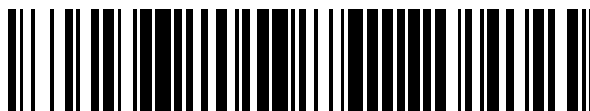


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 560 107**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

A61K 31/712 (2006.01)

A61P 25/16 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.02.2010 E 10741789 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.10.2015 EP 2396038**

54 Título: **Tratamiento de enfermedades relacionadas con el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) por inhibición de transcrito antisentido natural para BDNF**

30 Prioridad:

12.02.2009 US 152132 P

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

17.02.2016

73 Titular/es:

**CURNA, INC. (100.0%)
4400 Biscayne Boulevard
Miami, FL 33137, US**

72 Inventor/es:

**COLLARD, JOSEPH;
KHORKOVA SHERMAN, OLGA y
COITO, CARLOS**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 560 107 T3

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

DESCRIPCIÓN

Tratamiento de enfermedades relacionadas con el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) por inhibición de transcrito antisentido natural para BDNF

REFERENCIA CRUZADA

La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de EE.UU. N°. 61/152.132 presentada el 12 de febrero de 2009.

CAMPO DE LA DIVULGACIÓN

Ejemplos de la divulgación comprenden oligonucleótidos que modulan la expresión y/o función de BDNF y moléculas asociadas.

ANTECEDENTES

La hibridación de ADN-ARN y ARN-ARN es importante para muchos aspectos de la función del ácido nucleico que incluyen replicación, transcripción y traducción de ADN. La hibridación también es fundamental para una variedad de tecnologías que tanto detectan un ácido nucleico particular como alteran su expresión. Los nucleótidos antisentido, por ejemplo, alteran la expresión génica hibridándose con el ARN diana, interfiriendo así con el splicing, transcripción, traducción y replicación de ARN. El ADN antisentido tiene la característica añadida de que los híbridos de ADN-ARN sirven de sustrato para la digestión por ribonucleasa H, una actividad que está presente en la mayoría de los tipos celulares. Las moléculas antisentido pueden administrarse a células, como es el caso de los oligodesoxinucleótidos (ODN), o pueden expresarse a partir de genes endógenos como moléculas de ARN. La FDA aprobó recientemente un fármaco antisentido, VITRAVENE™ (para el tratamiento de retinitis por citomegalovirus), que refleja que el antisentido tiene utilidad terapéutica.

Pruunsild et al. 2007 (Genomics, vol. 90(3):397-406) describen la disección del locus de BDNF humano: transcripción bidireccional, splicing complejo y múltiples promotores.

Beiter et al. 2008 (Cellular and Molecular Life Sciences, vol. 66(1):94-112) describen la transcripción antisentido: una revisión crítica en ambas direcciones.

Liu et al. 2006 (Brain Research, vol. 1067(1):1-12) describen genes BDNF de roedor, promotores novedosos, variantes de splicing y regulación por cocaína.

Qing-Rong Liu et al. 2005 (American Journal of Medical Genetics, Parte B: Neuropsychiatric Genetics, vol. 134B(1):93-103) describen genes BDNF humanos, patrones de splicing y evaluaciones de asociaciones con abuso de sustancias y enfermedad de Parkinson.

Liu et al. 2006 (International Journal of Developmental Neuroscience, vol. 24(8):559) describen la regulación diferencial de genes BDNF/BDNFOS humanos sentido y antisentido y gen BDNF de roedor: posibles funciones en la enfermedad de Alzheimer y adicciones.

El documento WO 98/01573 describe la clonación recombinante asociada a transformación.

El documento WO 2006/072005 describe métodos para la supervivencia/proliferación de alta eficiencia de células madre embrionarias humanas y la supervivencia de embriones humanos en cultivo.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

La invención se define por las reivindicaciones. Aquellos aspectos/ casos de la presente divulgación que constituyen la invención se definen por las reivindicaciones.

RESUMEN DE LA DIVULGACIÓN

Este resumen se proporciona para presentar un resumen de la divulgación para indicar brevemente la naturaleza y sustancia de la divulgación.

En un aspecto, la divulgación proporciona métodos de inhibición de la acción de un transcrito antisentido natural usando oligonucleótido(s) antisentido dirigido(s) a cualquier región del transcrito antisentido natural produciendo la regulación por incremento del gen sentido correspondiente. También se contempla en el presente documento que la inhibición del transcrito antisentido natural puede lograrse por siRNA, ribozimas y moléculas pequeñas, que se consideran que están dentro del alcance de la presente divulgación.

Un aspecto proporciona un método de modulación de la función y/o expresión de un polinucleótido de BDNF en células o tejidos de paciente *in vivo* o *in vitro* que comprende poner en contacto dichas células o tejidos con un oligonucleótido antisentido de 5 a 30 nucleótidos de longitud, donde dicho oligonucleótido tiene al menos un 50 % de identidad de secuencia con un complemento inverso de un polinucleótido que comprende de 5 a 30 nucleótidos consecutivos dentro de los nucleótidos 1 a 3175 de la SEQ ID NO: 2 (Figura 3), modulando así la función y/o expresión del polinucleótido de BDNF en células o tejidos del paciente *in vivo* o *in vitro*.

En otro aspecto preferido, un oligonucleótido se dirige a una secuencia antisentido natural de polinucleótidos de BDNF, por ejemplo, nucleótidos expuestos en la SEQ ID NO: 2, y cualquier variante, alelo, homólogo, mutante, derivado, fragmento y secuencia complementaria a los mismos. Ejemplos de oligonucleótidos antisentido se exponen como SEQ ID NOS: 3 a 8 (Figura 4).

Otro aspecto proporciona un método de modulación de la función y/o expresión de un polinucleótido de BDNF en células o tejidos de paciente *in vivo* o *in vitro* que comprende poner en contacto dichas células o tejidos con un oligonucleótido antisentido de 5 a 30 nucleótidos de longitud, donde dicho oligonucleótido tiene al menos un 50 % de identidad de secuencia con un complemento inverso del antisentido del polinucleótido de BDNF; modulando así la función y/o expresión del polinucleótido de BDNF en células o tejidos del paciente *in vivo* o *in vitro*.

Otro aspecto proporciona un método de modulación de la función y/o expresión de un polinucleótido de BDNF en células o tejidos de paciente *in vivo* o *in vitro* que comprende poner en contacto dichas células o tejidos con un oligonucleótido antisentido de 5 a 30 nucleótidos de longitud, donde dicho oligonucleótido tiene al menos un 50 % de identidad de secuencia con un oligonucleótido antisentido para un polinucleótido de BDNF antisentido; modulando así la función y/o expresión del polinucleótido de BDNF en células o tejidos del paciente *in vivo* o *in vitro*.

En un aspecto preferido, una composición comprende uno o más oligonucleótidos antisentido que se unen a polinucleótidos de BDNF sentido y/o antisentido.

En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos comprenden uno o más nucleótidos modificados o sustituidos.

En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos comprenden uno o más enlaces modificados.

En otro aspecto más, los nucleótidos modificados comprenden bases modificadas que comprenden fosforotioato, metilfosfonato, ácidos nucleicos peptídicos, 2'-O-metilo, fluoro- o carbono, metileno u otras moléculas de ácido nucleico bloqueado (LNA). Preferentemente, los nucleótidos modificados son moléculas bloqueadas de ácidos nucleicos, que incluyen α -L-LNA.

En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos se administran a un paciente subcutáneamente, intramuscularmente, intravenosamente o intraperitonealmente.

En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos se administran en una composición farmacéutica. Una pauta de tratamiento comprende administrar los compuestos antisentido al menos una vez al paciente; sin embargo, este tratamiento puede modificarse para incluir múltiples dosis durante un periodo de tiempo. El tratamiento puede combinarse con uno o varios de otros tipos de terapias.

En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos están encapsulados en un liposoma o unidos a una molécula portadora (por ejemplo, colesterol, péptido TAT).

Otros aspectos se describen más adelante.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1

Figura 1 A: es una gráfica de resultados de PCR en tiempo real que muestra el cambio en veces + desviación estándar en ARNm de BDNF después del tratamiento de células HepG2 con los oligonucleótidos de fosforotioato del gápmero de LNA introducidos usando Lipofectamine 2000, en comparación con el control. Los resultados de PCR en tiempo real muestran que los niveles de ARNm de BDNF en células HepG2 son significativamente elevados 48 h después del tratamiento con dos de los gápmeros de LNA con esqueleto completamente fosfotioatado diseñado para BDNF antisentido NM_170735 (CUR-0071, P=0,04, CUR-0073, P=0,07, CUR-0075, P=0,03). Las barras indicadas como CUR-0071, CUR-0072, CUR-0073, CUR-0074, CUR-0075 y CUR-0076 se corresponden con muestras tratadas con SEQ ID NOS: 6, 7, 8, 3, 4 y 5, respectivamente.

Figura 1 B: es una gráfica de resultados de PCR en tiempo real que muestran el cambio en veces + desviación estándar en ARNm de BDNF después del tratamiento de células HepG2 con oligonucleótidos de fosforotioato introducidos usando Lipofectamine 2000, en comparación con el control. Los resultados de PCR en tiempo real muestran que los niveles de BDNF antisentido fueron significativamente reducidos después del tratamiento con todos los oligos, excepto CUR-0072, lo que es posiblemente debido a que diferentes oligos afectan diferentes variantes de splicing de BDNF y/o BDNF antisentido NM_170735. Las barras indicadas como CUR-0071, CUR-0072, CUR-0073, CUR-0074, CUR-0075 y CUR-0076 se corresponden con muestras tratadas con SEQ ID NOS: 6, 7, 8, 3, 4 y 5, respectivamente.

Figura 1 C: es una gráfica de resultados de PCR en tiempo real que muestran el cambio en veces + desviación estándar en ARNm de BDNF después del tratamiento de células CHP212 con oligonucleótidos de fosforotioato del gápmero de LNA introducidos usando Lipofectamine 2000, en comparación con el control. Los resultados de PCR en tiempo real muestran que los niveles de ARNm de BDNF en células CHP212 son significativamente elevados 48 h después del tratamiento con dos de los gápmeros de LNA con esqueleto completamente fosfotioatado diseñado para BDNF antisentido NM_170735. Las barras indicadas como CUR-0071, CUR-0072, y CUR-0076 se corresponden con muestras tratadas con SEQ ID NOS: 6, 7, y 3, respectivamente.

La Figura 2 muestra SEQ ID NO: 1: factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) de Homo sapiens, variante 1 de transcrito, ARNm. (Nº de acceso de NCBI: NM_170735) y la SEQ ID NO: 11 muestra la secuencia genómica de BDNF (se muestran los exones en letras mayúsculas, los intrones en minúscula).

La Figura 3 muestra SEQ ID NO: 2: secuencia antisentido de BDNF natural (NR_002832.1), hebra opuesta de BDNF de Homo sapiens (que no codifica proteína) (BDNFOS), ARN no codificante.

La Figura 4 muestra los oligonucleótidos antisentido, SEQ ID NOS: 3 a 8. * indica enlace fosfotioato y + indica modificación de LNA.

La Figura 5 muestra SEQ ID NOS: 9 y 10.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA DIVULGACIÓN

Varios aspectos de la divulgación se describen a continuación con referencia a aplicaciones de ejemplos para ilustración. Debe entenderse que los numerosos detalles, relaciones y métodos específicos se exponen para proporcionar un entendimiento completo de la divulgación. Un experto en la materia relevante, sin embargo, reconocerá fácilmente que la divulgación puede ponerse en práctica sin uno o más de los detalles específicos o con otros métodos. La presente divulgación no está limitada por el orden de actos o acontecimientos, ya que algunos actos pueden producirse en diferentes órdenes y/o simultáneamente con otros actos o acontecimientos. Además, no todos los actos o acontecimientos ilustrados son requeridos para implementar una metodología según la presente divulgación.

Todos los genes, nombres de genes y productos génicos descritos en el presente documento pretenden corresponderse con homólogos de cualquier especie para las que son aplicables las composiciones y métodos descritos en el presente documento. Así, los términos incluyen, pero no se limitan a, genes y productos génicos de seres humanos y ratones. Se entiende que cuando se describe un gen o producto génico de una especie particular, la presente divulgación pretende ser a modo de ejemplo solo, y no debe interpretarse como una limitación, a menos que el contexto en el que aparece lo indique claramente. Así, por ejemplo, los genes descritos en el presente documento, que en algunos casos se refieren a secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos de mamífero, pretenden englobar genes homólogos y/u ortólogos y productos génicos de otros animales que incluyen, pero no se limitan a, otros mamíferos, peces, anfibios, reptiles y aves. En aspectos preferidos, los genes o secuencias de ácidos nucleicos son humanos.

Definiciones

La terminología usada en el presente documento es con el fin de describir aspectos particulares solo y no pretende ser limitante de la divulgación. Como se usa en el presente documento, las formas en singular “un”, “una”, “el” y “la” pretenden incluir las formas plurales también, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Además, siempre que los términos “que incluye”, “incluye”, “que tiene”, “tiene”, “con”, o variantes de los mismos, se usen en la descripción detallada y/o las reivindicaciones, tales términos pretenden ser incluyentes de un modo similar al término “que comprende”.

10 El término “aproximadamente” significa dentro de un intervalo de error aceptable para el valor particular como se ha determinado por un experto habitual en la materia, lo que dependerá en parte de cómo se mide o determina el valor, es decir, de las limitaciones del sistema de medición. Por ejemplo, “aproximadamente” puede significar dentro de 1 o más de 1 desviación estándar, por la práctica en la materia. Alternativamente, “aproximadamente” puede significar un intervalo de hasta el 20 %, preferentemente hasta el 10 %, más preferentemente hasta el 5 %, y aún más preferentemente hasta el 1 % de un valor dado. Alternativamente, particularmente con respecto a sistemas o procesos biológicos, el término puede significar dentro de un orden de magnitud, preferentemente dentro de 5 veces, y más preferentemente dentro de 2 veces, de un valor. Si se describen valores particulares en la solicitud y reivindicaciones, a menos que se establezca de otro modo, debe asumirse que el término “aproximadamente” significa dentro de un intervalo de error aceptable para el valor particular.

20 Como se usa en el presente documento, el término “ARNm” significa (el) los transcrito(s) de ARNm actualmente conocidos de un gen elegido como diana, y cualquier transcrito adicional que pueda ser dilucidado.

25 Por “oligonucleótidos antisentido” o “compuesto antisentido” se entiende una molécula de ARN o de ADN que se une a otro ARN o ADN (ARN, ADN diana). Por ejemplo, si es un oligonucleótido de ARN se une a otra diana de ARN por medio de interacciones ARN-ARN y altera la actividad del ARN diana (Eguchi et al., (1991) Ann. Rev. Biochem. 60, 631-652). Un oligonucleótido antisentido puede regular por incremento o regular por disminución la expresión y/o función de un polinucleótido particular. La definición pretende incluir cualquier molécula de ARN o ADN foráneo que es útil desde un punto de vista terapéutico, diagnóstico, u otro punto de vista. Tales moléculas incluyen, por ejemplo, 30 moléculas de ARN o ADN antisentido, ARN de interferencia (iARN), microARN, moléculas de ARN señuelo, siRNA, ARN enzimático, ARN de edición terapéutica y ARN agonista y antagonista, compuestos oligoméricos antisentido, oligonucleótidos antisentido, oligonucleótidos de secuencia de guía externa (EGS), agentes de splicing alternativos, cebadores, sondas, y otros compuestos oligoméricos que hibridan con al menos una porción del ácido nucleico diana. Como tales, estos compuestos pueden introducirse en forma de compuestos oligoméricos monocatenarios, 35 bicatenarios, parcialmente monocatenarios, o circulares.

En el contexto de la presente divulgación, el término “oligonucleótido” se refiere a un oligómero o polímero de ácido ribonucleico (ARN) o ácido desoxirribonucleico (ADN) o miméticos de los mismos. El término “oligonucleótido” también incluye oligómeros lineales o circulares de monómeros o enlaces naturales y/o modificados, que incluyen 40 desoxirribonucleósidos, ribonucleósidos, formas sustituidas y alfa-anómeras de los mismos, ácidos nucleicos peptídicos (PNA), ácidos nucleicos bloqueados (LNA), fosforotioato, metilfosfonato y similares. Los oligonucleótidos son capaces de unirse específicamente a un polinucleótido diana a modo de un patrón regular de interacciones monómero a monómero, tales como tipo Watson-Crick de apareamiento de bases, tipos Hoögsteeen o Hoögsteeen inversa de apareamiento de bases, o similares.

45 El oligonucleótido puede ser “quimérico”, es decir, estar compuesto de diferentes regiones. En el contexto de la presente divulgación, los compuestos “quiméricos” son oligonucleótidos que contienen dos o más regiones químicas, por ejemplo, región (regiones) de ADN, región (regiones) de ARN, región (regiones) de PNA, etc. Cada región química está constituida de al menos una unidad de monómero, es decir, un nucleótido en el caso de un compuesto 50 de oligonucleótidos. Estos oligonucleótidos normalmente comprenden al menos una región en la que el oligonucleótido se modifica con el fin de presentar una o más propiedades deseadas. Las propiedades deseadas del oligonucleótido incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, elevada resistencia a la degradación por nucleasas, elevada captación celular y/o elevada afinidad de unión por el ácido nucleico diana. Las diferentes regiones del oligonucleótido pueden, por tanto, tener diferentes propiedades. Los oligonucleótidos quiméricos de la presente 55 divulgación pueden formarse como estructuras mixtas de dos o más oligonucleótidos, oligonucleótidos modificados, oligonucleósidos y/o análogos de oligonucleótidos, como se ha descrito anteriormente.

El oligonucleótido puede estar compuesto de regiones que pueden enlazarse en “registro”, es decir, cuando los monómeros se enlazan consecutivamente, como en ADN nativo, o se enlazan mediante espaciadores. Los

espaciadores pretenden constituir un “puente” covalente entre las regiones y tienen en aspectos preferidos una longitud que no supera aproximadamente 100 átomos de carbono. Los espaciadores pueden llevar diferentes funcionalidades, por ejemplo, tener carga positiva o negativa, llevar propiedades de unión a ácido nucleico especiales (intercaladores, ligantes de surcos, toxinas, fluoróforos, etc.), ser lipófilos, inducir estructuras secundarias especiales como, por ejemplo, péptidos que contienen alanina que inducen hélices alfa.

Como se usa en el presente documento, “BDNF” y “factor neurotrófico derivado de cerebro” incluyen todos los miembros de la familia, mutantes, alelos, fragmentos, especies, secuencias codificantes y no codificantes, hebras de polinucleótidos sentido y antisentido, etc.

10

Como se usa en el presente documento, la expresión ‘factor neurotrófico derivado del cerebro’ y BDNF se usan indistintamente en la presente solicitud.

Como se usa en el presente documento, el término “oligonucleótido específico para” u “oligonucleótido que se dirige a” se refiere a un oligonucleótido que tiene una secuencia (i) capaz de formar un complejo estable con una porción del gen elegido como diana, o (ii) capaz de formar un dúplex estable con una porción de un transcrito de ARNm del gen elegido como diana. La estabilidad de los complejos y dúplex puede determinarse por cálculos teóricos y/o ensayos *in vitro*. Ensayos a modo de ejemplo para determinar la estabilidad de complejos y dúplex de hibridación se describen en los ejemplos más adelante.

20

Como se usa en el presente documento, el término “ácido nucleico diana” engloba ADN, ARN (que comprende preARNm y ARNm) transcrito a partir de tal ADN, y también ADNc derivado de tal ARN, secuencias codificantes, no codificantes, polinucleótidos sentido o antisentido. La hibridación específica de un compuesto oligomérico con su ácido nucleico diana interfiere con la función normal del ácido nucleico. Esta modulación de la función de un ácido nucleico diana por compuestos que hibridan específicamente con él, se denomina generalmente “antisentido”. Las funciones de ADN que van a interferirse incluyen, por ejemplo, la replicación y transcripción. Las funciones de ARN que van a interferirse incluyen todas las funciones vitales tales como, por ejemplo, translocalización del ARN al sitio de traducción de proteína, traducción de proteína desde ARN, splicing del ARN para dar una o más especies de ARNm, y actividad catalítica que puede acoplarse en o facilitarse por el ARN. El efecto global de tal interferencia con la función del ácido nucleico diana es la modulación de la expresión de un producto codificado u oligonucleótidos.

La interferencia de ARN “iARN” está mediada por moléculas de ARN bicatenario (dsARN) que tienen homología específica de secuencia para sus secuencias de ácidos nucleicos “diana” (Caplen, N. J., et al. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:9742-9747). En ciertos aspectos de la presente divulgación, los mediadores son dúplex de ARN “interferente pequeño” (siRNA) de 5-25 nucleótidos. Los siRNA se derivan del procesamiento de dsARN por una enzima RNasa conocida como Dicer (Bernstein E., et al. (2001) Nature 409:363-366). Los productos de dúplex de siRNA son reclutados en un complejo de ARNip de multi-proteína llamado RISC (complejo de silenciamiento inducido por ARN). Sin desear ceñirse a ninguna teoría particular, se cree entonces que un RISC es guiado a un ácido nucleico diana (adecuadamente ARNm), en el que el dúplex de siRNA interacciona en una forma específica de secuencia para mediar en la escisión en un modo catalítico (Bernstein, E., et al. (2001) Nature 409:363-366; Boutla, A., et al. (2001) Curr. Biol. 11:1776-1780). Los ARN interferentes pequeños que pueden usarse según la presente divulgación pueden sintetizarse y usarse según procedimientos que son muy conocidos en la técnica y que serán familiares para el experto en la materia. Los ARN interferentes pequeños para su uso en los métodos de la presente divulgación comprenden adecuadamente entre aproximadamente 1 y aproximadamente 50 nucleótidos (nt). En los ejemplos de aspectos no limitantes, los siRNA pueden comprender aproximadamente de 5 a aproximadamente 40 nt, aproximadamente de 5 a aproximadamente 30 nt, aproximadamente de 10 a aproximadamente 30 nt, aproximadamente de 15 a aproximadamente 25 nt, o aproximadamente 20-25 nucleótidos.

La selección de oligonucleótidos apropiados se facilita usando programas informáticos que alinean automáticamente secuencias de ácidos nucleicos e indican regiones de identidad u homología. Tales programas se usan para comparar secuencias de ácidos nucleicos obtenidas, por ejemplo, buscando en bases de datos tales como GenBank o secuenciando productos de PCR. La comparación de secuencias de ácidos nucleicos de un intervalo de especies permite la selección de secuencias de ácidos nucleicos que muestran un grado de identidad apropiado entre especies. En el caso de genes que no se han secuenciado, se realizan Southern blots para permitir una determinación del grado de identidad entre genes en especies diana y otras especies. Realizando Southern blots a grados de astringencia variables, como es muy conocido en la técnica, es posible obtener una medida aproximada de la identidad. Estos procedimientos permiten la selección de oligonucleótidos que presentan un alto grado de complementariedad con secuencias de ácidos nucleicos diana en un sujeto que va a controlarse y un menor grado de complementariedad con secuencias de ácidos nucleicos correspondientes en otras especies. Un experto en la

materia se dará cuenta de que hay libertad considerable en la selección de regiones apropiadas de genes para su uso en la presente divulgación.

Por "ARN enzimático" se entiende una molécula de ARN con actividad enzimática (Cech, (1988) J. American. Med. Assoc. 260, 3030-3035). Los ácidos nucleicos enzimáticos (ribozimas) actúan uniéndose primero a un ARN diana. Tal unión se produce mediante la porción de unión diana de un ácido nucleico enzimático que se mantiene en estrecha proximidad a una porción enzimática de la molécula que actúa para escindir el ARN diana. Así, el ácido nucleico enzimático reconoce primero y luego se une a ARN diana mediante apareamiento de bases, y una vez unido al sitio correcto, actúa enzimáticamente para cortar el ARN diana.

Por "ARN señuelo" se entiende una molécula de ARN que imita el dominio de unión natural para un ligando. El ARN señuelo compete, por tanto, con la diana de unión natural para la unión de un ligando específico. Por ejemplo, se ha mostrado que la sobreexpresión del ARN de respuesta de activación en trans del VIH (TAR) puede actuar de "señuelo" y se une eficazmente a la proteína tat del VIH, previniendo así que se una a secuencias de TAR codificadas en el ARN del VIH (Sullenger et al. (1990) Cell, 63, 601- 608). Esto se entiende que es un ejemplo específico. Aquellos en la materia reconocerán que esto es solo un ejemplo, y fácilmente pueden generarse otros aspectos usando técnicas generalmente conocidas en la técnica.

Como se usa en el presente documento, el término "monómeros" normalmente indica monómeros enlazados por enlaces fosfodiéster o análogos de los mismos para formar oligonucleótidos que oscilan en tamaño de algunas unidades monoméricas, por ejemplo, de aproximadamente 3-4, a aproximadamente varios cientos de unidades monoméricas. Los análogos de enlaces fosfodiéster incluyen: fosforotioato, fosforoditioato, metilfosfonatos, fosforoselenoato, fosforamidoato y similares, como se describe más completamente más adelante.

El término "nucleótido" cubre nucleótidos que existen de forma natural, además de nucleótidos que no existen de forma natural. Debe ser evidente para el experto en la materia que los diversos nucleótidos que se ha considerado previamente "que no existen de forma natural" se han encontrado posteriormente en la naturaleza. Así, "nucleótidos" incluye no solo las moléculas que contienen heterociclos de purina y pirimidina conocidas, sino también análogos y tautómeros heterocíclicos de las mismas. Ejemplos ilustrativos de otros tipos de nucleótidos son moléculas que contienen adenina, guanina, timina, citosina, uracilo, purina, xantina, diaminopurina, 8-oxo-N6-metiladenina, 7-deazaxantina, 7-deazaguanina, N4,N4-etanocitosina, N6,N6-etano-2,6-diaminopurina, 5-metilcitosina, 5-alquilil (C3-C6)-citosina, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, pseudosicitosina, 2-hidroxi-5-metil-4-triazolopiridina, isocitosina, isoguanina, inosina y los nucleótidos "que no existen de forma natural" descritos en Benner et al., patente de EE.UU. N° 5.432.272. El término "nucleótido" pretende cubrir todos y cada uno de estos ejemplos, además de análogos y tautómeros de los mismos. Nucleótidos especialmente interesantes son aquellos que contienen adenina, guanina, timina, citosina y uracilo, que se consideran como los nucleótidos que existen de forma natural en relación con la aplicación terapéutica y diagnóstica en seres humanos. Los nucleótidos incluyen los azúcares naturales 2'-desoxi y 2'-hidroxilo, por ejemplo, como se describe en Kornberg y Baker, DNA Replication, 2nd Ed. (Freeman, San Francisco, 1992), además de sus análogos.

"Análogos", en referencia a nucleótidos, incluye nucleótidos sintéticos que tienen restos de bases modificados y/o restos de azúcar modificados (véase, por ejemplo, descrito generalmente por Scheit, Nucleotide Analogs, John Wiley, New York, 1980; Freier & Altmann, (1997) Nucl. Acid. Res., 25(22), 4429-4443, Toulmé, J.J., (2001) Nature Biotechnology 19:17-18; Manoharan M., (1999) Biochemica et Biophysica Acta 1489:117-139; Freier S. M., (1997) Nucleic Acid Research, 25:4429-4443, Uhlman, E., (2000) Drug Discovery & Development, 3: 203-213, Herdewin P., (2000) Antisense & Nucleic Acid Drug Dev., 10:297-310); [3.2.0]bicicloarabinonucleósidos enlazados en 2'-O, 3'-C (véase, por ejemplo, N.K Christensen., et al, (1998) J. Am. Chem. Soc., 120: 5458-5463; Prakash TP, Bhat B. (2007) Curr Top Med Chem. 7(7):641-9; Cho EJ, et al. (2009) Annual Review of Analytical Chemistry, 2, 241-264). Tales análogos incluyen nucleótidos sintéticos diseñados para potenciar propiedades de unión, por ejemplo, la estabilidad del dúplex o tríplex, especificidad, o similares.

Como se usa en el presente documento, "hibridación" significa el apareamiento de hebras sustancialmente complementarias de compuestos oligoméricos. Un mecanismo de apareamiento implica el enlace de hidrógeno, que puede ser enlace de hidrógeno de Watson-Crick, Hoogsteen o de Hoogsteen inverso, entre bases de nucleósidos o de nucleótidos (nucleótidos) complementarias de las hebras de compuestos oligoméricos. Por ejemplo, la adenina y la timina son nucleótidos complementarios que aparean mediante la formación de enlaces de hidrógeno. La hibridación puede producirse bajo circunstancias variables.

Un compuesto antisentido es "específicamente hibridable" cuando la unión del compuesto al ácido nucleico diana

interfiere con la función normal del ácido nucleico diana para producir una modulación de la función y/o actividad, y hay un grado suficiente de complementariedad para evitar la unión no específica del compuesto antisentido a secuencias de ácidos nucleicos no diana en condiciones en las que se desea la unión específica, es decir, bajo condiciones fisiológicas en el caso de ensayos *in vivo* o tratamiento terapéutico, y en condiciones en las que se realizan los ensayos en el caso de ensayos *in vitro*.

Como se usa en el presente documento, la expresión “condiciones de hibridación astringentes” o “condiciones astringentes” se refiere a condiciones bajo las que un compuesto de la divulgación hibridará con su secuencia diana, pero con un número mínimo de otras secuencias. Las condiciones astringentes son dependientes de la secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias y en el contexto de la presente divulgación, las “condiciones astringentes” bajo las que hibridan los compuestos oligoméricos con una secuencia diana se determinan por la naturaleza y composición de los compuestos oligoméricos y los ensayos en los que están siendo investigados. En general, las condiciones de hibridación astringentes comprenden bajas concentraciones (<0,15 M) de sales con cationes inorgánicas tales como Na⁺⁺ o K⁺⁺ (es decir, baja fuerza iónica), temperatura superior a 20 °C - 25 °C por debajo de la T_m del complejo de compuesto oligomérico:secuencia diana, y la presencia de desnaturalizantes tales como formamida, dimetilformamida, sulfóxido de dimetilo, o el detergente dodecilsulfato de sodio (SDS). Por ejemplo, la velocidad de hibridación disminuye el 1,1 % por cada 1 % de formamida. Un ejemplo de una condición de hibridación de alta astringencia es 0,1X tampón cloruro sódico-citrato sódico (SSC)/0,1 % (peso/volumen) de SDS a 60 °C durante 30 minutos.

“Complementario”, como se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad de apareamiento preciso entre dos nucleótidos en una o dos hebras oligoméricas. Por ejemplo, si una nucleobase en una cierta posición de un compuesto antisentido es capaz de formar enlace de hidrógeno con una nucleobase en una cierta posición de un ácido nucleico diana, siendo dicho ácido nucleico diana un ADN, ARN, o molécula de oligonucleótido, entonces la posición de enlace del hidrógeno entre el oligonucleótido y el ácido nucleico diana se considera que es una posición complementaria. El compuesto oligomérico y el ADN, ARN, o molécula de oligonucleótido adicional son complementarios entre sí cuando un número suficiente de posiciones complementarias en cada molécula están ocupadas por nucleótidos que pueden formar enlace de hidrógeno entre ellos. Así, “específicamente hibridable” y “complementario” son términos que se usan para indicar un grado suficiente de apareamiento preciso o complementariedad durante un número suficiente de nucleótidos de forma que se produzca la unión estable específica entre el compuesto oligomérico y un ácido nucleico diana.

Se entiende en la materia que la secuencia de un compuesto oligomérico no necesita ser 100 % complementaria a la de su ácido nucleico diana para ser específicamente hibridable. Además, un oligonucleótido puede hibridarse sobre uno o más segmentos de forma que segmentos intermedios o adyacentes no participen en el acontecimiento de hibridación (por ejemplo, una estructura de bucle, desapareamiento o estructura de horquilla). Los compuestos oligoméricos de la presente divulgación comprenden al menos aproximadamente el 70 %, o al menos aproximadamente el 75 %, o al menos aproximadamente el 80 %, o al menos aproximadamente el 85 %, o al menos aproximadamente el 90 %, o al menos aproximadamente el 95 %, o al menos aproximadamente el 99 %, de complementariedad de secuencia con una región diana dentro de la secuencia de ácidos nucleicos diana a la que se dirigen. Por ejemplo, un compuesto antisentido en el que 18 de los 20 nucleótidos del compuesto antisentido son complementarios a una región diana, y, por tanto, hibridarían específicamente, representaría el 90 por ciento de complementariedad. En este ejemplo, los nucleótidos no complementarios restantes pueden agruparse o intercalarse con nucleótidos complementarios y no necesitan ser contiguos entre sí o a nucleótidos complementarios. Como tal, un compuesto antisentido que tiene 18 nucleótidos de longitud que tiene 4 (cuatro) nucleótidos no complementarios que están flanqueados por dos regiones de complementariedad completa con el ácido nucleico diana tendría el 77,8 % de complementariedad global con el ácido nucleico diana y así entraría dentro del alcance de la presente divulgación. El porcentaje de complementariedad de un compuesto antisentido con una región de un ácido nucleico diana puede determinarse rutinariamente usando programas BLAST (herramientas de búsqueda de alineamientos locales básicos) y programas PowerBLAST conocidos en la técnica (Altschul et al., (1990) J. Mol. Biol., 215, 403-410; Zhang y Madden, (1997) Genome Res., 7, 649-656). La homología en porcentaje, identidad de secuencias o complementariedad pueden determinarse por, por ejemplo, el programa Gap (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison Wis.), usando parámetros por defecto, que usa el algoritmo de Smith y Waterman (Adv. Appl. Math., (1981) 2, 482-489).

Como se usa en el presente documento, el término “punto de fusión térmico (T_m)” se refiere a la temperatura, bajo fuerza iónica definida, pH y concentración de ácido nucleico, a la que el 50 % de los oligonucleótidos complementarios a la secuencia diana hibridan con la secuencia diana en equilibrio. Normalmente, condiciones

astringentes serán aquellas en las que la concentración de sales es la concentración de ion Na (u otras sales) de al menos aproximadamente 0,01 a 1,0 M a pH de 7,0 a 8,3 y la temperatura es al menos aproximadamente 30 °C para oligonucleótidos cortos (por ejemplo, de 10 a 50 nucleótidos). También pueden lograrse condiciones astringentes con la adición de agentes desestabilizantes tales como formamida.

