus	
30	<400> 37 ggcaaaagcc attcccct	18
35	<210> 38 <211> 18 <212> ADN <213> rattus norvegicus	
40	<400> 38 gccgatcttg ctccctac	18
45	<210> 39 <211> 21 <212> ADN <213> homo sapiens	
	<400> 39 gtcgcccctt ctccccgca g	21
50	<210> 40 <211> 13 <212> PRT <213> mus musculus	
55	<400> 40	
	His Ser Leu Gly Lys Trp Leu Gly His Pro Asp Lys Phe 1 5 10	
60	<210> 41 <211> 20 <212> ADN <213> mus musculus	
	<400> 41 gtcgaccgt ctacagcag	20

5	<210> 42 <211> 15 <212> ADN <213> mus musculus	
	<400> 42 atggacaata tgtct	15
10	<210> 43 <211> 20 <212> ADN <213> rattus norvegicus	
15	<400> 43 ctgcggggag aaggggagac	20
20	<210> 44 <211> 21 <212> ARN <213> homo sapiens	
25	<400> 44 guucaggacc aaacgaucug c	21
30	<210> 45 <211> 23 <212> ARN <213> homo sapiens	
	<400> 45 gcagaucguu ugguccugaa cau	23
35	<210> 46 <211> 21 <212> ARN <213> homo sapiens	
40	<400> 46 cucacgcacu cggugcucaa g	21
45	<210> 47 <211> 23 <212> ARN <213> homo sapiens	
	<400> 47 cuugagcacc gagugcguga gcg	23
50	<210> 48 <211> 21 <212> ARN <213> homo sapiens	
55	<400> 48 cucggcgccc gacuucuucu u	21
60	<210> 49 <211> 21 <212> ARN <213> homo sapiens	
65	<400> 49 gaagaagucg ggcgccgagu u	21
	<210> 50	

	<211> 21 <212> ARN <213> homo sapiens	
5	<400> 50 acgacuuuuc uccucgccuu u	21
10	<210> 51 <211> 21 <212> ARN <213> homo sapiens	
15	<400> 51 aggcgaggag aaaagucguu u	21
20	<210> 52 <211> 21 <212> ARN <213> homo sapiens	
25	<400> 52 acgaucugcg cucguccggu u	21
30	<210> 53 <211> 21 <212> ARN <213> homo sapiens	
35	<400> 53 ccggacgagc gcagaucguu u	21
40	<210> 54 <211> 21 <212> ARN <213> homo sapiens	
45	<400> 54 ggcgucacg cacucggugu u	21
50	<210> 55 <211> 21 <212> ARN <213> homo sapiens	
55	<400> 55 caccgagugc gugagcgccu u	21
60	<210> 56 <211> 21 <212> ARN <213> homo sapiens	
65	<400> 56 ggagcggcag cuggagcugu u	21
	<210> 57 <211> 21 <212> ARN <213> homo sapiens	
	<400> 57 cagcuccagc ugccgcuccu u	21
	<210> 58 <211> 21 <212> ARN	

	<213> homo sapiens	
5	<400> 58 aguguucagg uggccggauu u	21
10	<210> 59 <211> 21 <212> ARN <213> homo sapiens	
15	<400> 59 auccggccac cugaacacuu u	21
20	<210> 60 <211> 21 <212> ARN <213> homo sapiens	
25	<400> 60 gucaagaggc uguguugcuu u	21
30	<210> 61 <211> 21 <212> ARN <213> homo sapiens	
35	<400> 61 agcaacacag ccucuugacu u	21
40	<210> 62 <211> 21 <212> ARN <213> homo sapiens	
45	<400> 62 gaggcugugu ugcugugaau u	21
50	<210> 63 <211> 21 <212> ARN <213> homo sapiens	
55	<400> 63 uucacagaca cacagccucu u	21
60	<210> 64 <211> 21 <212> ARN <213> homo sapiens	
65	<400> 64 ucuuacggga agaucaaccu u	21
	<210> 65 <211> 21 <212> ARN <213> homo sapiens	
	<400> 65 gguugaucuu cccguaagau u	21
	<210> 66 <211> 21 <212> ARN <213> homo sapiens	

ES 2 388 968 T3

	<400> 66 gaucaacccc gagcuggugu u	21
5	<210> 67 <211> 21 <212> ARN <213> homo sapiens	
10	<400> 67 21 caccagcucg gguugaucu u	21
15	<210> 68 <211> 21 <212> ARN <213> homo sapiens	
20	<400> 68 21 ccccgagcug gugugcugcu u	21
25	<210> 69 <211> 21 <212> ARN <213> homo sapiens	
30	<400> 69 21 gcagcacacc agcucgggu u	21
35	<210> 70 <211> 21 <212> ARN <213> homo sapiens	
40	<400> 70 21 cgaauuauu ggcuccuggu u	21
45	<210> 71 <211> 21 <212> ARN <213> homo sapiens	
50	<400> 71 21 ccaggggcca gaaauucgu u	21
55	<210> 72 <211> 21 <212> ARN <213> homo sapiens	
60	<400> 72 21 cuucuucugg agccugggu u	21
65	<210> 73 <211> 21 <212> ARN <213> homo sapiens	
	<400> 73 21 ccccaggcuc cagaagaagu u	21
	<210> 74 <211> 21 <212> ARN <213> homo sapiens	
	<400> 74 uggcuuuugc cucggacagu u	

5 <210> 75
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> homo sapiens

 <400> 75
 cuguccgagg caaaagccau u

 10 <210> 76
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> homo sapiens

 <400> 76
 uucggacaac aagagucagu u

 15 <210> 77
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> homo sapiens

 <400> 77
 cugacucuug uuguccgaau u

 20 <210> 78
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> homo sapiens

 <400> 78
 ccgcagcagu uaccccaucu u

 25 <210> 79
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> homo sapiens

 <400> 79
 gaugggguaa cugcugcggu u

 30 <210> 80
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> homo sapiens

 <400> 80
 guccgccaca cuggacaacu u 21

 35 <210> 81
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> homo sapiens

 <400> 81
 guuguccagu guggcggacu u 21

 40 <210> 82
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> homo sapiens

 <400> 82
 cccggacucc aggacgcugu u 21

 45 <210> 83
 <211> 21

<212> ARN
<213> homo sapiens

<400> 83
cagcguccug gaguccgggu u 21

<210> 84
<211> 131
<212> PRT
<213> rattus norvegicus

<400> 84

Gly Gln Phe Arg Val Ile Gly Pro Gly His Pro Ile Arg Ala Leu Val
1 5 10 15

Gly Asp Glu Ala Glu Leu Pro Cys Arg Ile Ser Pro Gly Lys Asn Ala
20 25 30

Thr Gly Met Glu Val Gly Trp Tyr Arg Ser Pro Phe Ser Arg Val Val
35 40 45

His Leu Tyr Arg Asn Gly Lys Asp Gln Asp Ala Glu Gln Ala Pro Glu
50 55 60

Tyr Arg Gly Arg Thr Glu Leu Leu Lys Glu Ser Ile Gly Glu Gly Lys
65 70 75 80

Val Ala Leu Arg Ile Gln Asn Val Arg Phe Ser Asp Glu Gly Gly Tyr
85 90 95

Thr Cys Phe Phe Arg Asp His Ser Tyr Gln Glu Glu Ala Ala Val Glu
100 105 110

Leu Lys Val Glu Asp Pro Phe Tyr Trp Ile Asn Pro Gly His His His
115 120 125

His His His
130

REIVINDICACIONES

1. Un inhibidor específico de la expresión o función de Smad7 para su uso en la prevención, mejora o tratamiento de esclerosis múltiple o isquemia cerebral, en el que dicho inhibidor específico se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos intracelulares o fragmentos de anticuerpos, aptámeros, intrámeros, ARNi y moléculas antisentido anti-Smad7.
2. Uso de un inhibidor específico de la expresión o función de Smad7 para la preparación de una composición farmacéutica para la prevención, mejora o tratamiento de esclerosis múltiple o isquemia cerebral, en el que dicho inhibidor específico se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos intracelulares o fragmentos de anticuerpos, aptámeros, intrámeros, ARNi y moléculas antisentido anti-Smad7.
3. El inhibidor para el uso de la reivindicación 1 o el uso de la reivindicación 2, en el que dicha molécula antisentido anti-Smad7 comprende una molécula de ácido nucleico que es la cadena complementaria de una cadena complementaria invertida de la región codificante de Smad7.
4. El inhibidor para el uso de o el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha molécula antisentido anti-Smad7 comprende una molécula de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en la molécula de ácido nucleico
- cttcggctgccccaccg, atcggttggtcctgaacat, ccctcctcctcgctcctg, gtcgccccttctccccgcag, gccgtccgtcgccccttc, agcaccgagtgctgagc, agttcacagagtcgacta, ggcaaaagccattcccct, gccgatcttgctccgcac, ctccggctgccccaccg, cgaacatgacctccgcac, atcggttggtcctgaacat, ccctcctcctcgctcctg, gtcgccccttctccccgcag, gctgtccgtcgccccttc, agcaccgagtgctgagc, agttcgagagtcggcta, ggcaaaagccattcccct, gccgatttgctccgcac, ctgccccttctccaaaa, actcacacactcctga, tgcccagggtactgcctct, gagatccaggagcagatg, cttcggtgccccaccg, atcggttggtcctgaacat, ccctcctcctcgctcctg, gtcgccccttctccccgcag, gccgtccgtcgccccttc, agcaccgagtgctgagc, agttcacagagtcgacta, ggcaaaagccattcccct, gccgatcttgctccctac y gtcgccccttctccccgcag.
5. El inhibidor para el uso de o el uso de la reivindicación 1, en el que dicho ARNi es un ARNip.
6. El inhibidor para el uso de o el uso de la reivindicación 5, en el que dicho ARNip se selecciona del grupo que consiste en

ARNi: nt 3-23 5'-GUUCAGGACCAAAACGAUCUGC-3',
nt 23-1 5'-GCAGAUUGUUUGGUCCUGAACAU-3'

ARNi2: nt 283-303 5'-CUCACGCACUCGGUGCUCAAG-3',
nt 303-281 5'-CUUGAGCACCGAGUGCGUGAGCG-3',

ARNi3: nt 209-227 5'-CUCGGCGCCCGACUUCUUCuu-3',
nt 227-207 5'-GAAGAAGUCGGGCGCCGAGUU-3',

ARNi4: nt 266-284 5'-ACGACUUUUCUCCUCGCCUuu-3',
nt 284-264 5'-AGGCGAGGAGAAAAGUCGUUU-3',

ARNi5: nt 310-328 5'-ACGAUCUGCGCUCGUCCGGuu-3',
nt 328-308 5'-CCGGACGAGCGCAGAUUGUUU-3',

ARNi6: nt 574-592 5'-GGCGCUCACGCACUCGGUGuu-3',
nt 592-572 5'-CACCGAGUGCGUGAGCGCCUU-3',

ARNi7: nt 607-625 5'-GGAGCGGCAGCUGGAGCUGuu-3',
nt 625-605 5'-CAGCUCCAGCUGCCGCUCCUU-3',

ARNi8: nt 778-796 5'-AGUGUUCAGGUGGCCGGAUuu-3',
nt 796-776 5'-AUCCGGCCACCUGAACACUuu-3',

ARNi9: nt 815-833 5'-GUCAAGAGGCUGUGUUGCUuu-3',
nt 833-813 5'-AGCAACACAGCCUCUUGACUU-3',

ARNi10: nt 820-838 5'-GAGGCUGUGUUGCUGUGAAuu-3',
nt 838-818 5'-UUCACAGACACACAGCCUCUU-3',

ARNi11: nt 839-857 5'-UCUUACGGGAAGAUCAACCuu-3',
nt 857-837 5'-GGUUGAUUUCCCGUAAGAUU-3',

ARNi12: nt 850-868 5'-GAUCAACCCCGAGCUGGUGuu-3',
nt 868-848 5'-CACCAGCUCGGGUUGAUUU-3',

ARNi13: nt 856-874 5'-CCCCGAGCUGGUGUGCUGCuu-3',
nt 874-854 5'-GCAGCACACCAGCUCGGGGUU-3',

ARNi14: nt 1008-1026 5'-CGAAUUUAUCUGGCCCCUGGuu-3',
nt 1026-1006 5'-CCAGGGGCCAGAUAAUUCGUU-3',

ARNi15: nt 1046-1064 5'-CUUCUUCUGGAGCCUGGGGUu-3',
nt 1064-1044 5'-CCCCAGGCUCCAGAAGAAGUU-3',

ARNi16: nt 1177-1195 5'-UGGCUUUUGCCUCGGACAGuu-3',
nt 1195-1175 5'-CUGUCCGAGGCAAAAGCCAUU-3',

(continuación)

ARNi17: nt 1201-1219 5'-UUCGGACAACAAGAGUCAGuu-3',
 nt 1219-1199 5'-CUGACUCUUGUUGUCCGAAUU-3',
 ARNi18: nt 1297-1315 5'-CCGCAGCAGUUACCCCAUCuu-3',
 nt 1315-1295 5'-GAUGGGGUAACUGCUGCGGUU-3',
 ARNi19: nt 1324-1342 5'-GUCCGCCACACUGGACAACuu-3',
 nt 1342-1322 5'-GUUGUCCAGUGUGGCGGACUU-3',
 ARNi20: nt 1342-1360 5'-CCCGGACUCCAGGACGCUGuu-3',
 nt 1360-1340 5'-CAGCGUCCUGGAGUCCGGGUU-3',

7. El inhibidor para el uso de o el uso de la reivindicación 1, en el que dicha esclerosis múltiple es esclerosis múltiple recurrente-remitente, esclerosis múltiple progresiva secundaria, esclerosis múltiple progresiva crónica primaria, neuromielitis óptica o esclerosis múltiple fulminante.

