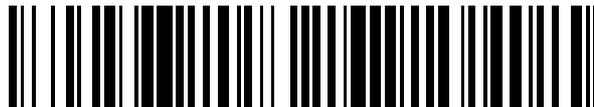


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 566 008**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.07.2009** **E 09788222 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.12.2015** **EP 2320925**

54 Título: **Antagonistas de complementos y usos de los mismos**

30 Prioridad:

10.07.2008 US 79501 P

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

08.04.2016

73 Titular/es:

REGENESANCE B.V. (100.0%)
Meibergdreef 9, D3307
1105 AZ Amsterdam Zuidoost, NL

72 Inventor/es:

BAAS, FRANK y
FLUITER, KEES

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 566 008 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

Antagonistas de complementos y usos de los mismos

5 Campo de la invención

La presente invención se relaciona con composiciones y métodos para modular la expresión del componente de complemento 6 (C6). En una realización, la invención se relaciona con antagonistas que reducen o bloquean la expresión de esa proteína. La invención tiene una amplia variedad de aplicaciones que incluyen promover la regeneración neuronal en un mamífero luego de una lesión aguda o crónica al sistema nervioso.

Antecedentes

El sistema de complemento incluye un grupo de casi treinta (30) proteínas que se reconocen por ser una parte importante de la respuesta inmunitaria. El sistema puede ser activado por una ruta clásica (usualmente dependiente de anticuerpos) o alternativa (usualmente dependiente de anticuerpos). La activación a través de cualquier ruta lleva a la generación de una enzima denominada convertasa C5. La convertasa ayuda a formar una proteína denominada C5b que, entre otras funciones, inicia lo que a menudo se conoce como la ruta del complemento terminal. Un objetivo de esta ruta es formar un complejo de ataque a membrana (MAC) dentro de la membrana de un patógeno invasor, provocando de esta manera la lisis. En general el MAC se forma por el ensamble secuencial de las proteínas de complemento C6, C7, C8 y (C9)_n junto con C5b. Véase, en general Walport, M. J. 2001. N. Engl. J. Med. 344: 1058-1066; y 1140-1144.

Existen informes de inhibidores naturales y sintéticos del sistema de complemento. Estos incluyen determinadas moléculas pequeñas, proteínas, anticuerpos, flavonoides, y polisacáridos, por ejemplo. Véase S. Bureeva et al. (2005) Drug Discovery Today 10: 1535.

La degeneración neuronal es una característica distintiva de muchas neuropatías agudas y crónicas. Un modo de degeneración axonal, denominada Degeneración Walleriana (WD) es un proceso altamente destructivo en el que muere la parte de un axón distal a una lesión. Se pueden ver las anomalías iniciales tan pronto como varias horas después de la lesión con WB más visible aparente uno o dos días más tarde (Ballin RH y Thomas PK (1969) Acta Neuropathol (Berl) 14: 237. Por ejemplo, las envolturas de mielina colapsan y son engullidas por las células depuradoras (Leonhard et al. (2002) Eur. J. Neurosci. 16: 1654). Estos procesos se asocian con la eventual reparación y regeneración del nervio, existen informes de que determinados componentes de complemento median la fagocitosis de mielina (Dailey et al. (2002) J. Neurosci. 18: 6713; y Liu (1999) J. Peripher. Nerv. Syst. 4: 123) Aunque es algo incierto acerca de qué componentes de complemento se necesitan para mediar estos procesos, se ha reportado que la formación de MAC es esencial para la WD rápida (Ramaglia, V. et al. (2007) J. Neurosci. 27: 7663). La solicitud de patente internacional WO 2008/044928 describe la inhibición del complemento para mejorar la regeneración de neuronal. Los inhibidores de complemento descritos incluyen anticuerpos, inhibidores de ácidos nucleicos, reguladores de complementos, factor de veneno de cobra, inhibidores polianiónicos y moléculas pequeñas naturales y sintéticas.

Se conoce una variedad de antagonistas de ácidos nucleicos. Por ejemplo, se ha mostrado que diversos oligómeros antisentido son útiles para diversas aplicaciones terapéuticas, diagnósticas y de investigación (véase, por ejemplo, Cheson, BD (2007) Ther Clin Riesgo Manag. 3 (5): 855 (que trata, por ejemplo, datos de ensayos clínicos favorables para oblimersen). Se ha propuesto que el ARN de interferencia corto (siARN), un tipo de antagonista de ARN, es una herramienta terapéutica y de investigación útil (McManus y Sharp, (2002) Nature Reviews Genetics 3: 737. También se han reportado otros antagonistas de ARN tales como complejos de silenciamiento inducidos por ARNi con una cadena clonada discontinua (Leuschner, et al. (2006) EMBO Reports 7: 314).