5

Como se usa en el presente documento, “modulación” significa tanto un aumento (estimulación) como una disminución (inhibición) en la expresión de un gen.

El término “variante”, cuando se usa en el contexto de una secuencia de polinucleótidos, puede englobar una secuencia de polinucleótidos relacionada con un gen no mutante. Esta definición también puede incluir, por ejemplo, variantes “alélicas”, de “splicing”, de “especie” o “polimórficas”. Una variante de splicing puede tener identidad significativa con una molécula de referencia, pero generalmente tendrá un mayor o menor número de polinucleótidos debido al splicing alternativo de exones durante el procesamiento de ARNm. El polipéptido correspondiente puede poseer dominios funcionales adicionales o una ausencia de dominios. Las variantes de especie son secuencias de polinucleótidos que varían de una especie a otra. Son de particular utilidad en la divulgación variantes de productos génicos no mutantes (wild type). Las variantes pueden resultar de al menos una mutación en la secuencia de ácidos nucleicos y pueden producir ARNm alterados o polipéptidos cuya estructura o función puede o puede no alterarse. Cualquier gen natural o recombinante dado puede tener ninguna, una o muchas formas alélicas. Cambios mutacionales comunes que dan lugar a variantes se atribuyen generalmente a delecciones, adiciones o sustituciones naturales de nucleótidos. Cada uno de estos tipos de cambios puede producirse solo, o en combinación con los otros, una o más veces en una secuencia dada.

Los polipéptidos resultantes generalmente tendrán identidad significativa de aminoácidos los unos con respecto a los otros. Una variante polimórfica es una variación en la secuencia de polinucleótidos de un gen particular entre individuos de una especie dada. Las variantes polimórficas también pueden englobar “polimorfismos de un solo nucleótido” (SNP), o mutaciones de una sola base en las que la secuencia de polinucleótidos varía una base. La presencia de SNP puede ser indicativa de, por ejemplo, una cierta población con una propensión por un estado de enfermedad, que es susceptibilidad frente a resistencia.

Los polinucleótidos derivados incluyen ácidos nucleicos sometidos a modificación química, por ejemplo, sustitución de hidrógeno por un grupo alquilo, acilo o amino. Los derivados, por ejemplo, oligonucleótidos derivados, pueden comprender porciones que no existen de forma natural, tales como restos de azúcar alterados o enlaces inter-azúcar. A modo de ejemplo, entre éstos están fosforotioato y otras especies que contienen azufre que se conocen en la técnica. Los ácidos nucleicos derivados también pueden contener etiquetas, que incluyen radionucleótidos, enzimas, agentes fluorescentes, agentes quimioluminiscentes, agentes cromogénicos, sustratos, cofactores, inhibidores, partículas magnéticas y similares.

Un polipéptido o péptido “derivado” es uno que se modifica, por ejemplo, por glicosilación, pegilación, fosforilación, sulfatación, reducción/alquilación, acilación, acoplamiento químico o tratamiento suave con formalina. Un derivado también puede modificarse para contener una etiqueta detectable, tanto directa como indirectamente, que incluye, pero no se limita a, un radioisótopo, etiqueta fluorescente y enzimática.

Como se usa en el presente documento, el término “animal” o “paciente” pretende incluir, por ejemplo, seres humanos, ovejas, alces, venados, ciervos mulos, visones, mamíferos, monos, caballos, ganado vacuno, cerdos, cabras, perros, gatos, ratas, ratones, aves, pollo, reptiles, peces, insectos y arácnidos.

“Mamífero” cubre mamíferos de sangre caliente que normalmente están bajo cuidado médico (por ejemplo, seres humanos y animales domesticados). Ejemplos incluyen felinos, caninos, equinos, bovinos y humanos, además de solo humanos.

50

“Tratar” o “tratamiento” cubre el tratamiento de un estado de enfermedad en un mamífero, e incluye: (a) prevenir que se produzca el estado de enfermedad en un mamífero, en particular, cuando tal mamífero tiene predisposición al estado de enfermedad, pero todavía no se ha diagnosticado que la tenga; (b) inhibir el estado de enfermedad, por ejemplo, detener el desarrollo; y/o (c) aliviar el estado de enfermedad, por ejemplo, causando la regresión del estado de enfermedad hasta que se alcance un punto final deseado. Tratar también incluye la mejora de un síntoma de una enfermedad (por ejemplo, reducir el dolor o molestia), en el que tal mejora puede o puede no afectar directamente la enfermedad (por ejemplo, causa, transmisión, expresión, etc.).

Como se usa en el presente documento, el término “cáncer” se refiere a cualquier tumor maligno, particularmente

que surge en el pulmón, riñón o tiroides. El propio cáncer se manifiesta como un “tumor” o tejido que comprende células malignas del cáncer. Ejemplos de tumores incluyen sarcomas y carcinomas tales como, pero no se limitan a: fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomioma, rhabdomioma, carcinoma de colon, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de las glándulas sudoríparas, carcinoma de las glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de las vías biliares, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, cáncer de cuello uterino, tumor testicular, carcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón de células pequeñas, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma y retinoblastoma. Como se observa anteriormente, la divulgación permite específicamente el diagnóstico diferencial de tumores de pulmón, riñón y tiroides.

Composiciones y moléculas de polinucleótido y oligonucleótido

Dianas: En un aspecto, las dianas comprenden secuencias de ácidos nucleicos de factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), que incluyen sin limitación secuencias no codificantes y/o codificantes sentido y/o antisentido asociadas a BDNF.

Las neurotrofinas son una clase de factores de crecimiento estructuralmente relacionados que promueven la supervivencia y diferenciación neural. Estimulan el crecimiento hacia afuera de neuritas, sugiriendo que pueden promover la regeneración de neuronas lesionadas, y actúan de factores neurotróficos derivados de diana para estimular la germinación colateral en tejidos diana que producen la neurotrofina (Korsching., (1993) J. Neurosci., 13: 2739). El factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) se caracterizó inicialmente como una proteína básica presente en extractos de cerebro y capaz de aumentar la supervivencia de ganglios de la raíz dorsal (Leibrock., et al., (1989) Nature, 341:149). Cuando la comunicación axonal con el cuerpo de la célula se interrumpe por lesión, las células de Schwann producen factores neurotróficos tales como factor de crecimiento nervioso (NGF) y BDNF. Las neurotrofinas son liberadas de las células de Schwann y se dispersan de forma difusa en modo de gradiente alrededor de los axones en regeneración, que entonces se extienden distalmente a lo largo del gradiente de densidad de neurotrofinas (Ide., (1996) Neurosci. Res., 25:101). Se ha mostrado que la aplicación local de BDNF a nervios cortados transversalmente en ratas neonatales previene la muerte masiva de neuronas motoras que sigue a axotomía (DiStefano., et al., (1992) Neuron, 8:983; Oppenheim., et al., (1992) Nature, 360:755; Yan., et al., (1992) Nature, 360:753). El título de ARNm de BDNF aumenta a varias veces el nivel normal cuatro días después de la axotomía y alcanza su máximo a las 4 semanas (Meyer., et al., (1992) J. Cell Biol. 119:45). Además, se ha descrito que BDNF potencia la supervivencia de neuronas colinérgicas en cultivo (Nonomura, et al., (1995) Cerebro Res. 683:129).

Enfermedades y trastornos mediados por el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) a modo de ejemplo que pueden tratarse con células/tejidos regenerados de células madre obtenidos usando los compuestos antisentido comprenden: una enfermedad o un trastorno asociado a neurogénesis defectuosa; una enfermedad o trastorno neurodegenerativo (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, etc.); un trastorno neuropsiquiátrico (depresión, esquizofrenia, trastorno esquizofreniforme, trastorno esquizoafectivo y trastorno delirante; trastornos de ansiedad tales como trastorno de pánico, fobias (incluyendo agorafobia), un trastorno obsesivo-compulsivo, un trastorno por estrés postraumático, un trastorno bipolar, anorexia nerviosa, bulimia nerviosa, un trastorno autoinmunitario (por ejemplo, esclerosis múltiple) del sistema nervioso central, pérdida de memoria, un trastorno de la memoria a largo plazo o a corto plazo, falta de memoria benigna, un trastorno del aprendizaje en la infancia, lesión cerrada de la cabeza, un trastorno de déficit de atención, reacción neuronal a infección viral, daño cerebral, narcolepsia, un trastorno del sueño (por ejemplo, trastornos de los ritmos circadianos, insomnio y narcolepsia); rotura de nervios o daño nervioso, rotura del tronco nervioso cerebroespinal (CNS) y un daño al cerebro o células nerviosas, un déficit neurológico asociado al SIDA, un trastorno motor y de tics caracterizado por tics motores y/o vocales (por ejemplo, trastorno de Tourette, trastorno motor o de tics vocales crónico, trastorno de tics transitorio y trastorno de movimientos estereotípicos), un trastorno por abuso de sustancias (por ejemplo, dependencia de sustancias, abuso de sustancias y las secuelas del abuso/dependencia de sustancias, tales como trastorno psicológico inducido por sustancias, abstinencia de sustancias y demencia inducida por sustancias o trastorno amnésico), lesión cerebral traumática, acúfenos, neuralgia (por ejemplo, neuralgia del trigémino), dolor (por ejemplo, dolor crónico, dolor inflamatorio crónico, dolor asociado a artritis, fibromialgia, dolor de espalda, dolor asociado al cáncer, dolor asociado a enfermedad digestiva,

dolor asociado a enfermedad de Crohn, dolor asociado a enfermedad autoinmunitaria, dolor asociado a enfermedad endocrina, dolor asociado a neuropatía diabética, dolor del miembro fantasma, dolor espontáneo, dolor crónico postquirúrgico, dolor crónico temporomandibular, causalgia, neuralgia post-herpética, dolor relacionado con el SIDA, síndromes de dolor regional complejo tipo I y II, neuralgia del trigémino, dolor de espalda crónico, dolor asociado a lesión de la médula espinal, dolor asociado a la ingesta de fármacos y dolor agudo recurrente, dolor neuropático), actividad neuronal inapropiada que produce neurodistesias en una enfermedad tal como diabetes, una EM y una enfermedad de las neuronas motoras, ataxias, rigidez muscular (espasticidad), disfunción de la articulación temporomandibular, síndrome de deficiencia de Reward (RDS), neurotoxicidad producida por alcohol o abuso de sustancias (por ejemplo, ecstasia, metanfetamina etc.), retraso mental o deterioro cognitivo (por ejemplo, retraso mental no sindrómico ligado a X, síndrome del X frágil, síndrome de Down, autismo), afasia, parálisis de Bell, enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, encefalitis, degeneración macular senil, síndrome de Ondina, síndrome de WAGR, sordera parcial, síndrome de Rett, epilepsia, lesión de la médula espinal, accidente cerebrovascular, hipoxia, isquemia, lesión cerebral, lesión del nervio óptico, neuropatía diabética, neuropatía periférica, complicaciones del trasplante de nervios, enfermedad de las neuronas motoras, lesión nerviosa periférica, obesidad, un síndrome metabólico, cáncer, asma, una enfermedad atópica, una inflamación alérgica, eccema, una enfermedad o trastorno neuro-oncológico, enfermedad o trastorno neuro-inmunológico y enfermedad o trastorno neuro-otológico; y una enfermedad o trastorno asociado al envejecimiento y senescencia.

En un aspecto preferido, los oligonucleótidos son específicos para polinucleótidos de BDNF, que incluyen, sin limitación regiones no codificantes. Las dianas de BDNF comprenden variantes de BDNF o BDNFOS; mutantes de BDNF o BDNFOS, que incluyen SNP; secuencias no codificantes de BDNF; alelos, fragmentos y similares. Preferentemente, el oligonucleótido es una molécula de ARN antisentido.

Según aspectos de la divulgación, la molécula de ácido nucleico diana no se limita a polinucleótidos de BDNF solos, sino que se extiende a cualquiera de las isoformas, receptores, homólogos, regiones no codificantes y similares de BDNF.

En otro aspecto preferido, un oligonucleótido se dirige a una secuencia antisentido natural (antisentido natural para las regiones codificantes y no codificantes) de dianas de BDNF, que incluyen, sin limitación, variantes, alelos, homólogos, mutantes, derivados, fragmentos y secuencias complementarias a los mismos. Preferentemente, el oligonucleótido es una molécula de ARN o de ADN antisentido.

En otro aspecto preferido, los compuestos oligoméricos de la presente divulgación también incluyen variantes en las que una base diferente está presente en una o más de las posiciones de nucleótido en el compuesto. Por ejemplo, si el primer nucleótido es una adenina, pueden producirse variantes que contienen timidina, guanósina, citidina u otros nucleótidos naturales o no naturales en esta posición. Esto puede hacerse en cualquiera de las posiciones del compuesto antisentido. Estos compuestos se prueban entonces usando los métodos descritos en el presente documento para determinar su capacidad para inhibir la expresión de un ácido nucleico diana.

En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencias o complementariedad, entre el compuesto antisentido y la diana, es de aproximadamente el 50 % a aproximadamente el 60 %. En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencias o complementariedad es de aproximadamente el 60 % a aproximadamente el 70 %. En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencias o complementariedad es de aproximadamente el 70 % a aproximadamente el 80 %. En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencias o complementariedad es de aproximadamente el 80 % a aproximadamente el 90 %. En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencias o complementariedad es de aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 % o aproximadamente el 100 %.

Un compuesto antisentido es específicamente hibridable cuando la unión del compuesto al ácido nucleico diana interfiere con la función normal del ácido nucleico diana para producir una pérdida de actividad, y hay un grado de complementariedad suficiente para evitar la unión no específica del compuesto antisentido a secuencias de ácidos nucleicos no diana en condiciones en las que se desea la unión específica. Tales condiciones incluyen, es decir, condiciones fisiológicas en el caso de ensayos *in vivo* o tratamiento terapéutico, y condiciones en las que se realizan los ensayos en el caso de ensayos *in vitro*.

Un compuesto antisentido, tanto ADN, ARN, quimérico, sustituido, etc., es específicamente hibridable cuando la unión del compuesto a la molécula de ADN o de ARN diana interfiere con la función normal del ADN o ARN diana para producir una pérdida de utilidad, y hay un grado de complementariedad suficiente para evitar la unión no

específica del compuesto antisentido a secuencias no diana en condiciones en las que se desea la unión específica, es decir, bajo condiciones fisiológicas en el caso de ensayos *in vivo* o tratamiento terapéutico, y en el caso de ensayos *in vitro*, en condiciones en las que se realizan los ensayos.

- 5 En otro aspecto preferido, el direccionamiento de BDNF que incluye, sin limitación, secuencias antisentido que se identifican y se expanden, usando por ejemplo, PCR, hibridación etc., una o más de las secuencias expuestas como SEQ ID NO: 2, y similares, modulan la expresión o función de BDNF. En un aspecto, la expresión o función está regulada por incremento en comparación con un control. En otro aspecto preferido, la expresión o función se regula por disminución en comparación con un control.

10

En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos comprenden secuencias de ácidos nucleicos expuestas como SEQ ID NOS: 3 a 8 que incluye secuencias antisentido que se identifican y se expanden, usando por ejemplo, PCR, hibridación etc. Estos oligonucleótidos pueden comprender uno o más nucleótidos modificados, fragmentos más cortos o más largos, enlaces modificados y similares. Ejemplos de enlaces modificados o enlaces internucleotídicos comprenden fosforotioato, fosforoditioato o similares. En otro aspecto preferido, los nucleótidos comprenden un derivado de fósforo. El derivado de fósforo (o grupo fosfato modificado) que puede unirse al resto de azúcar o de análogo de azúcar en los oligonucleótidos modificados de la presente divulgación puede ser un monofosfato, difosfato, trifosfato, alquifosfato, alcanofosfato, fosforotioato y similares. La preparación de los análogos de fosfato anteriormente indicados, y su incorporación en nucleótidos, nucleótidos modificados y oligonucleótidos, también es en sí conocida y no necesita describirse aquí.

20

La especificidad y sensibilidad de antisentido también se emplea por aquellos expertos en la materia para usos terapéuticos. Se han empleado oligonucleótidos antisentido como entidades terapéuticas en el tratamiento de estados de enfermedad en animales y el hombre. Los oligonucleótidos antisentido se han administrado con seguridad y eficazmente a seres humanos y numerosos ensayos clínicos están actualmente en marcha. Así, se establece que los oligonucleótidos pueden ser modalidades terapéuticas útiles que pueden configurarse para ser útiles en pautas de tratamiento para el tratamiento de células, tejidos y animales, especialmente seres humanos.

25

En aspectos de la presente divulgación, los compuestos antisentido oligoméricos, particularmente oligonucleótidos, se unen a moléculas de ácidos nucleicos diana y modulan la expresión y/o función de moléculas codificadas por un gen diana. Las funciones de ADN que van a interferirse comprenden, por ejemplo, replicación y transcripción. Las funciones de ARN que van a interferirse comprenden todas las funciones vitales tales como, por ejemplo, translocalización del ARN al sitio de traducción de proteína, traducción de proteína desde ARN, splicing del ARN para dar una o más especies de ARNm, y actividad catalítica que puede acoplarse en o facilitarse por el ARN. Las funciones pueden regularse por incremento o inhibirse dependiendo de las funciones deseadas.

30

Los compuestos antisentido incluyen compuestos antisentido oligoméricos, oligonucleótidos antisentido, oligonucleótidos de secuencia de guía externa (EGS), agentes de splicing alternativos, cebadores, sondas, y otros compuestos oligoméricos que hibridan con al menos una porción del ácido nucleico diana. Como tales, estos compuestos pueden introducirse en forma de compuestos oligoméricos monocatenarios, bicatenarios, parcialmente monocatenarios, o circulares.

40

El direccionamiento de un compuesto antisentido a una molécula de ácido nucleico particular, en el contexto de la presente divulgación, puede ser un proceso multietapa. El proceso normalmente empieza con la identificación de un ácido nucleico diana cuya función va a modularse. Este ácido nucleico diana puede ser, por ejemplo, un gen celular (o ARNm transcrito del gen) cuya expresión está asociada a un trastorno o estado de enfermedad particular, o una molécula de ácido nucleico de un agente infeccioso. En la presente divulgación, el ácido nucleico diana codifica el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF).

45

El proceso de direccionamiento normalmente también incluye la determinación de al menos una región diana, segmento, o sitio dentro del ácido nucleico diana para que la interacción antisentido se produzca de forma que resulte el efecto deseado, por ejemplo, la modulación de la expresión. Dentro del contexto de la presente divulgación, el término "región" se define como una porción del ácido nucleico diana que tiene al menos una estructura, función o característica identificable. Dentro de las regiones de ácidos nucleicos diana están segmentos. Los "segmentos" se definen como porciones más pequeñas o sub-porciones de regiones dentro de un ácido nucleico diana. "Sitios", como se usa en la presente divulgación, se define como posiciones dentro de un ácido nucleico diana.

50

En un aspecto preferido, los oligonucleótidos antisentido se unen a las secuencias antisentido naturales del factor

55

neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) y modulan la expresión y/o función del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) (SEQ ID NO: 1). Ejemplos de secuencias antisentido incluyen SEQ ID NOS: 2 a 8.

En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos antisentido se unen a uno o más segmentos de polinucleótidos del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) y modulan la expresión y/o función del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF). Los segmentos comprenden al menos cinco nucleótidos consecutivos de polinucleótidos sentido o antisentido del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF).

En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos antisentido son específicos para secuencias antisentido naturales del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) donde la unión de los oligonucleótidos a las secuencias antisentido naturales del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) modula la expresión y/o función del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF).

En otro aspecto preferido, los compuestos de oligonucleótido comprenden secuencias expuestas como SEQ ID NOS: 3 a 8, secuencias antisentido que se identifican y expanden usando, por ejemplo, PCR, hibridación etc. Estos oligonucleótidos pueden comprender uno o más nucleótidos modificados, fragmentos más cortos o más largos, enlaces modificados y similares. Ejemplos de enlaces modificados o enlaces internucleotídicos comprenden fosforotioato, fosforoditioato o similares. En otro aspecto preferido, los nucleótidos comprenden un derivado de fósforo. El derivado de fósforo (o grupo fosfato modificado) que puede unirse al resto de azúcar o de análogo de azúcar en los oligonucleótidos modificados de la presente divulgación puede ser un monofosfato, difosfato, trifosfato, alquilfosfato, alcanofosfato, fosforotioato y similares. La preparación de los análogos de fosfato anteriormente indicados, y su incorporación en nucleótidos, nucleótidos modificados y oligonucleótidos, también es en sí conocida y no necesita describirse aquí.

Ya que, como se conoce en la técnica, el codón de iniciación de la traducción normalmente es 5'-AUG (en moléculas de ARNm transcrito; 5'-ATG en la molécula de ADN correspondiente), el codón de iniciación de la traducción también se denomina el "codón AUG", el "codón de iniciación" o el "codón de iniciación AUG". Una minoría de genes tiene un codón de iniciación de la traducción que tiene la secuencia de ARN 5'-GUG, 5'-UUG o 5'-CUG; y se ha mostrado que 5'-AUA, 5'-ACG y 5'-CUG funcionan *in vivo*. Así, los términos "codón de iniciación de la traducción" y "codón de iniciación" pueden englobar muchas secuencias de codón, aun cuando el aminoácido iniciador en cada caso normalmente sea metionina (en eucariotas) o formilmetionina (en procariotas). Los genes eucariotas y procariotas pueden tener dos o más codones de iniciación alternativos, uno cualquiera de los cuales puede utilizarse preferencialmente para la iniciación de la traducción en un tipo particular de célula o tejido, o bajo un conjunto particular de condiciones. En el contexto de la divulgación, "codón de iniciación" y "codón de iniciación de la traducción" se refieren al codón o codones que se usan *in vivo* para iniciar la traducción de un ARNm transcrito de un gen que codifica el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), independientemente de la(s) secuencia(s) de tales codones. Un codón de terminación de la traducción (o "codón de terminación") de un gen puede tener una de tres secuencias, es decir, 5'-UAA, 5'-UAG y 5'-UGA (las secuencias de ADN correspondientes son 5'-TAA, 5'-TAG y 5'-TGA, respectivamente).

Los términos "región de codón de iniciación" y "región de codón de iniciación de la traducción" se refieren a una porción de un ARNm tal o gen que engloba de aproximadamente 25 a aproximadamente 50 nucleótidos contiguos en cualquier dirección (es decir, 5' o 3') desde un codón de iniciación de la traducción. Similarmente, los términos "región de codón de terminación" y "región de codón de terminación de la traducción" se refieren a una porción de un ARNm tal o gen que engloba de aproximadamente 25 a aproximadamente 50 nucleótidos contiguos en cualquier dirección (es decir, 5' o 3') desde un codón de terminación de la traducción. Por consiguiente, la "región de codón de iniciación" (o "región de codón de iniciación de la traducción") y la "región de codón de terminación" (o "región de codón de terminación de la traducción") son todas las regiones que pueden ser eficazmente dirigidas como diana con los compuestos antisentido de la presente divulgación.

El marco de lectura abierto (ORF) o "región codificante", que se conoce en la técnica para referirse a la región entre el codón de iniciación de la traducción y el codón de terminación de la traducción, también es una región que puede ser eficazmente elegida como diana. Dentro del contexto de la presente divulgación, una región elegida como diana es la región intragénica que engloba el codón de iniciación o de terminación de la traducción del marco de lectura abierto (ORF) de un gen.

Otra región diana incluye la región no traducida 5' (5'UTR), conocida en la técnica para referirse a la porción de un ARNm en la dirección 5' desde el codón de iniciación de la traducción, y que así incluye nucleótidos entre el sitio 5' cap y el codón de iniciación de la traducción de un ARNm (o nucleótidos correspondientes en el gen). Todavía otra

región diana incluye la región no traducida 3' (3'UTR), conocida en la técnica para referirse a la porción de un ARNm en la dirección 3' desde el codón de terminación de la traducción, y que así incluye nucleótidos entre el codón de terminación de la traducción y el extremo 3' de un ARNm (o nucleótidos correspondientes en el gen). El sitio 5' cap de un ARNm comprende un residuo de guanosina N7-metilado unido al residuo 5'-most del ARNm mediante un enlace trifosfato 5'-5'. La región 5' cap de un ARNm se considera que incluye la propia estructura 5' cap, además de los primeros 50 nucleótidos adyacentes al sitio cap. Otra región diana para la presente divulgación es la región 5' cap.

Aunque algunos ARNm transcritos eucariotas se traducen directamente, muchos contienen una o más regiones, conocidas como "intrones", que se escinden de un transcrito antes de que se traduzca. Las regiones restantes (y, por tanto, traducidas) se conocen como "exones" y se cortan y empalman juntas para formar una secuencia de ARNm continua. En un caso, el direccionamiento de sitios de splicing, es decir, empalmes intrón-exón o empalmes exón-intrón, es particularmente útil en situaciones en las que el splicing aberrante participa en la enfermedad, o en las que una producción en exceso de un producto de splicing particular participa en la enfermedad. Un empalme de fusión aberrante debido a la transposición o delección es otro caso de un sitio diana. Los ARNm transcritos producidos mediante el proceso de splicing de dos (o más) ARNm de diferentes fuentes de genes se conocen como "transcritos de fusión". Los intrones pueden ser eficazmente direccionados usando compuestos antisentido dirigidos a, por ejemplo, ADN o pre-ARNm.

En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos antisentido se unen a regiones codificantes y/o no codificantes de un polinucleótido diana y modulan la expresión y/o función de la molécula diana.

En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos antisentido se unen a polinucleótidos antisentido naturales y modulan la expresión y/o función de la molécula diana.

En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos antisentido se unen a polinucleótidos sentido y modulan la expresión y/o función de la molécula diana.

Pueden producirse transcritos de ARN alternativos a partir de la misma región genómica de ADN. Estos transcritos alternativos son generalmente conocidos como "variantes". Más específicamente, "variantes de pre-ARNm" son transcritos producidos a partir del mismo ADN genómico que se diferencian de otros transcritos producidos a partir del mismo ADN genómico en su posición de inicio o de parada y contienen tanto secuencia intrónica como exónica.

Tras la escisión de una o más regiones de exón o intrón, o porciones de las mismas durante el splicing, las variantes de pre-ARNm producen "variantes de ARNm" más pequeñas. Por consiguiente, las variantes de ARNm son variantes de pre-ARNm procesadas y cada variante de pre-ARNm única siempre debe producir una variante de ARNm única como resultado del splicing. Estas variantes de ARNm también se conocen como "variantes de splicing alternativas". Si no se produce splicing de la variante de pre-ARNm, entonces la variante de pre-ARNm es idéntica a la variante de ARNm.

Las variantes pueden producirse mediante el uso de señales alternativas para la transcripción de inicio o de parada. Los Pre-ARNm y ARNm pueden poseer más de un codón de iniciación o codón de terminación. Las variantes que se originan a partir de un pre-ARNm o ARNm que usan codones de iniciación alternativos se conocen como "variantes de inicio alternativas" de ese pre-ARNm o ARNm. Aquellos transcritos que usan un codón de terminación alternativo se conocen como "variantes de parada alternativas" de ese pre-ARNm o ARNm. Un tipo específico de variante de parada alternativa es la "variante de poliA", en la que los múltiples transcritos producidos resultan de la selección alternativa de una de las "señales de parada de poliA" por la maquinaria de transcripción, produciendo así transcritos que terminan en sitios de poliA únicos. Dentro del contexto de la divulgación, los tipos de variantes descritos en el presente documento también son casos de ácidos nucleicos diana.

Las localizaciones en el ácido nucleico diana con las que los compuestos antisentido hibridan se definen como al menos una porción de 5 nucleótidos de longitud de una región diana a la que se dirige un compuesto antisentido activo.

Aunque las secuencias específicas de ciertos segmentos diana a modo de ejemplo se exponen en el presente documento, un experto en la materia reconocerá que éstas sirven para ilustrar y describir casos particulares dentro del alcance de la presente divulgación. Segmentos diana adicionales son fácilmente identificables por un experto habitual en la materia en vista de la presente divulgación.

Se considera que segmentos diana de 5-100 nucleótidos de longitud que comprenden un estiramiento de al menos cinco (5) nucleótidos consecutivos seleccionados de dentro de los segmentos diana preferidos también son adecuados para el direccionamiento.

- 5 Los segmentos diana pueden incluir secuencias de ADN o ARN que comprenden al menos los 5 nucleótidos consecutivos desde el extremo 5' de uno de los segmentos diana preferidos ilustrativos (siendo los restantes nucleótidos un estiramiento consecutivo del mismo ADN o ARN que empieza inmediatamente aguas arriba del extremo 5' del segmento diana y que continúa hasta que el ADN o ARN contenga aproximadamente 5 a aproximadamente 100 nucleótidos). Segmentos diana similarmente preferidos se representan por secuencias de
- 10 ADN o ARN que comprenden al menos los 5 nucleótidos consecutivos desde el extremo 3' de uno de los segmentos diana preferidos ilustrativos (siendo los restantes nucleótidos un estiramiento consecutivo del mismo ADN o ARN que empieza inmediatamente aguas abajo del extremo 3' del segmento diana y que continúa hasta que el ADN o ARN contenga aproximadamente 5 a aproximadamente 100 nucleótidos). Un experto en la materia armado con los segmentos diana ilustrados en el presente documento será capaz, sin excesiva experimentación, de identificar
- 15 segmentos diana preferidos adicionales.

Una vez se han identificado una o más regiones diana, segmentos o sitios, se eligen compuestos antisentido que son suficientemente complementarios a la diana, es decir, hibridan suficientemente bien y con suficiente especificidad, para dar el efecto deseado.

- 20 En aspectos de la divulgación, los oligonucleótidos se unen a una hebra antisentido de una diana particular. Los oligonucleótidos tienen al menos 5 nucleótidos de longitud y pueden sintetizarse de manera que cada oligonucleótido se dirija a secuencias solapantes de forma que los oligonucleótidos se sinteticen para cubrir la longitud entera del polinucleótido diana. Las dianas también incluyen regiones codificantes, además de no codificantes.

- 25 En un aspecto, se prefiere dirigirse a ácidos nucleicos específicos por oligonucleótidos antisentido. El direccionamiento de un compuesto antisentido a un ácido nucleico particular es un proceso multietapa. El proceso normalmente empieza con la identificación de una secuencia de ácidos nucleicos cuya función va a modularse. Ésta puede ser, por ejemplo, un gen celular (o ARNm transcrito a partir del gen) cuya expresión está asociada a un
- 30 trastorno o estado de enfermedad particular, o un polinucleótido no codificante tal como, por ejemplo, ARN no codificante (ARNnc).

- Los ARN pueden clasificarse en (1) ARN mensajeros (ARNm), que se traducen en proteínas, y (2) ARN no codificantes de proteína (ARNnc). Los ARNnc comprenden microARN, transcritos antisentido y otras unidades
- 35 transcripcionales (TU) que contienen una alta densidad de codones de terminación y que carecen de cualquier amplio "marco de lectura abierto". Muchos ARNnc parecen empezar a partir de sitios de iniciación en regiones no traducidas 3' (3'UTRs) de loci codificante de proteína. Los ARNnc son frecuentemente raros y al menos la mitad de los ARNnc que se han secuenciado por el consorcio FANTOM no parecen estar poliadenilados. La mayoría de los investigadores se han basado por motivos obvios en ARNm poliadenilados que se procesan y se exportan al
- 40 citoplasma. Recientemente, se mostró que el conjunto de ARN nucleares no poliadenilados puede ser muy grande, y que muchos de tales transcritos surgen de las llamadas regiones intergénicas (Cheng, J. et al. (2005) Science 308 (5725), 1149-1154; Kapranov, P. et al. (2005). Genome Res 15 (7), 987-997). El mecanismo por el que los ARNnc pueden regular la expresión génica es por apareamiento de bases con transcritos diana. Los ARN que funcionan por apareamiento de bases pueden agruparse en (1) ARN codificados en cis que están codificados en la misma
- 45 localización genética, pero en la hebra opuesta a los ARN en los que actúan y, por tanto, muestran complementariedad perfecta con su diana, y (2) ARN codificados en trans que están codificados en una localización cromosómica distinta de los ARN en los que actúan y generalmente no presentan potencial de apareamiento de bases perfecto con sus dianas.

- 50 Sin desear ceñirse a ninguna teoría, la perturbación de un polinucleótido antisentido por los oligonucleótidos antisentido descritos en el presente documento puede alterar la expresión de los ARN mensajero sentido correspondientes. Sin embargo, esta regulación puede tanto ser discordante (la inactivación antisentido produce elevación de ARN mensajero) como concordante (la inactivación antisentido produce reducción concomitante de ARN mensajero). En estos casos, los oligonucleótidos antisentido pueden ser dirigidos a partes solapantes o no
- 55 solapantes del transcrito antisentido que producen su inactivación o secuestro. El antisentido codificante, además de no codificante, puede ser dirigido de una manera idéntica y que cualquier categoría es capaz de regular los transcritos sentido correspondientes - tanto de una manera concordante como discordante. Las estrategias que se emplean en identificar nuevos oligonucleótidos para su uso contra una diana pueden basarse en la inactivación de transcritos de ARN antisentido por oligonucleótidos antisentido o cualquier otro medio de modulación de la diana

deseada.

Estrategia 1: En el caso de regulación discordante, la inactivación del transcrito antisentido eleva la expresión del gen convencional (sentido). Si el último debe codificar un fármaco diana conocido o supuesto, entonces la inactivación de su homólogo antisentido podría imitar posiblemente la acción de un agonista receptor o una enzima estimulante.

Estrategia 2: En el caso de regulación concordante, podrían inactivarse concomitantemente tanto los transcritos antisentido como sentido y así lograr una reducción sinérgica de la expresión génica (sentido) convencional. Si, por ejemplo, un oligonucleótido antisentido se usa para lograr la inactivación, entonces esta estrategia puede usarse para aplicar un oligonucleótido antisentido dirigido al transcrito sentido y otro oligonucleótido antisentido al transcrito antisentido correspondiente, o un único oligonucleótido antisentido energéticamente simétrico que se dirige simultáneamente a transcritos sentido y antisentido solapantes.