5 8. El inhibidor para el uso de o el uso de la reivindicación 1, en el que dicha isquemia cerebral es isquemia cerebral focal, isquemia cerebral global o lesión cerebral isquémica hipóxica.

Fig. 1: El tratamiento con Smad7-as-ODN retrasa la aparición y alivia la gravedad clínica en at-EAE

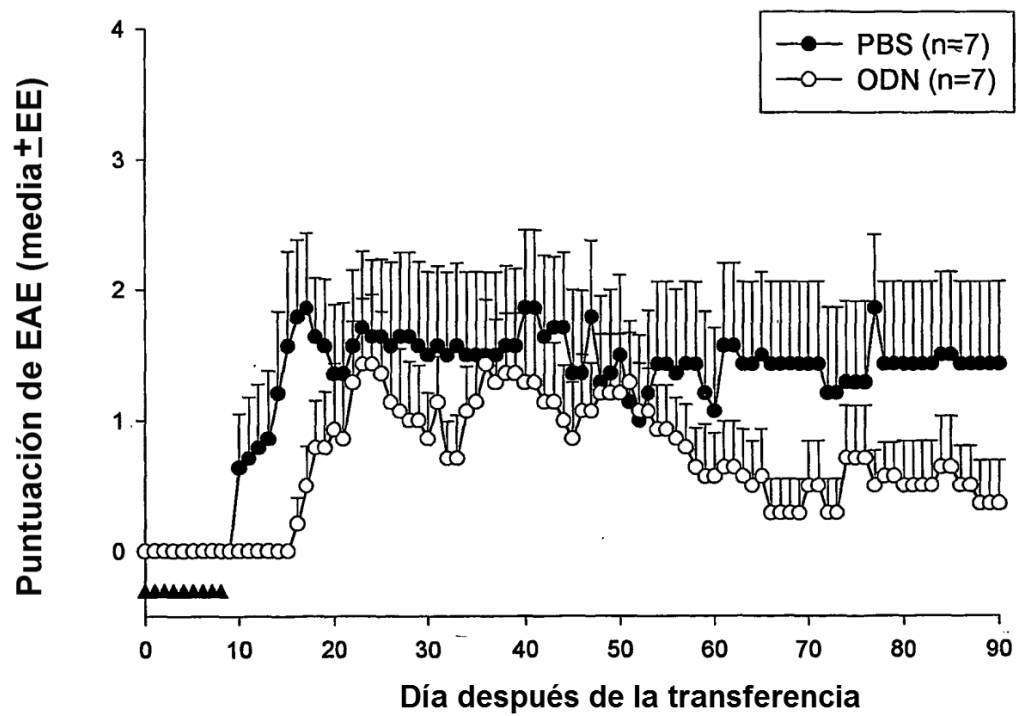


Fig. 2: Efecto a largo plazo del tratamiento con Smad7-as-ODN sobre la enfermedad clínica

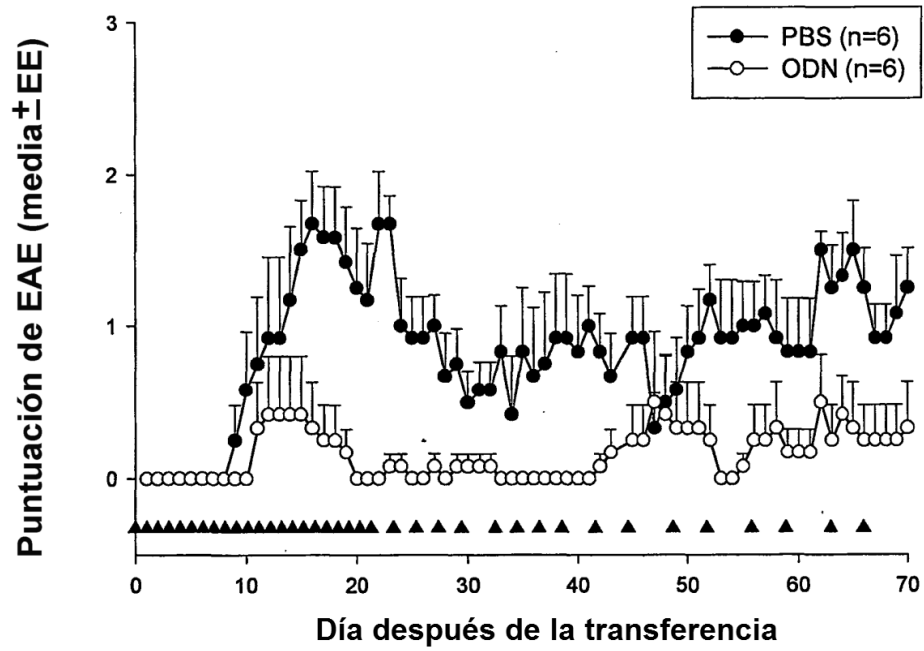


Fig. 3: Efecto terapéutico clasificado de diferentes secuencias de Smad7-as-ODN sobre EAE

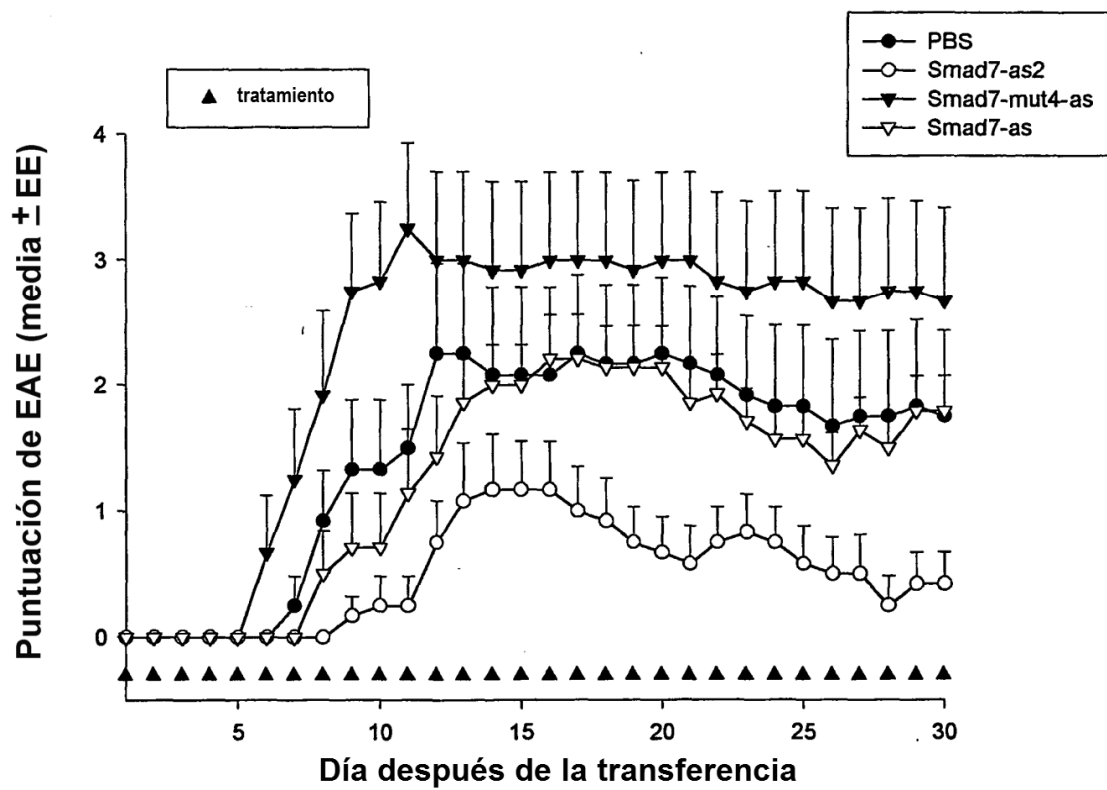


Fig. 4: Efecto terapéutico sobre el tratamiento con Smad7-as-ODN sobre enfermedad del SNC en curso

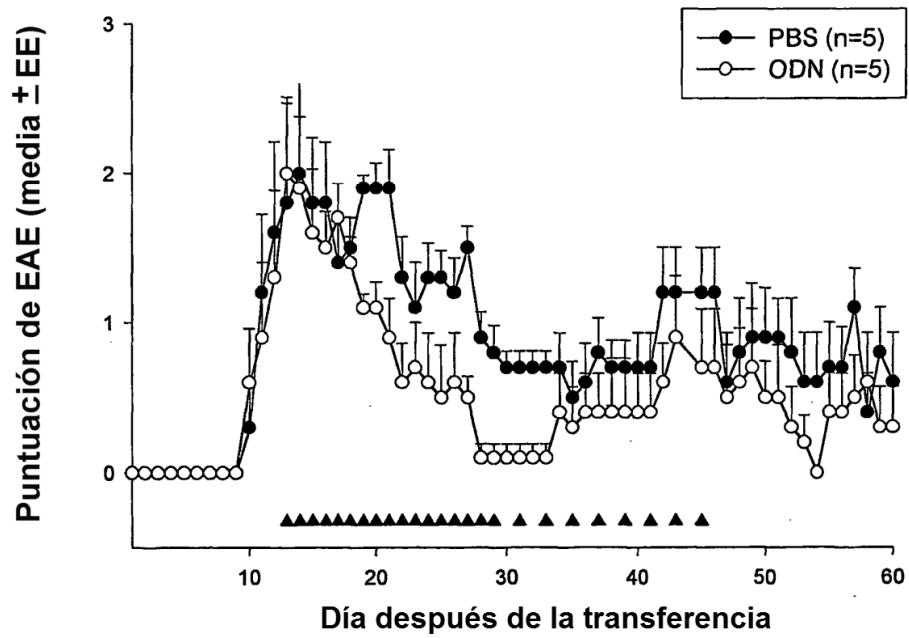


Fig. 5: Las células de ganglios linfáticos autorreactivos no inducen EAE después del tratamiento con Smad7-as-ODN in vitro

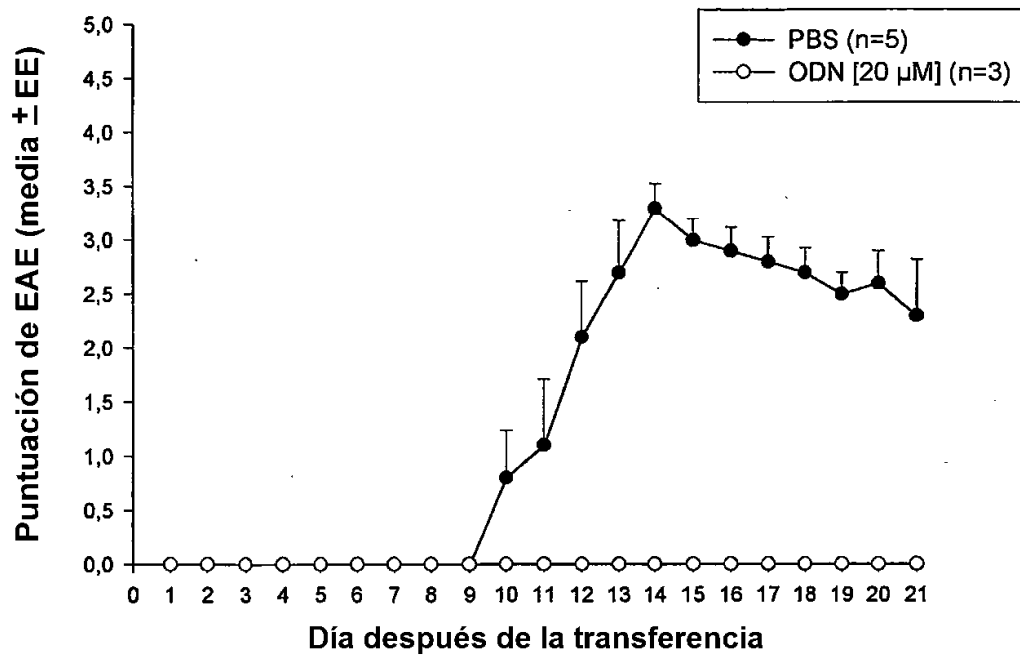


Fig. 6: Efecto supresor de Smad7-as2-ODN sobre la proliferación de LNC activadas por PLP in vitro

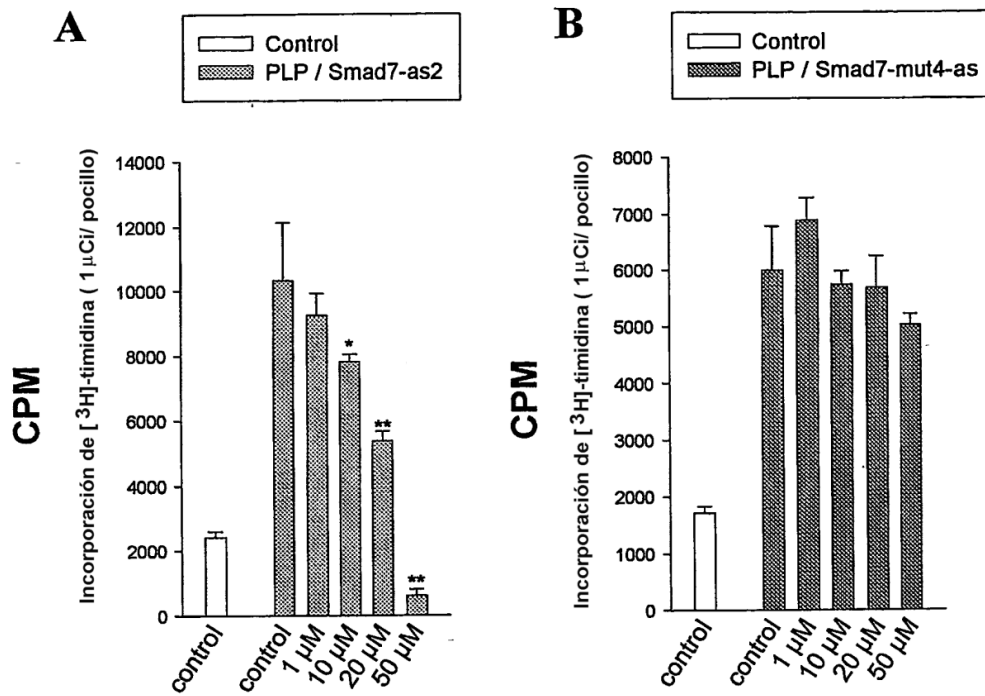


Fig. 7: Smad7-as-ODN disminuye la proliferación de LNC activadas *in vitro*

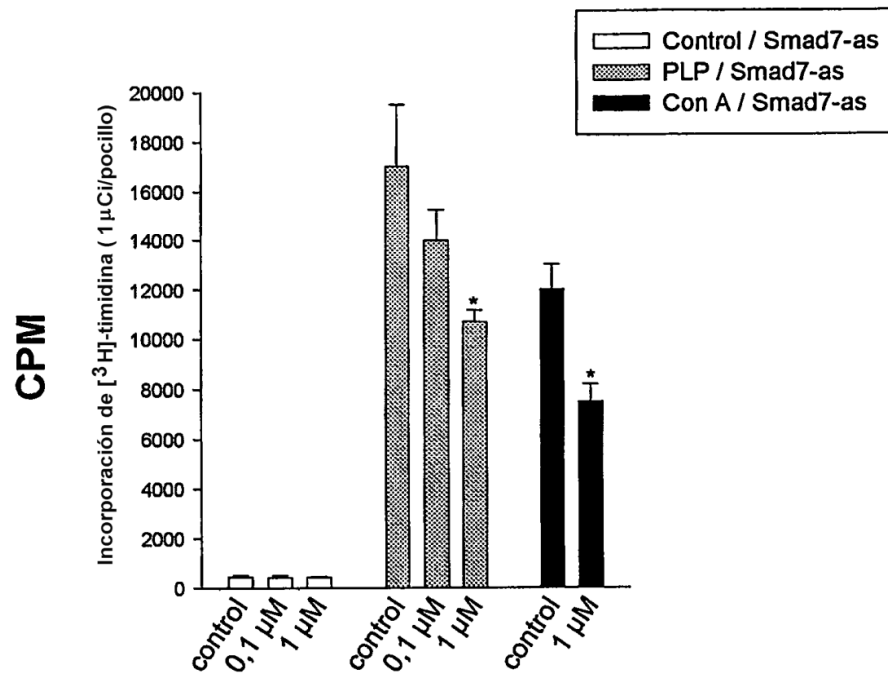


Fig. 8: Ausencia de toxicidad de Smad7-as2-ODN contra LNC activadas

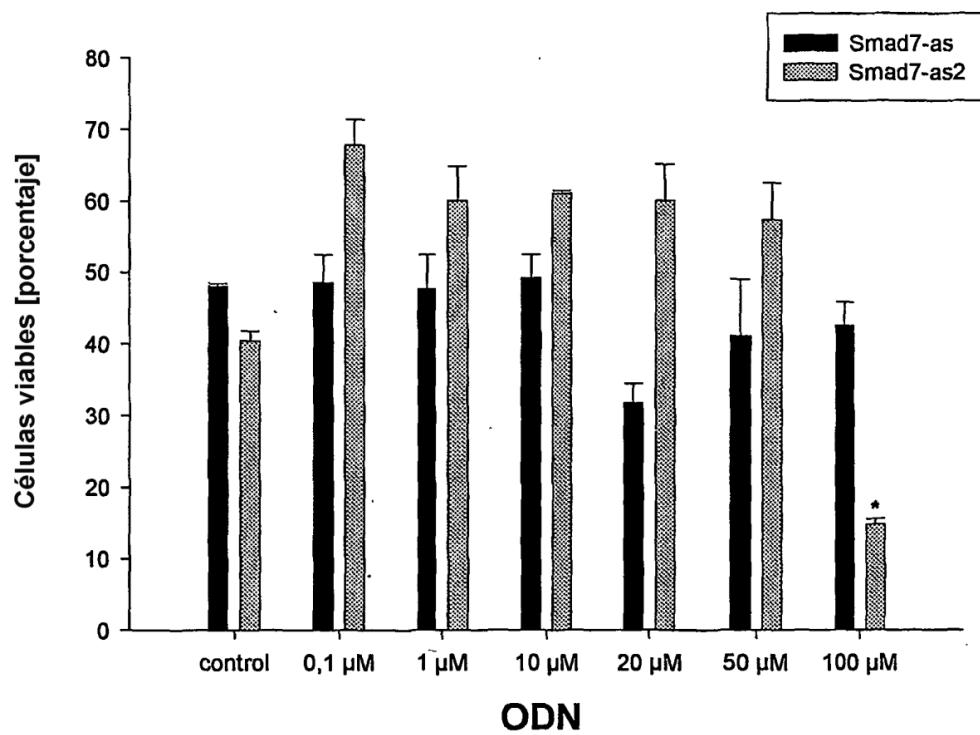


Fig. 9: Smad7-as2-ODN no son tóxicos contra LNC activadas

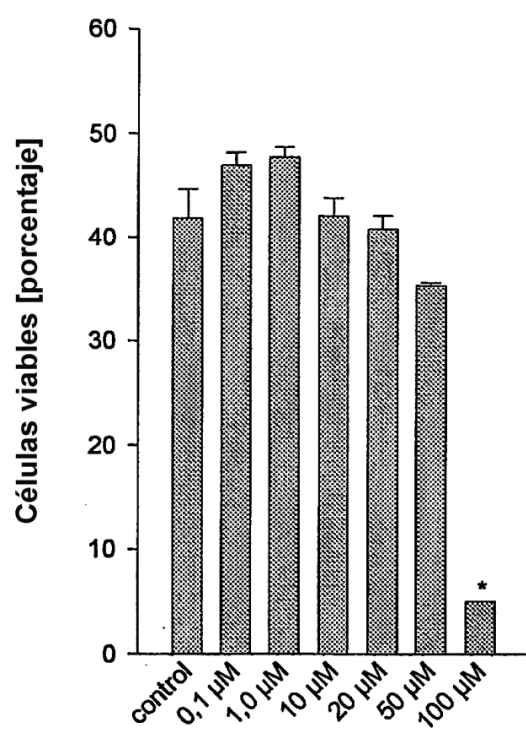
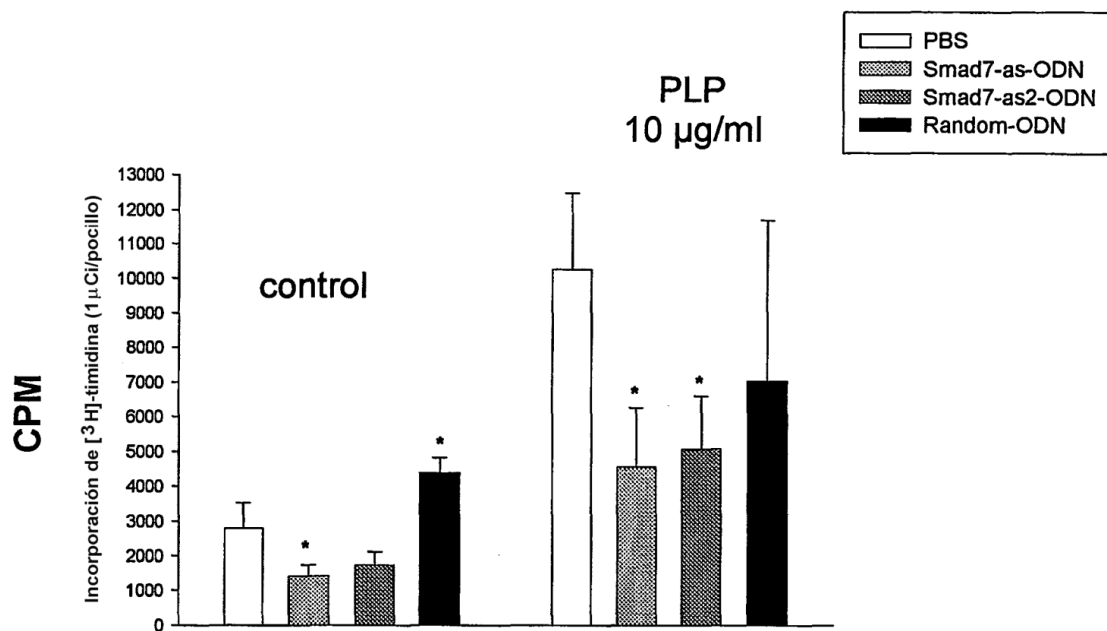


Fig. 10: Inhibición del cebado de LNC autorreactivas por tratamiento con Smad7-as-ODN *in vivo*