Según la presente divulgación, los compuestos antisentido incluyen oligonucleótidos antisentido, ribozimas, oligonucleótidos de secuencia de guía externa (EGS), compuestos de siRNA, compuestos de interferencia (iARN) de ARN mono- o bicatenario tales como compuestos de siRNA, y otros compuestos oligoméricos que hibridan con al menos una porción del ácido nucleico diana y modulan su función. Como tales, pueden ser ADN, ARN, similares a ADN, similares a ARN, o mezclas de los mismos, o pueden ser miméticos de uno o más de estos. Estos compuestos pueden ser compuestos oligoméricos monocatenarios, bicatenarios, circulares o de horquilla y pueden contener elementos estructurales tales como protuberancias internas o terminales, desapareamientos o bucles. Los compuestos antisentido se preparan rutinariamente linealmente, pero pueden unirse o prepararse de otro modo para ser circulares y/o ramificados. Los compuestos antisentido pueden incluir construcciones tales como, por ejemplo, dos hebras hibridadas para formar un compuesto completa o parcialmente bicatenario o una única hebra con auto-complementariedad suficiente para permitir la hibridación y formación de un compuesto completa o parcialmente bicatenario. Las dos hebras pueden enlazarse internamente, dejando los extremos 3' o 5' libres o pueden enlazarse para formar una estructura de horquilla continua o bucle. La estructura de horquilla puede contener un nucleótido protuberante en cualquiera de los extremos 5' o 3' que produce una extensión del carácter monocatenario. Los compuestos bicatenarios opcionalmente pueden incluir nucleótidos protuberantes en los extremos. Modificaciones adicionales pueden incluir grupos conjugados unidos a uno de los extremos, posiciones de nucleótido seleccionadas, posiciones de azúcar o a uno de los enlaces internucleosídicos. Alternativamente, las dos hebras pueden enlazarse mediante un resto no de ácido nucleico o grupo conector. Cuando se forma a partir de solo una hebra, el dsARN puede tomar la forma de una molécula tipo horquilla auto-complementaria que se dobla sobre sí misma para formar un dúplex. Así, el dsARN puede ser completa o parcialmente bicatenario. Puede lograrse modulación específica de la expresión génica por expresión estable de horquillas de dsARN en líneas celulares transgénicas, sin embargo, en algunos casos, la expresión génica o función está regulada por incremento. Cuando se forma a partir de dos hebras, o una única hebra que adopta la forma de una molécula de tipo horquilla auto-complementaria que se dobla sobre sí misma para formar un dúplex, las dos hebras (o regiones formadoras de dúplex de una sola hebra) son hebras de ARN complementarias que se aparean con bases en el modo de Watson-Crick.

Una vez introducido a un sistema, los compuestos de la divulgación pueden provocar la acción de una o más enzimas o proteínas estructurales para efectuar la escisión u otra modificación del ácido nucleico diana o pueden trabajar mediante mecanismos basados en la ocupación. En general, los ácidos nucleicos (incluyendo oligonucleótidos) pueden describirse como "similares a ADN" (es decir, que generalmente tienen uno o más 2'-desoxiazúcares y, generalmente, bases T en vez de U) o "similares a ARN" (es decir, que generalmente tienen uno o más 2'-hidroxilazúcares o azúcares modificados en 2' y, generalmente bases U en vez de T). Las hélices de ácido nucleico pueden adoptar más de un tipo de estructura, más comúnmente las formas A y B. Se cree que, en general, los oligonucleótidos que tienen estructura similar a la forma B son "similares a ADN" y aquellos que tienen estructura similar a la forma A son "similares a ARN". En algunos casos (quiméricos), un compuesto antisentido puede contener tanto regiones en forma A como B.

En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos deseados o compuestos antisentido comprenden al menos uno de: ARN antisentido, ADN antisentido, oligonucleótidos antisentido quiméricos, oligonucleótidos antisentido que comprenden enlaces modificados, ARN de interferencia (iARN), ARN interferente pequeño (siRNA); un microARN interferente (miARN); un ARN temporal pequeño (ARNtp); o un ARN de horquilla corta (ARNhc); activación génica inducida por ARN pequeño (aARN); ARN activantes pequeños (ARNap), o combinaciones de los mismos.

Los dsARN también pueden activar la expresión génica, un mecanismo que se ha llamado "activación génica inducida por ARN pequeño" o aARN. Los promotores génicos que se dirigen a dsARN inducen la potente activación

transcripcional de genes asociados. El aARN se demostró en células humanas usando dsARN sintéticos, llamados "ARN activantes pequeños" (ARNap). No se sabe actualmente si el aARN está conservado en otros organismos.

Se ha encontrado que el ARN bicatenario pequeño (dsARN), tal como ARN interferente pequeño (siRNA) y microARN (miARN), es el desencadenante de un mecanismo evolutivamente conservado conocido como interferencia de ARN (iARN). La iARN conduce invariablemente al silenciamiento génico mediante la remodelación de cromatina para así suprimir la transcripción, degradación de ARNm complementario, o bloqueo de la traducción de proteína. Sin embargo, en los casos descritos en detalle en la sección de ejemplos que sigue, se muestra que los oligonucleótidos aumentan la expresión y/o función de los polinucleótidos del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) y productos codificados por los mismos. Los dsARN también pueden actuar de ARN activantes pequeños (ARNap). Sin desear ceñirse a ninguna teoría, direccionando secuencias a promotores génicos, los ARNap inducirán la expresión de genes diana en un fenómeno denominado activación transcripcional inducida por dsARN (aARN).

En otro aspecto, los "segmentos diana preferidos" identificados en el presente documento pueden emplearse en un cribado para compuestos adicionales que modulan la expresión de polinucleótidos del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF). "Moduladores" son aquellos compuestos que disminuyen o aumentan la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) y que comprenden al menos una porción de 5 nucleótidos que es complementaria a un segmento diana preferido. El método de cribado comprende las etapas de poner en contacto un segmento diana preferido de una molécula de ácido nucleico que codifica polinucleótidos sentido o antisentido naturales del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) con uno o más moduladores candidatos, y seleccionar uno o más moduladores candidatos que disminuyen o aumentan la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica polinucleótidos del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), por ejemplo, SEQ ID NOS: 3 a 8. Una vez se muestra que el modulador o moduladores candidatos son capaces de modular (por ejemplo, tanto disminuir como aumentar) la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica polinucleótidos del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), el modulador puede entonces emplearse en estudios de investigación adicionales de la función de polinucleótidos del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), o para su uso como un agente de investigación, diagnóstico o terapéutico según la presente divulgación.

El direccionamiento de la secuencia antisentido natural modula preferentemente la función del gen diana. Por ejemplo, el gen BDNF (por ejemplo, número de acceso NM_170735, Fig. 2). En un aspecto preferido, la diana es un polinucleótido antisentido del gen BDNF. En un aspecto preferido, un oligonucleótido antisentido se dirige a secuencias sentido y/o antisentido naturales de los polinucleótidos del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) (por ejemplo, número de acceso NM_170735, Fig. 2), variantes, alelos, isoformas, homólogos, mutantes, derivados, fragmentos y secuencias complementarias a los mismos. Preferentemente, el oligonucleótido es una molécula antisentido y las dianas incluyen regiones codificantes y no codificantes de polinucleótidos antisentido y/o sentido de BDNF.

Los segmentos diana preferidos de la presente divulgación también pueden combinarse con sus compuestos antisentido complementarios respectivos de la presente divulgación para formar oligonucleótidos (duplexados) bicatenarios estabilizados.

Se ha mostrado en la materia que tales restos de oligonucleótido bicatenario modulan expresión de diana y regulan la traducción, además del procesamiento de ARN mediante un mecanismo antisentido. Además, los restos bicatenarios pueden someterse a modificaciones químicas (Fire et al., (1998) Nature, 391, 806-811; Timmons and Fire, (1998) Nature, 395, 854; Timmons et al., (2001) Gene, 263, 103-112; Tabara et al., (1998) Science, 282, 430-431; Montgomery et al., (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 15502-15507; Tuschl et al., (1999) Genes Dev., 13, 3191-3197; Elbashir et al., (2001) Nature, 411, 494-498; Elbashir et al., (2001) Genes Dev. 15, 188-200). Por ejemplo, se ha mostrado que tales restos bicatenarios inhiben la diana por la hibridación clásica de la hebra antisentido del dúplex con la diana, produciendo así la degradación enzimática de la diana (Tijsterman et al., (2002) Science, 295, 694-697).

En un aspecto preferido, un oligonucleótido antisentido se dirige a polinucleótidos del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) (por ejemplo, número de acceso NM_170735), variantes, alelos, isoformas, homólogos, mutantes, derivados, fragmentos y secuencias complementarias a los mismos. Preferentemente, el oligonucleótido es una molécula antisentido.

Según aspectos de la divulgación, la molécula de ácido nucleico diana no se limita al factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) solo, sino que se extiende a cualquiera de las isoformas, receptores, homólogos y similares de las moléculas del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF).

En otro aspecto preferido, un oligonucleótido se dirige a una secuencia antisentido natural de polinucleótidos de BDNF, por ejemplo, polinucleótidos expuestos como SEQ ID NO: 2, y cualquier variante, alelo, homólogo, mutante, derivado, fragmento y secuencia complementaria a los mismos. Ejemplos de oligonucleótidos antisentido se exponen como SEQ ID NOS: 3 a 8.

En un aspecto, los oligonucleótidos son complementarios a o se unen a secuencias de ácidos nucleicos de antisentido del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), que incluyen sin limitación secuencias sentido y/o antisentido no codificantes asociadas a polinucleótidos del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) y modulan la expresión y/o función de moléculas del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF).

En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos son complementarios a o se unen a secuencias de ácidos nucleicos de antisentido natural de BDNF, expuestas como SEQ ID NO: 2 y modulan la expresión y/o función de moléculas de BDNF.

En un aspecto preferido, los oligonucleótidos comprenden secuencias de al menos 5 nucleótidos consecutivos de SEQ ID NOS: 3 a 8 y modulan la expresión y/o función de moléculas del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF).

Las dianas de polinucleótido comprenden BDNF, que incluye miembros de su familia, variantes de BDNF; mutantes de BDNF, que incluyen SNP; secuencias no codificantes de BDNF; alelos de BDNF; variantes de especies, fragmentos y similares. Preferentemente, el oligonucleótido es una molécula antisentido.

En otro aspecto preferido, el oligonucleótido que se dirige a polinucleótidos del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) comprende: ARN antisentido, ARN de interferencia (iARN), ARN interferente pequeño (siRNA); microARN interferente (miARN); un ARN temporal pequeño (ARNtp); o un ARN de horquilla corta (ARNhc); activación génica inducida por ARN pequeño (aARN); o, ARN activante pequeño (ARNap).

En otro aspecto preferido, el direccionamiento de los polinucleótidos del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), por ejemplo, SEQ ID NO: 2, modula la expresión o función de estas dianas. En un aspecto, la expresión o función está regulada por incremento en comparación con un control. En otro aspecto preferido, la expresión o función se regula por disminución en comparación con un control.

En otro aspecto preferido, los compuestos antisentido comprenden secuencias expuestas como SEQ ID NOS: 3 a 8. Estos oligonucleótidos pueden comprender uno o más nucleótidos modificados, fragmentos más cortos o más largos, enlaces modificados y similares.

En otro aspecto preferido, las SEQ ID NOS: 3 a 8 comprenden uno o más nucleótidos de LNA.

La Tabla 1 muestra a modo de ejemplo oligonucleótidos antisentido útiles en los métodos de la divulgación.

Tabla 1

ID de secuencia	Nombre del oligo	Secuencia
SEQ ID NO:3	CUR-0076	C*+T*+T*G*A*A*T*T*G*T*T*+G*+T*+A
SEQ ID NO:4	CUR-0075	A*+G*+T*T*G*C*A*A*G*A*G*T*+T*+G*+G
SEQ ID NO:5	CUR-0074	A*+T*+C*T*G*T*T*C*T*G*C*T*+G*+T*+C
SEQ ID NO:6	CUR-0071	C*+A*+T*A*T*T*C*T*T*G*G*A*+C*+G*+A
SEQ ID NO:7	CUR-0072	T*+G*+T*G*C*T*G*T*T*G*T*A*+A*+G*+A
SEQ ID NO:8	CUR-0073	T*+G*+A*C*A*G*A*G*G*A*G*T*+A*+T*+T

La modulación de un ácido nucleico diana deseado puede llevarse a cabo de varias formas conocidas en la técnica. Por ejemplo, oligonucleótidos antisentido, siRNA, etc. Las moléculas de ácidos nucleicos enzimáticos (por ejemplo, ribozimas) son moléculas de ácidos nucleicos capaces de catalizar una o más de una variedad de reacciones, que incluyen la capacidad para escindir repetidamente otras moléculas de ácidos nucleicos separadas en un modo específico de secuencia de bases de nucleótidos. Tales moléculas de ácidos nucleicos enzimáticos pueden usarse, por ejemplo, para dirigirse prácticamente a cualquier transcrito de ARN (Zaug et al., 324, Nature 429 1986; Cech, 260 JAMA 3030, 1988; y Jefferies et al., 17 Nucleic Acids Research 1371, 1989).

Debido a su especificidad de secuencia, las moléculas de ácidos nucleicos enzimáticos que se escinden en trans

muestran promesa como agentes terapéuticos para enfermedad humana (Usman & McSwiggen, (1995) Ann. Rep. Med. Chem. 30, 285-294; Christoffersen and Marr, (1995) J. Med. Chem. 38, 2023-2037). Las moléculas de ácidos nucleicos enzimáticos pueden diseñarse para escindir dianas de ARN específicas dentro del fondo del ARN celular. Un acontecimiento de escisión tal convierte el ARNm en no funcional y anula la expresión de proteínas de ese ARN.

5 De este modo puede inhibirse selectivamente la síntesis de una proteína asociada a un estado de enfermedad.

En general, los ácidos nucleicos enzimáticos con actividad de escisión de ARN actúan uniéndose primero a un ARN diana. Tal unión se produce mediante la porción de unión de diana de un ácido nucleico enzimático que se mantiene en estrecha proximidad a una porción enzimática de la molécula que actúa para escindir el ARN diana. Así, el ácido

10 nucleico enzimático se reconoce primero y entonces se une a ARN diana mediante apareamiento de bases complementario, y una vez se une al sitio correcto, actúa enzimáticamente para cortar el ARN diana. La escisión estratégica de un ARN diana tal destruirá su capacidad para dirigir la síntesis de una proteína codificada. Después de unirse un ácido nucleico enzimático y escindir su ARN diana, se libera de ese ARN para buscar otra diana y puede unirse repetidamente y escindir nuevas dianas.

15 Se han usado varios enfoques, tales como estrategias de selección *in vitro* (evolución) (Orgel, (1979) Proc. R. Soc. London, B 205, 435), para desarrollar nuevos catalizadores de ácido nucleico capaces de catalizar una variedad de reacciones, tales como escisión y ligación de enlaces fosfodiéster y enlaces amida (Joyce, (1989) Gene, 82, 83-87; Beaudry et al., (1992) Science 257, 635-641; Joyce, (1992) Scientific American 267, 90-97; Breaker et al., (1994) TIBTECH 12, 268; Bartel et al., (1993) Science 261:1411- 1418; Szostak, (1993) TIBS 17, 89-93; Kumar et al., (1995) FASEB J., 9, 1183; Breaker, (1996) Curr. Op. Biotech., 7, 442).

El desarrollo de ribozimas que son óptimas para la actividad catalítica contribuiría significativamente a cualquier estrategia que empleara ribozimas que escinden ARN con el fin de regular la expresión génica. La ribozima de

25 cabeza de martillo, por ejemplo, funciona con una velocidad catalítica (kcat) de aproximadamente 1 min⁻¹ en presencia de concentraciones saturantes (10 mM) de cofactor de Mg²⁺. Se ha mostrado que una ribozima de "ligasa de ARN" artificial cataliza la reacción de auto-modificación correspondiente con una velocidad de aproximadamente 100 min⁻¹. Además, se sabe que ciertas ribozimas de cabeza de martillo modificadas que tienen brazos de unión al sustrato hechos de ADN catalizan la escisión de ARN con múltiples velocidades de recuperación que se aproximan a

30 100 min⁻¹. Finalmente, la sustitución de un residuo específico dentro del núcleo catalítico de la cabeza de martillo con ciertos análogos de nucleótido da ribozimas modificadas que muestran una mejora de nada menos 10 veces en la velocidad catalítica. Estos hallazgos demuestran que las ribozimas pueden promover transformaciones químicas con velocidades catalíticas que son significativamente superiores a aquellas mostradas *in vitro* por la mayoría de las ribozimas que se auto-escinden naturales. Entonces es posible que las estructuras de ciertas ribozimas que se auto-

35 escinden puedan optimizarse para dar la máxima actividad catalítica, o que puedan prepararse motivos de ARN completamente nuevos que muestran velocidades significativamente más rápidas para la escisión de fosfodiéster de ARN.

La escisión intermolecular de un sustrato de ARN por un catalizador de ARN que se ajusta al modelo de "cabeza de

40 martillo" se mostró por primera vez en 1987 (Uhlenbeck, O. C. (1987) Nature, 328: 596-600). Se recuperó el catalizador de ARN y se hizo reaccionar con múltiples moléculas de ARN, demostrando que era verdaderamente catalítico.

Se han usado ARN catalíticos diseñados basados en el motivo de "cabeza de martillo" para escindir secuencias

45 diana específicas haciendo cambios de base apropiados en el ARN catalítico para mantener apareamiento de bases necesarios con las secuencias diana (Haseloff y Gerlach, (1988) Nature, 334, 585; Walbot y Bruening, (1988) Nature, 334, 196; Uhlenbeck, O. C. (1987) Nature, 328: 596-600; Koizumi, M., et al. (1988) FEBS Lett., 228: 228-230). Esto ha permitido el uso del ARN catalítico para escindir secuencias diana específicas e indica que los ARN catalíticos diseñados según el modelo de "cabeza de martillo" pueden escindir posiblemente ARN de sustrato

50 específico *in vivo* (véase Haseloff y Gerlach, (1988) Nature, 334, 585; Walbot y Bruening, (1988) Nature, 334, 196; Uhlenbeck, O. C. (1987) Nature, 328: 596-600).

La interferencia de ARN (iARN) se ha convertido en una poderosa herramienta para modular la expresión génica en mamíferos y células de mamífero. Este enfoque requiere la administración de ARN interferente pequeño (siRNA)

55 bien como el propio ARN o bien como ADN, usando un plásmido de expresión o virus y la secuencia codificante para ARN de horquilla pequeño que se procesa a siRNA. Este sistema permite el eficaz transporte de los pre-siRNA al citoplasma en el que son activos y permite el uso de promotores regulados y específicos de tejido para la expresión génica.

En un aspecto preferido, un oligonucleótido o compuesto antisentido comprende un oligómero o polímero de ácido ribonucleico (ARN) y/o ácido desoxirribonucleico (ADN), o un mimético, quimera, análogo u homólogo de los mismos. Este término incluye oligonucleótidos compuestos de nucleótidos que existen de forma natural, azúcares y enlaces internucleosídicos covalentes (esqueleto), además de oligonucleótidos que tienen porciones que no existen de forma natural que funcionan similarmente. Tales oligonucleótidos modificados o sustituidos son frecuentemente deseados con respecto a formas nativas debido a propiedades deseables tales como, por ejemplo, captación celular potenciada, afinidad potenciada por un ácido nucleico diana y elevada estabilidad en presencia de nucleasas.

Según la presente divulgación, los oligonucleótidos o “compuestos antisentido” incluyen oligonucleótidos antisentido (por ejemplo, ARN, ADN, mimético, quimera, análogo u homólogo de los mismos), ribozimas, oligonucleótidos de secuencia de guía externa (EGS), compuestos de siRNA, compuestos de interferencia (iARN) de ARN mono- o bicatenario tales como compuestos de siRNA, ARN_{ap}, ARN_a, y otros compuestos oligoméricos que hibridan con al menos una porción del ácido nucleico diana y modulan su función. Como tales, pueden ser ADN, ARN, similares a ADN, similares a ARN, o mezclas de los mismos, o pueden ser miméticos de uno o más de estos. Estos compuestos pueden ser compuestos oligoméricos monocatenarios, bicatenarios, circulares o de horquilla y pueden contener elementos estructurales tales como protuberancias internas o terminales, desapareamientos o bucles. Los compuestos antisentido se preparan rutinariamente linealmente, pero pueden unirse o prepararse de otro modo para ser circulares y/o ramificados. Los compuestos antisentido pueden incluir construcciones tales como, por ejemplo, dos hebras hibridadas para formar un compuesto completa o parcialmente bicatenario o una única hebra con auto-complementariedad suficiente para permitir la hibridación y formación de un compuesto completa o parcialmente bicatenario. Las dos hebras pueden enlazarse internamente, dejando los extremos 3' o 5' libres o pueden enlazarse para formar una estructura de horquilla continua o bucle. La estructura de horquilla puede contener un nucleótido protuberante en cualquiera de los extremos 5' o 3' que produce una extensión del carácter monocatenario. Los compuestos bicatenarios opcionalmente pueden incluir nucleótidos protuberantes en los extremos. Modificaciones adicionales pueden incluir grupos conjugados unidos a uno de los extremos, posiciones de nucleótido seleccionadas, posiciones de azúcar o a uno de los enlaces internucleosídicos. Alternativamente, las dos hebras pueden enlazarse mediante un resto no de ácido nucleico o grupo conector. Cuando se forma a partir de solo una hebra, el dsARN puede tomar la forma de una molécula tipo horquilla auto-complementaria que se dobla sobre sí misma para formar un dúplex. Así, el dsARN puede ser completa o parcialmente bicatenario. Puede lograrse modulación específica de la expresión génica por expresión estable de horquillas de dsARN en líneas celulares transgénicas (Hammond et al., (1991) Nat. Rev. Genet., 2, 110-119; Matzke et al., (2001) Curr. Opin. Genet. Dev., 11, 221-227; Sharp, (2001) Genes Dev., 15, 485-490). Cuando se forma a partir de dos hebras, o una única hebra que adopta la forma de una molécula de tipo horquilla auto-complementaria que se dobla sobre sí misma para formar un dúplex, las dos hebras (o regiones formadoras de dúplex de una sola hebra) son hebras de ARN complementarias que se aparean con bases en el modo de Watson-Crick.

Una vez introducido a un sistema, los compuestos de la divulgación pueden provocar la acción de una o más enzimas o proteínas estructurales para efectuar la escisión u otra modificación del ácido nucleico diana o pueden trabajar mediante mecanismos basados en la ocupación. En general, los ácidos nucleicos (incluyendo oligonucleótidos) pueden describirse como “similares a ADN” (es decir, que generalmente tienen uno o más 2'-desoxiazúcares y, generalmente, bases T en vez de U) o “similares a ARN” (es decir, que generalmente tienen uno o más 2'-hidroxilazúcares o azúcares modificados en 2' y, generalmente bases U en vez de T). Las hélices de ácido nucleico pueden adoptar más de un tipo de estructura, más comúnmente las formas A y B. Se cree que, en general, los oligonucleótidos que tienen estructura similar a la forma B son “similares a ADN” y aquellos que tienen estructura similar a la forma A son “similares a ARN”. En algunos casos (quiméricos), un compuesto antisentido puede contener tanto regiones en forma A como B.

Los compuestos antisentido según la presente divulgación pueden comprender una porción antisentido de aproximadamente 5 a aproximadamente 80 nucleótidos (es decir, de aproximadamente 5 a aproximadamente 80 nucleósidos enlazados) de longitud. Esto se refiere a la longitud de la hebra antisentido o porción del compuesto antisentido. En otras palabras, un compuesto antisentido monocatenario de la divulgación comprende de 5 a aproximadamente 80 nucleótidos, y un compuesto antisentido bicatenario de la divulgación (tal como un dsARN, por ejemplo) comprende una hebra sentido y antisentido o porción de 5 a aproximadamente 80 nucleótidos de longitud. Un experto habitual en la materia apreciará que éste comprenda porciones antisentido de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, u 80 nucleótidos de longitud, o cualquier intervalo entremedias.

En un aspecto, los compuestos antisentido de la divulgación tienen porciones antisentido de 10 a 50 nucleótidos de

longitud. Un experto habitual en la materia apreciará que éstos integran oligonucleótidos que tienen porciones antisentido de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 nucleótidos de longitud, o cualquier intervalo entremedias. En algunos aspectos, los oligonucleótidos tienen 15 nucleótidos de longitud.

5

En un aspecto, los compuestos antisentido o de oligonucleótido de la divulgación tienen porciones antisentido de 12 o 13 a 30 nucleótidos de longitud. Un experto habitual en la materia apreciará que éstos integran compuestos antisentido que tienen porciones antisentido de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos de longitud, o cualquier intervalo entremedias.

10

En otro aspecto preferido, los compuestos oligoméricos de la presente divulgación también incluyen variantes en las que una base diferente está presente en una o más de las posiciones de nucleótido en el compuesto. Por ejemplo, si el primer nucleótido es una adenosina, pueden producirse variantes que contienen timidina, guanosina o citidina en esa posición. Esto puede hacerse en cualquiera de las posiciones de los compuestos antisentido o de dsARN. Estos compuestos se prueban entonces usando los métodos descritos en el presente documento para determinar su capacidad para inhibir la expresión de un ácido nucleico diana.

15

En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencias o complementariedad, entre el compuesto antisentido y diana, es de aproximadamente el 40 % a aproximadamente el 60 %. En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencias o complementariedad es de aproximadamente el 60 % a aproximadamente el 70 %. En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencias o complementariedad es de aproximadamente el 70 % a aproximadamente el 80 %. En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencias o complementariedad es de aproximadamente el 80 % a aproximadamente el 90 %. En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencias o complementariedad es de aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 % o aproximadamente el 100 %.

20

25

En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos antisentido, tales como, por ejemplo, las moléculas de ácidos nucleicos expuestas en SEQ ID NOS: 2 a 8, comprenden una o más sustituciones o modificaciones. En un aspecto, los nucleótidos están sustituidos con ácidos nucleicos bloqueados (LNA).

30

En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos se dirigen a una o más regiones de las moléculas de ácidos nucleicos sentido y/o antisentido de secuencias codificantes y/o no codificantes asociadas a BDNF y las secuencias expuestas como SEQ ID NOS: 1, 2. Los oligonucleótidos también se dirigen a regiones solapantes de SEQ ID NOS: 1, 2.

35

Ciertos oligonucleótidos preferidos de la presente divulgación son oligonucleótidos quiméricos. "Oligonucleótidos quiméricos" o "quimeras", en el contexto de la presente divulgación, son oligonucleótidos que contienen dos o más regiones químicamente distintas, cada una constituida de al menos un nucleótido. Estos oligonucleótidos normalmente contienen al menos una región de nucleótidos modificados que confiere una o más propiedades beneficiosas (tales como, por ejemplo, elevada resistencia a nucleasas, elevada captación en células, elevada afinidad de unión por la diana) y una región que es un sustrato para enzimas capaces de escindir híbridos de ARN:ADN o ARN:ARN. A modo de ejemplo, la RNasa H es una endonucleasa celular que escinde la hebra de ARN de un dúplex de ARN:ADN. La activación de RNasa H, por tanto, produce la escisión del ARN diana, potenciando así enormemente la eficiencia de la modulación antisentido de la expresión génica. Por consiguiente, frecuentemente pueden obtenerse resultados comparables con oligonucleótidos más cortos cuando se usan oligonucleótidos quiméricos, en comparación con desoxioligonucleótidos de fosforotioato que hibridan con la misma región diana. La escisión del ARN diana puede detectarse rutinariamente por electroforesis en gel y, si fuera necesario, técnicas de hibridación de ácidos nucleicos asociadas conocidas en la técnica. En un aspecto preferido, un oligonucleótido quimérico comprende al menos una región modificada para aumentar la afinidad de unión de la diana, y, normalmente, una región que actúa de sustrato para RNasa H. La afinidad de un oligonucleótido por su diana (en este caso, un ácido nucleico que codifica ras) se determina rutinariamente midiendo la T_m de un par de oligonucleótido/diana, que es la temperatura a la que se disocian el oligonucleótido y la diana; la disociación se detecta espectrofotométricamente. Cuanto mayor sea la T_m , mayor será la afinidad del oligonucleótido por la diana.

40

45

50

55

Los compuestos antisentido quiméricos de la divulgación pueden formarse como estructuras compuestas de dos o más oligonucleótidos, oligonucleótidos modificados, miméticos de oligonucleósidos y/o de oligonucleótidos, como se han descrito anteriormente. Tales compuestos también se han denominado en la materia híbridos o gápmers. Patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de tales estructuras híbridas comprenden, pero no se limitan a, las patentes de EE.UU. Nº 5.013.830; 5.149.797; 5.220.007; 5.256.775; 5.366.878; 5.403.711;

5.491.133; 5.565.350; 5.623.065; 5.652.355; 5.652.356; y 5.700.922.

En otro aspecto preferido, la región del oligonucleótido que se modifica comprende al menos un nucleótido modificado en la posición 2' del azúcar, más preferentemente un nucleótido modificado con 2'-O-alquilo, 2'-O-alquil-O-alquilo o 2'-flúor. En otros aspectos preferidos, las modificaciones de ARN incluyen modificaciones de 2'-flúor, 2'-amino y 2'-O-metilo en la ribosa de pirimidinas, residuos abásicos o una base invertida en el extremo 3' del ARN. Tales modificaciones se incorporan rutinariamente en oligonucleótidos y se ha mostrado que estos oligonucleótidos tienen una mayor T_m (es decir, mayor afinidad de unión a diana) que los 2'-desoxioligonucleótidos contra una diana dada. El efecto de tal afinidad elevada es potenciar enormemente la inhibición por oligonucleótidos de iARN de la expresión génica. La RNasa H es una endonucleasa celular que escinde la hebra de ARN del dúplex de ARN:ADN; por tanto, la activación de esta enzima produce la escisión del ARN diana, y así puede enormemente potenciar la eficiencia de inhibición de iARN. La escisión del ARN diana puede demostrarse rutinariamente por electroforesis en gel. En otro aspecto preferido, el oligonucleótido químico también se modifica para potenciar la resistencia a nucleasas. Las células contienen una variedad de exo- y endo-nucleasas que puede degradar ácidos nucleicos. Se ha mostrado que varias modificaciones de nucleótidos y nucleósidos hacen que el oligonucleótido en el que se incorporan sea más resistente a la digestión por nucleasa que el oligodesoxinucleótido nativo. La resistencia a nucleasas se mide rutinariamente incubando oligonucleótidos con extractos celulares o disoluciones de nucleasa aisladas y midiendo el grado de oligonucleótido intacto que queda con el tiempo, normalmente por electroforesis en gel. Los oligonucleótidos que se han modificado para potenciar su resistencia a nucleasas sobreviven intactos durante más tiempo que los oligonucleótidos sin modificar. Se ha demostrado que una variedad de modificaciones de oligonucleótidos potencia o confiere resistencia a nucleasas. Los oligonucleótidos que contienen al menos una modificación de fosforotioato son actualmente más preferidos. En algunos aspectos, las modificaciones de oligonucleótidos que potencian la afinidad de unión a diana son, por tanto, independientemente capaces de potenciar la resistencia a nucleasas. Algunas modificaciones deseables pueden encontrarse en De Mesmaeker et al. (1995) Acc. Chem. Res., 28:366-374.

Ejemplos específicos de algunos oligonucleótidos preferidos concebidos por la presente divulgación incluyen aquellos que comprenden esqueletos modificados, por ejemplo, fosforotioatos, fosfotriésteres, metilfosfonatos, enlaces entre azúcares de alquilo o cicloalquilo de cadena corta o enlaces entre azúcares heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta. Los preferidos son oligonucleótidos con esqueletos de fosforotioato y aquellos con esqueletos de heteroátomo, particularmente esqueletos de CH₂--NH--O--CH₂, CH₂--N(CH₃)--O--CH₂ [conocido como un esqueleto de metilen(metilimino) o MMI], CH₂--O--N(CH₃)--CH₂, CH₂--N(CH₃)--N(CH₃)--CH₂ y O--N(CH₃)--CH₂--CH₂, en los que el esqueleto de fosfodiéster nativo se representa O--P--O--CH₂. También se prefieren esqueletos de amida descritos por De Mesmaeker et al. (1995) Acc. Chem. Res. 28:366-374. También se prefieren oligonucleótidos que tienen estructuras de esqueleto de morfolino (Summerton y Weller, patente de EE.UU. N° 5.034.506). En otros aspectos preferidos, tales como el esqueleto de ácido nucleico peptídico (PNA), el esqueleto de fosfodiéster del oligonucleótido se sustituye por un esqueleto de poliamida, estando los nucleótidos unidos directamente o indirectamente a los átomos de nitrógeno azo del esqueleto de poliamida (Nielsen et al. (1991) Science 254, 1497). Los oligonucleótidos también pueden comprender uno o más restos de azúcar sustituidos. Oligonucleótidos preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': OH, SH, SCH₃, F, OCN, OCH₃, OCH₃, O(CH₂)_nCH₃, O(CH₂)_nNH₂ o O(CH₂)_nCH₃ en los que n es de 1 a aproximadamente 10; alquilo C1 a C10 inferior, alcoxicoxi, alquilo, alcarilo o aralquilo inferior sustituido; Cl; Br; CN; CF₃; OCF₃; O-, S-, o N-alquilo; O-, S-, o N-alquenilo; SOCH₃; SO₂ CH₃; ONO₂; NO₂; N₃; NH₂; heterocicloalquilo; heterocicloalcarilo; aminoalquilamino; polialquilamino; sililo sustituido; un grupo de escisión de ARN; un grupo indicador; un intercalador; un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido; o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un oligonucleótido y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. Una modificación preferida incluye 2'-metoxietoxi [2'-O-CH₂ CH₂ OCH₃, también conocido como 2'-O-(2-metoxietilo)] (Martin et al., (1995) Helv. Chim. Acta, 78, 486). Otras modificaciones preferidas incluyen 2'-metoxi (2'-O--CH₃), 2'-propoxi (2'-OCH₂CH₂CH₃) y 2'-flúor (2'-F). También pueden hacerse modificaciones similares en otras posiciones sobre el oligonucleótido, particularmente la posición 3' del azúcar en el nucleótido del extremo 3' y la posición 5' del nucleótido del extremo 5'. Los oligonucleótidos también pueden tener miméticos de azúcar tales como ciclobutilos en lugar del grupo pentofuranosilo.