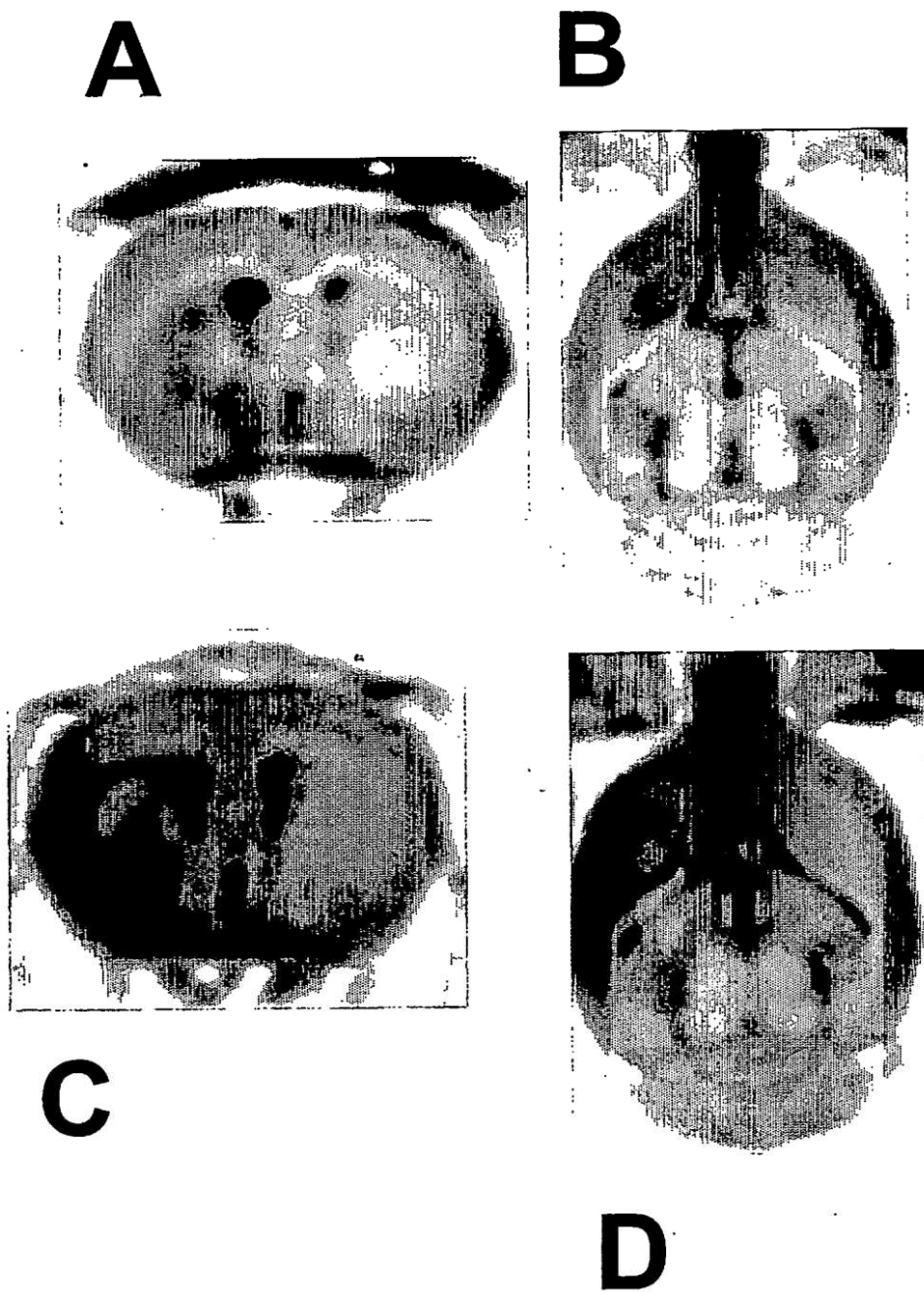


Figura 11

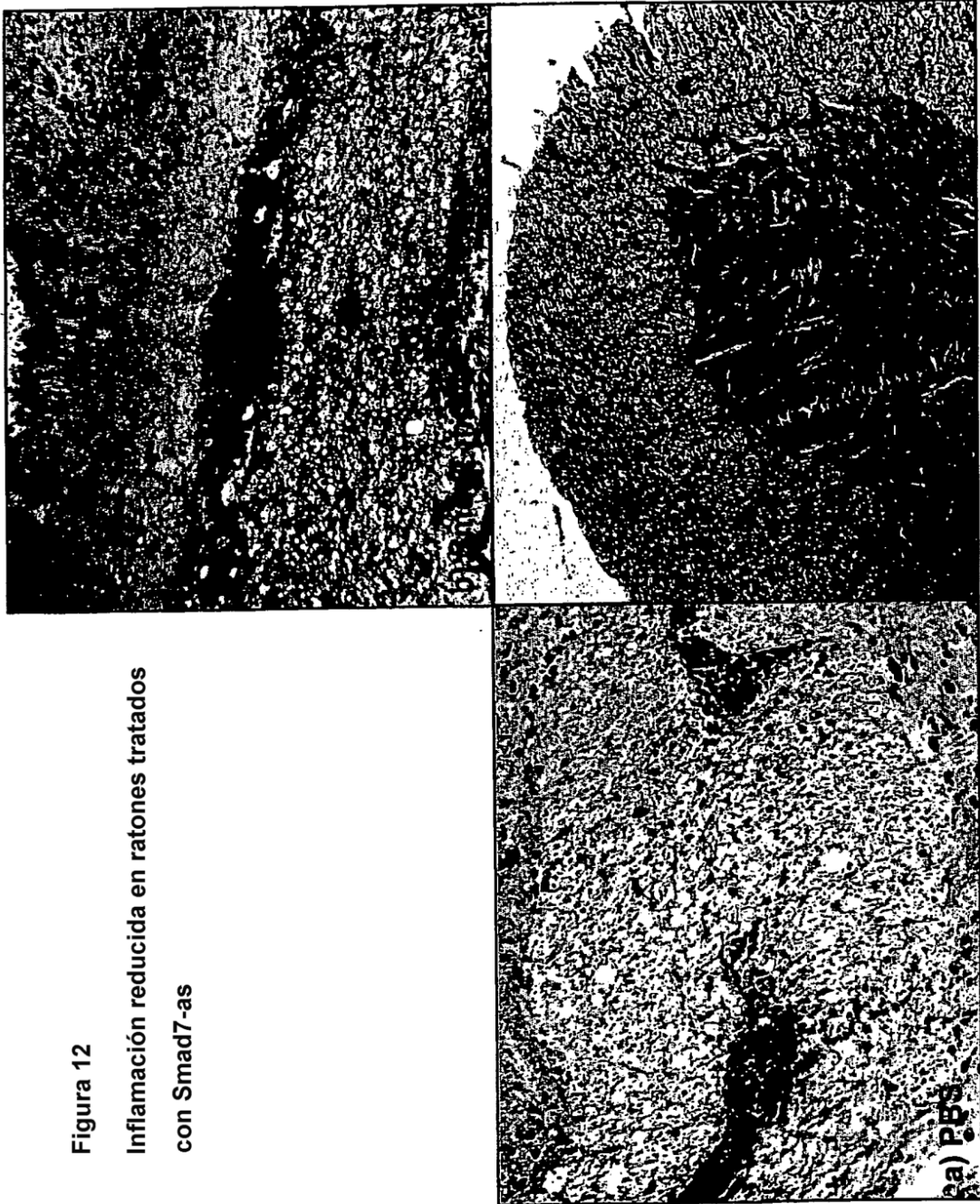


Figura 12
Inflamación reducida en ratones tratados
con Smad7-as

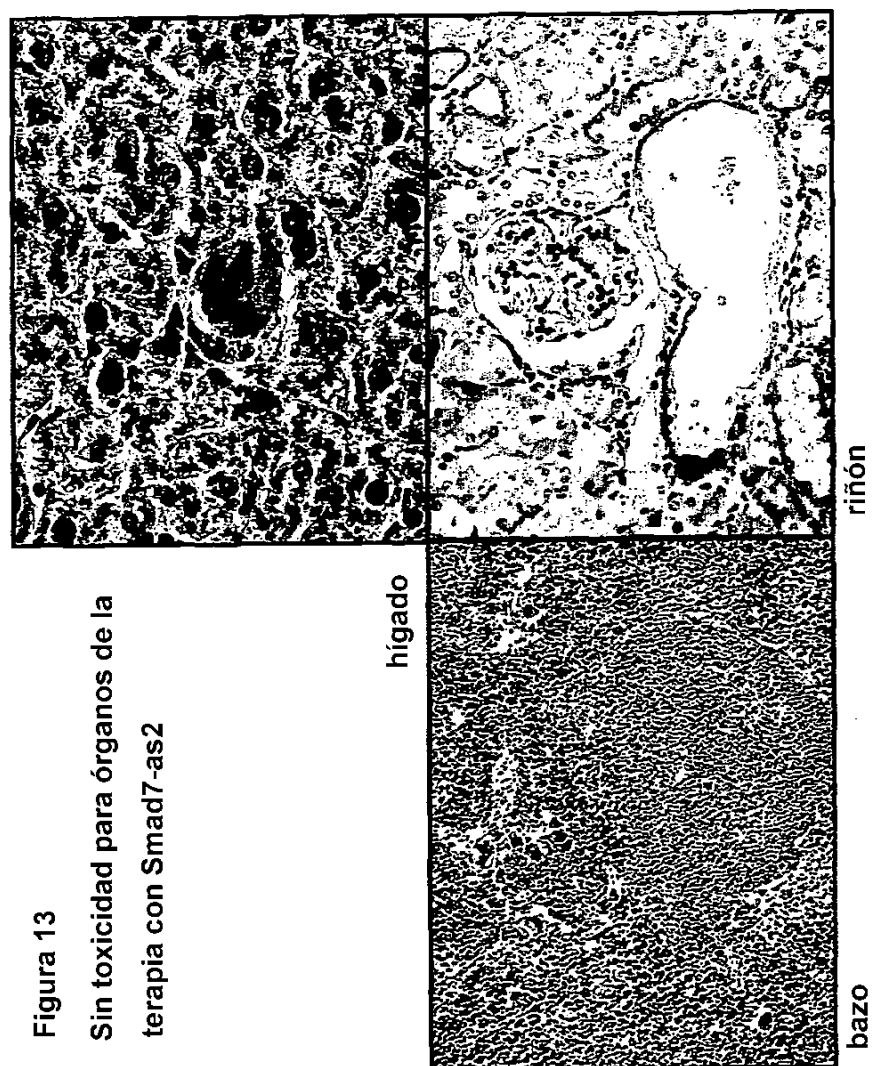


Fig. 14: Smad7-as2-ODN disminuye la proliferación de células del bazo mitógenicamente activadas

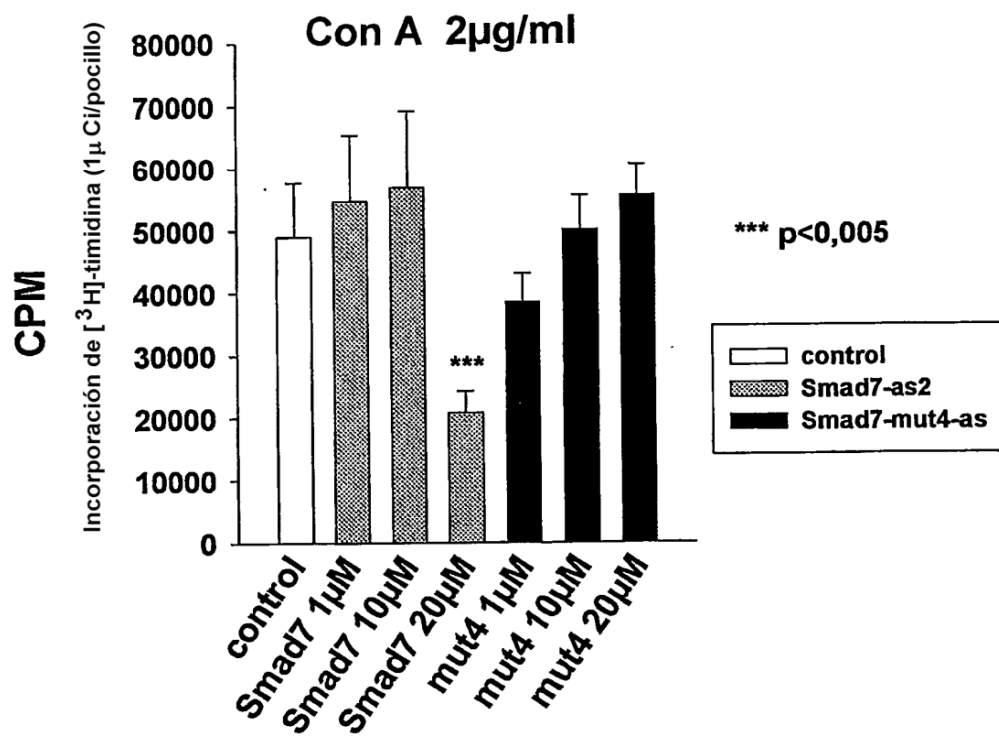


Fig. 15a: Células del bazo enriquecidas en Ficoll, estimulación anti-CD3: supresión por Smad7-as2-ODN

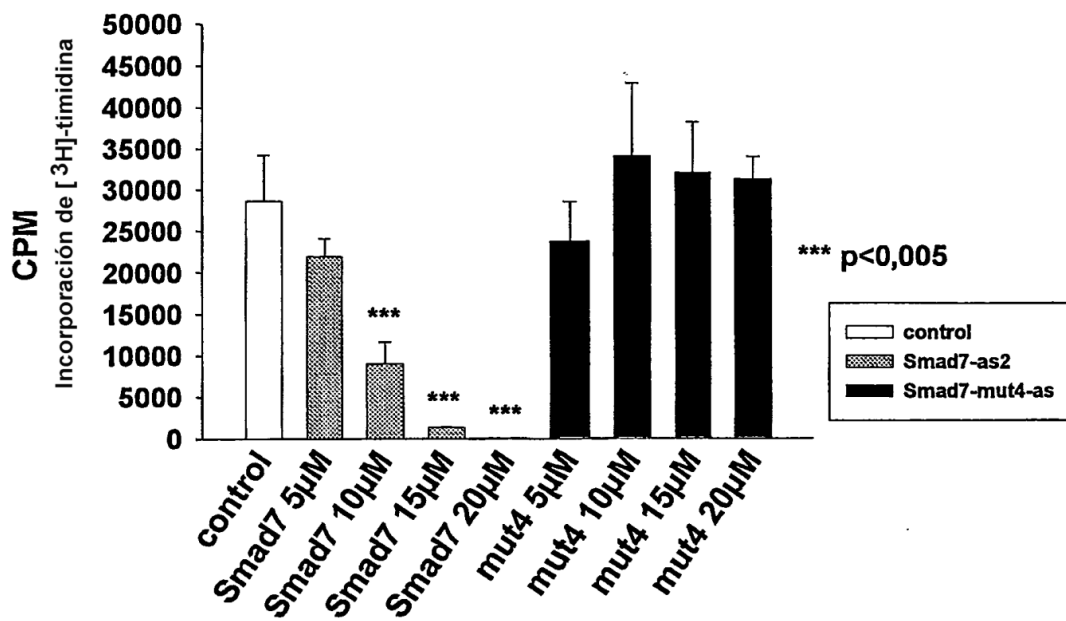


Fig. 15b: Linfocitos T CD4+: estimulación anti-CD3: supresión por Smad7-as2-ODN

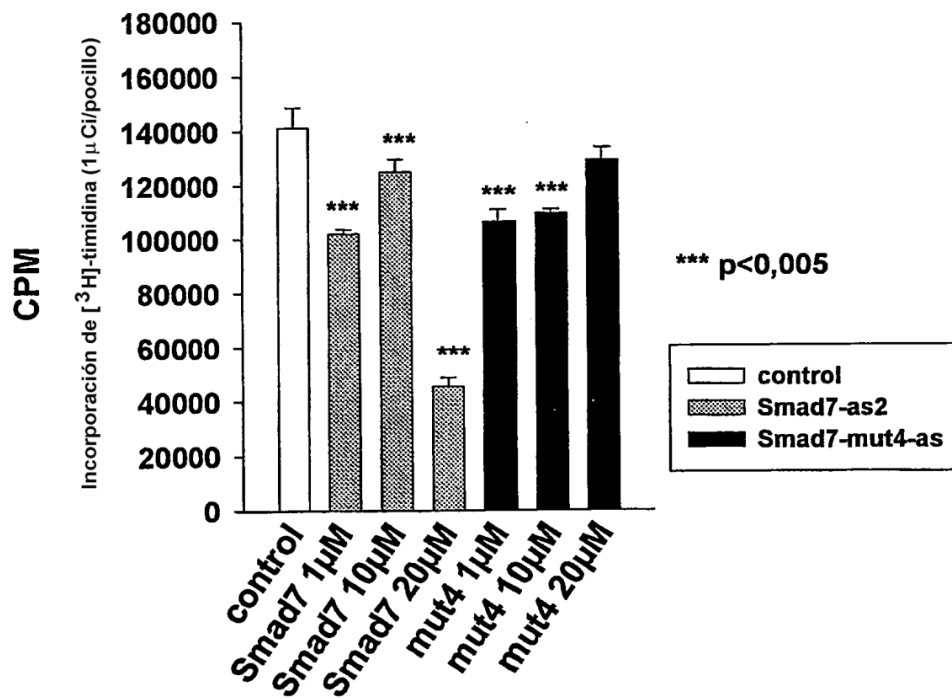


Fig. 15c: Linfocitos T CD8+: estimulación anti-CD3: supresión por Smad7-as2-ODN

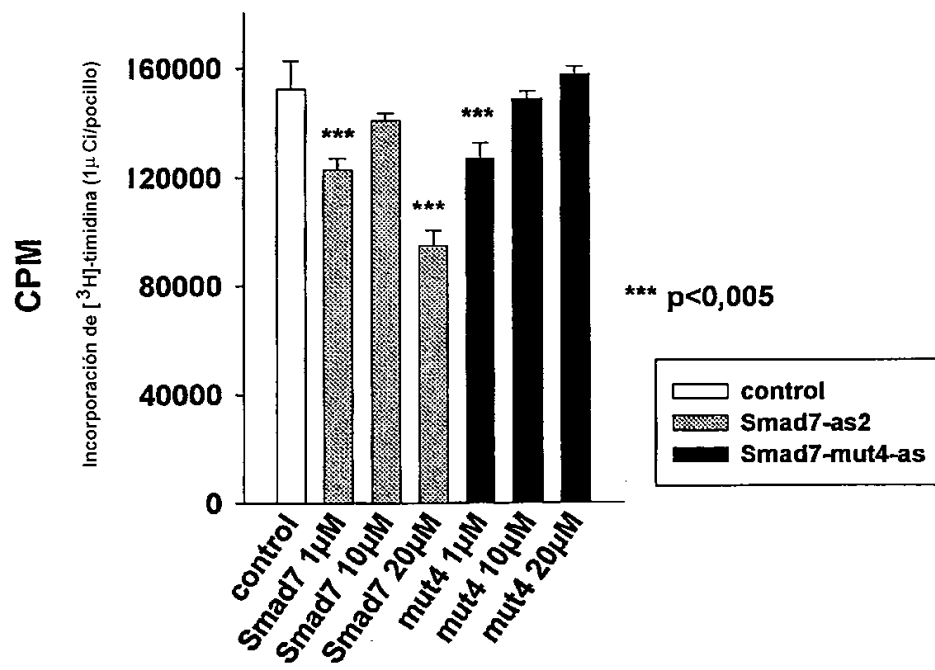


Fig. 16: Efectos de diversos ODN antisentido para Smad7 sobre la proliferación de linfocitos T in vitro

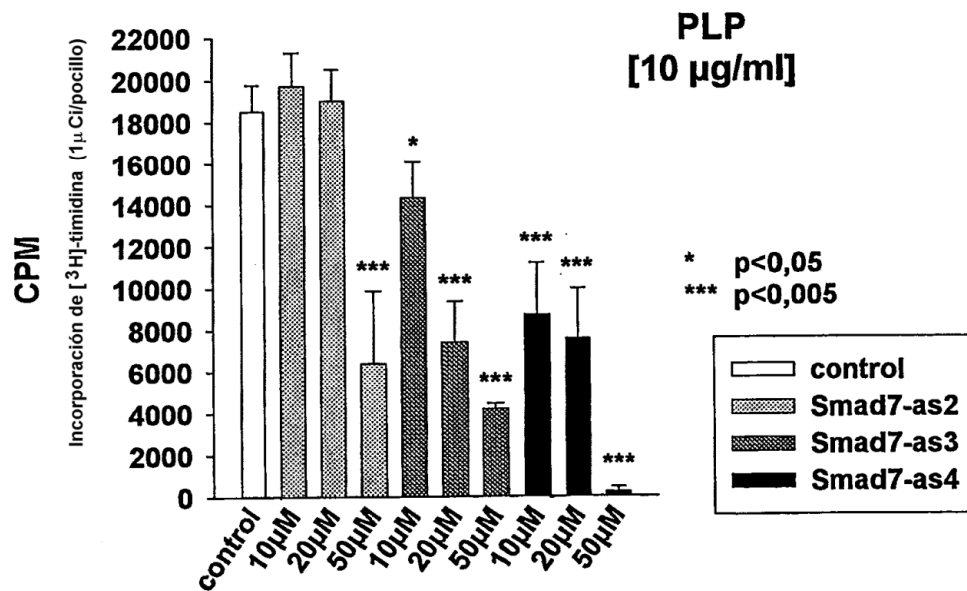


Fig. 17: El tratamiento con Smad7-as2-ODN in vivo inhibe las respuestas de cebado antigénicas.

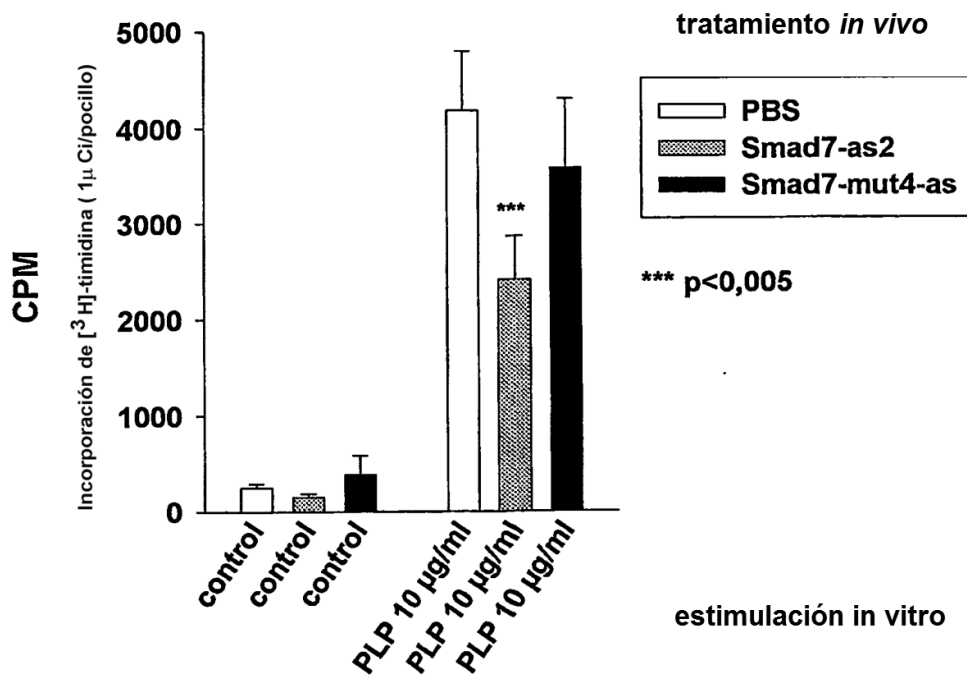


Fig. 18a: El tratamiento in vivo con Smad7-as2-ODN reduce la encefalitogenicidad de LNC reestimuladas con antígeno

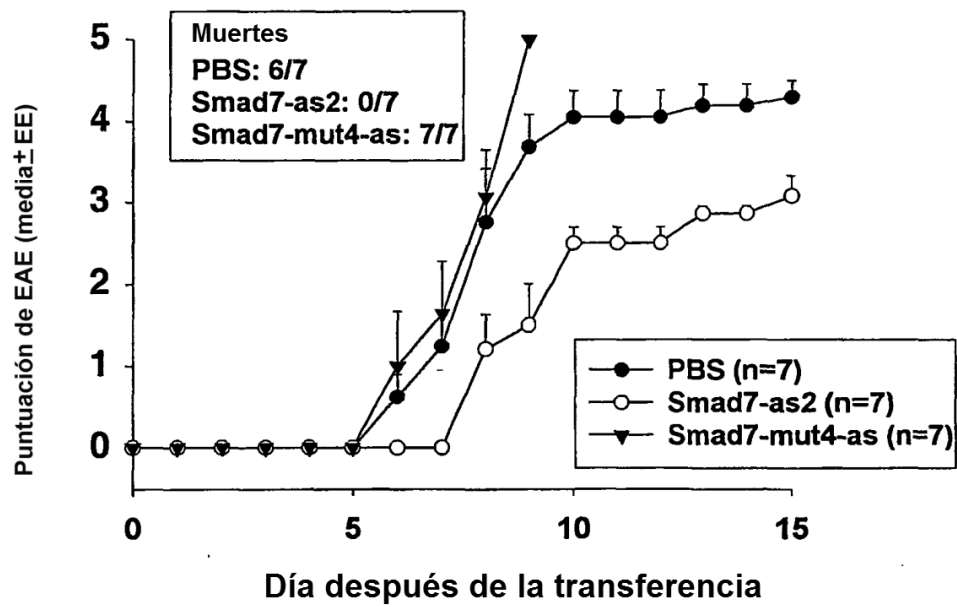


Fig. 18b: El tratamiento in vivo con Smad7-as2-ODN reduce la encefalitogenicidad de LNC reestimuladas con antígeno