Los oligonucleótidos también pueden incluir, adicionalmente o alternativamente, modificaciones o sustituciones de nucleobases (frecuentemente denominadas en la materia simplemente "base"). Como se usa en el presente documento, nucleótidos "no modificados" o "naturales" incluyen adenina (A), guanina (G), timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Los nucleótidos modificados incluyen nucleótidos encontrados solo poco frecuentemente o transitoriamente en ácidos nucleicos naturales, por ejemplo, hipoxantina, 6-metiladenina, 5-Me-pirimidinas, particularmente 5-metilcitosina (también denominada 5-metil-2'-desoxicitosina y frecuentemente denominada en la

materia 5-Me-C), 5-hidroximetilcitosina (HMC), glicosil HMC y gentobiosil HMC, además de nucleótidos sintéticos, por ejemplo, 2-aminoadenina, 2-(metilamino)adenina, 2-(imidazolilalquil)adenina, 2-(aminoalquilamino)adenina u otras alquiladeninas heterosustituidas, 2-tiouracilo, 2-tiotimina, 5-bromouracilo, 5-hidroximetiluracilo, 8-azaguanina, 7-deazaguanina, N6(6-aminohehexil)adenina y 2,6-diaminopurina (Kornberg, A., DNA Replication, W. H. Freeman & Co., San Francisco, 1980, pp. 75-77; Gebeyehu, G., (1987) et al. Nucl. Acids Res. 15:4513). Puede incluirse una base "universal" conocida en la técnica, por ejemplo, inosina. Se ha mostrado que las sustituciones de 5-Me-C aumentan la estabilidad del dúplex de ácido nucleico 0,6-1,2 °C (Sanghvi, Y. S., en Crooke, S. T. and Lebleu, B., eds., Antisense Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278) y son las sustituciones de base actualmente preferidas.

10

Otra modificación de los oligonucleótidos de la divulgación implica enlazar químicamente al oligonucleótido uno o más restos o conjugados que potencian la actividad o captación celular del oligonucleótido. Tales restos incluyen, pero no se limitan a, restos de lípido tales como un resto de colesterol, un resto colesteroilo (Letsinger et al., (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 6553), ácido cólico (Manoharan et al. (1994) Bioorg. Med. Chem. Let. 4, 1053), un tioéter, por ejemplo, hexil-S-tritilol (Manoharan et al. (1992) Ann. N.Y. Acad. Sci. 660, 306; Manoharan et al. (1993) Bioorg. Med. Chem. Let. 3, 2765), un tiocolesterol (Oberhauser et al., (1992) Nucl. Acids Res. 20, 533), una cadena alifática, por ejemplo, residuos de dodecanodiol o de undecilo (Saison-Behmoaras et al. EMBO J. 1991, 10, 111; Kabanov et al. (1990) FEBS Lett. 259, 327; Svinarchuk et al. (1993) Biochimie 75, 49), un fosfolípido, por ejemplo, di-hexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato de trietilamonio (Manoharan et al. (1995) Tetrahedron Lett. 36, 3651; Shea et al. (1990) Nucl. Acids Res. 18, 3777), una poliamina o una cadena de polietilenglicol (Manoharan et al. (1995) Nucleosides & Nucleotides, 14, 969), o ácido adamantanoacético (Manoharan et al. (1995) Tetrahedron Lett. 36, 3651). Los oligonucleótidos que comprenden restos lipófilos, y métodos para preparar tales oligonucleótidos, son conocidos en la técnica, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N° 5.138.045, 5.218.105 y 5.459.255.

25

No es necesario que todas las posiciones en un oligonucleótido dado estén uniformemente modificadas, y de hecho más de una de las modificaciones anteriormente mencionadas puede incorporarse en un único oligonucleótido o incluso dentro de un único nucleósido dentro de un oligonucleótido. La presente divulgación también incluye oligonucleótidos que son oligonucleótidos quiméricos como se define anteriormente en este documento.

30

En otro aspecto, la molécula de ácido nucleico de la presente divulgación está conjugada con otro resto que incluye, pero no se limita a, nucleótidos abásicos, poliéter, poliamina, poliamidas, péptidos, hidratos de carbono, lípido, o compuestos de polihidrocarburo. Aquellos expertos en la materia reconocerán que estas moléculas pueden enlazarse a uno o más de cualquiera de los nucleótidos que comprenden la molécula de ácido nucleico en varias posiciones en el azúcar, base o grupo fosfato.

35

Los oligonucleótidos usados según la presente divulgación pueden prepararse convenientemente y rutinariamente mediante la técnica muy conocida de síntesis en fase sólida. Equipo para tales síntesis se vende por varios vendedores que incluyen Applied Biosystems. También puede emplearse cualquier otro medio para tal síntesis; la síntesis actual de los oligonucleótidos está perfectamente dentro de las aptitudes de un experto habitual en la materia. También es muy conocido usar técnicas similares para preparar otros oligonucleótidos tales como fosforotioatos y derivados alquilados. También es muy conocido usar técnicas similares y amiditos modificados comercialmente disponibles y productos de vidrio de poro controlado (CPG) tales como biotina, fluoresceína, acridina o amiditos modificados con psoraleno y/o CPG (disponible de Glen Research, Sterling VA) para sintetizar oligonucleótidos fluorescentemente marcados, biotinilados u otros oligonucleótidos modificados tales como oligonucleótidos modificados con colesterol.

40

45

Según la divulgación, el uso de modificaciones tales como el uso de monómeros de LNA para potenciar la potencia, especificidad y duración de la acción y ampliar las vías de administración de oligonucleótidos comprende químicas actuales tales como MOE, ANA, FANA, PS, etc. (Uhlman, et al. (2000) Current Opinions in Drug Discovery & Development Vol. 3 No 2). Esto puede lograrse sustituyendo algunos de los monómeros en los presentes oligonucleótidos por monómeros de LNA. El oligonucleótido modificado con LNA puede tener un tamaño similar al compuesto parental o puede ser más largo o preferentemente más pequeño. Se prefiere que tales oligonucleótidos modificados con LNA contengan menos de aproximadamente el 70 %, más preferentemente menos de aproximadamente el 60 %, más preferentemente menos de aproximadamente el 50 % de monómeros de LNA y que sus tamaños estén entre aproximadamente 5 y 25 nucleótidos, más preferentemente entre aproximadamente 12 y 20 nucleótidos.

50

55

Esqueletos de oligonucleótidos modificados preferidos comprenden, pero no se limitan a, fosforotioatos,

fosforotioatos quirales, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, metil y otros alquil fosfonatos que comprenden 3'-alquilenfosfonatos y fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidatos que comprenden 3'-amino fosforamidato y aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionoalquilfosfonatos, tionoalquilfosfotriésteres y boranofosfatos que tienen enlaces 3'-5' normales, análogos enlazados en 2'-5' de estos, y aquellos que tienen polaridad invertida en los que los pares adyacentes de unidades de nucleósidos están enlazados 3'-5' a 5'-3' o 2'-5' a 5'-2'. También están incluidas diversas sales, sales mixtas y formas de ácido libre.

Patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de los enlaces que contienen fósforo anteriores comprenden, pero no se limitan a, las patentes de EE.UU. N° 3.687.808; 4.469.863; 4.476.301; 5.023.243; 10 5.177.196; 5.188.897; 5.264.423; 5.276.019; 5.278.302; 5.286.717; 5.321.131; 5.399.676; 5.405.939; 5.453.496; 5.455.233; 5.466.677; 5.476.925; 5.519.126; 5.536.821; 5.541.306; 5.550.111; 5.563.253; 5.571.799; 5.587.361; y 5.625.050.

Esqueletos de oligonucleótido modificados preferidos que no incluyen un átomo de fósforo en ellos tienen esqueletos 15 que se forman por enlaces internucleosídicos de alquilo o cicloalquilo de cadena corta, enlaces internucleosídicos de heteroátomo y alquilo o cicloalquilo mixtos, o uno o más enlaces internucleosídicos heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta. Éstos comprenden aquellos que tienen enlaces morfolino (formados en parte a partir de la porción de azúcar de un nucleósido); esqueletos de siloxano; esqueletos de sulfuro, sulfóxido y sulfona; esqueletos de formacetilo y tioformacetilo; esqueletos de metilenformacetilo y tioformacetilo; esqueletos que contienen alqueno; 20 esqueletos de sulfamato; esqueletos de metilenimino y metilenhidrazino; esqueletos de sulfonato y sulfonamida; esqueletos de amida; y otros que tienen partes de componentes de N, O, S y CH₂ mixtos.

Patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de los oligonucleósidos anteriores comprenden, pero no se limitan a, las patentes de EE.UU. N° 5.034.506; 5.166.315; 5.185.444; 5.214.134; 25 5.216.141; 5.235.033; 5.264.562; 5.264.564; 5.405.938; 5.434.257; 5.466.677; 5.470.967; 5.489.677; 5.541.307; 5.561.225; 5.596.086; 5.602.240; 5.610.289; 5.602.240; 5.608.046; 5.610.289; 5.618.704; 5.623.070; 5.663.312; 5.633.360; 5.677.437; y 5.677.439.

En otros miméticos de oligonucleótidos preferidos, tanto el azúcar como el enlace internucleosídico, es decir, el 30 esqueleto, de las unidades de nucleótido se sustituyen por grupos novedosos. Las unidades de base se mantienen para la hibridación con un compuesto de ácido nucleico diana apropiado. Un compuesto oligomérico tal, un oligonucleótido mimético que se ha mostrado que tiene excelente propiedades de hibridación, se denomina un ácido nucleico peptídico (PNA). En compuestos de PNA, el esqueleto de azúcar de un oligonucleótido se sustituye por un esqueleto que contiene amida, en particular un esqueleto de aminoetilglicina. Las nucleobases son retenidas y se unen directamente o indirectamente a átomos de nitrógeno azo de la porción de amida del esqueleto. Patentes de 35 Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de compuestos de PNA comprenden, pero no se limitan a, las patentes de EE.UU. N° 5.539.082; 5.714.331; y 5.719.262. Enseñanzas adicionales de compuestos de PNA pueden encontrarse en Nielsen, et al. (1991) Science 254, 1497-1500.

40 En otro aspecto preferido de la divulgación, los oligonucleótidos con esqueletos de fosforotioato y oligonucleósidos con esqueletos de heteroátomo, y en particular -CH₂-NH-O-CH₂-, -CH₂-N(CH₃)-O-CH₂-, son conocidos como un esqueleto de metileno (metilimino) o MMI, -CH₂-O-N(CH₃)-CH₂-, -CH₂N(CH₃)-N(CH₃)CH₂- y -O-N(CH₃)-CH₂-CH₂- en las que el esqueleto de fosfodiéster nativo se representa como -O=P-O-CH₂- de la patente de EE.UU. N° 5.489.677 anteriormente citada, y los esqueletos de amida de la patente de EE.UU. N° 5.602.240 anteriormente citada. También se prefieren oligonucleótidos que tienen estructuras de esqueleto de morfolino de la patente de 45 EE.UU. N° 5.034.506 anteriormente citada.

Los oligonucleótidos modificados también pueden contener uno o más restos de azúcar sustituidos. Oligonucleótidos preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': OH; F; O-, S- o N-alquilo; O-, S-, o N-alqueno; O-, S- 50 o N-alquino; o O-alquil-O-alquilo, en los que el alquilo, alqueno y alquino pueden ser alquilo C a CO sustituido o sin sustituir o alqueno y alquino C2 a CO. Particularmente se prefieren O(CH₂)_nOmCH₃, O(CH₂)_n, OCH₃, O(CH₂)_nNH₂, O(CH₂)_nCH₃, O(CH₂)_nONH₂ y O(CH₂nON(CH₂)_nCH₃)₂ en las que n y m pueden ser de 1 a aproximadamente 10. Otros oligonucleótidos preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': C a CO, (alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, alcarilo, aralquilo, O-alcarilo o O-aralquilo, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, 55 CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂, NO₂, NH₂, heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, polialquilamino, sililo sustituido, un grupo de escisión de ARN, un grupo indicador, un intercalador, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido, o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un oligonucleótido, y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. Una modificación preferida comprende 2'-metoxietoxi (2'-O-CH₂CH₂OCH₃, también conocido como 2'-O-(2-metoxietilo) o 2'-MOE)

(Martin et al., (1995) *Helv. Chim. Acta*, 78, 486-504), es decir, un grupo alcoxialcoxi. Otra modificación preferida comprende 2'-dimetilaminooxiatoxi, es decir, un grupo $O(CH_2)_2ON(CH_3)_2$, también conocido como 2'-DMAOE, como se describe en los ejemplos en el presente documento más adelante, y 2'-dimetilaminoetoxietoxi (también conocido en la técnica como 2'-O-dimetilaminoetoxietilo o 2'-DMAEOE), es decir, 2'-O-CH₂-O-CH₂-N(CH₂)₂.

- 5 Otras modificaciones preferidas comprenden 2'-metoxi (2'-OCH₃), 2'-aminopropoxi (2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂) y 2'-flúor (2'-F). También pueden hacerse modificaciones similares en otras posiciones en el oligonucleótido, particularmente la posición 3' del azúcar en el nucleótido del extremo 3' o en oligonucleótidos enlazados 2'-5' y la posición 5' del nucleótido del extremo 5'. Los oligonucleótidos también pueden tener miméticos de azúcar tales como restos
- 10 ciclobutilo en lugar del pentofuranosil azúcar. Patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de tales estructuras de azúcar modificadas comprenden, pero no se limitan a, las patentes de EE.UU. N° 4.981.957; 5.118.800; 5.319.080; 5.359.044; 5.393.878; 5.446.137; 5.466.786; 5.514.785; 5.519.134; 5.567.811; 5.576.427; 5.591.722; 5.597.909; 5.610.300; 5.627.053; 5.639.873; 5.646.265; 5.658.873; 5.670.633; y 5.700.920.
- 15 Los oligonucleótidos también pueden comprender modificaciones o sustituciones de nucleobases (frecuentemente denominadas en la materia simplemente "base"). Como se usa en el presente documento, nucleótidos "no modificados" o "naturales" comprenden las bases de purina adenina (A) y guanina (G), y las bases de pirimidina timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Los nucleótidos modificados comprenden otros nucleótidos sintéticos y naturales tales como 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetilcitosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, derivados de 6-
- 20 metilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, derivados de 2-propilo y otros de alquilo de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracilo y citosina, 5-propiniluracilo y citosina, 6-azouracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudo-uracilo), 4-tiouracilo, 8-halógeno, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo y otras adeninas y guaninas sustituidas en 8, 5-halo, particularmente 5-bromo, 5-trifluorometilo y otros uracilos y citosinas sustituidos en 5, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-deazaguanina y 7-deazaadenina
- 25 y 3-deazaguanina y 3-deazaadenina.

Además, los nucleótidos comprenden los descritos en la patente de Estados Unidos N° 3.687.808, los descritos en 'The Concise Encyclopedia of Polymer Science And Engineering', páginas 858-859, Kroschwitz, J.I., ed. John Wiley & Sons, 1990, aquellos descritos por Englisch et al., 'Angewandte Chemie, International Edition', 1991, 30, page 613,

30 y aquellos descritos por Sanghvi, Y.S., Capítulo 15, 'Antisense Research and Applications', páginas 289-302, Crooke, S.T. y Lebleu, B. ea., CRC Press, 1993. Ciertos de estos nucleótidos son particularmente útiles para aumentar la afinidad de unión de los compuestos oligoméricos de la divulgación. Estos comprenden pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y purinas sustituidas en N-2, N-6 y O-6, que comprenden 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. Se ha mostrado que sustituciones de 5-metilcitosina aumentan la estabilidad del dúplex de ácido nucleico 0,6-1,2 °C (Sanghvi, Y.S., Crooke, S.T. and Lebleu, B., eds, 'Antisense Research and Applications', CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278) y son sustituciones de base actualmente preferidas,

35 incluso más particularmente cuando se combinan con modificaciones de 2'-O-metoxietilazúcar.

Patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de los nucleótidos modificados

40 anteriormente indicados, además de otros nucleótidos modificados, comprenden, pero no se limitan a, las patentes de EE.UU. N° 3.687.808, además de 4.845.205; 5.130.302; 5.134.066; 5.175.273; 5.367.066; 5.432.272; 5.457.187; 5.459.255; 5.484.908; 5.502.177; 5.525.711; 5.552.540; 5.587.469; 5.596.091; 5.614.617; 5.750.692 y 5.681.941.

Otra modificación de los oligonucleótidos de la divulgación implica enlazar químicamente al oligonucleótido uno o

45 más restos o conjugados, que potencian la actividad, distribución celular o captación celular del oligonucleótido.

Tales restos comprenden, pero no se limitan a, restos de lípido tales como un resto colesterol (Letsinger et al., (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 6553-6556), ácido cólico (Manoharan et al., (1994) *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 4, 1053-1060), un tioéter, por ejemplo, hexil-S-tritilitol (Manoharan et al., (1992) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 660, 306-309;

50 Manoharan et al., (1993) *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 3, 2765-2770), un tiocolesterol (Oberhauser et al., (1992) *Nucl. Acids Res.*, 20, 533-538), una cadena alifática, por ejemplo, residuos de dodecanodiol o de undecilo (Kabanov et al., (1990) *FEBS Lett.*, 259, 327-330; Svinarchuk et al., (1993) *Biochimie* 75, 49-54), un fosfolípido, por ejemplo, dihexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicerol-3-H-fosfonato de trietilamonio (Manoharan et al., (1995) *Tetrahedron Lett.*, 36, 3651-3654; Shea et al., (1990) *Nucl. Acids Res.*, 18, 3777-3783 una poliamina o una cadena

55 de polietilenglicol (Manoharan et al., (1995) *Nucleosides & Nucleotides*, 14, 969-973), o ácido adamantanoacético (Manoharan et al., (1995) *Tetrahedron Lett.*, 36, 3651-3654), un resto palmitilo (Mishra et al., (1995) *Biochim. Biophys. Acta*, 1264, 229-237), o un resto octadecilamina o hexilamino-carbonil-oxicolesterol (Crooke et al., (1996) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 277, 923-937).

Patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de tales oligonucleótidos conjugados comprenden, pero no se limitan a, las patentes de EE.UU. N° 4.828.979; 4.948.882; 5.218.105; 5.525.465; 5.541.313; 5.545.730; 5.552.538; 5.578.717; 5.580.731; 5.580.731; 5.591.584; 5.109.124; 5.118.802; 5.138.045; 5.414.077; 5.486.603; 5.512.439; 5.578.718; 5.608.046; 4.587.044; 4.605.735; 4.667.025; 4.762.779; 4.789.737; 5.424.941; 4.835.263; 4.876.335; 4.904.582; 4.958.013; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.245.022; 5.254.469; 5.258.506; 5.262.536; 5.272.250; 5.292.873; 5.317.098; 5.371.241; 5.391.723; 5.416.203; 5.451.463; 5.510.475; 5.512.667; 5.514.785; 5.565.552; 5.567.810; 5.574.142; 5.585.481; 5.587.371; 5.595.726; 5.597.696; 5.599.923; 5.599.928 y 5.688.941.

- 10 *Descubrimiento de fármacos:* Los compuestos de la presente divulgación también pueden aplicarse en las áreas del descubrimiento de fármacos y validación de dianas. La presente divulgación comprende el uso de los compuestos y segmentos diana preferidos identificados en el presente documento en los esfuerzos del descubrimiento de fármacos para esclarecer relaciones que existen entre polinucleótidos del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) y un estado de enfermedad, fenotipo o afección. Estos métodos incluyen detectar o modular los
- 15 polinucleótidos del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) que comprenden poner en contacto una muestra, tejido, célula u organismo con los compuestos de la presente divulgación, medir el nivel de ácido nucleico o de proteína de los polinucleótidos del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) y/o un criterio de valoración fenotípico o químico relacionado en algún momento después del tratamiento, y opcionalmente comparar el valor medido con una muestra no tratada o muestra tratada con otro compuesto de la divulgación. Estos métodos también
- 20 pueden realizarse en paralelo o en combinación con otros experimentos para determinar la función de genes desconocidos para el proceso de validación de dianas o para determinar la validez de un producto génico particular como diana para el tratamiento o prevención de una enfermedad, afección o fenotipo particular.

Evaluación de la regulación por incremento o inhibición de la expresión génica:

- 25 La transferencia de un ácido nucleico exógeno en una célula huésped u organismo puede evaluarse detectando directamente la presencia del ácido nucleico en la célula u organismo. Tal detección puede lograrse por varios métodos muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, la presencia del ácido nucleico exógeno puede detectarse por Southern blot o por una técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando cebadores que amplifican
- 30 específicamente secuencias de nucleótidos asociadas al ácido nucleico. La expresión de los ácidos nucleicos exógenos también puede medirse usando métodos convencionales que incluyen análisis de expresión génica. Por ejemplo, el ARNm producido a partir de un ácido nucleico exógeno puede detectarse y cuantificarse usando una Northern blot y PCR con transcripción inversa (RT-PCR).
- 35 La expresión de ARN del ácido nucleico exógeno también puede detectarse midiendo una actividad enzimática o una actividad de proteína reportera. Por ejemplo, puede medirse la actividad moduladora antisentido indirectamente como una disminución o aumento en la expresión de ácido nucleico diana como una indicación de que el ácido nucleico exógeno está produciendo el ARN efector. Basándose en conservación de secuencias, pueden diseñarse cebadores y usarse para amplificar regiones codificantes de los genes diana. Inicialmente, la región codificante más
- 40 altamente expresada de cada gen puede usarse para construir un gen de control modelo, aunque puede usarse cualquier región codificante o no codificante. Cada gen de control se ensambla insertando cada región codificante entre una región codificante reportera y su señal de poli(A). Estos plásmidos producirían un ARNm con un gen reportero en la porción upstream del gen y una posible diana de iARN en la región no codificante 3'. La eficacia de oligonucleótidos antisentido individuales se ensayaría por modulación del gen reportero. Genes reporteros útiles en
- 45 los métodos de la presente divulgación incluyen acetohidroxiácido sintasa (AHAS), fosfatasa alcalina (AP), beta-galactosidasa (LacZ), beta-glucuronidasa (GUS), cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), proteína verde fluorescente (GFP), proteína roja fluorescente (RFP), proteína amarilla fluorescente (YFP), proteína cian fluorescente (CFP), peroxidasa de rábano picante (HRP), luciferasa (Luc), nopalina sintasa (NOS), octopina sintasa (OCS), y derivados de los mismos. Están disponibles múltiples marcadores de selección que confieren resistencia a ampicilina,
- 50 bleomicina, cloranfenicol, gentamicina, higromicina, kanamicina, lincomicina, metotrexato, fosfotricina, puromicina y tetraciclina. Los métodos de determinación de la modulación de un gen reportero son muy conocidos en la técnica, e incluyen, pero no se limitan a, métodos fluorimétricos (por ejemplo, espectroscopía de fluorescencia, citometría de flujo activada por fluorescencia (FACS), microscopía de fluorescencia), determinación de la resistencia a antibióticos.
- 55 La expresión de la proteína BDNF y de ARNm puede ensayarse usando métodos conocidos para aquellos expertos en la materia y descritos en cualquier parte en el presente documento. Por ejemplo, pueden usarse inmunoensayos tales como ELISA para medir niveles de proteína. Los kit de ELISA de BDNF están comercialmente disponibles, por ejemplo, de R&D Systems (Mineápolis, MN).

En aspectos, la expresión de BDNF (por ejemplo, ARNm o proteína) en una muestra (por ejemplo, células o tejidos *in vivo* o *in vitro*) tratada usando un oligonucleótido antisentido de la divulgación se evalúa comparando con la expresión de BDNF en una muestra de control. Por ejemplo, la expresión de la proteína o ácido nucleico puede compararse usando métodos conocidos para aquellos expertos en la materia con aquella en una muestra tratada con vector vacío o sin tratar. Alternativamente, la comparación con una muestra tratada con un oligonucleótido antisentido de control (por ejemplo, una que tiene una secuencia alterada o diferente) puede hacerse dependiendo de la información deseada. En otro aspecto, una diferencia en la expresión de la proteína o ácido nucleico BDNF en una muestra tratada frente a sin tratar puede compararse con la diferencia en la expresión de un ácido nucleico diferente (incluyendo cualquier estándar considerado apropiado por el investigador, por ejemplo, un gen de mantenimiento) en una muestra tratada frente a una muestra sin tratar.

Las diferencias observadas pueden expresarse según se desee, por ejemplo, en forma de una relación o fracción, para su uso en una comparación con control. En aspectos, el nivel de ARNm de BDNF o proteína, en una muestra tratada con un oligonucleótido antisentido de la presente divulgación, disminuye o aumenta aproximadamente 1,25 veces a aproximadamente 10 veces o más con respecto a una muestra sin tratar o una muestra tratada con un ácido nucleico de control. En aspectos, el nivel de ARNm de BDNF o proteína aumenta o disminuye al menos aproximadamente 1,25 veces, al menos aproximadamente 1,3 veces, al menos aproximadamente 1,4 veces, al menos aproximadamente 1,5 veces, al menos aproximadamente 1,6 veces, al menos aproximadamente 1,7 veces, al menos aproximadamente 1,8 veces, al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 2,5 veces, al menos aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 3,5 veces, al menos aproximadamente 4 veces, al menos aproximadamente 4,5 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 5,5 veces, al menos aproximadamente 6 veces, al menos aproximadamente 6,5 veces, al menos aproximadamente 7 veces, al menos aproximadamente 7,5 veces, al menos aproximadamente 8 veces, al menos aproximadamente 8,5 veces, al menos aproximadamente 9 veces, al menos aproximadamente 9,5 veces, o al menos aproximadamente 10 veces o más.

Kits, reactivos de investigación, diagnósticos y terapéuticos

Los compuestos de la presente divulgación pueden utilizarse para diagnóstico, agentes terapéuticos y profilaxis, y como reactivos de investigación y componentes de kits. Además, los oligonucleótidos antisentido, que son capaces de inhibir la expresión génica con exquisita especificidad, se usan frecuentemente por aquellos expertos para aclarar la función de genes particulares o para distinguir entre funciones de diversos miembros de una vía biológica.

Para su uso en kits y diagnósticos y en diversos sistemas biológicos, los compuestos de la presente divulgación, tanto solo como en combinación con otros compuestos o terapéuticos, son útiles como herramientas en análisis diferenciales y/o combinatorios para aclarar patrones de expresión de una porción o del complemento entero de genes expresados dentro de células y tejidos.

Como se usa en el presente documento, el término "sistema biológico" o "sistema" se define como cualquier organismo, célula, cultivo celular o tejido que expresa, o se ha hecho competente para expresar productos de genes del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF). Éstos incluyen, pero no se limitan a, seres humanos, animales transgénicos, células, cultivos celulares, tejidos, xenoinjertos, trasplantes y combinaciones de los mismos.

Como un ejemplo no limitante, patrones de expresión dentro de células o tejidos tratados con uno o más compuestos antisentido se comparan con células o tejidos de control no tratados con compuestos antisentido y los patrones producidos se analizan para niveles diferenciales de expresión génica ya que están relacionados, por ejemplo, con asociación de enfermedad, vía de señalización, localización celular, nivel de expresión, tamaño, estructura o función de los genes examinados. Estos análisis pueden realizarse en células estimuladas o sin estimular y en presencia o ausencia de otros compuestos que afectan los patrones de expresión.

Ejemplos de métodos de análisis de la expresión génica conocidos en la técnica incluyen matrices o micromatrices de ADN (Brazma and Vilo, (2000) FEBS Lett., 480, 17-24; Celis, et al., (2000) FEBS Lett., 480, 2-16), SAGE (análisis en serie de la expresión génica) (Madden, et al., (2000) Drug Discov. Today, 5, 415- 425), READS (amplificación por enzima de restricción de ADN digeridos) (Prashar and Weissman, (1999) Methods Enzymol., 303, 258-72), TOGA (análisis de la expresión génica total) (Sutcliffe, et al., (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 97, 1976-81), matrices de proteínas y proteómica (Celis, et al., (2000) FEBS Lett., 480, 2-16; Jungblut, et al., Electrophoresis, 1999, 20, 2100-10), secuenciación de marcadores de secuencia expresada (EST) (Celis, et al., FEBS Lett., 2000, 480, 2-16; Larsson, et al., J. Biotechnol., 2000, 80, 143-57), huellas genómicas de ARN sustractivas (SuRF) (Fuchs, et al., (2000) Anal. Biochem. 286, 91-98; Larson, et al., (2000) Cytometry 41, 203-208), clonación sustractiva, expresión

diferencial (DD) (Jurecic and Belmont, (2000) Curr. Opin. Microbiol. 3, 316-21), hibridación genómica comparativa (Carulli, et al., (1998) J. Cell Biochem. Suppl., 31, 286-96), técnicas de FISH (hibridación *in situ* fluorescente) (Going and Gusterson, (1999) Eur. J. Cancer, 35, 1895-904) y métodos de espectrometría de masas (To, Comb. (2000) Chem. High Throughput Screen, 3, 235-41).

5

Los compuestos de la divulgación son útiles para investigación y diagnóstico, debido a que estos compuestos hibridan con ácidos nucleicos que codifican factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF). Por ejemplo, los oligonucleótidos que hibridan con tal eficiencia y bajo tales condiciones que se han descrito en el presente documento por ser eficaces. Los moduladores del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) son cebadores o

10 sondas eficaces en condiciones que favorecen la amplificación génica o detección, respectivamente. Estos cebadores y sondas son útiles en métodos que requieren la detección específica de moléculas de ácidos nucleicos que codifican factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) y en la amplificación de dichas moléculas de ácidos nucleicos para la detección o para su uso en estudios adicionales del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF). La hibridación de los oligonucleótidos antisentido, particularmente los cebadores y sondas, de la divulgación

15 con un ácido nucleico que codifica factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) puede detectarse por medios conocidos en la técnica. Tales medios pueden incluir conjugación de una enzima con el oligonucleótido, radiomarcado del oligonucleótido, o cualquier otro medio de detección adecuado. También pueden prepararse kits que usan tales medios de detección para detectar el nivel del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) en una muestra.

20

La especificidad y sensibilidad de antisentido también se emplea por aquellos expertos en la materia para usos terapéuticos. Se han empleado oligonucleótidos antisentido como restos terapéuticos en el tratamiento de estados de enfermedad en animales, que incluyen seres humanos. Los fármacos de oligonucleótido antisentido se han administrado con seguridad y eficazmente a seres humanos y numerosos ensayos clínicos están actualmente en

25 marcha. Así, se establece que los compuestos antisentido pueden ser modalidades terapéuticas útiles que pueden configurarse para ser útiles en pautas de tratamiento para el tratamiento de células, tejidos y animales, especialmente seres humanos.

Para terapéuticos, un animal, preferentemente un ser humano, que se sospecha que tiene una enfermedad o

30 trastorno que puede tratarse modulando la expresión del polinucleótidos del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) se trata administrando compuestos antisentido según la presente divulgación. Por ejemplo, en un aspecto no limitante, los métodos comprenden la etapa de administrar al animal en necesidad de tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz del modulador del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF). Los moduladores del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) de la presente divulgación modulan eficazmente la actividad del

35 factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) o modulan la expresión de la proteína del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF). En un aspecto, la actividad o expresión del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) en un animal se inhibe aproximadamente el 10 % en comparación con un control. Preferentemente, la actividad o expresión del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) en un animal se inhibe aproximadamente el 30 %. Más preferentemente, la actividad o expresión del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) en un animal se inhibe

40 el 50 % o más. Así, los compuestos oligoméricos modulan la expresión del ARNm de factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) al menos el 10 %, al menos el 50 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o el 100 % en comparación con un control.

45 En un aspecto, la actividad o expresión del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) y/o en un animal se eleva aproximadamente el 10 % en comparación con un control. Preferentemente, la actividad o expresión del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) en un animal se eleva aproximadamente el 30 %. Más preferentemente, la actividad o expresión del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) en un animal se eleva el 50 % o más. Así, los compuestos oligoméricos modulan la expresión del ARNm de factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) al

50 menos el 10 %, al menos el 50 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o el 100 % en comparación con un control.

Por ejemplo, la reducción de la expresión del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) puede medirse en

55 suero, sangre, tejido adiposo, hígado o cualquier otro líquido corporal, tejido u órgano del animal. Preferentemente, las células contenidas dentro de dichos líquidos, tejidos u órganos que se analizan contienen una molécula de ácido nucleico que codifica péptidos del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) y/o la propia proteína del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF).

Los compuestos de la divulgación pueden utilizarse en composiciones farmacéuticas añadiendo una cantidad eficaz de un compuesto a un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado. El uso de los compuestos y métodos de la divulgación también pueden ser útiles profilácticamente.

5 Conjugados

Otra modificación de los oligonucleótidos de la divulgación implica enlazar químicamente al oligonucleótido uno o más restos o conjugados que potencian la actividad, distribución celular o captación celular del oligonucleótido. Estos restos o conjugados pueden incluir grupos conjugados covalentemente unidos a grupos funcionales tales como

10 grupos hidroxilo primarios o secundarios. Grupos conjugados de la divulgación incluyen intercaladores, moléculas indicadoras, poliaminas, poliamidas, polietilenglicoles, poliéteres, grupos que potencian las propiedades farmacodinámicas de oligómeros, y grupos que potencian las propiedades farmacocinéticas de oligómeros. Grupos conjugados típicos incluyen colesterol, lípidos, fosfolípidos, biotina, fenazina, folato, fenantridina, antraquinona, acridina, fluoresceínas, rodaminas, cumarinas y colorantes. Grupos que potencian las propiedades

15 farmacodinámicas, en el contexto de la presente divulgación, incluyen grupos que mejoran la captación, potencian la resistencia a la degradación y/o fortalecen la hibridación específica de secuencia con el ácido nucleico diana. Grupos que potencian las propiedades farmacocinéticas, en el contexto de la presente divulgación, incluyen grupos que mejoran la captación, distribución, metabolismo o eliminación de los compuestos de la presente divulgación. Grupos conjugados representativos se desvelan en la solicitud de patente internacional N°. PCT/US92/09196, presentada el

20 23 de octubre de 1992, y la patente de EE.UU. N° 6.287.860. Restos conjugados incluyen, pero no se limitan a, restos de lípido tales como un resto colesterol, ácido cólico, un tioéter, por ejemplo, hexil-5-tritilol, un tiocolesterol, una cadena alifática, por ejemplo, residuos de dodecanodiol o undecilo, un fosfolípido, por ejemplo, di-hexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato de trietilamonio, una poliamina o una cadena de polietilenglicol, o ácido adamantanoacético, un resto palmitilo, o un resto octadecilamina o hexilamino-carbonil-oxicolesterol. Los oligonucleótidos de la divulgación también pueden conjugarse con principios activos, por ejemplo,

25 aspirina, warfarina, fenilbutazona, ibuprofeno, suprofen, fenbupreno, ketoprofeno, (S)-(+)-pranoprofeno, carprofeno, dansilsarcosina, ácido 2,3,5-triiodobenzoico, ácido flufenámico, ácido folínico, una benzotiadiazida, clorotiazida, una diazepina, indometacina, un barbitúrico, una cefalosporina, un fármaco sulfa, un antidiabético, un antibacteriano o un antibiótico.

30 Patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de tales oligonucleótidos conjugados incluyen, pero no se limitan a, las patentes de EE.UU. N° 4.828.979; 4.948.882; 5.218.105; 5.525.465; 5.541.313; 5.545.730; 5.552.538; 5.578.717; 5.580.731; 5.580.731; 5.591.584; 5.109.124; 5.118.802; 5.138.045; 5.414.077; 5.486.603; 5.512.439; 5.578.718; 5.608.046; 4.587.044; 4.605.735; 4.667.025; 4.762.779; 4.789.737; 4.824.941; 35 4.835.263; 4.876.335; 4.904.582; 4.958.013; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.245.022; 5.254.469; 5.258.506; 5.262.536; 5.272.250; 5.292.873; 5.317.098; 5.371.241; 5.391.723; 5.416.203; 5.451.463; 5.510.475; 5.512.667; 5.514.785; 5.565.552; 5.567.810; 5.574.142; 5.585.481; 5.587.371; 5.595.726; 5.597.696; 5.599.923; 5.599.928 y 5.688.941.

40 Formulaciones

Los compuestos de la divulgación también pueden mezclarse, encapsularse, conjugarse o asociarse de otro modo a otras moléculas, estructuras de molécula o mezclas de compuestos, como, por ejemplo, liposomas, moléculas dirigidas a receptor, formulaciones orales, rectales, tópica u otras, para ayudar en la captación, distribución y/o

45 absorción. Patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de tales formulaciones que ayudan en la captación, distribución y/o absorción incluyen, pero no se limitan a, las patentes de EE.UU. N° 5.108.921; 5.354.844; 5.416.016; 5.459.127; 5.521.291; 5.543.165; 5.547.932; 5.583.020; 5.591.721; 4.426.330; 4.534.899; 5.013.556; 5.108.921; 5.213.804; 5.227.170; 5.264.221; 5.356.633; 5.395.619; 5.416.016; 5.417.978; 5.462.854; 5.469.854; 5.512.295; 5.527.528; 5.534.259; 5.543.152; 5.556.948; 5.580.575; y 5.595.756.

50 Aunque los oligonucleótidos antisentido no necesitan administrarse en el contexto de un vector con el fin de modular una expresión y/o función de diana, aspectos de la divulgación se refieren a construcciones de vector de expresión para la expresión de oligonucleótidos antisentido, que comprende promotores, secuencias de genes promotores híbridos y poseen una fuerte actividad constitutiva promotora, o una actividad de promotor que puede inducirse en el

55 caso deseado.

En un aspecto, la práctica de la divulgación implica administrar al menos uno de los oligonucleótidos antisentido anteriores con un sistema de administración de ácidos nucleicos adecuado. En un aspecto, ese sistema incluye un vector no viral operativamente ligado al polinucleótido. Ejemplos de tales vectores no virales incluyen el

oligonucleótido solo (por ejemplo, una cualquiera o más de SEQ ID NOS: 3 a 8) o en combinación con una formulación de proteína, polisacárido o lípido adecuada.

- 5 Sistemas de administración de ácidos nucleicos adecuados adicionales incluyen vector viral, normalmente secuencia de al menos uno de un adenovirus, virus asociado a adenovirus (AAV), adenovirus dependiente de cooperador, retrovirus, o complejo de virus hemaglutinante de Japón-liposoma (HVJ). Preferentemente, el vector viral comprende un promotor de eucariota fuerte operativamente enlazado al polinucleótido, por ejemplo, un promotor del citomegalovirus (CMV).
- 10 Vectores preferidos adicionales incluyen vectores virales, proteínas de fusión y conjugados químicos. Los vectores retrovirales incluyen virus de la leucemia murina de Moloney y virus basados en el VIH. Un vector viral basado en el VIH preferido comprende al menos dos vectores en los que los genes gag y pol son de un genoma del VIH y el gen env es de otro virus. Se prefieren vectores virales de ADN. Estos vectores incluyen vectores de pox tales como vectores de ortopox o avipox, vectores del virus del herpes tales como un vector del virus del herpes simple I (HSV)
- 15 [Geller, A.I. et al., (1995) J. Neurochem, 64: 487; Lim, F., et al., en DNA Cloning: Mammalian Systems, D. Glover, Ed. (Oxford Univ. Press, Oxford England) (1995); Geller, A.I. et al., (1993) Proc Natl. Acad. Sci.: U.S.A.:90 7603; Geller, A.I., et al., (1990) Proc Natl. Acad. Sci USA: 87:1149], vectores de adenovirus (LeGal LaSalle et al., Science, 259:988 (1993); Davidson, et al., (1993) Nat. Genet. 3: 219; Yang, et al., (1995) J. Virol. 69: 2004) y vectores de virus adeno-asociados (Kaplitt, M.G., et al., (1994) Nat. Genet. 8:148).
- 20 Los compuestos antisentido de la divulgación engloban cualquier sal farmacéuticamente aceptable, éster o sal de tales ésteres, o cualquier otro compuesto que, tras la administración a un animal, que incluye un ser humano, es capaz de proporcionar (directamente o indirectamente) el metabolito biológicamente activo o residuo del mismo.
- 25 El término "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales fisiológicamente y farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la divulgación: es decir, sales que retienen la actividad biológica deseada del compuesto parental y no confieren efectos toxicológicos no deseados al mismo. Para oligonucleótidos, ejemplos preferidos de sales farmacéuticamente aceptables y sus usos se describen adicionalmente en la patente de EE.UU. N° 6.287.860.
- 30 La presente divulgación también incluye composiciones farmacéuticas y formulaciones que incluyen los compuestos antisentido de la divulgación. Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación pueden administrarse en varias formas que dependen de si se desea tratamiento local o sistémico y del área que va a tratarse. La administración puede ser tópica (incluyendo oftálmica y a membranas mucosas que incluyen administración vaginal y rectal), pulmonar, por ejemplo, por inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, que incluye por nebulizador;
- 35 intratraqueal, intranasal, epidérmica y transdérmica), oral o parenteral. La administración parenteral incluye inyección o infusión intravenosa, intrarterial, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular; o administración intracraneal, por ejemplo, intratecal o intraventricular.
- Para tratar tejidos en el sistema nervioso central, la administración puede hacerse por, por ejemplo, inyección o
- 40 infusión en el líquido cefalorraquídeo. La administración de ARN antisentido en líquido cefalorraquídeo se describe, por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. N°. 2007/0117772, "Methods for slowing familial ALS disease progression".
- Si se pretende que el oligonucleótido antisentido de la presente divulgación se administre a células en el sistema
- 45 nervioso central, la administración puede ser con uno o más agentes capaces de promover la penetración del oligonucleótido antisentido objeto a través de la barrera hematoencefálica. La inyección puede hacerse, por ejemplo, en la corteza entorrinal o hipocampo. La administración de factores neurotróficos por administración de un vector de adenovirus a neuronas motoras en tejido muscular describe es, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 6.632.427, "Adenoviral-vector-mediated gene transfer into medullary motor neurons". La administración de vectores
- 50 directamente al cerebro, por ejemplo, el estriado, el tálamo, el hipocampo, o la sustancia negra, se conoce en la técnica y se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. N° 6.756.523, "Adenovirus vectors for the transfer of foreign genes into cells of the central nervous system particularly in brain". La administración puede ser rápida como mediante inyección o hacerse durante un periodo de tiempo como por infusión o administración lenta de formulaciones de liberación lenta.
- 55 Los oligonucleótidos antisentido objeto también puede enlazarse o conjugarse con agentes que proporcionan propiedades farmacéuticas o farmacodinámicas deseables. Por ejemplo, el oligonucleótido antisentido puede acoplarse a cualquier sustancia, conocida en la técnica para promover la penetración o transporte a través de la barrera hematoencefálica, tal como un anticuerpo para el receptor de transferrina, y administrarse mediante

inyección intravenosa. El compuesto antisentido puede enlazarse con un vector viral, por ejemplo, que hace al compuesto antisentido más eficaz y/o aumenta el transporte del compuesto antisentido a través de la barrera hematoencefálica. La rotura osmótica de la barrera hematoencefálica también puede llevarse a cabo por, por ejemplo, infusión de azúcares que incluyen, pero no se limitan a, mesoeritritol, xilitol, D(+) galactosa, D(+) lactosa, D(+) xilosa, dulcitol, mioinositol, L(-) fructosa, D(-) manitol, D(+) glucosa, D(+) arabinosa, D(-) arabinosa, celobiosa, D(+) maltosa, D(+) rafinosa, L(+) ramnosa, D(+) melibiosa, D(-) ribosa, adonitol, D(+) arabitól, L(-) arabitól, D(+) fucosa, L(-) fucosa, D(-) lixosa, L(+) lixosa y L(-) lixosa, o aminoácidos que incluyen, pero no se limitan a, glutamina, lisina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glicina, histidina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, tirosina, valina y taurina. Métodos y materiales para potenciar la penetración de la barrera hematoencefálica se describen, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. N° 4.866.042, "Method for the delivery of genetic material across the blood brain barrier", 6.294.520, "Material for passage through the blood-brain barrier", y 6.936.589, "Parenteral delivery systems".

Los compuestos antisentido objeto pueden mezclarse, encapsularse, conjugarse o asociarse de otro modo a otras moléculas, estructuras de molécula o mezclas de compuestos, por ejemplo, liposomas, moléculas dirigidas a receptor, formulaciones orales, rectales, tópica u otras, para ayudar en la captación, distribución y/o absorción. Por ejemplo, pueden incluirse lípidos catiónicos en la formulación para facilitar la captación de oligonucleótidos. Se mostró que una composición tal que facilitaba la captación es LIPOFECTIN (disponible de GIBCO-BRL, Bethesda, MD).

Se cree que los oligonucleótidos con al menos una modificación de 2'-O-metoxietilo son particularmente útiles para administración por vía oral. Composiciones farmacéuticas y formulaciones para administración tópica pueden incluir parches transdérmicos, pomadas, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, esprays, líquidos y polvos. Pueden ser necesarios o deseables vehículos farmacéuticos convencionales, bases acuosas, en polvo o aceitosas, espesantes y similares. También pueden ser útiles preservativos recubiertos, guantes y similares.

Las formulaciones farmacéuticas de la presente divulgación, que pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria, pueden prepararse según técnicas convencionales muy conocidas en la industria farmacéutica. Tales técnicas incluyen la etapa de poner en asociación los principios activos con el (los) vehículo(s) farmacéutico(s) o excipiente(s). En general, las formulaciones se preparan poniendo en asociación uniforme e íntimamente los principios activos con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos, o ambos, y luego, si fuera necesario, moldeando el producto.

Las composiciones de la presente divulgación pueden formularse en cualquiera de muchas formas de dosificación posibles tales como, pero no se limitan a, comprimidos, cápsulas, cápsulas de gel, jarabes líquidos, geles blandos, supositorios y enemas. Las composiciones de la presente divulgación también pueden formularse como suspensiones en medios acuosos, no acuosos o mixtos. Las suspensiones acuosas pueden contener adicionalmente sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión que incluyen, por ejemplo, carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol y/o dextrano. La suspensión también puede contener estabilizadores.

Composiciones farmacéuticas de la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a, disoluciones, emulsiones, espumas y formulaciones que contienen liposomas. Las composiciones farmacéuticas y formulaciones de la presente divulgación pueden comprender uno o más potenciadores de la penetración, vehículos, excipientes u otros principios activos o inactivos.

Las emulsiones normalmente son sistemas heterogéneos de un líquido dispersado en otro en forma de gotitas que normalmente superan 0,1 μm de diámetro. Las emulsiones pueden contener componentes adicionales, además de las fases dispersas, y el fármaco activo que puede estar presente como una disolución en o bien la fase acuosa, fase aceitosa o bien él mismo como una fase separada. Las microemulsiones están incluidas como un aspecto de la presente divulgación. Las emulsiones y sus usos son muy conocidos en la técnica y se describen adicionalmente en la patente de EE.UU. N° 6.287.860.

Formulaciones de la presente divulgación incluyen formulaciones liposomales. Como se usa en la presente divulgación, el término "liposoma" significa una vesícula compuesta de lípidos anfifílicos dispuestos en una bicapa o bicapas esféricas. Los liposomas son vesículas unilaminares o multilaminares que tienen una membrana formada de un material lipófilo y un interior acuoso que contiene la composición que va a administrarse. Los liposomas catiónicos son liposomas positivamente cargados que se cree que interaccionan con moléculas de ADN negativamente cargadas para formar un complejo estable. Se cree que los liposomas que son sensibles al pH o están cargados negativamente atapan el ADN en vez de complejarse con él. Se han usado tanto liposomas

cati3nicos como no cati3nicos para administrar ADN a c3lulas.

Los liposomas tambi3n incluyen liposomas "est3ricamente estabilizados", un t3rmino que, como se usa en el presente documento, se refiere a liposomas que comprenden uno o m3s l3pidos especializados. Cuando se incorporan en liposomas, estos l3pidos especializados producen liposomas con vidas en duraci3n mejoradas con respecto a los liposomas que carecen de tales l3pidos especializados. Ejemplos de liposomas est3ricamente estabilizados son aquellos en los que parte de la porci3n de l3pido formado de ves3cula del liposoma comprende uno o m3s glicol3pidos o se derivatiza con uno o m3s pol3meros hidr3filos, tales como un resto de polietilenglicol (PEG). Los liposomas y sus usos se describen adicionalmente en la patente de EE.UU. N3 6.287.860.

10 Las formulaciones farmac3uticas y composiciones de la presente divulgaci3n tambi3n pueden incluir tensioactivos. El uso de tensioactivos en medicamentos, formulaciones y en emulsiones es muy conocido en la t3cnica. Tensioactivos y sus usos se describen adicionalmente en la patente de EE.UU. N3 6.287.860.

15 En un aspecto, la presente divulgaci3n emplea diversos potenciadores de la penetraci3n para efectuar la eficaz administraci3n de 3cidos nucleicos, particularmente oligonucle3tidos. Adem3s de ayudar en la difusi3n de f3rmacos no lip3filos a trav3s de membranas celulares, los potenciadores de la penetraci3n tambi3n potencian la permeabilidad de f3rmacos lip3filos. Los potenciadores de la penetraci3n pueden clasificarse como que pertenecen a una de cinco amplias categor3as, es decir, tensioactivos, 3cidos grasos, sales biliares, agentes quelantes y no tensioactivos no quelantes. Los potenciadores de la penetraci3n y sus usos se describen adicionalmente en la patente de EE.UU. N3 6.287.860.

Un experto en la materia reconocer3 que las formulaciones se dise1an rutinariamente seg3n su uso previsto, es decir, v3a de administraci3n.

25 Formulaciones preferidas para administraci3n t3pica incluyen aquellas en las que los oligonucle3tidos de la divulgaci3n est3n en mezcla con un agente de administraci3n t3pica tal como l3pidos, liposomas, 3cidos grasos, 3steres de 3cidos grasos, esteroides, agentes quelantes y tensioactivos. L3pidos y liposomas preferidos incluyen neutros (por ejemplo, dioleoil-fosfatidiletanolamina DOPE, dimiristoilfosfatidilcolina DMPC, diestearoilfosfatidilcolina) negativos (por ejemplo, dimiristoilfosfatidilglicerol DMPG) y cati3nicos (por ejemplo, dioleoil-tetrametilaminopropilo DOTAP y dioleoil-fosfatidiletanolamina DOTMA).

30 Para administraci3n t3pica u otra, los oligonucle3tidos de la divulgaci3n pueden encapsularse dentro de liposomas o pueden formar complejos con los mismos, en particular con liposomas cati3nicos. Alternativamente, los oligonucle3tidos pueden estar complejados con l3pidos, en particular con l3pidos cati3nicos. 3cidos grasos y 3steres preferidos, sales farmac3uticamente aceptables de los mismos, y sus usos se describen adicionalmente en la patente de EE.UU. N3 6.287.860.

35 Las composiciones y formulaciones para administraci3n por v3a oral incluyen polvos o gr3nulos, microp3rticulas, nanop3rticulas, suspensiones o disoluciones en agua o medios no acuosos, c3psulas, c3psulas de gel, sobres, comprimidos o minicomprimidos. Pueden ser deseables espesantes, aromatizantes, diluyentes, emulsionantes, adyuvantes de dispersi3n o aglutinantes. Formulaciones orales preferidas son aquellas en las que los oligonucle3tidos de la divulgaci3n se administran conjuntamente con uno o m3s potenciadores de la penetraci3n, tensioactivos y quelantes. Tensioactivos preferidos incluyen 3cidos grasos y/o 3steres o sales de los mismos, 3cidos biliares y/o sales de los mismos. 3cidos biliares/sales y 3cidos grasos preferidos y sus usos se describen adicionalmente en la patente de EE.UU. N3 6.287.860. Tambi3n se prefieren combinaciones de potenciadores de la penetraci3n, por ejemplo, 3cidos grasos/sales en combinaci3n con 3cidos biliares/sales. Una combinaci3n particularmente preferida es la sal de sodio de 3cido l3urico, 3cido c3prico y UDCA. Potenciadores de la penetraci3n adicionales incluyen 3ter polioxietilen-9-laur3lico, 3ter polioxietilen-20-cet3lico. Los oligonucle3tidos de la divulgaci3n pueden administrarse por v3a oral, en forma granulada que incluye p3rticulas secadas por pulverizaci3n, o complejados para formar micro o nanop3rticulas. Los agentes de complejantes de oligonucle3tidos y sus usos se describen adicionalmente en la patente de EE.UU. N3 6.287.860.

45 Las composiciones y formulaciones para administraci3n parenteral, intratecal o intraventricular pueden incluir disoluciones acuosas est3riles que tambi3n pueden contener tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados tales como, pero no se limitan a, potenciadores de la penetraci3n, compuestos portadores y otros veh3culos o excipientes farmac3uticamente aceptables.

Ciertos aspectos de la divulgaci3n proporcionan composiciones farmac3uticas que contienen uno o m3s compuestos

- oligoméricos y uno o varios de otros agentes quimioterapéuticos que funcionan por un mecanismo no antisentido. Ejemplos de tales agentes quimioterapéuticos incluyen, pero no se limitan a, fármacos quimioterapéuticos para el cáncer tales como daunorubicina, daunomicina, dactinomicina, doxorubicina, epirubicina, idarubicina, esorubicina, bleomicina, mafosfamida, ifosfamida, citosina arabinósido, biscloroetil-nitrosurea, busulfano, mitomicina C, actinomicina D, mitramicina, prednisona, hidroxiprogesterona, testosterona, tamoxifeno, dacarbazina, procarbazina, hexametilmelamina, pentametilmelamina, mitoxantrona, amsacrina, clorambucilo, metilciclohexilnitrosurea, mostazas de nitrógeno, melfalan, ciclofosfamida, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-azacitidina, hidroxiurea, desoxicoformicina, 4-hidroxiperoxíciclo-fosforamida, 5-fluorouracilo (5-FU), 5-fluorodesoxiuridina (5-FUdR), metotrexato (MTX), colchicina, taxol, vincristina, vinblastina, etopósido (VP-16), trimetrexato, irinotecán, topotecán, gemcitabina, tenipósido, cisplatino y dietilestilbestrol (DES). Cuando se usa con los compuestos de la divulgación, tales agentes quimioterapéuticos pueden usarse individualmente (por ejemplo, 5-FU y oligonucleótido), secuencialmente (por ejemplo, 5-FU y oligonucleótido durante un periodo de tiempo seguido de MTX y oligonucleótido), o en combinación con uno o varios de otros de tales agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, 5-FU, MTX y oligonucleótido, o 5-FU, radioterapia y oligonucleótido). Fármacos antiinflamatorios, que incluyen, pero no se limitan a, fármacos antiinflamatorios no esteroideos y corticosteroides, y fármacos antivirales, que incluyen, pero no se limitan a, ribivirina, vidarabina, aciclovir y ganciclovir, también pueden combinarse en composiciones de la divulgación. Las combinaciones de compuestos antisentido y otros fármacos no antisentido también están dentro del alcance de la presente divulgación. Pueden usarse dos o más compuestos combinados juntos o secuencialmente.
- En otro aspecto relacionado, las composiciones de la divulgación pueden contener uno o más compuestos antisentido, particularmente oligonucleótidos, dirigidos a un primer ácido nucleico y uno o más compuestos antisentido adicionales dirigidos a un segundo ácido nucleico diana. Por ejemplo, la primera diana puede ser una secuencia antisentido particular del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), y la segunda diana puede ser una región de otro secuencia de nucleótidos. Alternativamente, las composiciones de la divulgación pueden contener dos o más compuestos antisentido dirigidos a diferentes regiones del mismo ácido nucleico diana del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF). Se ilustran numerosos ejemplos de compuestos antisentido en el presente documento y otros pueden seleccionarse de entre compuestos adecuados conocidos en la técnica. Pueden usarse dos o más compuestos combinados juntos o secuencialmente.
- Dosificación:**
- Se cree que la formulación de composiciones terapéuticas y su posterior administración (dosificación) están dentro de la experiencia de aquellos en la materia. La dosificación depende de la gravedad y sensibilidad del estado de enfermedad que va a tratarse, durando el ciclo de tratamiento de varios días a varios meses, o hasta que se efectúe una cura o se logre una disminución del estado de enfermedad. Pueden calcularse programas de dosificación óptimos a partir de mediciones de acumulación de fármaco en el cuerpo del paciente. Los expertos pueden determinar fácilmente dosificaciones óptimas, metodologías de dosificación y tasas de repetición. Las dosificaciones óptimas pueden variar dependiendo de la potencia relativa de oligonucleótidos individuales, y generalmente pueden estimarse basándose en las CE50 que se encuentra que son eficaces en modelos animales *in vitro* e *in vivo*. En general, la dosificación es de 0,01 µg a 100 g por kg de peso corporal, y puede administrarse una vez o más diariamente, semanalmente, mensualmente o anualmente, o incluso una vez cada 2 a 20 años. Los expertos habituales en la materia pueden estimar fácilmente tasas de repetición para la dosificación basándose en tiempos de residencia medidos y concentraciones del fármaco en fluidos corporales o tejidos. Tras el tratamiento satisfactorio, puede desearse que el paciente reciba terapia de mantenimiento para prevenir la reaparición del estado de enfermedad, en el que el oligonucleótido se administra en dosis de mantenimiento, que oscilan de 0,01 µg a 100 g por kg de peso corporal, una vez o más diariamente, a una vez cada 20 años. En aspectos, un paciente se trata con una dosificación de fármaco que es al menos aproximadamente 1, al menos aproximadamente 2, al menos aproximadamente 3, al menos aproximadamente 4, al menos aproximadamente 5, al menos aproximadamente 6, al menos aproximadamente 7, al menos aproximadamente 8, al menos aproximadamente 9, al menos aproximadamente 10, al menos aproximadamente 15, al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 25, al menos aproximadamente 30, al menos aproximadamente 35, al menos aproximadamente 40, al menos aproximadamente 45, al menos aproximadamente 50, al menos aproximadamente 60, al menos aproximadamente 70, al menos aproximadamente 80, al menos aproximadamente 90, o al menos aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal. Ciertas dosificaciones inyectadas de oligonucleótidos antisentido se describen, por ejemplo, en la patente de EE.UU. N° 7.563.884, "Antisense modulation of PTP1B expression".

Aunque diversos aspectos de la presente divulgación se han descrito anteriormente, debe entenderse que se han presentado a modo de ejemplo solo, y no limitación. Pueden hacerse numerosos cambios a los aspectos descritos según la divulgación en el presente documento sin apartarse del espíritu o alcance de la divulgación. Así, la anchura

y alcance de la presente divulgación no debe limitarse por cualquiera de los aspectos anteriormente descritos.

Por su citación de diversas referencias en este documento, los solicitantes no admiten que ninguna referencia particular sea “estado de la técnica” a su invención. Casos de composiciones y métodos inventivos se ilustran en los siguientes ejemplos.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos no limitantes sirven para ilustrar aspectos seleccionados de la divulgación. Se apreciará que variaciones en proporciones y alternativas en elementos de los componentes mostrados serán evidentes para aquellos expertos en la materia y están dentro del alcance de aspectos de la presente divulgación.

Ejemplo 1: Diseño de oligonucleótidos antisentido específicos para una molécula de ácido nucleico antisentido para un polinucleótido del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) y/o una hebra codificante de polinucleótido del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF)

Como se indica anteriormente el término “oligonucleótido específico para” u “dianas de oligonucleótido” se refiere a un oligonucleótido que tiene una secuencia (i) capaz de formar un complejo estable con una porción del gen elegido como diana, o (ii) capaz de formar un dúplex estable con una porción de un transcrito de ARNm del gen elegido como diana.

La selección de oligonucleótidos apropiados se facilita usando programas informáticos que alinean automáticamente secuencias de ácidos nucleicos e indican regiones de identidad u homología. Tales programas se usan para comparar secuencias de ácidos nucleicos obtenidas, por ejemplo, buscando en bases de datos tales como GenBank o secuenciando productos de PCR. La comparación de secuencias de ácidos nucleicos de un intervalo de especies permite la selección de secuencias de ácidos nucleicos que muestran un grado de identidad apropiado entre especies. En el caso de genes que no se han secuenciado, se realizan Southern blots para permitir una determinación del grado de identidad entre genes en especies diana y otras especies. Realizando Southern blots a grados de rigurosidad variables, como es muy conocido en la técnica, es posible obtener una medida aproximada de la identidad. Estos procedimientos permiten la selección de oligonucleótidos que presentan un alto grado de complementariedad con secuencias de ácidos nucleicos diana en un sujeto que va a controlarse y un menor grado de complementariedad con secuencias de ácidos nucleicos correspondientes en otras especies. Un experto en la materia se dará cuenta de que hay libertad considerable en la selección de regiones apropiadas de genes para su uso en la presente divulgación.

Un compuesto antisentido es “específicamente hibridable” cuando la unión del compuesto al ácido nucleico diana interfiere con la función normal del ácido nucleico diana para producir una modulación de la función y/o actividad, y hay un grado suficiente de complementariedad para evitar la unión no específica del compuesto antisentido a secuencias de ácidos nucleicos no diana en condiciones en las que la unión específica se desea, es decir, bajo condiciones fisiológicas en el caso de ensayos *in vivo* o tratamiento terapéutico, y en condiciones en las que los ensayos se realizan en el caso de ensayos *in vitro*.

Las propiedades de hibridación de los oligonucleótidos descritos en el presente documento pueden determinarse por uno o más ensayos *in vitro* como se conoce en la técnica. Por ejemplo, las propiedades de los oligonucleótidos descritos en el presente documento pueden obtenerse por determinación de la intensidad de unión entre el antisentido natural diana y una posible molécula de fármaco usando el ensayo de la curva de fusión.

La intensidad de unión entre el antisentido natural diana y una posible molécula de fármaco (molécula) puede estimarse usando cualquiera de los métodos establecidos de medición de la intensidad de interacciones intermoleculares, por ejemplo, un ensayo de la curva de fusión.

El ensayo de la curva de fusión determina la temperatura a la que se produce una rápida transición de conformación bicatenaria a monocatenaria para el complejo de antisentido natural/molécula. Esta temperatura es ampliamente aceptada como una medida fiable de la intensidad de interacción entre las dos moléculas.

Puede realizarse un ensayo de la curva de fusión usando una copia de ADNc de la molécula de ARN antisentido natural real o un nucleótido de ADN o ARN sintético correspondiente al sitio de unión de la molécula. Están disponibles múltiples kits que contienen todos los reactivos necesarios para realizar este ensayo (por ejemplo, kit MeltDoctor de Applied Biosystems Inc.). Estos kits incluyen una disolución de tampón adecuada que contiene uno de

los colorantes de unión a ADN bicatenario (dsADN) (tales como los colorantes ABI HRM, SYBR Green, SYTO, etc.). Las propiedades de los colorantes de dsADN son tales que casi no emiten fluorescencia en forma libre, pero son altamente fluorescentes cuando se unen a dsADN.

- 5 Para realizar el ensayo, el ADNc o un oligonucleótido correspondiente se mezclan con la molécula en concentraciones definidas por los protocolos del fabricante particulares. La mezcla se calienta a 95 °C para disociar todos los complejos de dsADN previamente formados, luego se enfría lentamente a temperatura ambiente u otra temperatura menor definida por el fabricante del kit para permitir que se hibriden las moléculas de ADN. Entonces, los complejos recientemente formados se calientan lentamente a 95 °C con recogida de datos continua simultánea
- 10 sobre la cantidad de fluorescencia que se produce por la reacción. La intensidad de fluorescencia es inversamente proporcional a las cantidades de dsADN presentes en la reacción. Los datos pueden recogerse usando un instrumento de PCR en tiempo real compatible con el kit (por ejemplo, sistema de PCR en tiempo real StepOne Plus de ABI o el instrumento LightTyper, Roche Diagnostics, Lewes, RU).
- 15 Los picos de fusión se construyen representando la derivada negativa de la fluorescencia con respecto a la temperatura ($-d(\text{Fluorescencia})/dT$) sobre el eje y) contra la temperatura (eje x) usando software apropiado (por ejemplo, LightTyper (Roche) o SDS Dissociation Curve, ABI). Los datos se analizan para identificar la temperatura de la rápida transición del complejo de dsADN a moléculas monocatenarias. Esta temperatura se llama T_m y es directamente proporcional a la intensidad de la interacción entre las dos moléculas. Normalmente, la T_m superará 40
- 20 °C.

Ejemplo 2: Modulación de polinucleótidos de BDNF

Tratamiento de células HepG2 con oligonucleótidos antisentido:

- 25 Se cultivaron células HepG2 de ATCC (cat n° HB-8065) en medio de crecimiento (MEM/EBSS (Hyclone, cat n° SH30024 o Mediatech, cat n° MT-10-010-CV) + 10 % de FBS (Mediatech, cat n° MT35- 011-CV) + penicilina/estreptomicina (Mediatech, cat n° MT30-002-CI)) a 37 °C y 5 % de CO₂. Un día antes del experimento, las células volvieron a sembrarse a la densidad de $1,5 \times 10^5/\text{ml}$ en placas de 6 pocillos y se incubaron a 37 °C y 5 % de
- 30 CO₂. El día del experimento, el medio en las placas de 6 pocillos se cambió a medio de crecimiento nuevo. Todos los oligonucleótidos antisentido se diluyeron a la concentración de 20 µM. Se incubaron dos µl de esta disolución con 400 µl de medio Opti-MEM (Gibco, cat n° 31985-070) y 4 µl de Lipofectamine 2000 (Invitrogen, cat n° 11668019) a temperatura ambiente durante 20 min y se aplicó a cada pocillo de las placas de 6 pocillos con células HepG2. Se usó una mezcla similar que incluye 2 µl de agua en lugar de la disolución de oligonucleótido para los controles
- 35 transfectados con vector vacío. Después de 3-18 h de incubación a 37 °C y 5 % de CO₂, el medio se cambió a medio de crecimiento nuevo. 48 h después de la adición de oligonucleótidos antisentido, el medio se eliminó y se extrajo ARN de las células usando el sistema de aislamiento de ARN total SV de Promega (cat n° Z3105) o el kit de aislamiento de ARN total RNeasy de Qiagen (cat n° 74181) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se añadieron 600 ng de ARN a la reacción de transcripción inversa realizada usando el kit de ADNc Verso de Thermo Scientific
- 40 (cat n° AB1453B) o el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (cat n° 4368813) como se describe en el protocolo del fabricante. El ADNc de esta reacción de transcripción inversa se usó para monitorizar la expresión génica por PCR en tiempo real usando mezcla de expresión génica Taqman de ABI (cat n° 4369510) y cebadores/sondas diseñados por ABI (ensayo de expresión génica Taqman de Applied Biosystems por Applied Biosystems Inc., Foster City CA). Se usó el siguiente ciclo de PCR: 50 °C durante 2 min, 95 °C durante 10 min, 40
- 45 ciclos de (95 °C durante 15 segundos, 60 °C durante 1 min) usando la máquina de PCR en tiempo real StepOne Plus (Applied Biosystems).

- Se calcularon el cambio en veces en la expresión génica después del tratamiento con oligonucleótidos antisentido basándose en la diferencia en valores de dCt normalizados con 18S entre muestras tratadas y transfectadas con
- 50 vector vacío.