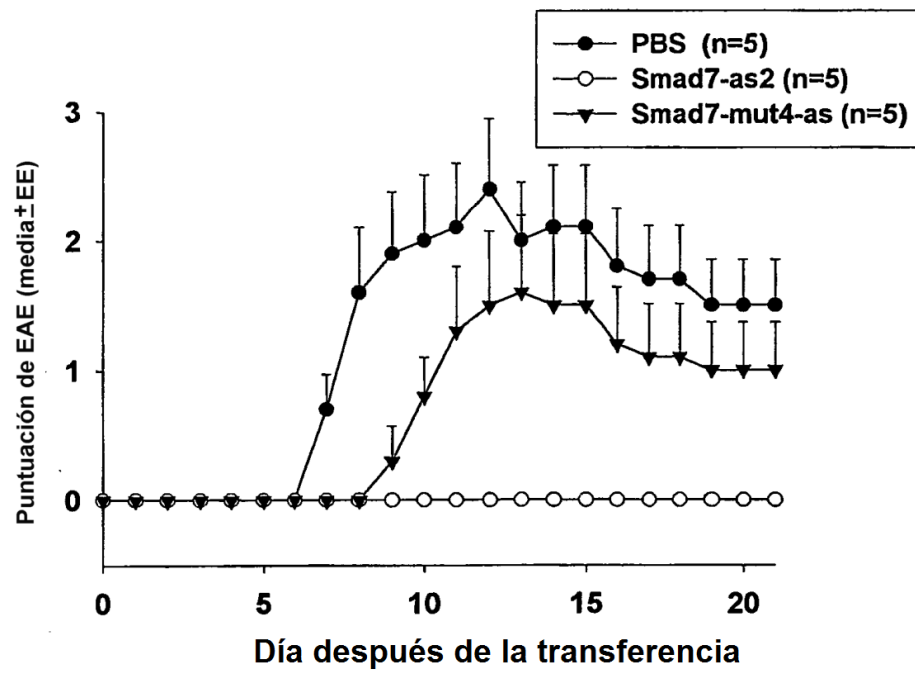


Fig. 19: Tratamiento preventivo con ARN interferente pequeño (ARNip) específico para Smad7

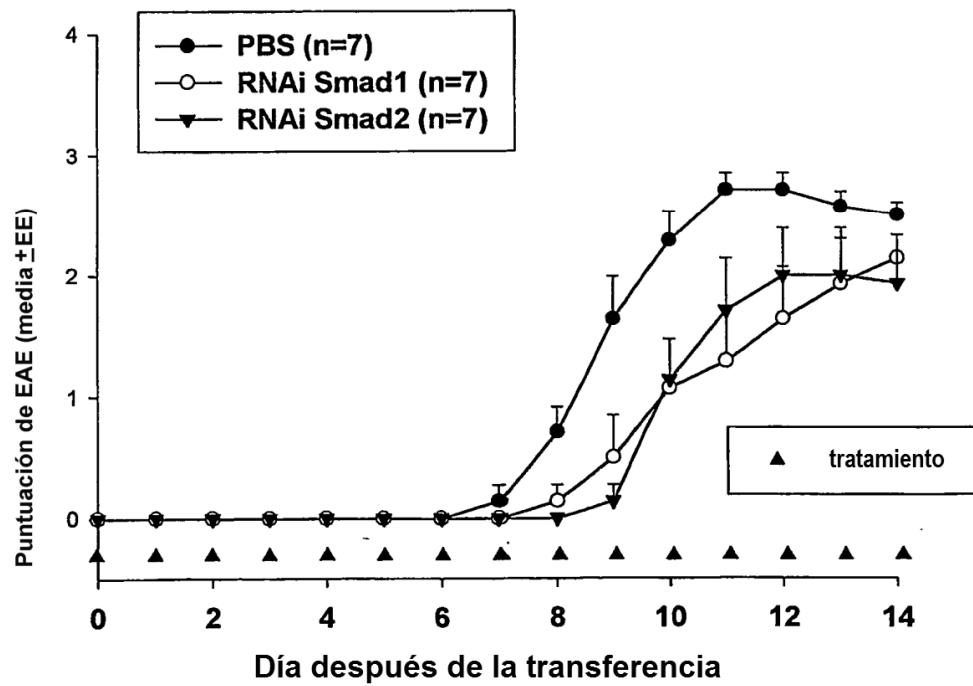
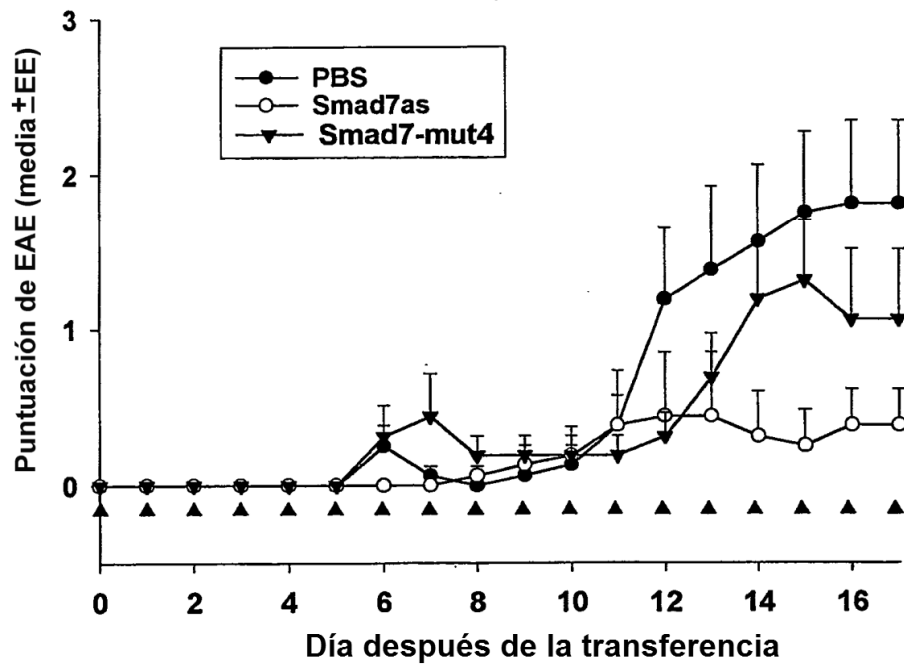


Fig. 20: Tratamiento preventivo con antisentido para Smad7 en EAE inducida por MOG en la rata



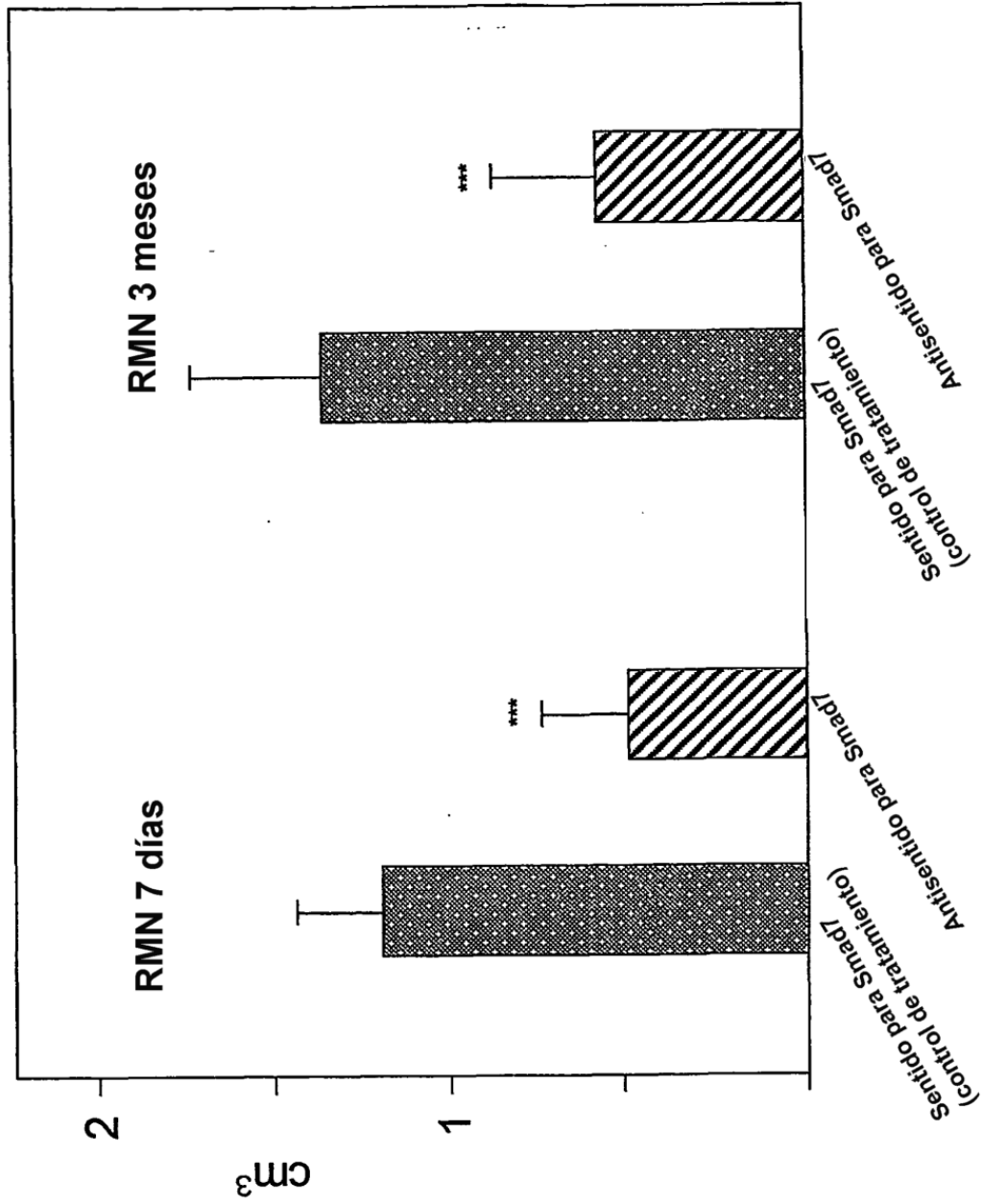


Fig. 21

***: $P < 0,0001$, en comparación con control (prueba de la t de Student)

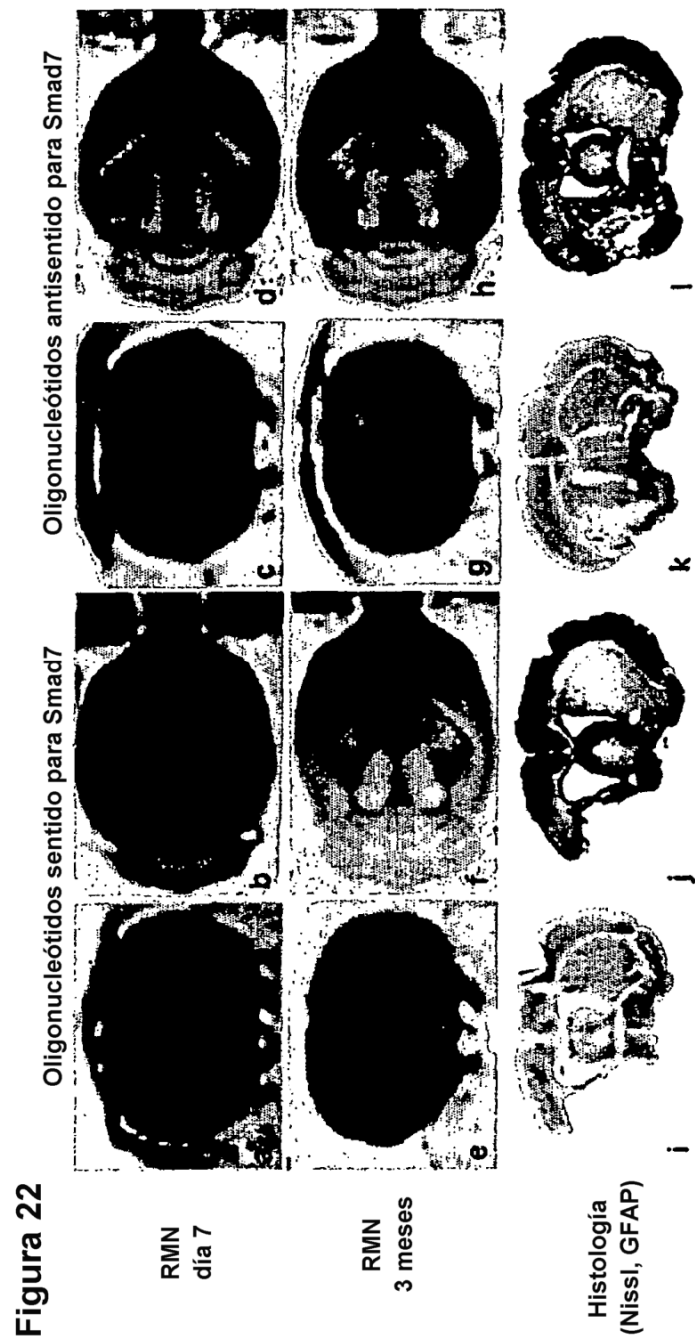


Fig. 23a

SEC ID N°: 1, ARNm de Smad7 humana

```

1  ggacagagc gagagccgcg cagggcgcgg gccgcgcggg gtggggcagc cggagcgag
61  gcccccgatc cccggcgggc gccccgggc cccgcgcgc gccccggcct cggggagact
121  ggcgcagcgc acggagcgcc cctcggggcg cctcggctcc tgcccgggccc cctgctgctg
181  ctgctgtcgc ctgcgcctgc tgcccgaact cggcgcccca ctcttcatg gtgtgcggag
241  gtcatgttctg ctcttagca ggcaaacgac ttttctctc gcctcctcgc ccgcatgtt
301  caggaccaaa cgatctgcgc tctcggcg tctctggagg agccgtgcgc ccggcggcga
361  ggacgaggag gagggcgag ggggaggtgg aggagggagc gagctgcggg gagaaggggc
421  gacggacagc cgagcgcatg gggcgggtgg cggcggcgc ggcaaggctg gatgctgcct
481  gggcaaggcg gtgcgaggtg ccaaaggta ccaacctcc caccgccag ccgcgggcgc
541  cggcgcgccc gggggcgcc aggcgatct gaaggcgctc acgcactcgg tgctcaagaa
601  actgaaggag cggcagctgg agctgctgct ccaggccgtg ggtcccgcg gcgggacgcg
661  caccgcgtgc ctctgctgc ccggccgct cggactgcagg ctgggcccg gggcgccgc
721  cggcgcgcag cctgcgcag ccgatctca ggcatctct cactcgtc ccctcctgc tgtgcaaat
781  gttcagggtgg ccggaatcga agctggtgtg ctgcaacccc catcacctta gccgactctg
841  ttacgggaag atcaacccc tctcccccc ctcttactc cagatacccg atggatttc tcaaaccaac
901  cgaactagag tctcccccc ccagatgctg tgcttctct cgctgaaaca gggggaacga attatctggc
961  tgcagactgt cccagagatt ctttcagatt cccaactct tctggagcct ggggacggt cacactgggtg
1021  ccctgggggg tactgggagg agtgggggag ctctactgtg tccaggagcc
1081  cgtgggtggca atcttctatg atctacctca ggggaatggc ttttgccctg gacagctcaa
1141  ctctctggat