Oligos de detección para BDNF antisentido:

ID de ensayo de ABI Hs00417345_m1

- 55 Secuencia contexto GCACACCTGGAGATACTCTATTATA (SEQ ID No.: 9)

Oligos de detección para BDNF:

ID de ensayo de ABI Hs00542425_s1

CCTGCAGAATGGCCTGGAATTACAA (SEQ ID No.: 10)

Resultados:

- 5 Los resultados de PCR en tiempo real muestran que los niveles de ARNm de BDNF en células HepG2 aumentan significativamente 48 h después del tratamiento con dos de los gámperos de LNA con esqueleto completamente fosfotioatado diseñados para BDNF antisentido (CUR-71, P=0,04, CUR-73, P=0,07, CUR-76, P=0,03) (Fig. 1A). En las mismas muestras, los niveles de BDNF antisentido disminuyeron significativamente después del tratamiento con todos los oligos, excepto CUR-72, que es posiblemente debido a que diferentes oligos afectan diferentes variantes de splicing de BDNF y/o BDNF antisentido (Fig. 1B).

Tratamiento de células CHP212 con oligonucleótidos antisentido:

- Se cultivaron células CHP212 de ATCC (cat nº CRL-2273) en medio de crecimiento (MEM/F12 (ATCC, cat nº 30-2003 y Mediatech, cat nº 10-080-CV) + 10 % de FBS (Mediatech, cat nº MT35-011-CV) + penicilina/estreptomicina (Mediatech, cat nº MT30-002-CI)) a 37 °C y 5 % de CO₂. Un día antes del experimento, las células volvieron a sembrarse a la densidad de $1,5 \times 10^5$ /ml en placas de 6 pocillos y se incubaron a 37 °C y 5 % de CO₂. El día del experimento, el medio en las placas de 6 pocillos se cambió a medio de crecimiento nuevo. Todos los oligonucleótidos antisentido se diluyeron a la concentración de 20 µM. Se incubaron dos µl de esta disolución con 400 µl de medio Opti-MEM (Gibco, cat nº 31985-070) y 4 µl de Lipofectamine 2000 (Invitrogen, cat nº 11668019) a temperatura ambiente durante 20 min y se aplicó a cada pocillo de las placas de 6 pocillos con células CHP212. Se usó una mezcla similar que incluye 2 µl de agua en lugar de la disolución de oligonucleótido para los controles transfectados con vector vacío. Después de 3-18 h de incubación a 37 °C y 5 % de CO₂, el medio se cambió a medio de crecimiento nuevo. 48 h después de la adición de oligonucleótidos antisentido, el medio se eliminó y se extrajo ARN de las células usando el sistema de aislamiento de ARN total SV de Promega (cat nº Z3105) o el kit de aislamiento de ARN total RNeasy de Qiagen (cat nº 74181) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se añadieron 600 ng de ARN a la reacción de transcripción inversa realizada usando el kit de ADNc Verso de Thermo Scientific (cat nº AB1453B) o el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (cat nº 4368813) como se describe en el protocolo del fabricante. El ADNc de esta reacción de transcripción inversa se usó para monitorizar la expresión génica por PCR en tiempo real usando mezcla de expresión génica Taqman de ABI (cat nº 4369510) y cebadores/sondas diseñados por ABI (ensayo de expresión génica Taqman de Applied Biosystems: Hs00542425_s1 por Applied Biosystems Inc., Foster City CA). Se usó el siguiente ciclo de PCR: 50 °C durante 2 min, 95 °C durante 10 min, 40 ciclos de (95 °C durante 15 segundos, 60 °C durante 1 min) usando la máquina de PCR en tiempo real StepOne Plus (Applied Biosystems).

- Se calcularon el cambio en veces en la expresión génica después del tratamiento con oligonucleótidos antisentido basándose en la diferencia en valores de dCt normalizados con 18S entre muestras tratadas y transfectadas con vector vacío.

Resultados:

Los resultados de PCR en tiempo real muestran que los niveles de ARNm de BDNF en células CHP212 aumentan significativamente 48 h después del tratamiento con tres de los oligos diseñados para BDNF antisentido (Fig. 1C).

Ejemplo 3: Modulación antisentido de producto de polinucleótido y de proteína de BDNF y efecto sobre la memoria y el aprendizaje en ratones transgénicos para amiloide

- Se administran oligonucleótidos antisentido específicos para BDNF-AS (por ejemplo, oligonucleótidos identificados por SEQ ID NOS 3-8) a ratones J20, que expresan el transgén de la proteína precursora de amiloide (APP) humana que lleva tanto las mutaciones de APP Swedish como Indiana. Como se describe por, por ejemplo, Nagahara, et al., 2009, "Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in rodent and primate models of Alzheimer's disease", Nature Medicine 15(3): 331-337, incorporado en el presente documento por referencia, estos ratones muestran placas corticales y pérdida de células progresiva en la corteza entorrinal que empieza a la edad de 2-3 meses, y declive cognitivo a los 6-7 meses. Se recogen muestras de sangre previas al tratamiento varios días antes de la dosificación recogiendo 4-7 gotas de la vena de la cola. Cada oligonucleótido antisentido se disuelve en PBS y se administra en un ratón mediante inyección en la corteza entorrinal o el hipocampo a aproximadamente 10 mg/kg. Los ratones de control (compañeros de camada WT de la misma edad) se administran con el mismo volumen de PBS solo. Un mes después, se prueba la memoria espacial en el laberinto de agua de Morris en ratones tratados y de control, y se compara su rendimiento. También se prueban los efectos reconstituyentes del aprendizaje midiendo

el aprendizaje dependiente del hipocampo e independiente del hipocampo. Después de la prueba, los ratones se sacrifican y se recogen tejidos cerebrales (corteza entorrinal y giro dentado hipocámpico) para el análisis de expresión de proteína y ARNm de BDNF. La concentración de proteína BDNF humana y los niveles de secreción se determinan usando un kit de enzimo-inmunoanálisis de adsorción (ELISA) (disponible comercialmente, por ejemplo, Quantikine human BDNF, R&D Systems, Mineápolis, MN), según las instrucciones del fabricante. El ARNm se ensaya usando RT-PCR, como se describe en cualquier parte en el presente documento.

Ejemplo 4: Modulación antisentido de producto de polinucleótido y de proteína de BDNF y efecto sobre la memoria y el aprendizaje en ratones SAM-P8.

La cepa P8 de ratones de senescencia acelerada (SAM), como se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. N° 6.310.048, "Antisense modulation of amyloid beta protein expression", incorporada en el presente documento por referencia, muestra un aumento relacionado con la edad en los problemas del aprendizaje (adquisición) y memoria (retención), además de un aumento relacionado con la edad en la acumulación de proteína precursora de amiloide y AβP. Los ratones SAM-P8 tienen una mediana de la vida de 17,2 meses, a diferencia de una vida normal de 24 meses para ratones R1 estándar.

Se dividen ratones SAM-P8 en siete grupos de 10 ratones cada uno. A los 11 meses de edad (4 semanas antes del entrenamiento), un grupo se administra con 0,2 microlitros de suero de ternero por inyección ventricular intracerebral (ICV), mientras que los otros seis grupos se administran con una o dos inyecciones de 0,2 microlitros (cada una de 2 microlitros y que tiene 60 ng de oligonucleótido) ICV de oligonucleótidos antisentido de la presente divulgación. La administración se realiza taladrando un orificio a través del cráneo sobre el tercer ventrículo (-0,5 con respecto al bregma; 0,5 mm a la derecha de la sutura central). Se cierra el cuero cabelludo y los ratones se devuelven a sus jaulas. Dos semanas después de esta primera inyección, uno de los grupos de ratones tratados y el grupo que había recibido suero se inyectan con el vehículo de solución salina que se usa como vehículo para los oligonucleótidos antisentido. En este mismo tiempo (dos semanas antes del entrenamiento), cada uno de los oligonucleótidos se administra en solución salina ICV a todos los ratones en un grupo. Cada administración contiene 0,2 microlitros (60 ng de oligonucleótido por inyección).

Dos semanas después de la última inyección, cuando los ratones tienen 12 meses de edad, se entrenan para evitar choques en las patas en un laberinto en T. Los procedimientos de entrenamiento y de prueba son los mismos que se describen por Flood et al., Physiology & Behavior, 58:819-822 (1995); y Flood et al., Neurobiology of Aging, 14:159-166 (1993), y la patente de EE.UU. N° 6.310.048, todos incorporados por referencia en el presente documento. Todos los ratones son entrenados hasta que hacen su primera respuesta de evitación. Se comparan las puntuaciones de la prueba de retención cuando se prueba 1 h después del entrenamiento y una semana después. Una semana después del entrenamiento original, la retención para tanto ratones de 4 como de 12 meses de edad se prueba continuando el entrenamiento hasta que cada ratón hace 5 evitaciones en 6 ensayos de entrenamiento consecutivos. Los resultados se expresan como medias y con un error estándar de las medias. Los ensayos hasta la primera evitación, o hasta un criterio de 5 evitaciones en 6 ensayos consecutivos, se analizan en ANOVA unilaterales separados. Las diferencias estadísticas entre las medias de los ratones de 12 meses de edad que recibieron oligonucleótidos antisentido se comparan con las medias de los ratones de 12 meses de edad que recibieron el vehículo de solución salina usando la prueba de la t de Dunnett.

Las muestras se recuperan de las regiones de la amígdala, hipocámpica y septal de los cerebros de cada uno de los cuatro ratones, dos tratados con el vehículo de solución salina y los otros dos tratados con los oligonucleótidos antisentido. Las muestras se prueban para la expresión de proteínas BDNF por ELISA o inmunotransferencia contra un anticuerpo que hibrida específicamente con BDNF.

Ejemplo 5: Modulación antisentido de producto de polinucleótido y de proteína de BDNF y efecto sobre progresión de la enfermedad en pacientes con esclerosis lateral amiotrófica

Una composición farmacéutica que comprende un oligonucleótido antisentido de la presente divulgación (por ejemplo, un oligonucleótido identificado por cualquiera de SEQ ID NOS: 3-8) se administra al líquido cefalorraquídeo de un individuo que padece ELA familiar. Se usa una bomba SyncroMed II de Medtronic para administrar la composición al líquido cefalorraquídeo. La bomba se implanta quirúrgicamente según las instrucciones del fabricante. El depósito de la bomba se carga con la composición farmacéutica en solución salina tamponada con fosfato. La composición farmacéutica se administra a una cantidad que da una infusión de 8 mg a 12 mg/día del oligonucleótido antisentido en el líquido cefalorraquídeo. El oligonucleótido antisentido se infunde, durante al menos 28 días. El fármaco se bombea a una dosis programada en un catéter que está quirúrgicamente intratecalmente

implantado.

La progresión de la enfermedad se mide por métodos rutinarios en la materia y descritos en el presente documento, por ejemplo, usando indicadores que incluyen ALSFSR-R, y mediciones de FEV₁, FVC y fuerza muscular. Estos
5 métodos son usados por un médico para evaluar el estado de enfermedad al inicio del tratamiento, y para proporcionar un nivel inicial para el estado de enfermedad. Las posteriores evaluaciones se realizan a intervalos, como se ha determinado por el médico, durante el periodo de administración. Se ensaya la expresión de proteína BDNF y ARNm en líquido cefalorraquídeo. La concentración de proteína BDNF humana y los niveles de secreción se determinan usando un kit de enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA) (por ejemplo, Quantikine human BDNF,
10 R&D Systems, Mineápolis, MN), según las instrucciones del fabricante. El ARNm se ensaya usando RT-PCR, como se describe en cualquier parte en el presente documento.

Aunque la divulgación se ha ilustrado y descrito con respecto a una o más implementaciones, alteraciones y modificaciones equivalentes se les ocurrirán a otros expertos en la materia tras la lectura y entendimiento de esta
15 memoria descriptiva y los dibujos adjuntos. Además, aunque se ha descrito una característica particular de la divulgación con respecto a solo una de varias implementaciones, tal característica puede combinarse con una o varias de otras características de las otras implementaciones, ya que puede desearse y ser ventajoso para cualquier aplicación dada o particular.

20 El resumen de la divulgación permitirá al lector determinar rápidamente la naturaleza de la divulgación técnica. Se presenta con el entendimiento de que no se usará para interpretar o limitar el alcance o significado de las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

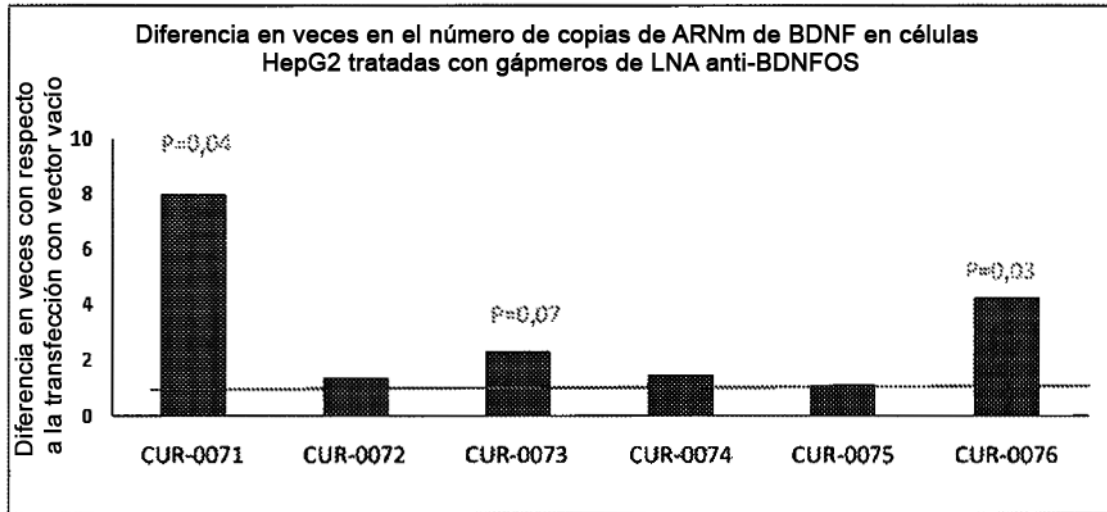
1. Un oligonucleótido antisentido que se dirige a un transcrito antisentido natural de factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) para su uso como un compuesto terapéutico, donde el transcrito antisentido natural de BDNF es un transcrito de BDNFOS, y donde el oligonucleótido antisentido aumenta la expresión de un factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF).
2. Un oligonucleótido antisentido que se dirige a un transcrito antisentido natural de factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), donde el transcrito antisentido natural de BDNF es un transcrito de BDNFOS, para su uso en la prevención o tratamiento de una enfermedad o trastorno asociada al factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), donde dicho oligonucleótido antisentido aumenta la expresión de un factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), donde la enfermedad o trastorno está seleccionado del grupo que consiste en enfermedad o trastorno neuro-otológico, sordera parcial, síndrome de Rett, enfermedad de Alzheimer, esquizofrenia, enfermedad de Huntington, lesión de la médula espinal, depresión, deterioro cognitivo, un trastorno bipolar, síndrome de WAGR y obesidad.
3. Uso de un oligonucleótido antisentido que se dirige a un transcrito antisentido natural de factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), donde el transcrito antisentido natural de BDNF es un transcrito de BDNFOS, para la fabricación de un medicamento para la prevención o tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado al factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), donde dicho oligonucleótido antisentido aumenta la expresión de un factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), donde la enfermedad o trastorno está seleccionado del grupo que consiste en enfermedad o trastorno neuro-otológico, sordera parcial, síndrome de Rett, enfermedad de Alzheimer, esquizofrenia, enfermedad de Huntington, lesión de la médula espinal, depresión, deterioro cognitivo, un trastorno bipolar, síndrome de WAGR y obesidad.
4. Un método *in vitro* de aumento de la expresión de un factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) en células o tejidos de paciente que comprende: poner en contacto dichas células o tejidos con un oligonucleótido antisentido que se dirige a un transcrito antisentido natural de factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), donde el transcrito antisentido natural de BDNF es un transcrito de BDNFOS; aumentando así la expresión de un factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF).
5. Uso según la reivindicación 3, o un oligonucleótido antisentido para su uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, o un método según la reivindicación 4, donde el transcrito antisentido natural tiene la secuencia de ácido nucleico que se expone en SEQ ID NO: 2.
6. Uso según la reivindicación 3 o la reivindicación 5, o un oligonucleótido antisentido para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 5, o un método según la reivindicación 4 o la reivindicación 5, donde el oligonucleótido antisentido es monocatenario, o donde el oligonucleótido antisentido es un compuesto de siRNA.
7. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 3, 5 o 6, o un oligonucleótido antisentido para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 5 o 6, o un método según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, donde el oligonucleótido antisentido comprende una de SEQ ID NOs: 3, 5, 6, 7 u 8.
8. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 3, 5 a 7, o un oligonucleótido antisentido para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 5 a 7, o un método según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, donde la expresión de un factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) aumenta al menos el 10 %.
9. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 3, 5 a 8, o un oligonucleótido antisentido para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 5 a 8, o un método según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, donde el oligonucleótido antisentido comprende además una o más modificaciones que comprenden:
 - a. al menos un enlace internucleosídico modificado seleccionado de: un fosforotioato, alquilfosfonato, fosforoditioato, alquilfosfonotioato, fosforamidato, carbamato, carbonato, triéster de fosfato, acetamidato, éster carboximetílico, y combinaciones de los mismos;
 - b. al menos un nucleótido modificado seleccionado de: un ácido nucleico peptídico (PNA), un ácido nucleico bloqueado (LNA), un ácido arabino-nucleico (FANA), un análogo, un derivado, y combinaciones de los mismos; o
 - c. al menos un resto de azúcar modificado seleccionado de: un resto de azúcar modificado por 2'-O-metoxietilo, un

resto de azúcar modificado por 2'-flúor, un resto de azúcar modificado por 2'-metoxi, un resto de azúcar modificado por 2'-O-alquilo, un resto de azúcar bicíclico, y combinaciones de los mismos.

10. Un oligonucleótido antisentido que se dirige a un transcrito antisentido natural de factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), donde el transcrito antisentido natural de BDNF es un transcrito de BDNFOS, donde el oligonucleótido aumenta la expresión de un factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), donde el oligonucleótido antisentido es un compuesto de siRNA.
11. Un oligonucleótido antisentido que se dirige a un transcrito antisentido natural de factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), donde el transcrito antisentido natural de BDNF es un transcrito de BDNFOS, donde el oligonucleótido aumenta la expresión de un factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), donde el oligonucleótido antisentido comprende una de SEQ ID NOs: 3, 5, 6, 7 u 8.
12. El oligonucleótido antisentido según la reivindicación 10 o la reivindicación 11, donde el transcrito de BDNFOS tiene la secuencia de ácido nucleico que se expone en SEQ ID NO: 2.
13. El oligonucleótido antisentido según la reivindicación 11 o la reivindicación 12, donde el oligonucleótido antisentido es monocatenario o donde el oligonucleótido antisentido es un compuesto de siRNA.
14. El oligonucleótido antisentido según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, donde la expresión de un factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) aumenta al menos el 10 %.
15. El oligonucleótido antisentido según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, donde el oligonucleótido antisentido comprende además una o más modificaciones que comprenden:
 - a. al menos un enlace internucleosídico modificado seleccionado de: un fosforotioato, alquifosfonato, fosforoditioato, alquifosfonotioato, fosforamidato, carbamato, carbonato, triéster de fosfato, acetamidato, éster carboximetílico, y combinaciones de los mismos;
 - b. al menos un nucleótido modificado seleccionado de: un ácido nucleico peptídico (PNA), un ácido nucleico bloqueado (LNA), un ácido arabino-nucleico (FANA), un análogo, un derivado, y combinaciones de los mismos; o
 - c. al menos un resto de azúcar modificado seleccionado de: un resto de azúcar modificado por 2'-O-metoxietilo, un resto de azúcar modificado por 2'-flúor, un resto de azúcar modificado por 2'-metoxi, un resto de azúcar modificado por 2'-O-alquilo, un resto de azúcar bicíclico, y combinaciones de los mismos.
16. Un oligonucleótido antisentido según una cualquiera de las reivindicaciones 10, 12-15, donde el oligonucleótido antisentido tiene entre 10 y 30 nucleótidos de longitud.
17. Un oligonucleótido antisentido según una cualquiera de las reivindicaciones 10, 12-16, donde el oligonucleótido antisentido tiene al menos el 90 % de complementariedad de secuencia con un transcrito de BDNFOS.
18. Una composición farmacéutica que comprende al menos un oligonucleótido antisentido según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 17 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

FIGURA 1

A



B

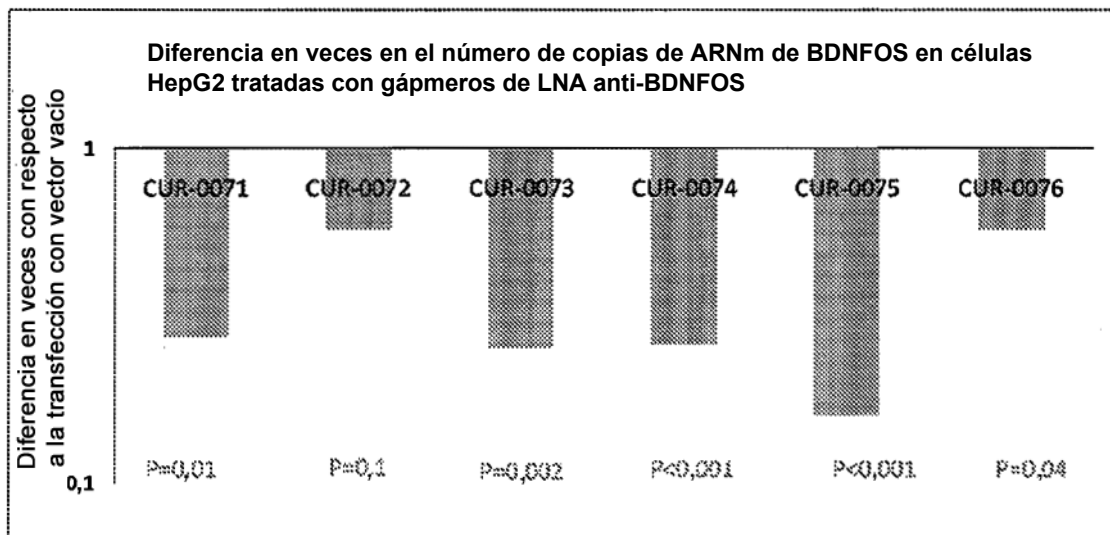


FIGURA 1 (cont.)

C

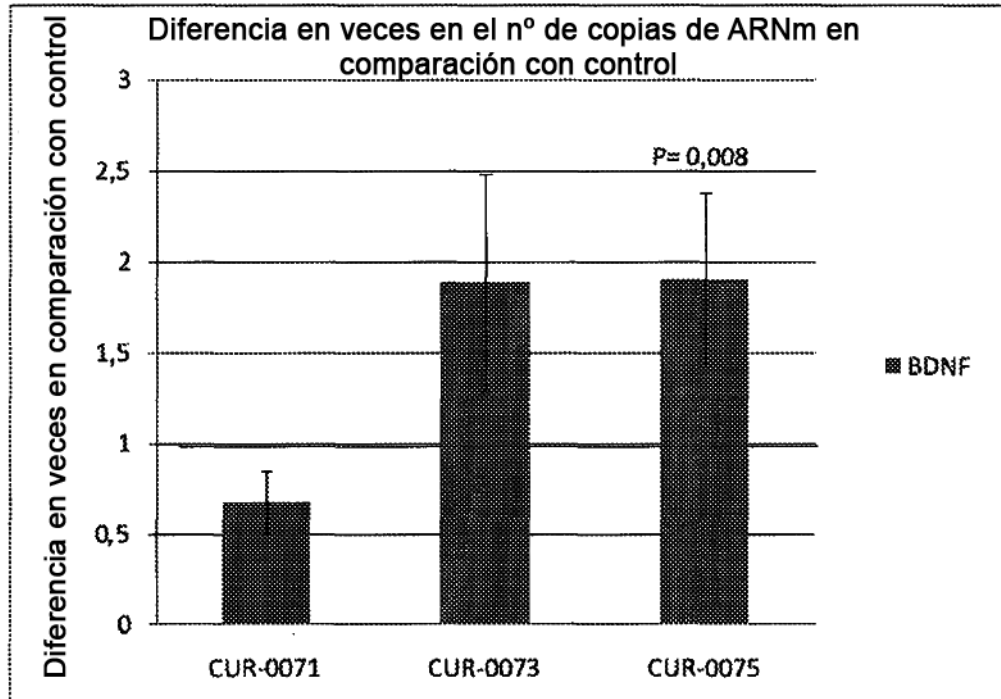


FIGURA 2

(SEQ ID NO: 1)

>gi|219842286|ref|NM_170735| Factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) de Homo sapiens, variante 1 de transcrito, ARNm

CACACACACACACACACAGAGAACATCTCTAGTAAAAAGAAAGTTGAGCTTCTTAGCTAGATGTGTGATT
AGCCAGAAAAAGCCAAGGAGTGAAGGGTTTTAGAGAACTGGAGGAGATAAAGTGGAGTCTGCATATGGGAGGCATTT
GAAATGGACTTAAATGCTTTTTAATGCTGACTTTTTAGTTTTCTCCTTACCAGACACATTGTTTTCATGACATTA
GCCCCAGGCATAGACACATCATTAATAATGAACATGTCAAAAAATGATTTCTGTTTAGAAATAAGCAAAACATTTTCA
GTTGTGACCACCCAGGTGTAGAATAAAGAACAGTGGAAATGGGAGCCCTGAGTTCTAACATAAACTTTCTTCATGAC
ATAAGGCAAGTCTTCTATGGCCTTTGGTTTCTTACCTGTAAACAGGATGGCTCAATGAAATATCTTTCTCTTT
GCTATAATAGAGTATCTCTGTGGGAAGAGGAAAAAAAGTCAATTTAAAGGCTCCTTATAGTTCCCCAACTGCTGT
TTTATTGTGCTATTTCATGCCCTAGACATCAGTAGCTAGAAAGGCCCATCAGACCCCTCAGGCCACTGCTGTTCTCTGT
CACCATTTCTGCAAGGACCATGTTGCTAACTTGAAAAAAATTAATAATTACACTTGCAGTTGTTGCTTAGTA
ACATTTATGATTTTGTGTTTCTCGTGACAGCATGAGCAGAGATCATTAAAAATTAACCTTACAAAGCTGCTAAAGTG
GGAAGAAGGAGAACTTGAAGCCACAATTTTGCCTTGCTTAGAAGCCATCTAATCTCAGGTTATATGCTAGATCTT
GGGGGCAAACTGTCATGCTCTGGTTTTATTAACCACATACAGCACACTACTGACACTGATTTGTGTCTGGTGC
AGCTGGAGTTTATCACCAGACATAAAAAACCTTGACCTGCGAGATGGCCTGGAATTACAATCAGATGGGCCACA
TGCCATCCCGGTGAAAGAAAGCCCTAACCAAGTTTCTGTCTTGTCTTCTGCTTCTCCTTACAGTTCCACCAAGGTGAG
AAGAGTGATGACCATCCTTTTCTTACTATGTTTATTTTCATACCTTTGGTTGTCATGAAGGCTGCCCCCATGAAGAAG
CAACATCCGAGGACAAGGTGGCTTGGCTTACCCAGGTGTGCGGACCCATGGGACTCTGGAGAGCGTGAATGGGCC
AAGGCAGGTTCAAGAGGCTTGACATCATTGGCTGACACTTTTCAACACGTGATAGAAGAGCTGTTGGATGAGGACCA
GAAAGTTCCGGCCCAATGAAGAAAAACAATAAGGACGCAGACTTGTACACGTCCAGGTTGATGCTCAGTAGTCAAGTGC
CTTTGGAGCCTCTCTCTCTTCTTCTGCTGGAGGAATACAAAAATTACCTAGATGCTGCAACATGTCCATGAGGGTCT
CGGCGCCACTCTGACCTGCGCCGAGGGGAGCTGAGCGTGTGTGACAGTATTAGTGAGTGGGTAAACGGCGGCAGAGA
CAAAAAGACTGCAAGTGACATGTGCGGCGGGACGGTACAGTCTTGAAAAGGTCCCTGTATCAAAAGGCCAACTGA
AGCAATACTTCTACGAGACCAAGTGCAATCCCATGGGTACACAAAAGAAGGCTGCAGGGGCATAGACAAAAGGCAT
TGGAACTCCCAAGTGCCGAACACCCAGTGTGACGTGCGGGCCCTTACCATGGATAGCAAAAAGAGAATTGCTGCGG
ATTCATAAGGATAGACACTTCTTGTGTATGTACATTGACCAATTAAGGGGAAGATAGTGGATTTATGTTGTATAGA
TTAGATTATATTGAGACAAAAATTATCTATTTGTATATATACATTAACAGGGTAAATTATTCAGTTAAGAAAAAATA
ATTTTATGAATGTCATGTATAAATGAAGTTTATACAGTACAGTGGTTCTACAATCTATTTATTGGACATGTCCATGA
CCAGAAGGGAAACAGTCAATTTGCGCACAACTTAAAAAGTCTGCATTACATTCCCTGATAATGTTGTGTTTGTGCT
GTTGCCAAGAAGTGAACATAAAAAAGTTAAAAAATAATAAATGTCATGCTGCTTAATTTGTAATTGATAATAA
ACTGTCCTCTTTCAGAAAACAGAAAAAACACACACACACACACAAAAATTTGAACCAAAACATTCCGTTTACATT
TTAGACAGTAAGTATCTTCTGTTCTTGTAGTACTATCTGTTTACTGCTTTTAACTTCTGATAGCGTTGGAATTA
AAACAATGTCAAGGTGCTGTTGCTTCTTACTGGCTTAGGGGATGGGGGATGGGGGATATTTTTGTTGTTT
TGTGTTTTTTTTTCTGTTTGTGTTTGTGTTTTTGTGTTTCCACAGGGAGTAGAGATGGGGAAGAATTCTTACAATA
TATATTCTGGCTGATAAAAGATACATTTGTATGTTGTGAAGATGTTTGAATATCGATCAGATGACTAGAAAGTGAA
TAAAAATTAAGGCAACTGAACAAAAAATGCTCACACTCCACATCCCGTGATGCACCTCCCAGGCCCGCTCATTCT
TTGGGCGTTGGTCAGAGTAAGCTGCTTTTGACGGAAGGACCTATGTTTGTCTCAGAACACATTCTTCCCCCTCCC
CCTCTGGTCTCCTCTTTGTTTTGTTTTAAGGAAGAAAAATCAGTTGCGCGTTCTGAAATATTTTACCACCTGCTGTGA
ACAAGTGAACACATTGTGTACATCATGACACTCGTATAAGCATGGAGAACAGTGATTTTTTTTTTAGAACAGAAAAAC
AACAAAAAATAACCCCAAAATGAAGATTATTTTTATGAGGAGTGAACATTTGGGTAAATCATGGCTAAGCTTAAAA
AAACTCATGGTGAGGCTTAACAATGCTTGTGAAGCAAAAGGTAGAGCCCTGTATCAACCCAGAAACACCTAGATCA
GAACAGGAATCCACATTGCCAGTGACATGAGACTGAACAGCCAAATGGAGGCTATGTGGAGTTGGCATTGCATTTAC
CGGCAGTGCGGGAGGAATTTCTGAGTGGCCATCCCAAGGTCTAGGTGGAGGTGGGGCATGGTATTTGAGACATTCCA
AAACGAAGGCCCTGAAGGACCTTTCAGAGGTGGCTCTGGAATGACATGTGTCAAGCTGCTTGGACCTCGTCTTTA
AGTGCCATACATTATCTAACTGTGCTCAAGAGGTTCTCGACTGGAGGACCACACTCAAGCCGACTTATGCCACCATC
CCACCTCTGGATAATTTTGCATAAAATTTGGATTAGCCTGGAGCAGGTTGGGAGCCAAATGTGGCATTTGTGATCATG
AGATTGATGCAATGAGATAGAAGATGTTTGTACCTGAACACTTATTGCTTTGAACTAGACTTGAGGAAACAGGG
TTTATCTTTTGAAGCTTTTGGTAAGGGAAGGGAACAGGAAAAAGAAACCCCAAACTCAGGCCGAATGATCAAGGG
GACCCATAGGAATCTTGTCCAGAGACAGACTTCGGGAAGGTGTCTGGACATTGAGAACACCAAGACTTGAAGGTG
CCTTGCTCAATGGAAGAGGCCAGGACAGAGCTGACAAAAATTTGCTCCCCAGTGAAGGCCACAGCAACCTTCTGCC
ATCCTGTCTGTTCATGGAGAGGGTCCCTGCCCTCACCTCTGCCATTTTGGGTTAGGAGAAGTCAAGTTGGGAGCCTGA
AATAGTGGTTCTTGGAAAAATGGATCCCAAGTGAAGCTCTAAGCCCATTCAGCCCATTTTACACCTGAAA
ATGTTAGTGATCACCCTTGGACCAGCATCCTTAAGTATCAGAAAGCCCCAAGCAATTGCTGCATCTTAGTAGGGTG
AGGATAAGCAAAAGAGGATGTTACCATTAACCCAGGAATGAAGATACCATCAGCAAGAATTTCAATTTGTTTCACT