```

Fig. 23b

```

1201 ttccgacaac aagagtcagc ttgtgcagaa ggtgcggagc aaatcggct gcggcatcca
1261 gctgacgcgg gaggtggatg gtgtgtgggt gtacaaccgc agcagttacc ccatcttcat
1321 caagtccgcc aactggaca accggactc caggacgctg ttggtacaca aggtgttccc
1381 cggtttctcc atcaaggctt tcgactacga gaaggcgtac agcctgcagc ggccaatga
1441 ccacgagttt atgcagcagc cgtggacggg cttaccgtg cagatcagct ttgtgaaggg
1501 ctgggggtcag tgctacaccc gccagttcat cagcagctgc ccgtgctggc tagaggtcat
1561 cttcaacagc cggtagccgc gtgcggaggg gacagagcgt gagctgagca ggccacactt
1621 caaactactt tgctgctaata atttcctcc tgagtgcctg cttttcatgc aaactctttg
1681 gtcgtttttt ttttgtttgt ttgttggttt tcttctctc gtccctgctt gtgtctgtt
1741 ttgtttcgct ctttgagaaa tagcttatga aaagaattgt tgggggtttt ttgggaagaa
1801 ggggcaggta tgatcggcag gacaccctga taggaagagg ggaagcagaa atccaagcac
1861 caccaaacac agtgtatgaa ggggggcggt catcattca cttgtcagga gtgtgtgtga
1921 gtgtgagtggt gcggctgtgt ttgtgtctct tatggatgtc ccagcagag aggtttgcag tccaagcgg
1981 gctctttgtt ttgtgtctct gcccttggc cagctcagt ggggcagagg cagtacctgg gcaagctggc
2041 tgtctctcct gctctctct ccagcagctg ccctcctcct ccgtctgtcc ccagcctggg aaagcccctg
2101 ggctgggggc ccctcctct ccctcctcct ccgtcctcct ctgtccacag gcttctgagc agcgagcctg
2161 cccctcctct aaccagaacc aattattttc atccttgtct tattcccttc ctgccagccc
2221 ctagtggccc agcgtcttct tttttggcc atctgtcctt ggatctccct gagatgggct
2281 ctgccattgt agcgtcttct tttttggcc atctgtcctt ggatctccct gagatgggct
2341 tccaaggggc tgccggggga gcccctcctc agtattgtct acccagtgcc ctctccctc

```

Fig. 23c

```

2401 agcctctccc ctgcctgccc tggtagacatc aggtttttcc cggacttaga aaaccagctc
2461 agcactgcct gctcccatcc tgtgtgttaa gctctgctat taggccagca agcggggatg
2521 tccctgggag ggacatgctt agcagtcctc ttccctccaa gaaggatttg gtccgtcata
2581 acccaaggta ccatcctagg ctgacaccta actcttcttt catttcttct acaactcata
2641 cactcgtatg atacttcgac actgttctta gctcaatgag catgttttaga ctttaacata
2701 agctattttt ctaactacaa aggtttaaat gaacaagaga agcatttctca ttggaaaattt
2761 agcattgtag tgcttttgaga gagaaaggac tcctgaaaaa aaacctgaga ttatttaaag
2821 aaaaaaatgt atttatgtt atatataaat atattattac ttgtaaatat aaagacgttt
2881 tataagcatc attatttatg tattgtgcaa tgtgtataaa caagaaaaaat aaagaaaaaga
2941 tgcactttgc ttaaatataa atgcaaaataa caaatgcca attaaaaaag ataaacacaa
3001 gattggtgtt tttccctatg ggtgttatca cctagctgaa tgtttttctta aaggagttaa
3061 tgttccatta aacgattttt aaaatgtaca cttgaaaaaa aaaaaaaaaa a

```

Las secuencias diana de oligonucleótidos antisentido para Smad7 humana de SEC ID N°: 16-29 están subrayadas, una secuencia parcialmente solapante, correspondiente a SEC ID N°: 21, se muestra en cursiva.

Fig. 24

SEC ID N°: 2, secuencia de aminoácidos de Smad7 humana

```
CDS      296..1576
          /gen="SMAD7"
          /codón_iniciación=1
          /producto="gen SMAD7 relacionado con MAD"
          /translation="MFRTRRSALVRRLWRSRAPGGEDEEEAGGGGGGELRGEATD
          SRAHGAGGGPGRAGCCLGKAVRGAKGHHHPPPAAGAGAGGAEDLKALTHSVLKK
          LKERQLELLLOAVESRGGTRTACLLPGRLCDRLGPGAPAGAQAQPPSSYSPLLLC
          KVFRWPDLRHSSEVKRLCCESYGKINPELVCCNPHHLSRLCELESPPPPYSRYPMDF
          LKPTADCPDAVPSSAETGGTNYLAPGGLSDSQLLLEPGDRSHWCVVAYWEEKTRVGRL
          YCVQEPSLDIFYDLPQNGFCGLQNSDNKSQLVQKVRSKIGCGIQLTREVDGVWVYN
          RSSYPIFIKSATLDNPDSTRLLVHKVFPGFSIKAFDYEKAYSLQRPNDHEFMQQPWTG
          FTVQISFVKGWGQCYTRQFISSCPCWLEVIENSR"
```

Fig. 25a

SEC ID N°: 3, ARNm de Smad7 de ratón

```

1  cgagtgcggc gcggcgagcc ccagcgggc gcagaaggac tcgagcgcca ggagagggcg
61  gacgggggac gaggaggctc cggggcgcca cgaagagagt ctccgaggaa gaggctgcga
121  gaggacacc gggcctcctg ccgccactgt cgggtcgggg ccagcagctc atgagagcag
181  ccccgcggc caccgcggc caggagaagg agcaccggag gccccacac tagcctgtgc
241  cctcggggc gagagcttgc gaccgcccgg agcccgcgc cgcgcgccc tcccccggc
301  tgacagcccc ccggggcgca gcccgcccg cagcatcttc tgtccctgct tccccagcg
361  ggaggaagtc ccgcccagg acctgagccc ccgggaacgc aggaggaaag accagagact
421  ctaaaacacc cagatacgca agattgaagc agcctagcca gacctttctg tggattaaaa
481  gaaatacgat ttttttttt ttttttttgc agaagaaaag gaaaggaaag ccggctgggt
541  tcagcaagga aaaaagggg gatgtaactc gtggatacgg tttttttccc ccacccttcc
601  aacatcttgt tttatttgt aaacatttcc tcttttaaac ccgggctcca tccggtgccc
661  tccagacctc cgaggcgca ggaggtggtg tgttttttca ttgggggctt tgcatatttt
721  ggttttgggg gttttgagag acctccaga catctcacga ggggtgaagt ctactcggtc
781  cctcccgcga agtcttcgg tgacacagaa tcgaggagat ccggttacta aggatataga
841  agaaaaaaa taaatcgtgc ctgccttttt tttttaattg cctgcttctc ccacccccca
901  aataaagtgt cttagcaagg gggaagagg ctttttccctc cttttagtag ctcagccctaa
961  cgtcttctgt ttttttttt tttttttttt ttttgcccc gaggatcttc catgtaggaa
1021 gccgaggctg gcgagccga cactcgggag cactgtagg ggggcctttt ttggggggagg
1081 cgtctaccgg ggttgctcgc gccgccccca gggaagcggc ggccgcgttc ctccagggca
1141 cgccggggcc cgaaagccc gcaggcgcg ggccgcgcgg ggtgggggcag ccgaaagcgca

```

Fig. 25b

1201 gcccccgat cccggcagg cgcccctggg ccccgcgcg cgcccgggc tctgggagac
 1261 tggcgcatgc caggagcgc cctcgggcc cccgcgctt ctgcccggc cctgctgtt
 1321 gctgctgtcg cctgcgcctg ctgcccacac tcggcgcccg acttcttcat ggtgtgcgga
 1381 ggtcatgttc gtccttagc cggcaaacga cttttctcct cgccctcctcg ccccgcatgt
 1441 tcaggaccaa acgatctgcg ctcgctcggc gtctctggag gagccgtgcg cccggcgggcg
 1501 aggacgagga ggagggcgtg gggggtggcg gcggagggag cgagctgcgg ggagaaagggg
 1561 cgacggacgg ccgggcttat ggggctggtg gcggcgggtgc gggcagggt ggctgctgcc
 1621 tgggcaaggc agtccgaggt gccaaaggtc accaccatcc ccatccccc acctcgggtg
 1681 ccggggcgcc cgggggcgcc gagcggtgc tgaaggcgct cacgcactcg gtgctcaaga
 1741 aactcaagga gcggcagctg gagctgctgc ttcaggccgt ggagtccgc ggcggtagc
 1801 gcaccgcgtg cctcctgctg ccggcccgcc tggactgcag gctgggccc ggggcgccc
 1861 ccagcgcgca gcccgcgag ccgcccctgt cctactcgt ccccctcctg ctgtgcaaa
 1921 tggtcagggtg gccggatctc aggcatcct cggaagtcaa gaggctgtgt tgctgtgaat
 1981 cttacggga gatcaacccc gagctgggtg gctgcaaccc ccatcacctt agtcgactct
 2041 gtgaactaga gtctccccct cctccttact ccagataccc aatggatttt ctcaaaccaa
 2101 ctgcaggctg tcagatgct gtaccttct ccgcggaaac cgggggaaac aattatctgg
 2161 cccctggggg gctttcagat tcccaacttc ttctggagcc tggggatcgg tcacactggt
 2221 gcgtgggtggc atactgggag gagaagactc gcgtggggag gctctactgt gtccaagagc
 2281 cctccctgga tatcttctat gatctacctc aggggaatgg cttttgcctc ggacagctca
 2341 attcggacaa caagagtcag ctggctacaga aagtgcggag caagatcggc tgtggcatcc

Fig. 25c

```

2401 agctgacgcg ggaagtggat ggcggtgtggg tttacaaccg cagcagttac ccatcttca
2461 tcaagtccgc cactctggac aaccggact ccaggacgct gttggtgcac aaagtgttcc
2521 ctggtttctc catcaaggct tttgactatg agaaagccta cagcctgcag cggcccaatg
2581 accacgagtt catgcagcaa ccatggacgg gttcacccgt gcagatcagc tttgtgaagg
2641 gctggggcca gtgctacacc cgcagttca tcagcagctg ccggtgctgg ctggaggtca
2701 tcttcaacag ccggtagtcg gtcgtgtggt ggggagaaga ggacagggcg gatcgtgagc
2761 cgagcaggcc accgttcaaa ctacttgctg ctaatcttcc ccgagtgat gcttttcag
2821 caaactcttt ggttggtgtt gttattgcca ttcattgttg gttttgtttt gttctgttct
2881 ggtttgtttt tttttttttt cctcccaag ggctgccggg acagccccag tcacagtatt
2941 gctaccccag taccctctca ggcccttcca cgggtccca agcatcccat ccccatcct gtgtgctgag
3001 aggtttctcc cagatgtgga agtcagctc agtcagctc agtcagctc cttcctgctg
3061 ctctgtagac cagcagggg catcagggag ggacctgcgc agtgcccccc cttcctgctg
3121 agaagggtgt agccccgtca caaaaagggt accatccctt ggctggctcc cagcccttct
3181 ctcagctcat acgctcgctc gtatgatact ttgacactgt tcttagctca atgagcatgt
3241 ttagaattta acataagcta tttttctaac taaaaagggt taaatgaaca agagaagcat
3301 tctcattgga aatttagcat tgtagtgctt tgagagagga aaggactcct taaaagaaaa
3361 aaaaagctga gatttattaa agaaaaatgt attttatgtt atatataaat atattattac
3421 ttgtaaatat aaagacgttt tataagcatc attatttatg tatttgcaa tgtgtataaa
3481 cgagaagaat aaagaaaaaaga tgcactttgc tttaatataa atgtaataa catgccaaat
3541 taaaaaaaaa aagataaaca caagattggt gtttttttct atgggtgtta tcacctagct
3601 gaatgttttt ctaaaaggag ttatgtttcca ttaaaacaatt ttaaaatgt taaaaaaaa
3661 aaaaaaaaaa a

```

Las secuencias diana de oligonucleótidos antisentido para Smad7 de ratón de SEC ID N°: 7-15 están subrayadas, una secuencia parcialmente solapante, correspondiente a SEC ID N°: 11, se muestra en cursiva.

Fig. 26

SEC ID N°: 4, secuencia de aminoácidos de Smad7 de ratón

CDS

1437..2717

/gen="Madh7"

/codón_iniciación=1

```
/translation="MFRTKRSALVRRLWRSRAPGGDEEEGVGGGGGGELRGEGATD
GRAYGAGGGGAGRAGCCLGKAVRGAKGHHHPPTSGAGAAGGAEDLKALTHSVLKK
LKERQLELLQAVESRGGTRTACLLLPGRLCDRLGPGAPASAPQPPSSYSLELLLC
KVFRWPDLRHSSEVKRLCCCESYGKINPELVCCNPHHLSRLCELESPPPPYSRYPMDF
LKPTAGCPDAVPSSAETGGTNYLAPGGLSDSQQLLLEPGDRSHWCVVAYWEEKTRVGR
YCVQEPSLDIFYDLPOGNGFCGLQNSDNKSQQLVQKVRSKIGCGIQLTREVDGVWVYN
RSSYPFIKSAITLDNPDSTRLLVHKVFPGFSIKAFDYEKAYSLQRPNDHEFMQQPWTG
FTVQISFVKGWGQCYTRQFISSPCWLEVIFNSR"
```

Fig. 27a

SEC ID N°: 5, ARNm de Smad7 de rata

```

1  tgagtgcggc gcggcgagcc ccagcggcg gcagaaggac tcgagcgcca ggagagggcg
61  gacgggggac gaggaggctc ccgggcgcga cgaagagagt ctcgaggaa gaggtgcga
121  gaggacacc ggccctcctg ccgccactgt cgggtcgggg ggcacccgca gcccacgc tagctagcct
181  cccagcgac caccctcggc caggagaagg gcacccgcgc gcacccgcgc gacccatctt ctgtccctgc
241  gccgcctgt ccctcggggg cgagagcttg cagcccgccg gaccccgccg cccgggagcg caggaggaaa
301  ctcccccg cgagagaaagt cccgcgcgag cccgatacgc aagattgaag cagcctaacc agacctttct
361  tccccagcgc tctaaacac cccgaggaagt cccgcgcgag gacctgggccc cccgggagcg caggaggaaa
421  gaccagagac tctaaacac cccgaggaagt cccgcgcgag gacctgggccc cccgggagcg caggaggaaa
481  gtggattaaa agaaatacga tttttttttt gacagaagaa aaggaaagga agaccggcgg
541  ggttcagcaa gaaaaaaag ggatgtaac tcgtggatac ggtttttccc ccaccccttc
601  caacatcttg ttctactttg taacaatttt ctttttttaa accccggctc catccggctg
661  cctccagacc tccgaggctg gagaaggctg gacctccag acatctcacg aggggtgaag tctactcggc
721  tggttttggg gtttttgaga gacctccag gacctccag acatctcacg aggggtgaag tctactcggc
781  cccctccctc aagtcttcgc gtgcacagaa ttcgaggaga tccggttact aaggatatag
841  aagaaaaaaa taaatcgtgt gcctgccctt ttttttttta attgcctgct tctcccacc
901  ccaaaattaa gttgcttagc aagggggaaa gaggtttttt cctccctca gtagctcagc
961  ctaacgtctt tcgttttttg cccctgagga tcttccatgt aggaagccga ggctggcgag
1021  cccgacactc gggagccact gtaggggggc ctttttgagg agagggcgtg accggggctg
1081  cctcggccgc cccagggaa gcggcgccgc cgttcctcag gggcacgcgc gggcccgaga
1141  gccgcgcagg gcgcggggcg gcgcgggtgg ggcagccgaa gcgcaggccc ccgatccccg

```

Fig. 27b

```

1201 gggggggccc ctggggcccc gggggggccc gagactggcg catgccacgg
1261 agcggccctc gggcgcccg cgtttctgcc ogggcccttg ctgttgttgc tgtcgccctgc
1321 gcctgctgcc ccaactcggc gccgacttc ttcatgtgtg gcggaggtca tgttcgctcc
1381 ttagccggca aacgactttt ctctcgccct cctcgccccc catgttcagg accaaacgat
1441 ctgcgctcgt ccggcgtctc tggaggagcc gtgcgccccg cggcgaggac gaggaggagg
1501 gcgtgggggg tggcgggggc ggaggcgacc tgcggggaga agggggcgac gacggccggg
1561 ctatatgggc tggtaggggc ggtgcgggca gggctggctg ctgcctgggt aaggcagtc
1621 gagtgccaa aggtcaccac catccccc ccccatctc ggtgcccggg gcggccgggg
1681 gcgccgaggc ggatctgaag gcgctcacgc actcggtgct caagaaactc aaggagcggc
1741 agctggagct gctgcttcag gccgtggagt cccgcgggcg taccgcacc gcgtgcctcc
1801 tgctgcccgg ccgcctggac tgcaggctgg gcccgggggc gcccgccagc gcgcagccc
1861 cgcagccgcc ctgctcctac tcgctcccc tctgctgtg caaagtgttc aggtggcccg
1921 atctcaggca ttctcggaa gtcaagaggc tgtgttgctg tgaatcttac gggaagatca
1981 accccgagct ggtgtgctgc aaccccatc acctagtct actctgtgaa ctagagtctc
2041 cccctcctcc ttactccaga taccgatgg attttctcaa accaaactga gactgtccag
2101 acgctgtacc ttctccgat gaaaccgggg gaaacgaatta tctggccctt ggggggcttt
2161 cagattccca acttctcttg gacctgggg atcggtcaca ctggtgcgtg tggccatact
2221 gggaggagaa gactcgagtg gggaggctct actgtgtcca agagccctcc ctggatatct
2281 tctatgatct acctcagggg aatggctttt gcctcggaca gctcaattcg gacaacaaga
2341 gtcagctggt acagaaagt aggagcaaga tcggctgtgg catccagctg acaagggaag
2401 tggatggcgt gtgggtttac aaccgcagca gttaccccat cttcatcaag tccgccacac

```

Fig. 27c

```

2461  tggacaacc  ggactccagg  acgctgttg  tgcacaaagt  gttccctggt  ttctccatca
2521  aggcctttga  ctatgaaaa  gcctacagcc  tgcagcggcc  caatgaccac  gagttcatgc
2581  agcagccatg  gacgggcttc  accgtgcaga  ttagcttcgt  gaagggctgg  ggccagtgct
2641  acaccgcca  gttcatcagc  agttgcccg  gctggctgga  ggtcatcttc  aacagccggt
2701  agtctcccg  tgtggggaga  agaggacagg  acggaggggt  gagccgagca  ggccaccgtt
2761  caaactactt  gctgctaata  ttccatgcaa  aactctttcg  gtcggttttg  ttgtttgccca
2821  ttcatgttg  gttctgtttt  gttttgtttt  cctttttttt  tttcttccct  tcttcttttt
2881  cctcctttct  tgtcactctt  gtgtcctgtg  tgtctcgttc  tttagaaaaa  tatgatgcgg
2941  atttttggt  gtgtgttttt  tttttcgtt  tgtttgtttg  ttgtgtttgt  ttgtgttttg
3001  aggtggtggt  ggggtgcggt  ggcaggacac  ccgatacaa  aaacgggaag  caagagtcag
3061  cactgccaa  cgtggtgtgc  gaaagtgggt  accaccttc  cctttggatc  agcatttcag
3121  ttgtcagtgt  gtgtgtgtga  ggggggtgta  cgtgaatgac  agatggggga  atggcgtgct
3181  ttttttgtgt  tctttatgga  tgtcccccag  tgagaggctt  gcagtcccaa  gctgtgtgtc
3241  tctcactgtg  tgtctctctc  atgagccttt  cggacatgct  cggtggggca  gaggctgtac
3301  ctgggcagac  tggcagcagg  tgtcccagca  ggtgccgagc  tctgctccgc  tgaagctccc
3361  ccgcccccg  ccccttccc  acaggacacg  ggcctatcca  caggcttctg  agaagccagc
3421  ctgctagaag  gctgaaccag  aaccaattgt  ttccatccct  gtcttactgc  ctctgtcac
3481  ccgctgccat  tgtcgaaggc  tgtctttttt  ggccatctgc  tcctggatct  ctcttgagat
3541  gggcttccca  agggctgccg  ggacagcccc  agtcacagta  ttgctacccc  agtaccttct
3601  caggcccttc  caccggtccc  agccgtggtt  ttttcatcag  gtttctccca  gatctggaaa

```

Fig. 27d

```

3661 gtcagctcag caccatcc ccagcctgt gtgctgagct ctgtagacca gcgaggggca
3721 tcaggaggag acctgctcag tgcccaccca ccccccttc ccgctgagaa ggggtgtagcc
3781 ccgtcataac aaaggtaacca tcgtaggctg gctccagcc cttctctcgg ctcatacact
3841 cgtatgatac tctgacactg ttcttggtc atgagcatg ctacacttt aataaagct
3901 attttctaa ctacaaaagg tttaatgaac aagagaggcg ttctcatcgg aaatttagca
3961 tcgtagtgct ttgagagagg aaaggactcc ttaaaagaga aaaaaaaag ctgagattta
4021 ttaagaaaa aaatgtatt tatgttatat ataaatatat tattacttgt aaatataaaag
4081 acgttttata agcatcatca tttatgtatt gtgcaatgtg tataaacgag aataaaagaaa
4141 agatgcaact tgctttaata taaacgcaaa taacatgcca aattaaaaaa aaaaaagata
4201 aacacaagat tgggtgtttt ttctatgggt gttatcacct agctgaaatgt ttttctaaag
4261 gagtttatgt tccattaaac aatttttaa atgtataaaa aaaaaaaa a

```

Las secuencias diana de oligonucleótidos antisentido para Smad7 de rata de SEC ID N°: 30-38 están subrayadas, una secuencia parcialmente solapante, correspondiente a SEC ID N°: 34, se muestra en cursiva.

Fig. 28

SEC ID N°: 6, secuencia de aminoácidos de Smad7 de rata

CDS

1422..2702

/gen="Madh7"

/codón_iniciación=1

```
/translation="MERTKRSALVRRLLWRSRAPGGEDEEEGVGGGGGDLRGEATD
GRAYGAGGGGAGRAGCCLGKAVRGAKGHHHPHPPSSGAGAAGGAADLKALTHSVLKK
LKERQLELLLOAVESRGGTRTACILLPGRLCDRLGPGAPASAQPAQPPSSYSLPLLCLC
KVFRWPDLRHSSEVKRLCCCESYGKINPELVCCNPHHLSRLCELESPPPYSRYPMDF
LKPTADCPDAVPSSDETGGTNYLAPGGLSDSQLLEPGDRSHWCVVAYWEEKTRVGRL
YCVQEPSLDIFYDLPPQNGFCLGQLNSDNKSQVLVQKVRSKIGCGIQLTREVDGVWVYN
RSSYPIFIKSATLDNPDSTRLLVHKVFPGFESIKAFDYEKAYSLORPNDHEFMQQPWTG
FTVQISFVKGWGQCYTRQFISSCPCWLEVIENSR"
```

FIG. 29

Smad-7-as-ODN suprime la expresión de ARNm de Smad7 inducida por TGF- β en linfocitos T de Jurkat