CTTTCATTTAGAGCTAGTCTTTACAGTACCATCTGAATACCTCTTTGAAAGAAGGAAGACTTTACGTAGTGTAGAT
 TTGTTTTGTGTTGTTTGAATAATATTATCTTTGTAAATTATTTTAAATATGTAAGGAATGCTTGGAAATATCTGCTATAT
 GTCAACTTTATGCAGCTTCCTTTTGGAGGACAAATTTAAACAAACAACCCCCATCACAACTTAAAGGATTGCAA
 GGGCCAGATCTGTTAAGTGGTTTCATAGGAGACACATCCAGCAATTGTGTGGTCAGTGGCTCTTTACCCAATAAGA
 TACATCACAGTCACATGCTTGATGGTTTATGTTGACCTAAGATTTATTTTGTTAAATCTCTCTGTTGTGTTTCGT
 TCTTGTCTGTTTTGTTTTGTTTTTAAAGTCTTGCTGTGGTCTCTTTGTGGCAGAAGTGTTCATGCATGGCAGCA
 GGCTGTGCTTTTTTATGGCGATTCCCATTTGAAATGTAAGTAAATGTCTGTGGCCTTGTCTCTATGGTAAAG
 ATATTATTCACCATGTAAACAAAAACAATATTTATTGTATTTTAGTATATTTATATAATTATGTTATTGAAAAA
 ATTGGCATTAAACTTAACCGCATCAGAACCATTGTAATACAAGTCTATTTAAGTGTACTAATTAACATATAAT
 ATATGTTTTAAATATAGAAATTTTTAATGTTTTTAAATATATTTTCAAAGTACATAAAA

(SEQ ID NO: 11)

>hg18_Gen conocido_uc009yjj.1 intervalo=cr11:27633018-27679176 relleno 5' = 0 relleno 3' = 0
 hebra= repetir enmascaramiento=ninguno

GTAACCAATAGCCCCATGCTCTGTGCGATTTCATTGTGTGCTCGCGTTCGCAAGCTCCGTAGTGCAGGAAGGTGC
 GGAAGgtgtgtctgtgccccgggaaacgcacgcccctctcccagagaacttgggtgctgggagtgaggaggggga
 gagttagaaagctaggggagcgagacctcgggcgctgcgattctcactcgctccctccgccccagcgcccacagccg
 gggttctgcagagggcgcgaggcggggtccccggggctgaggctggggctggaacaccctcgaagccgcggg
 cgtcctgtccaaagcgccccaggagggcgcgaggactcgagggcgatgtcgggggccctaggggaggaggtgagga
 caggccccggggagcggggagttccggggcgccctcggttccccgcgcgaggaagacgcggcggttccctttaag
 cgccgcctcgaacgggtatcggtagcgggcgagcggggagcgggggcgggggggggggggggggggggggggcgc
 cgtttgaccaatcgaagctcaaccgaagagctaaataatgtctgaccggcgcaaggcgagcctggagctccggg
 tccccgacgtgcgcgcgcgcgcggggcgaccccgcccgctcgctgtccgcgcaccccgtagcgccctcgggctc
 ccgggcccgcagagaggagccagccgggtgcgcccctccacctcctgctcggggggctttaatgagacaccacccgct
 gctgtggggcgggcggggagcagcaccgcgacggggacgggggctgggcgctggagccagaatcggaaccacgatgt
 gactccgcgcgggggacccgtgaggttgtgtggaccccgaggtaggcaagcgctgggaatggggcttggtgcagg
 agctgcccgcgcgcgagagagttgactgggggatccccaccccaagttgtgggacgagcgccagctcctctctt
 tctctccctccggtagaagggagcatttgaggttactcttggggagtttctccccatccccacaaccagaaggtc
 agccggcaccaccagggaagggacccgggaagtcacgaagtagaggagggaaaggcctggaggagaccagagc
 tgcgtgatgggagcaaaagcgcgacccggggtccctcgagccctccccagccaggagttagtcgagagagact
 tagggggccagagctgtcgagggctcctgactgaggggaggggtgctggggctaggctaggaaatccttccagggggtg
 gtgtccccgcgcgcgacttgcgggggagtgaggggaaagcttgcgccttcagcccgcatcccttccccggagctgc
 acacggctacctgctccccaggaattgagactgaagtggacttacaagtcgaagccaatgtagcttggaaaacttg
 ggaggcggaattcctaccgctgggaactgaaagggctgcgacactctcgggcagggccgaaccacatctctacca
 tctgcgcccctcttctgaagcgccctccagggaagttaaagagttttagcttccggggagtggttgggagtgacgtg
 ggggattctttagctcggttagtctctggggatgcagagccgggaagaggaatgggtgagtgagttactcctggaaa
 gaaatagctgaggattgggggctctgtgcctgacgggcaagaagaaggaggagattacagactaggggcatccctaag
 gaagaagcctcggggctgcgaggggtgaactggaggatgcagtggttgtgtgtggggtagagcggggtaggggac
 cggggtggaggggagggcagggagggaggggacccagagaacgaagctagggaaaggtagagggtgcccctctgcgg
 ccatgctccaagagcagctactggggcgggaggctgggggtggggaagtggttaaaggaaggttttgcgggatccc
 ttagagagctggtaggaggacttgtgaatgggtgctgactccagctcggtggggcgctgcgactcgtcgtcggt
 ggattttgactcctcgttcttgggttctatgcaagtttctcgcgctgggggagcttgataagcctcgatt
 ggcggtgtgttagggcttcttgatcttatttttaggttctctagtattatcctgcacttactccttaatgtcagtagc
 aaccaaagaacatttccgacaagcagcaggaatgttcttgccagaaagcaagaaaggcatatttctgagtggtt
 attaatcctcctagtaattctttaaagcaagtaatatgtaattgggaacgttgatttctaaactgcataaaaagg
 cgacatgatattaatgagacccctccctactgactcaatatcctgcaaaatctctctctcccttattattatgg
 aaaaatctatttttatagagtttgtgtaaggtcaaaagccattttgggtcttacaatttgatatgtctttacattt
 taacttattgaggcataattacagatttaatttgtatgaacgtgtgtgccttcaatgcttatctcatgcaacataat
 ttttaggttgagatttctgatgttatggcatgtagcgttcaaggcattacacataataggttaacatagcatgttg
 aaattacaccacaaagttttagccctgggaacagcaccttttaaaaacaatcactaaactcctgttccgttttctg
 attttgcaaatgccttgcttaagacttt
 caggagaggttaaaaaaaggaaagagacacttgttgaaatgtaaccataaccttactggaaatttaaacatgttg
 taccattactggaattccagggccataaagtcggtgtcttttttttcttacttcattttgtaaaatgtgataaa
 tgttggtaaatatagaccagtagtaagtattatgacactaaaagcattatgtatgtggaactattttaagttattac
 agaacattttctattttataatgatataagcagaaagaaatgatttccagataaacaaggcttacgtacatgttttg
 aagcattagaacattgcagacactcttagacatcacatttttaagcaaaaataacagtaattttcacataccttt
 ggagcctttcatagccattcagagctgagtttagtagtggaagtttcccttattttaaggtgatattttaaacca
 tttaacatgtatagtaggtcaacatttggtgcatcgaaaaatgaagcatttaggaaatctgtttcagtgcttttca

[illegible]

gcaatgggtgaggggacttggaaatgcatgacttagggacaagaaaacttaggctggaatggcaagtgggtttttgaat
 gttgggttgagaagaattctaaaactgtgaaggattagtaaaaaataacattcagattgctaagcctactgtggctg
 ggagattagagtgtcaacatgtgtgatgtatttttgacatccttattttgaggatgggcttcaaagatttgacgaac
 tgtcataagtgtaatgtgtgtgcttcagacagcagttcttagaaccaatgatgtaaatttagatactctacatggta
 gttagaaaactttccattaatttaatttagcaaatattgaatgctcactgcatacagagcactttatttagaggaata
 tataataaagaaaaagaggtctgggtgtgggtgctcatgctgtaatcccagcactctgggaggtgaggtgggagg
 atcacttgagcccaggagatcattacagctctggacaacatagcaagaccccatctttacaaaagacaaaaaaatt
 atccaagcctgggtgacaggcacttgtagtcccagctacttgggaggtgaggcagtaggatcgtttgagcccaggag
 gttggggctgcagtgcagcgtgattgtcccactgctctcagcctgggtgacagagtgcagaccccggtggaggggaag
 gaaggaaggaaggaagaaaggttaggaaggctgaaatgaaacccttttagaaatgacactaaaatgggaggttgag
 taaggtattttctgaagtgcctttgtacttgttttttctaatgcattggccataagtctgctccttatttatagtc
 cataaacaatcctaattgagaacagttatatatttgcctttgaatcatctacttgaagtgttttagcatcatgaatt
 gagtatacagaatccctccatttcttgcagagcgtgtatttttacttttcttatttgcagatttctcaaaa
 ttggctatttttcttgggttagacagaaacagaatgtctggaaaaaaagtcttatacaaatcaggtgccccaaat
 tgcttaagaaattaacttttgaggttatatttttttagggttcagtagctaaactaagaaaacttctcaccgttcac
 ctctacttttggaaaccacaaaatcttcagatattacagttttccaaagagtttctctttttaaataaaactaaaa
 ggaattgactcctccccaaactccctcaggcctcagcatggatagagttacttttttctttaaataatttatttata
 acttatttgcctctctgtagaacagctggagattaaagcaacatggccatgcataaaaatgcaagttagacataaag
 atgagcagcccactccaagtatgaatgagtagtacttcttctgtgactctctcactgctttttaggtatttaagtgt
 cagtcagcaagcaaacagtttaataatttcatctccttttaggatcatatagtttatagttttagtattgtgttcttg
 cgtgtatgttttcttctgtttcaaatcttttttcttaaagtaagaatgttatatgtagcaaatgggtctttcatta
 attcatttgttaattcaccgtgcattaattgagtgcccagtgagtgctcaggcactgggctacttggatttcttttcc
 ctgtatttgatccatatacttccaggtgctccttgatatggctctccattgactctctcatataaggttttcattacc
 tattcacataactccctccaaagaggaactgggtccaaaagtataaatcttgagcaagttctctgagttatttcagaact
 tcttgccccaaaactgtatttttaattattgactggttagcatttttggaaataacttacctctcttttttaaagattga
 agttctttatcctctctgattttcaggtgtcagtttgtgtacaaattgagacaataaaaatgtttgttagacatttt
 cttaaagcattttgctatgtgagaatcttcatgaagaactctttttaacaatgactctatagcagaagccacagta
 gagggagaactactgaatcaaagatggtgtttgagtcctatgattttatgatggatttttttttttttacatacaag
 gatattgcattgggtcttttagtattcaggaatctgttcttccactgacagattttataaattgtgtgtttcccccata
 aaaaacttaaatgtgtgagaatgcttccatttactagaagttggttaattgattatgccaataaaggaaaataagacag
 aaaaatcagtttagtgaatactattttgcctttaaattttagtaatttagtaacagtatctcttgggggttactaga
 aaccactttttaatccaataggtctcttccattgtgagtcaggaggtgattttgcttaaatgtgtagtataggaat
 ctatatgtggtgttcaaggatcatgtaaatatgctgatataatcggagcacagtttggcatcattaaactcagaata
 tttaaactcttgctatacaacatggaagcaaaccttgtgcatagtttgtgtgtgtgtgtgtgtgtgaactcctaaaaa
 agaaaaaatcaggtcaggaagtcggaataggtgcccacttttcttctagtaccaaactcagacacacactggggtgag
 gccttctcttttactcccaagcaagacagacaggcaaatgaccatcctgctgcccatttctgtgtatattcacttgc
 attgagagttgtattcacctgcttgttgagagatttcacaaatggtacctgataaagtagatacttctttaacatg
 tgaatttttttgcattgtataatgtttagaataatcatgtataaatgggtgaattataacagagattgccttctc
 aagtattttatataatcattaaaatgtggtgtcattaatacaatttattttaagtgttttctctaaaataaccagatta
 ttttctgattttcactacccctgacaatgactttcttaacttggtagccaggaacagaaaacctaactcagctgatt
 tctcactataagtggagctgaacagagagacacataggtggttaattgattatgccaataaactcaggtggtgag
 cagggggcaggggaagggagagagtgctcaggacaaacagacaaatagctaattgcagtgagccttaatacctagg
 tgatgggttgataggtgcagcaaacacacatgacacataattacctaagtaacaaacctgcacattctgcacatgta
 tcccggaaactaaagtataaaaaataataataaaaaataaaacttagtagcatctattgttccagagcctgt
 aattgctcttcaggcagctctcacataaaaaacctaggagaacctcactgtcactgttccatgaggtgttaggaaaac
 ttgctcactgtccacctttgtctccagcagagactggtacccttctgtgtgccaaggaataaagtggtaattgggaa
 gattaaaaatgtttttccaaggagttttttaatttaatttttttaaaaaagaaaaaactcttagagggaaaaatga
 atatatgacttttgatgtattgttcttagtaacttagttataatttacttaaacctgagactcttgctaagtga
 tgattagaataattaggtggctggccagatggcaaataggaacagctgcagctctgcagctcccagagagatcaatgc
 agaaggtgggtgatttctgcatttccaactgaggtaccgggctcatctcattgggactgggttagacagtggtgcag
 cccatggaggtgagccaaagcaggtggagcattgcctcactcaggaagcgcaaggggtcaggggaactccctccc
 ctagccaaggaagcctgagggactgtgccaatgagggacagtgctatctggccagatactacacatttctacag
 tctttgcagccggcagaccaggagattcccttgggtgcctacaccaccaggggccctgggtttcaagtacaaaactgg
 gtggccatttgggcagacaccagtttagctgcaggagtttttttctacacccagtgccacctgaaattccagtgag

acagaaccatttcaactcccccgaaaggggctgaaggccaggcagccaagtgatctagctcagcagatcccaccccca
 tggagcacggcaaggttaagatctgctggtttgaaattctcaactgccagcacagctgcctgaagtcaacctgggatgc
 tccagcttggtcgggggaggggcatccgccattactgaggttgagtaggctgttttctctcacaatgtaaacaaa
 gccactgggaagtttgaactgggtggagcctaccacagctcagcaaagccctgtagccagattgcctctctagatt
 ctccctctctgggcagggcatctgggaaagaaaggcagcagccccagtcaggggcttatagataaaaactcccatctc
 atgggacagagcacctgggagaggggggtgctgtgggcccagcttcagcagacttaaatgttctttgctgttggct
 gtgaagagagcagtggtatctccagcacagcacttgagctctgctaaggacagactgccttcttaagcaggtccct
 gaccctctgattcctgagtgaggagacacctccagcaggggtcgacagacacttcatacaggagagctctggctgg
 catctggtgggtgcccctctgggacaaaccttccagaggaaggaacaggcagcagctcttctgtgttctgcagcttct
 gctggtgatcccaggcaaacagggtctggagtggacctccacaaatttccagcagacctgcagcagaggggctga
 ctgtagaaggaaaactaacaacaggaatagcatcaacatcaacaaaaaggtatgtccacacgaaaacccgtacaa
 aggtcgccaacatcaaagatcaaacatagataaatccacaaggtatgaggaaaatccagcacaacaaagggtgaaaatt
 ccaaaaaccagaaatgcctcttctcctccaaggagcagacaaactcttggcagcaagggaacaaaactggatggagaat
 gagtttgatgaattgacagaagtatgcttcagaaagtgggtaaaaaacagactcctccaagctaaaggagcatgctct
 aacccaatgcaaagaagctaagaaccttgaaaaaggttgagggaattgctaactagaataactagtttagagaaga
 acataaatgacctaatggagctgaaaaacacagcagcagaaactctgtgaagcatacacaaagcttcaataactgaatc
 gataaagcagaggaaggaatcagagattgaagatcaatttaatagaataaagcatgaagacaagatttagagaaaa
 aaagaatgaaaaggaaggaacaaagcctccaagaaatgtgggactatgtgaaaagaccaaacctacatttcatgtgt
 gtacctgaaagtggcggggacaatggaaccaagtgtgaaaacactccttaggatattatccaggagaacttccccaa
 actagcaagacaagccaacattcaaatccaggaatatcagagaaacaccacaaagataccctcaagaagagcaaaccc
 caagacatgtaattgtcagattcaccaaggttgaaatgcaggaaaaaaagttaagggcagcgagagagaaaggtcgg
 gttacccaaaaaggaagcccatcagactaacagtggtctctcagcagaaacctacaagcctacaagccagaaga
 gagtgggggccaatattcaacattcttaagaaaaagaatttcaacccagaatttcatatccagccaactaagcttc
 agaagtgaagtagaaataaaatcctttacagacgagcaaatgctgagagattttgtcaccaccaggcatgccttaca
 agagctcctgaaggaagtactaaataaggaaggaacccggtagcagccactgcagaaacatacacaattgtaaa
 gaccattgaaactatgaagaaactgcataactaatgggcaaaaataaccagctaacatcataatgacaggatcaaat
 tcacacataacaatatattaaccttaaatataaatgggctaataatgccccattaaaagaccacagactggcaaattgg
 taaagagtcagagcccatcagtggtgtgtgttctggagaccatctcacatgcaaagacacacataggctgaaata
 aagggtatggaggaagatctaccaagcaaatggaaagcaaaaaaaagcaggggttgcaatcctagtctctgataaaa
 cagactttaaaccacaagaatcaaaaagagacaaagaaggccattacataatgataaagggtcaattcaacaagaa
 gagctaactatcctaaacatatatgcaccaatacaggagcaccagattcataaagcaagttcttagagaccaca
 aagagaccaagactcccacacaataatagtgtagactttaacaccccaatgtcaatatagggtcaacgagacagaa
 aattaacaagcatattcaggatttgaactcagctctggacccagtggaactaatagacatctacagaactctccacc
 ccatatcaacagaatatacattcttctcagcaccacatcacacttattctaaaattgaccacataattggaagtaa
 acactcctcagcaaatgcaaaagaatggaatcatacaaacagctctctcagaccaaagtcaatataattagaact
 caggattaagaaactaactcaaaaccatacaactcagtggaactgaacaacctgctcctgaatgactactgagta
 aatacaaaaagaaggcagaaataaatacattatttgagaccaatgagaataaagatacaacataccagaatctctg
 ggacacagctaaaaacagtggttaggggaaattcatagcaataaatgcccacaggagaaagcaggaagagctaaaa
 caacactctaacatcacaaattaaaggaactagagaagcaagagcaaacacattcaaaagctagcagaagacaagaaa
 taactaagatcagagcagaactgaaggagattagagacacaaaaacccctcaaaaaaatcagtgaatccagaagct
 gggtttttgaaaagattaacaaaatagatagaatgctagccagattgataaagaagaaaaagagagaagaatcaata
 gacgcaataaaaagatgataaaggagatataccactgatcccaaaaaatacaatctaccatcagagaacactataa
 acacctctatgcaataaactagaaaaatctagaagaataatgaataatcctggacacatacaccctcctaagactaa
 aggaagaagtcaaatcctgaatagaccaataataagttctgaaatcgaggcagtaattaacagcctaccaacccaaa
 aaaagcccaggaccagacggattcacagctgaattctaccagaagtacaagaagagctgggtaccattccttctgaa
 actattccaatcaatagaaaaggagggaatcctccctaactcattttatgagtcggcatcatcctgatacaaaaac
 ctggcagagacacagcaaaaaataaaattgtaggccaatatccctgatgaacattgatgcaaaaatcttcaataaa
 aaactggtaaaactgaatccagcagcacatcaaaaagcttatctaccatgataatttggcttcatccctgggatgcaa
 ggctgggtcaacatgcaaatcaataaagataatccatcacataaagagaaccaatgacaaaaaccacatgattat
 ttcaatagatgcagaaaaaggcctttcataaaaattcaacagcccttcatgctaaaaactctcaataaactagggtattg
 atggaacatatctcaaaaataaagagctatttatgagaacccacagccaatatcatactgaatgggcaaaagctg
 gaagcattcatttgaaaacgggcacaaaaaaggtatgcctctgtcaccactcctattcaacatagtttggacgtt
 ctagccagggcaatcaggcaatagaaagaaataaagcatattcaaataggaagagaggaagtcaaatgtctctgtt
 tgcagatgacatgattgtatatttagaaaaccccatcatctcagcccaaatctccttaagctgataagcaacttca
 gcaagctctcaggatacaaaaatcaatgtgcaaaaatcacagcattcctatacaccaataatgacaaaacagccaagt
 catgagtgaactcccattcacaattgctacaaagagaataaaatgccttaggaatacaacttcaaaagggtgtggaag
 acctctttaagagaactacaaaccactgctcaatgaataaagagaggacacaaacaaatggaagaacattccattc
 tcatggataggaagaatcaatatcgtgaaaatggccatactgcccagtaattttatagatccaatgctatcccat
 caagctaccattgactttctcatagaattagaaaaaactactttaatttcatatggaacaaaaaacagccgta
 tagccaagacaatcctaagcaaaatgaacaagctggaggcatcatgctacctgacttcaactatactacaaggcta

cagtaaccaaaaacatcatggtactggtacataaacagatagatagaccaatggaacagaacagaggcctcagaaata
 acgccacacatctacaacatctgatcctttgacaaaacatgacaaaaacaagcaatgcagaaaggattccctatttta
 taaatggtgtcgggaaaaactggttagccattttgcagaaaactgaaactggacccttccttacacgttatataaaaa
 ttaactcaagatggattaaagacttaaacataaaaacataaaaaccataaaaaccctagaagaaaacctaggcaatacc
 attcaggacataggcatggcaagacttcatgactaaaataccaaaaagcaatggcaacaaaagccaaaattgacaaa
 tgggatctaattaaactaaagagcttctgcacagcaaaaagaaactaacatcagagtgaacagggaaccgacagaatg
 ggtgaaatTTTTTgcaacgtatccatctgacaaaaggctaataatccagaatctacaaggaacctaacaagtttaca
 agaaaaaaaacaaccccatcaaaaagtggcggaagggtatgaacagatgcttctcaaaagaagaaatTTTatgctgcc
 aacaaacatacgaagaaaagctcatcatcactggtcattagagaaatgcaaatcaaaaaccacagtgcagataccatct
 tatgccagttagaatggcgatcattaaaaagtcaggaaacaacagatgcaggagaggatgtagagaaataggaacac
 ttttacactgttgggtgggagtgtaaattagttcaaccattgtggaagacagtggtgattcctcaaggatctagaa
 ccagaaatatcttttgaccagccatccattactgggtatataactcaaggattataaatcatgctactataaaga
 cacatgcacatgtatgtttattgtggcactattcacaaatagcaaaagacttggaaaccaatccgaatgcccatcaatga
 tagactggataaagaaaaatgtgacacacatacacatggaatactatgcagccataaaaaaggatgagttcatgtcc
 tttgcaggagacatggatgaagctggaaaccatcattcttggcaaggtaacacagggaacagaaaaccaaaccacat
 gttctcactcataagtgggagttgaacagtgagaacacatggacactgggaggagaacatcacacactggggcctgt
 caggggtgtaggggctaggggagggaatagcattaggagaaaatacctaattgtagatgacaagttgtagtgagcagaa
 accaccatggcatctgtatacctaggtaacaaactgcacgttctgcacatgtacccagaacttaaaagtattatt
 attattattataataataataaaaaagaaatacaataaataagaatgcagcatacagcagtgattctcaaacacat
 tcagcatcagaattacccttgaatctttaaaaatatatacatatgagatcttagtctccaagatttgtaagtttgg
 tattgggtccctgggcctatgttgggttagaaacttctacagatggtttggatgtatgggacagtttaagaatcgc
 tgaactaaaatcaaataaactgaatatcctgtgatttagagagacttatcgtttatttccactatccaagtacttgca
 ttagagcgtggctagaaggatttgcagccttgaataatcagaaattcagacattttgagatgagagaactgctg
 aagattttattctgacttgaataaaatttctaattagaacttccaggtgagagcaaaagcctggaaacaattattcc
 tgagccagaggaggatcgagtttgactccaggcctaaccacttactaggtctatgacctgggtcagtaatttaaatt
 ctctgtatctcaacctctcaacagggtattggtagggattaaatgtgttagtctgtgaagtgtctagagcagtgct
 ttggcatagtaaatgcttaatgaatttcagccactgtttttatttttagtactttccagctcccccaaaagataact
 ttttttagacttgtattaagacaataaaaagtttaatcagcatgcttcatacctaataatgcttcactttatagcaa
 agtttacaagactaaaactgttttgttgaattctctgagttctcatgtgtttattaatgattttttctgctgtttat
 tcatctgaattctactcattcttcaagacctagctggaaatcctgtttctagaaagactcttgcccataataataaac
 ctgcccctatctgagttcctagggtggtctgtacctcataatttggttaatttaattgtatatgcacttatatacaaaaac
 attattgtgtgtctttgctgtatcagattctaggctggaggtgtagatatgatgtttttgtctagaaaaatgttct
 agaatgtcctactcaggacagttctgttgaactttaaaagacacatttccctaacagacacttcatgaggcagccccagc
 ctgtacctgtgttcttgacctgatgatcaagtttgatttaagcctcaccacttactagctctgtgattttgggcaa
 gttacttgaattctctgtgtgtagatagaacaaatgttgagggaatccctttcccccatcctgtgtttccacaag
 gaacttgcttcttaataagtaaacactttcagggaatattctagggccttctcttatccccattactgttctttct
 gtgaaaagaggagaggttaattctgatggatgaaatccttaattcttcatcttctggactgtagagcctgtgaaccaa
 agcaatggaccacttgactgaaattgaggtgaccctgtattttgattcttattttggcaacttattctattctgt
 tcccaattcaaaatcccaaggggagaaggaagataattgattaccagaagtatgtaattggtggtaggaagttgaata
 aatggtaactttttaaaagtgcagtagatatagtccttatcccagagaagctaagtttgctttttcttctctcat
 gtatttttagtattttctacaattagattgtaaaccttttaaaagcaagaatatttctacattttcttactctga
 tagcacacagtagactgctgggcacatacatagtaggtggctctgtaggtacttgctaaatgattcaacatgttttt
 cctcatggaaaagaaagatttcagattgttcttatcagctaggaaggcactctgaataggaaatcagttctagggc
 aggtatccataaatgggttatgatttccaacttacttgccccagaggctcgtaattgtgaactcttcatgggtact
 ttgtcttgcttcatgagctatacatgctaaggggttagcagatcataatcttttgatctacaaaatatgatcttt
 attgaacaaaaacttgggccaaggcctttctcctttggccacttccctcctttttcattctctttttgggaatg
 ccctttgtgcatgttagtttacagcatgtaccacattgcagctgattgttgggttttgggttcttaccacccttaaca
 ctgcagtcctcccaagggcagaaattcagttctcatttcttattgtgtctcagtgctgtgctcagagaatatctatta
 tttgaaaaaatagtgcaaaagtaatttttaggagactacatcacactcatctaaactgcaagtttgacaagttgaca
 tccaaaagaaaggctctcctaataaacctcgccacagaaatttgggtgacctttagctctggagaagcagaggc
 aaaaatgaaacctaaaaattatttgggttttttaaaaaatgttttctcatggagtaaaaggtctacagctgagttct
 tttcatatgagggaaatgcagaaaacacagctggttctgactttcagcttcaactgagcgaccagagctctgctggtg
 aaacaggaaactgtatttggccctgacgtgcaccttggaaggtgcagctcattgtccctttgttcacataaatagt
 tttttaagaattgtttttgatcttgtgagcctctaactaaatgattaaacctgcaagttggccatttggggaata
 ctgaagcacttctcttgagggtattgacaggtgggaatgtgccacctcttgggtctctggttttcatgtcatac
 ttgcaaatcagtgacagtttaacttgggcaatcacttagcaagcttattgagttaccaagtttaattatcccaact
 ttgcatgaagcaaccttgaaaatgattttcctaagcaagtaacatccaaactcagtaaccttcttaataacctttgc
 tgaatgaataaatgactaattcataaaaaatgtaacatacttttaattcttacttacgggcagtttaagcctctgtg
 gtaagaggaggcctcggttagagataacataggtatgaagcctcctagagaaatttctattggaacatgggtctg
 ctatgaagctagaagtgcagggacatttatatttgaccattatatttggcttcagagcttctcaacatggggcccaa

gtcaaggctcccttggttcattaagaggaggtccaggagtgcatgacacccatcagactactgagaccagctggaac
 taggcacctgacaggggcttgccaatcaaaatagttcttattttttctgagttccaagtaactagtttcttaa
 cccagtgctcggatagtagtgccaagtgaggagtagcttcaatgaacttccctcatgaggttatttctagcctattgga
 atgtttcgtttttaggagggtaggaagggaagtccttgaatttttgcttagtttaattgtgtgatacagctttgac
 catccgtttaatgggagatctgtttccagatgactatacatgtggaaggagaagtttttgagtggttttttaaa
 ccccttttaagaatgggttttcathtagtctctacatttgggggtaaaaggctccttagggagactttcaaaagt
 atttgaagtttgcatctgatttcagaggtgagttggaggccctatctgtgtatgacagacacatgtctccaacaacta
 tatgttcacaaggactaagagccatccttttgggtccatcattcaacattgatctcacattcgtgttcgtatcagta
 tctttacagtgcgctcccagttacatctccctaatttcccttagtaggcttcacagaatttgcagtgatgcaatgg
 cagatgaccacatgtggagtcatttaaccacatcttccactgcaagtcagcccgtcttgatgtctgtttatgttta
 gattccatcttttggaaagatttcattcctctgcactatctcagtatctcagatgcttttgagactgggtccctttcc
 cctctatgtttggccatggccacccctcagggttggtgtgtgtttcacagctgctgtttgttaggggtgaccttta
 caatgtacaaaagctcttcccatatgttgacaatccctgggtgagtgctgtgagttaggcagggtgtatcacgtgt
 cctcatcatattacagtggtaaggcaacagggttttgaatttgatcacccatgaatttgtctaatttgttggtaaa
 aatgggtcatgtatcagccgtttcacagggtcagcttaatagaaagtgggagttaggcaggaccagaattcaggact
 tcagcccccgttcccaggagactattctctatacccaattgtcccacctgaatcagtttcttctagggaaatatctc
 caaaactgagatggcaccacaggacttcttaattgtagtcattaccaggaaaaacaagcaaaaggaactgggtgtaa
 tctctgttttgggtgattgggtggagatttggagattgtctgtgtcaaaagtaagccactagattaaatgttttgt
 taataaattgggtatttttaatttaatttatttgacaggttaatttacattattcaaaaatcaaaataaattttaaag
 aagtttacactgaaaagtcttgcccacttataccctgctcacctcagtatcccccaatacataccatctataaggt
 gatcatttgtattagtttctgtgaatccttgatagtggttttatatagatacaggtaaatatgagtatgtactat
 tatttccccccacccacccctgttttttttgagacggagtcctgctctgtcgcagggctggagtgagtggtgca
 cgatctcggtccacgcaagctccaccattttccccatttttaaaacaaaaggtagtagccatatatacactattt
 tacacctgttttatcacttactaataataaccagagagctttccatcattttgtacatatgcacctatatctgtca
 attattcccagaagtgaattgctgggtcagcaggaataatcatgtataattttgataggattgcttaattgtctc
 gcacagggttgaattgttgtactcccacttttagtgatgagaagacctgttttccatagcctcatcaaacaga
 gtgtgtgagattagatgagaaataggaggtgagcagcttttaccatccgtagtttgagtggtggaacactgcaca
 gttgcaagagctggtgcaggtatcagattagttccagtggaacgctgcctcaccatggccatgggcttgcgcagc
 tctagtgacacacacgaatggaccacgttgccacttgacagaatttccgtgtagcagaaggtgaacatgcattcat
 tattcatctaactagccatgctggtatctaaagagcacaacagtggtttttagaacaaaaagaaaattgtttcacta
 caacacactgtgtataaggcttcaatgctcttttccagctattaacattattttcaggactgagttcaagagatg
 tatcccaaatcacagggtatgtcttgaagcttggaaactttcatactcaagggtatgctttttgaggaatgatttta
 cacttactcaacatttgaattaaataatttagtactttataagataaaatttaaactgtccaagtacaataaaacat
 tgaactatgatgcattattgctagacttttccctaaagttgccaagtggtttccctgattaggcaaataggggatc
 atataaaaatgccatgatttacggcctagataacatctccaccatttgagcagcatatattccaggtcatccccaca
 taactccttaccattctcattagaaaggttgattcttagtcttatttttctctgaggacagcaaaaaaaaaaatccc
 cttcagttccactgcatagaaaaagtggttaaatggagccgggcacagtggttatttaatttaaatggacaatattt
 tttatagaattttgacagggccactgtataggggaaagtcactcctcttcccctttatagaagagtgacacctggac
 agttgcattgatgactgtatccagctacacaagaggtcattcctgggcataagaatggactgcaaaaatctagctg
 aaacaccattgacaaatagacattttcttttggtaataaacctgtgaaggctttcataacagacatttccagtttt
 gttctcaggtccttgcagctgctcctctaaaagtgtgctctcttccaagagctgacaatggccagaagcaaggtgt
 tctgtcttttggccatcatctaaacttgccacacacatttgggatgtcagcctagggtataggttttgtatccac
 tcagtatggcttgggtctggttgccttgggtattctatctgagggcctctgggcacagtttgggtgtgagagaac
 ccattccatgacctccttcccttggctgttttgactcgatggctcttgttggcacagctctgtgagtgctgtgct
 ctatccatgcccagaccatctgttctgctgtctgtggtctgaagtcgttttctgaactattccttgataataaatt
 tgagatgatcttgttctacctttctttcaagtcacatcttagcccttagccacattcccgagaacatgacaaat
 ggatgggtcacaagtcacgtagcataggggtgtcagaccacgaggcttgaagggtattctgttgggtgctaaaaagaa
 agattttgtgtcaccacgatttttttaaggcatgttgacacttaggccttaattgaaagcgttcttactcaagta
 gagttgacagaggagtatttggtagtcgcggttgcgtgctgaagagcatgtggttctgtttcaatgccaatgaga
 tcttctcaggggaaaaatgttctgacatctcaacaaatgacctcatgcatagtttgacaaaataccctattaagt
 atgcataataggttggtagcttggtaataattcaatactggaacagagtagcaacaaagaaacattaggggttat
 atttaacctctgtgaattagtggtgaacaaactgcttatcagaaatgctcatatggggctttgtttaataaata
 agaaactggcatataggggtctgcaggtatattctgccaagtagacctccctcacattataagacaccacatctatgt
 ctgaccccatatggaagaggcatagcaagccagcactggttcatattccctctccaccacataatgggttatgtgat
 cttagggaataccacgaaactctctgggcctcatttccagctataaatgggtggataaataatttatctca
 ccattataaataatgttagctattatttttatcaagtttaatacaaaagagaacattttacttatttttccagctatc
 cagagcatcttccaaaatcctatcaccaacaaatactgtattgtatttattatagcaactatgtaaaaatggagtc
 ctgtcctatgcttagatgaaatattgttggtattttagtttgcagtcctctataggaatcagtggttagtgaaaacg
 ggtggagataaacagatgttttccagtcctgttgcacagtagcccaaatgaaatgtttccataggtgcatt
 ctaatggcttaaatgatgcagatattttctggccagccataggtatctttgtcatctaagatgttaataatttcc

[illegible]

gatgcgggctcttttttgggtccatatgaactttaagtagtttttttccaattctgtggagaaagtcattggtagc
 ttgatggggatggcattgaatctataaattacottgggtagtagtgccattttcatgatattgattcttctaccaca
 tgagaatggaaatgttcttccatttgggttgcgtcctcttttatttctcttgagcagtggtttgtagtcttcttgaaga
 ggtcttccacatcccttgtaagttggattcctaagtagtttttattctctttgaaacaattgtgaatgggagttcactc
 atgatttggctctctgtttgtctgttattgggtgataggaatgcttgtgatttttgcacattgattttgtatcctga
 gactttgctgaagtgtctatcagcttaaggagattttgggctgagatgatggggttttctaaatatacaatcatgt
 catctgcaaacagagacaatttgacttccctctcttctcatttgaatatcctttatttcttctattgacctgattgcc
 ctggctagaacgtccaatactatgttgaataggagtggtgacagaggacatccttgttttgtgccagtttcaaagg
 gaatgcttccagcttttggccattcagtagacattggctgtgggtttgtcgtgaatagctcttattattttgagat
 atgtcccatcaatacctagtttatttagagtttttagcacaaaggctgttgaattttgtcaaaggccttttctgcat
 ctattgagataatcatggtttttgtctttgattctgtttatatgatggattatatttattgatttgcataatgttga
 ccagccttgcatccagggatgaagccaacttgatcatggtggataagctttttgagtgtctgctggattcgggttgc
 ccagtattttactgaggatttttccatcgatcttcatcagggtatattggcctgaaattctcttttttgggtgtct
 ctgtcaggctgtggtatcaggatgatgctggcctcataaaatgagttaggaggattccctcttttctattgatta
 gaatagtttcagaatggtaccagctcctccttatcctctggtagaattcagctgtgaatccatctggtcctgatgg
 atttttttgggtggtaggctattaattattgcctcaatttcagagcctgttattggtctattaagagattcaacttc
 tctcgtgttttagtctgggagggtgtgtgtgtccaggaatttataaatttcttttaggttttctagtttatttgcatt
 agaagtgttttagtctctctgtaggttagttgtatttctgtgggattgggtgggtgatccccctttatcacctttt
 attgcatctattttagattcttctcttcttcttcttatttagtctgttagtctatcaattttgttgatcttttt
 aaaaaaccagctcctgggttcattgattttttgaaggagtttttctgtctctatctccttcagttctactctgatct
 tagttatttcttctgtcttctgctagcttttgaatgtgtttgctcttctctctaaattgtgatgttaggggtgcaat
 tttagatcttctcgtcttctcttctgtgggcattttagtctataaatttccctctacacactgctttaaattgtgtccc
 agagattctggtatgttgtgtcttcttctcattgggttcaaagaacatctttatttctgccttcacttcgttaagt
 acccagtagtcactcaggagcaggttgctcagtttccatgtagttgagtggttctgagtgagttcttaatcctgag
 ttctagtttgaaagcactgtagtctgagaggcagtttgttataaatttctgttcttttacatttgcaggagtgctt
 tacttccaactatgtagtcaatttttggaaatagtgtagtggtgcccagagaagaatgtatattctgttgatttggga
 gtggagagttctgtagatgtctattaggtccgcttggtgacagagctgagttcaatttctggatatcttgttaattt
 tctgtcttgttgatctgtctaatattgaccgtggggtgataaagctctccattattattgtgtgggagtcctaaagtct
 cttttaggtctctaaaggacttgccttgtgaatctggtgctcctgtattaggtgcataatttttaggtaggttagc
 tcttcttgttgaattgatccctttatcattatgtaattggccttcttctgtctcttggatcttgggttaaagtc
 tgttttatcagagactaggattgcaactcctgcttttttttgccttccatttcccttggtagatcttctccatccct
 ttattttgagcctatgtgctctctgcacatgagatgggtctgctgaatacagcacactgatgggtcttgactcttt
 atccaatttgcagctccatgtcttttaactggagcatttagcccatttacatttaagggttaatatgttatgtgtga
 atttgatctctgcatattgatgttagctgggtatttttgcctcgttagttgatgcagtttcttctcagcctcaatgatc
 ttacaatttggcagtttttgcagtgctggtactggttcttcccttccatggttagtgcttctcagagctct
 tgaaggcagggcctgggtggtgacaaaatctctcagcatttgcctgtctgtaaggattttatttctccttcacttat
 gaagcttagtttggctggatagaaattctgggttgaattcttttctttaagaatgttgaatattggccccact
 ctcttctggtctgtagagttctgcccgaagatgctgttagtctgatggacttcccttggggtaacctgcccctt
 ctctctcgtgcacttaattgttttcttctcatttcaacttgggtgaatctgacaattatgtgtctttaggttactc
 ttcttgaggagtagcttctgagcattctctgtatttctggaattgaaatgctggcctgctcagtagattggggaag
 ttctctggataaatcctgcagagcgttttccaactgggttccatttctcccatcacttccaggtacaccaatcag
 atgtagatttgggtcttttccatagctcccatatttcttggaggcttgggtcatttcttttactcttttctctaa
 acttctcttcttgcctcattcattcatttgatcttcaatcccttcttccacttgattgaatcagctactgaagct
 tgtgcatgtgtcacatagttctcgtgccatgggtttcagctccatcaggctcatttaagggtcttctctatgctgtttt
 ttctagttagccattcgtctaatgtttttcaagggttttagcttcttctgctaaaagggttcaaacatcctccttag
 ctggagaggtttgttattactgatcatctgaagccttcttctcacttgtgaaagtcatttctgtgccagcttt
 gttccattgctggcgaggagctgcattccttggaggagaagacgtgctctgatttttagaattttcagcttctctg
 ctctggtttctccccatcttattgggtttatctaccttgggtctttagatgatggtgacgtacagatgggggtttgggt
 gtggatgttcttcttcttggtagtttcttctaacagtcaggaccctcagctgcaggtctgttggagtttgcctgg
 aggtccactccagaccctgttggcttgggtatcaccagcagaggctgcagaacagcaaatattgcagaacggcaaat
 gttgctccctgattgttctctggaagctcgtctcagagggggcactggcgtatgaggtgtcagtcggccctac
 tgggaggtgctccaggttaggctactcaggggtcaggaaccacttgaagaggcagactgtccattctcagatatac
 atattccatgctgggaggacccctactcttttcaaagctgtcagacagggacatttaagtctgcagaagtttctgct
 gtcttttgttcagctgtgcccctgcccctagaggtggagctcagagggcagggcaggtcctttagctgctgggtggg
 tccacccatttgcagcttctggtgcttgtttacctaactcaagtctcagcaatgggtggacaccctccccagcc
 tcgctgctgcttgcagttcgtatctcagactgctgtgctagcagtgagccaggctccgtgggcatgggaccctccga
 gccagggcctgggacataatctcctggtgtgcccgtttgctaagaccattggaaaagcacagattaggggtgggagtg
 tctgatttttcaggtaaccgtcagtcaggttcccttggctaggaaagggaattcccccaacccttgtgcttctgt
 ggtgaggtgatccccaccctgcttgggtcagctcctggtgggtgtaccactgtctgacaagccccagtgagatg
 aaccgggtacctcagttggaatgcagaaatcaccgctcttctgcatcactcacgctgggggctgtagactggagct

gttcataatttggccatcttggaaacctccctttccaagttctttattacagagtgggtcactgaaacttcatggaaca
aattggaaattatcttcttaattaatgtcactgtctaccatgtatgggaatttggtaaatattatatggtttcaata
acatagtagatagaacattgtcaaacttaaaacttcagtgaaattgtaacagatcccacctgaaattctaaagaaaaa
gaattctaattgaagaggttaaacttttacagggaaatgtcaactgccatttgggtcctgtaaacaaaaaactgtttt
ttaaaaaagtaaaactttaaagtttttcagatgacctcatttgcataccaagtggcttgagtagcttgatgctaa
gacttctttgttacagactggagatgtgtgctactgggagctgttgcctgtgacaaggaggcagaggtgagggc
aagggttcgatgtgactgtgaattctgggtggctctggctatcgggagccttcattgattacagcaaaacagttgctt
tcctagggcaatagtgctctgtcaccaggtggagttcagtggtcatgatcaatcgctcactgtagcctcaacttc
tagactcaagtaatcctcccacctcagcctcccaagtagctgaaactacaggtgtgcaccaccacctaattttt
ttaatttttaagttttttagagacatggtctcactgtgtgcccaggttgatctcgaattcctgggctctagtgtat
cctccgcctcggcctcccaaagtgttgggattacaagtgtgagccactgcacctggccctttgcaaccttcttgac
aatgcatttctttattccctaactggaagttaacttcttctctttataaaattgtatctgtaccttttctgggtcat
ttctacctttatattctagttagctatgtcctacctccctcctagggaggaggtaagtaagactggaaagtagact
tcatgtgtgatgaatgaatgaacaaaaggaggtctaacatattggatatagtcactggatgcaaaattaaaaattttt
aaatattgatttgcaagatttcattaaggtcaactcttaatagttttgatcatatatgttaggaacaaatattaat
aacttcttcagcattaccattatctttataggactgtctaaaatgagcagccatatctttaaactgtgttttctctg
attacacgctcacaggtaaaacccaaagggtgggaaacaaagacttttttttttctgtatgcctgaattat
ctgtactgttctgttttccacaccttggccatagaaacttagtttctaactgtctacaatttttgcagttctttct
cttagaaaaagaccacattgtctgaaatttcatccatttaagtaataagccttaaagttgaaggatcttggctcatg
attaatctagacctacaaagtagtatcttaatggcactccttttagaaagttaggttccaggacacacatagctgca
gtgtccacattttgtaagctccttctgtgtcacagccactctcttctctgtggctgatattctaaactggcaacac
atcctgatggttaaagcttgggtcaggagacaggtgacctactagctttatggcatttgacaggttacctaacctct
ctgacgcataattgctcatctatataatgggataataataacctcctgtctccttgtaaaaaatcaaatttagatg
acgctctgtaagtgttctatagctctcttagacaaatgttaagttatgactacagcaagagtaaaagagcatgtgttat
ggacatttcttcagtgaatgtctaagacttgtgagtcacacttaaagctaaacttgatatctacttcatgtatttt
cttttttagttctatgtactatattgaatttctgtacagtggggctatgaaagccttcttagcattttatagatgtgg
ttgaattaatggctgtaagccttaaagcagaatttagacagcatcaatgaattttattaagtataaaataatataat
ctgcttagcaatattacacagcctctttatcttatgtgtgataaagagtcacccgaaggttgaaaatgaagaattgt
cctggaagctcttacttaattcttttattatttcttaataacagtatataaaattactcattgaaagcttagcagaata
agaaacaagaagttaaaggctgaaaactacaaatttctgtattattattgttattacttcccaagctctctattga
tctgttagaaaatagagctacacaggaaattgtaggacagtttagtatgtggtagtggttatctgcttttaattattca
agtaaggttttattccattagaggaactcaagaagtgtgtcatggctgataattgtctatctgtcaaatccttagag
cagggtaccgcaacacccagccatggattgttaccagtccctggcctgttaggaaccagggtgcacagtaggaagt
gagcgcggttgagcaaacattgccatctgagctctgtctcctttcagatcagcagcagcattagattctcatagaa
gcactgacccctgttgaactgcacatgcaaggatctaggtgtgtgctccttatgagaaaatccaatccttagat
aatttaactgatgatctaaggtggaaccatttcatcccaaaaccatccacctgctactcccagaccgtggaaaaat
tgtcttccacaaaactgggtcctgtgctgcaaaaagggtgggaccactgccttagagtttataatttggggtagcac
agcctatatttacctgagaatttcaatgggttactgtatcttccaaatgaaaaggcttcttacgaaaattatattcc
aaactgtcttttctttagtttaataaaacctatcagtaagtttttactgagtagctattacatttttctctgtta
agcattatggggctcagacatgatccattccctcaaagacttacctttcagctgaagcatgagaatgagcaaa
atacgggttaacaattaacaagttagtaggagcagctcggaacatggtgaaacctgtctctactaaaaatacaaaa
attagccgggcatggtggtggcgctgtaatcccagctacctcctgctgaggcaggagaattgcttgaaccaggga
ggtggagattgcagtgagccgagattgcaccattgcactccagcctggcgacagagcaagactctgtcttgggaaa
aaaacaaaaacaaaacagtgagaagggaatcaagtactacgtaagatgtaattgtggaattttaggaagggaaggcag
tgtatgctggagtaattagagaaagggtgcatgattttagtgcttgaactggatcatgaaggataagcaagattt
tggcagcaagttagaggggagagaggatttgtcagaggaatggaacaagtcaggaggcagtaattgtgacggcactc
caaggactctgtcctgatcgaggacagaagtgtgaagcattgagtagtttgagaaagttagctaagaagggtgaggg
cagatgttggagagagttgagtagatcagagagaagacattagattttagcagatagaaacaaaatgccattgccagtt
tttgtgtaagagaatagtagtttaggtgttaccaggaaagtggtcatcagagttgaatggagcagaaagagtgctg
atacagcatcgggacgttgtgtgcacaaaatgaggtgtgagggctgagccaagatggtggcagtgggatggataaa
aagggtgagccaggacaaatattttaaggaaaaataaacaggacatcttactgactggattggaaggctatgcag
gaaatataattgtcaaacttgattccaggatttctatctctcctgggttggccaaaatcagggaaccattgttta
gaaaaggtaggagataccactgttccaacaaaagatttagtttgggtgtgcaccacttaacttcaaggccttac
aagttagtagacagtttagtagaattgcagaagtgcactcagagagcagggttgcaatgtgggggttggaactttgt
caccattgtgttaattcctaattctatgcagatgctcagcttgaggaatacccatgtttgggcttcagaatgaaagc
caagtaattatttactcagatgccaatttccctctgaaatatttgcctcatggaactgagagaaacataataaagca
ttaattattttctcataaagttattataaaaaagataagatcagtgaaaggcagagtaaacatagaaagccaagtata
gaaaatggtatcattcaagactcattagtggtggaacaaaacaaattttccaacagcttaagatgcctcag
tattttggaccatttttaagtagtttagtggtggcacttagtaaatatgtattaaactatagttcattattctttt
tttttttttttagagatggagtttactctggtcaccaggtgcatttttgccttcttagtgatatataaaatgtcog

agtttcacaatgatgggtatcttagatttgattaaatatgggtattaaaaaatagctgatcacagaaagtctctaccag
 tgtgatgtagatggcctaagatttccacatttgcaacttttattgacctaaataagaggtgccccttgggttggtt
 ttatttggactgggaatatttaggagaaagctttttcattcagtggtgtaagtacaatctaccagaaatagaaaccccc
 atggacgatctatttctttgatggtagagactcagaacatttcacaaagatttagttgtagcggaatagacatctg
 tattttattcaaaccaattttcccttccctaactctgagaacattgtgcaatctaagcagttctaagcatgtttgctat
 tcgtgcaaagtggagtagaaatctaaaagaaattttttgggtggttagGGATGGTAATAAAGTCTCTTAGTGGTTGA
 AAATGTTATTTCTTACAAAAGTGGAGAACATTGCTTTTCAATACCAGAGTTTTTCAGCCATTTCTGCATTCTGACCT
 ATTGACTGGAGgtaggttgctttgaattcagtaaaacttcatgggcagaaacacagttccttttctacttatttg
 gatcatcatgatggccattgcatgtatgtgtcttttgaagtccatgcctcagaactgagaagtaggaataaaatta
 ggggtcagggctggggatgctactctttgctgctgagaaacacaatgcttcaggtaagtgtattctgaagtccttcacc
 acctgacggtaaccttgggttggtccataggtatgttttcattttgcctgttcatccattttaattggcttccctaga
 gcatgcttgttagatgtagagcacaatttagagtagagcaacctctggcaaacaggaaagagattaaatttgggtgata
 gcttttaagggtacttccaggaaacttcaaaagcagaaaaagaagcactagctgcctattccaaaatgtgtaaaaca
 ccactcagctttttaaagtaggataaaactcagagcgcgcgacacgcgcgcgcacacacacacacacacacaga
 gagaacatctctagtaaaaaagaaagttgagctttcttagctagatgtgtgtattagccagaaaaagccaaggagt
 aagggttttagagaactggaggagataaagtggagctgcatatgggaggtattgaaatggacttaaatgtctttt
 taatgctgacttttccagtttctccttaccagacacattgttttcatgacattagccccaggcatagacacatcat
 taaaatgaacatgtcaaaaaatgatttctgtttagaaataagcaaaacattttcagttgtgaccacccagggtgtaga
 ataaagaacagtggaattgggagccctgagttctaacataaaactttcttcatgacataaggcaagtcttctatggcc
 tttggttttccctacctgtaaaaacaggatggctcaatgaaattatcttcttcttctgtataatagagtatctctgtg
 ggaagaggaaaaaaaagtcattttaaaggctccttatagttccccaactgctgttttattgtgctattcatgccta
 gacatcacatagctagaaaggcccatcagacccctcaggccactgctgttccctgtcacacatttctgcaaaggacca
 tgttgcctaacttgaaaaaattactattaattacacttgcagttgttgccttagtaaacatttatgatttgtgttct
 cgtgacagcatgagcagagatcattaaaaattaaacttcaaaagctgctaaagtgggaaggaaggagaaactgaaagcc
 acaatttttgcacttgccttagaagccatctaactcaggtttatgtctagatcttgggggaaacactgcatgtctc
 tggtttatattaaccacatacagcacactactgacactgatttgtgtctggtgcagctggagtttatcaccaagac
 ataaaaaaccttgaccctgcagaatggcctggaattacaatcagatgggcccacatggcatcccgggtgaaagaaagc
 cctaaccagtttctgtcttctgttctgtcttctccctacagTCCACCAGGTGAGAAGAGTGATGACCATCTTTTC
 CTTACTATGGTTATTTTCATACTTTGGTTGCATGAAGGCTGCCCCCATGAAAGAAGCAACATCCGAGGACAAGGTGG
 CTTGGCCTACCCAGGTGTGCGGACCCATGGGACTCTGGAGAGCGTGAATGGGCCCAAGGCAGGTTCAAGAGGCTTGA
 CATCATTTGGCTGACACTTTTCGAACACGTGATAGAAGAGCTGTTGGATGAGGACCAGAAAGTTCGGCCCAATGAAGAA
 AACATAAGGACGCAGACTTGTACACGTCCAGGGTGATGCTCAGTAGTCAAGTGCCTTTGGAGCCTCCTCTTCTCTT
 TCTGCTGGAGGAATACAAAAATTACCTAGATGCTGCAACATGTCCATGAGGGTCCGGCGCCACTCTGACCCCTGCC
 GCCGAGGGGAGCTGAGCGTGTGTGACAGTATTAGTGAGTGGGTAACGGCAGCAGACAAAAAGACTGCACTGGACATG
 TCGGGCGGGACGGTCACAGTCTTGAAGAGGTCCCTGTATCAAAAGGCCAAGTGAAGCAATACTTCTACGAGACCAA
 GTGCAATCCCATGGGTTACACAAAAGAAGGCTGCAGGGGCATAGACAAAAGGCATTGGAATCCCAGTGCCGAACATA
 CCCAGTCGTACGTGCGGGCCCTTACCATGGATAGCAAAAAGAGAATTGGCTGGCGATTTCATAAGGATAGACACTTCT
 TGTGTATGTACATTGACCATTAAGGGGAAGATAGTGGATTATGTGTATAGATTAGATTATATTGAGACAAAAA
 TTATCTATTGTATATACATAACAGGGTAAATTATTAGTTAAGAAAAAATAATTTATGAATGCATGTATATA
 ATGAAGTTTATACATACAGTGGTTCTACAATCTATTATTGGACATGTCCATGACCAGAAGGAACAGTCAATTG
 CGCACAACTTAAGAGTCTGCATTACATTCCCTTGATAATGTTGTGGTTTGTGCGGTTGCCAAGAACTGAAAACATA
 AAAAGTTAAAAAATAATAAATTGCATGCTGCTTTAATTGTGAATTGATAATAAACTGCTCTTTTCAGAAAACAG
 AAAAAAACACACACACACACACAAAAAATTGAACCAAAACATTCCGTTTACATTTTAGACAGTAAGTATCTTCGT
 TCTTGTAGTACTATATCTGTTTTACTGCTTTTAACTCTGTATAGCGTTGGAATTAACAAATGTCAAGGTGCTGTT
 GTCATTGCTTTTACTGGCTTAGGGGATGGGGATGGGGGTATATTTTTGTTTGTGTTTTTGTGTTTTTTCGTTTTGT
 TGTGTTTTGTTTTTGTGTTCCACAGGGAGTAGAGATGGGGAAGAATTCTTACAATATATATTCTGGCTGATAAAGA
 TACATTTGTATGTTGTGAAGATGTTTGCAATATCGATCAGATGACTAGAAAGTGAATAAAAAATTAGGCAACTGAAC
 AAAAAATGCTCACACTCCACATCCCGTGATGCACCTCCAGGCCCGCTCATTCTTTGGGCGTTGGTCAGAGTAAG
 CTGCTTTTGACGGAAGGACCTATGTTTGCTCAGAACACATTCTTTCCCCCCTCCCCCTCTGGTCTCCTCTTTGTTT
 TGTTTTAAGGAAGAAAAATCAGTTGCGGCTTCTGAAATATTTTACCAGTCTGTGAACAAGTGAACACATTGTGTCA
 CATCATGACACTCGTATAAGCATGGAGAACAGTGATTTTTTTTTTAGAACAGAAAAACAAAAAATAACCCCAAAAT
 GAAGATTATTTTTTATGAGGAGTGAACATTTGGGTAAATCATGGCTAAGCTTAAAAAAACTCATGGTGAGGCTTAA
 CAATGTCTTGTGAAGCAAAAGGTAGAGCCCTGTATCAACCCAGAAACACCTAGATCAGAACAGGAATCCACATTGCCA
 GTGACATGAGACTGAACAGCCAAATGGAGGCTATGTGGAGTTGGCATTGCATTTACCGGCAGTGCGGGAGGAATTC
 TGAGTGGCCATCCCAAGGTCTAGGTGGAGGTGGGGCATGGTATTGAGACATTCCAAAACGAAGGCCCTCTGAAGGAC
 CCTCAGAGGTGGCTCTGGAATGACATGTGTAAGTCTGGACCTCGTGTCTTAAAGTGCTACATATCTACTACTG
 TGCTCAAGAGGTTCTCGACTGGAGGACCACATCAAGCCGACTTATGCCCACCATCCACCTCTGGATAATTTTTGCA
 TAAAATTGGATTAGCCTGGAGCAGGTTGGGAGCCAAATGTGGCATTGTGATCATGAGATTGATGCAATGAGATAGA
 AGATGTTTGTCTACCTGAACACTTATTGCTTTGAACTAGACTTGAGGAACCCAGGGTTATCTTTTGAAGACTTTTG
 GTAAGGGAAGGAACAGGAAAGAAACCCCAAACTCAGGCCGAATGATCAAGGGGACCCATAGGAAATCTTGTC

AGAGACAAGACTTCGGGAAGGTGTCTGGACATTGAGAACACCAAGACTTGAAGGTGCCTTGCTCAATGGAAGAGGCC
 AGGACAGAGCTGACAAAATTTTGTCTCCCACTGAAGGCCACAGCAACCTTCTGCCCATCCTGTCTGTTTCATGGAGAG
 GGTCCCTGCCCTCACCTCTGCCATTTTGGGTAGGAGAAGTCAAGTTGGGAGCCTGAAATAGTGGTTCTTGAAAAAT
 GGATCCCCAGTGAAAACCTAGAGCTCTAAGCCCATTCAGCCCATTTTCACACCTGAAAATGTTAGTGATCACCCTTGG
 ACCAGCATCCTTAAGTATCAGAAAGCCCCAAGCAATTGCTGCATCTTAGTAGGGTGAGGGATAAGCAAAAGAGGATG
 TTCACCATAACCCAGGAATGAAGATACCATCAGCAAGAATTTCAATTTGTTCAGTCTTTTCATTTAGAGCTAGTCTT
 TCACAGTACCATCTGAATACCTCTTTGAAAGAAGGAAGACTTTACGTAGTGTAGATTTGTTTGTGTTGTTTGAAAA
 TATTATCTTTGTAATTATTTTAAATATGTAAGGAATGCTTGAATATCTGCTGTATGTCAACTTTATGCAGCTTCCT
 TTTGAGGGACAAATTTAAACAAACAACCCCCATCACAACTTAAAGGATTGCAAGGGCCAGATCTGTTAAGTGGT
 TTCATAGGAGACACATCCAGCAATTGTGTGGTCAGTGGCTCTTTTACCCAATAAGATACATCACAGTCACATGCTTG
 ATGGTTTATGTTGACCTAAGATTTATTTTGTAAATCTCTCTGTTGTTCGTTCTTGTCTGTTTGTGTTTGT
 TTTTAAAGTCTTGCTGTGGTCTCTTTGTGGCAGAAGTGTTCATGCATGGCAGCAGGCTGTTGCTTTTATGCG
 GATTTCCCATGAAAATGTAAGTAAATGTCTGTGGCCTTGTCTCTATGGTAAAGATATTTATTCACCATGTAAC
 AAAAAACAATATTTATTGTATTTAGTATATTTATATAATTATGTTATTGAAAAAATTTGGCATTAAACCTTAACCG
 CATCAGAAGCCTATTGTAATACAAGTCTATTTAAGTGTACTAATTAACATATAATATATGTTTTAAATATAGAAT
 TTTTAAATGTTTTAAATATATTTTCAAAGTACATAA

FIGURA 3

Secuencia antisentido natural (NR_002832.1): SEQ ID NO: 2

>gi|84872122|ref|NR_002832.1| Hebra opuesta de BDNF de Homo sapiens (que no codifica proteína)
 (BDNFOS), ARN no codificante

CNGCNNAAGATTTCTTTCACAGGGTCCTTTAACTGTCNNNTTNTAAGAGGTCCCTTCCACTACAGGTAAAGGGAAAT
 TCCCTCTACCTAGGGCCCCCAGGANCCCTTCTCTCTACACGTTTCTTCGACTGCTNNNGATTTAAGCATTTCAG
 CTGGCCACGCAACGCAAGAAGCAATAAGAACACAAAAACCTACCCTGTTCTNTCTCTATCCGTGGCCTTTGCCACC
 ACCTCCACAACCTAGTTTCAGATTCCTCTCTTTTCTCAAGGGAACGCTCTAAAGCTCTCAAGTCCGTTTTGGCAGGGC
 GATTTTGTAAAGTCTGAANCATTTTCAGTGTGTCTCTCGATCTCAGGCAGCTCAAAAGAAAAGATCTGCTGGCTGCGTG
 AAGGTGCATTAGAAACCTGCTGCTACCTTGACAGCTGGGCTGAGCATATGCTCCGGAACCTTGCTTCTCTCCAACAT
 CCTGCACCTCAGGGTTGCACGCTCTGGTTCCCAAGCCCCCGCGCTGGCTTATGCAATCACTTAGGTACATGCAA
 AAGTATCCCTTCTCCCGGAGCGCCATTGGCCCCGGGAGGTCTCGAGCTCATTAATGAGAGAGGAGAGCCGCCAT
 TGGCCAAGAGGAGGACCAGAGGGGCGTGTCTCGGGCAAATTGGATCTCTAAATTGGATGACCTGGGCTGAAAGA
 CAACTTAAAGACCCCCAGAAAACCTCTGGTTTTATAGATAAGAAATCTGAGGCTCGAGAGAGAGTGTGTTCTGCCAA
 CATCATCACGGAACAGCTCCTGGGCTCCTGGCTCCTAATCTGTCTCATCGTGTCTGGAACAGCGATGACTCGATCGCG
 AGATCAGGAAGGTGGCCGAGTGTGTGCGCCGGGCCATCAGGCACCTTCTCTCTGCCCCTGTATGAAGAAGGATGT
 GTTTGCTTCCCTTGTGCCATGATTGTAAATTTCTGAGGCTCCTCAGCCCTGCAGAACTGGGGTTATAGCCATGT
 GACTGATCTTCGTCCAAGAAATATGTAAGAAAAAGTGTGAGTTGGCTTTAGGGCTAGAGCAATGTATCTTAGGCT
 CACTTAAGGAAGCTGTAGAGATGAGCCCCAAGGAGGGAACAGAGAAGAGCCCCAGGCTCACCAGTTGTTTGTGTC
 TCCCTACAAACATGTCAATCAAGTGGCTAATCTTACAACAGCACAAATTCATCTAACCAGAAAGAGAAGAGGAGGCT
 CCAAAGGCACTTGACTACTGAGCATCACCTGGACGTGTACAAGTCTGCGTCTTATTGTTTTCTTCATTGGGCGGA
 ACTTTCTGGTCTCATCCACAGCTCTTCTATCACGTGTTGCAAGTGTGAGCCAATGATGTCAAGCATCTTGAACC
 TGCTTGGGCCCCATTACGCTCTCCAGAGTCCCATGGGTCCGCACACCTGGAGATACTCTATTATAGCAAGAAGAA
 AGATAATTTTCATTGAGCCATCCTGTTTTACAGTATTGAATTATTACCACAAGGTACCAACCATATATGCATACTTAA
 TAGGGTATTTTGTCAAACTATGCATGAAGGTCAATTTGTTTGAGATGTCAGAACATTTTCCCGTGAGAAGATCTCAT
 TGGGCATTGAAACAGAACCACATGCTCTTCAGACCAGCAACCGGACTACCAATACTCCTCTGTCAACTCTACTTG
 AGTAAGAACGCTTTCAATTAAGGCCTAAGTGTCAACATGCCTTTAAAAAAAATCGTGGTGACACAAAATCTTCTTT
 TTAGCACCCAACAGAATCCCTTCAAGCCTCGTGGTCTGACACCTATGCTACGTGACTTGTGACCCATCCATTTGT
 CATGTTCTTCGGGAATGTGGCTAAGGGGTAAGATGTGACTTGAAAAGAAAGGTAGAACAGATCATCTCAATTTA
 TTATCAAGGAATAGTTTCAGAAAACGACTTCAGACCACAGAGACAGCAGAACAGATGGTCCGGCATGGATAGAGCATC
 AGACACTCACAGACTGTGCAACAAGAGCATCGAGTCAAAACAGCCAAAGGAAGGAGGTCATGGAATGGGTCTC
 TCACACCAAACTGATGCCAGAGGCCCTCAGCATGAATAACAAAGGCAACCAGACCCACAAGCCATACTGAGTGGAT
 ACAAACCTATACCTAGGCTGACATCCCAATGTGTGTGGCAAGTTAGATGATGATGGCACAAAAGACAGAACACCT

TGCTTCTGGCCATTGTCAGCTCTTGAAGAGAGCACACTTTTAGAGGAGCAGCTGCAAGGAGCCTGAGAACAAAAC
GGAAATGTCTGTTATGAAAGCCTTCACAGGAAATTCGCAAGTGGCAACGTGGGTCCATTCCGTGTGTGTCAC
GCTGGCGCAAGCCCATGGCCATGGTGAGGCAGCGTTTCCACTGGAACATACTGATACCTGCACCAACTCTTGCAAC
TGTGCAGTGTTCCCACTGCAAACTACGGATGGGGTAAAAGACTGCTCACCTCCTATTTCTCATCTAATCTCACACAC
TCTGTTTGATGAGGCTATGGAGAAACAGGTCTTCTCATACACTAAAGGTGGGAGTACAAACAATTCAAGCCCTGTGC
AGGACAATTAGGCAATACCTATCAAAATTATACATGATTTTTCTGCTGACCCAGCAATTCCACTTTTGGGAATAAT
TGACAGATATAGGTGCATATGTACAAATGATGGAAAGCTCTCTGGTATATATTAGTAAGTGATAAAACAAGGTGTG
TGTATATATGGCTACTACCTTTTGTTTTAAAAATGGGGGAAAAATGGTGGAGCTTGCGGTGAGCCGAGATCGTGCCAC
TGCACTCCAGCCTGGGCGACAGAGCGAGACTCCGTCTCAAAAAAAAAACAGGGTGGGGTGGGGGGAAATAATAGTA
CATACTCATATTTACCTGTATCTATATAAAACACACTATCAAGGATTACAAAGAACTAATACAAATGATCCCCCTTA
TAGATGGTATGTATTGGGGGATACTGAGGTGAGCAGGGTATAAGTGGGGCAAGACTTTTCAGTGTAACCTTCTTTTA
AATTTTATTTGATTTTTGAATAATGTAAATTAAGTGTCAAATAATTAATTAATAAATAACCAATTTATTAACAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAATA

FIGURA 4

ID de secuencia	Secuencia
SEQ ID NO:3	C*+T*+T*G*A*A*T*T*G*T*T*T*+G*+T*+A
SEQ ID NO:4	A*+G*+T*T*G*C*A*A*G*A*G*T*+T*+G*+G
SEQ ID NO:5	A*+T*+C*T*G*T*T*C*T*G*C*T*+G*+T*+C
SEQ ID NO:6	C*+A*+T*A*T*T*C*T*T*G*G*A*+C*+G*+A
SEQ ID NO:7	T*+G*+T*G*C*T*G*T*T*G*T*A*+A*+G*+A
SEQ ID NO:8	T*+G*+A*C*A*G*A*G*G*A*G*T*+A*+T*+T

FIGURA 5

ID de secuencia	Secuencia
SEQ ID NO:9	GCACACCTGGAGATACTCTATTATA
SEQ ID NO:10	CCTGCAGAATGGCCTGGAATTACAA