Sería deseable tener antagonistas que bloqueen o inhiban la actividad, de una proteína de componente de complemento C6 (C6) de mamífero. Sería más deseable tener antagonistas que se puedan utilizar para prevenir, tratar o reducir la severidad de neuropatías que se sabe o se sospecha están asociadas con la formación del MAC.

Resumen de la invención

55

La presente invención se relaciona con antagonistas que reducen o bloquean la actividad de una proteína de Componente de Complemento 6 (C6) de mamífero. Se pueden utilizar antagonistas de ejemplo para prevenir, tratar o reducir la severidad de neuropatías que se sabe o se sospecha están asociadas con la formación de un complejo de ataque a membrana (MAC). Los antagonistas particulares se relacionan con ácidos nucleicos de cadena sencilla o múltiples cadenas (normalmente aproximadamente una, dos o aproximadamente tres cadenas) que bloquean o reducen la expresión de la proteína de complemento 6 (C6) de mamífero. La invención tiene una amplia variedad de aplicaciones que incluyen promover la regeneración neuronal en un mamífero luego de una lesión aguda o crónica neuronal.

En un aspecto, la presente invención proporciona un oligómero antisentido de cadena sencilla de entre aproximadamente 10 a 50 nucleótidos de longitud que tiene una secuencia de nucleobases contigua con por lo menos 80% de identidad de secuencia con una región complementaria de un ácido nucleico que codifica la secuencia de

COMPONENTE DE COMPLEMENTO 6 (C6) representada por la SEQ ID NO: 1; el oligómero comprende por lo menos un análogo de nucleótido y es capaz de reducir el nivel de expresión de mRNA de C6 en un mamífero mediante por lo menos 20% según se determina por un ensayo qPCR, en donde el oligómero se dirige a aproximadamente los nucleótidos 112-152, 433-473, 546-586, 706-746, o 1015-1055 del sitio de inicio de ATG de la SEQ ID NO: 1.

5

En aras de simplicidad, la expresión «componente de complemento 6 (C6) de mamífero» se abreviará como «C6», «proteína C6 de mamífero» y similares a menos que se especifique lo contrario.

10

En otro aspecto, la invención se relaciona con un compuesto de ácido nucleico de cadenas dobles que preferiblemente incluye un primer oligómero (cadena clonada) y un segundo oligómero (cadena antisentido) dirigido a una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína C6 de mamífero, particularmente C6 de humano, rata o ratón. En un ejemplo, cada cadena del compuesto incluye desde entre aproximadamente 12 hasta aproximadamente 35 nucleobases y la cadena antisentido consiste de una secuencia de nucleobases contigua con por lo menos 80% de identidad de secuencia con una región correspondiente de un ácido nucleico que codifica la secuencia de COMPONENTE DE COMPLEMENTO 6 (C6) representada por la SEQ ID NO: 1 (humano) El oligómero incluye por lo menos un análogo de oligonucleótido.

15

20

En otro aspecto, la invención se relaciona con una composición que incluye un complejo de ARN con una región de doble cadena de núcleo que incluye una cadena antisentido que consiste de una secuencia de nucleobases contigua con por lo menos 80% de identidad de secuencia con una región correspondiente de un ácido nucleico que codifica la secuencia de COMPONENTE DE COMPLEMENTO 6 (C6) representada por la SEQ ID NO: 1 (humano) El oligómero incluye por lo menos un análogo de oligonucleótido, el complejo de ARN que comprende adicionalmente una cadena clonada discontinua se hibrida a la cadena antisentido.

25

La presente invención es útil para un método para reducir o inhibir la expresión de un C6 de mamífero tal como C6 de humano, en una célula o un tejido. En un ejemplo, el método incluye la etapa de poner en contacto la célula o tejido con por lo menos un oligómero, compuesto de doble cadena u otra composición de la invención en una cantidad que sea suficiente para reducir o inhibir la expresión de la proteína de C6 en la célula o tejido.

30

La invención también es útil para un método para tratar, prevenir o reducir síntomas de un trastorno mediado por actividad no deseada del sistema de complemento y particularmente formación no deseada del MAC. En un ejemplo, el método incluye la etapa de administrar una composición de la invención (terapéuticamente o profilácticamente) a un mamífero en necesidad de esta y en una cantidad suficiente para reducir o bloquear la formación de MAC en el mamífero. Un trastorno preferido dentro del alcance de la presente invención es uno en el que es deficiente la regeneración neuronal o de otra forma anormal.

35

40

La presente invención es adicionalmente útil para un método para mejorar la regeneración neuronal en un mamífero que incluye la etapa de administrar al mamífero (terapéuticamente o profilácticamente) una cantidad de por lo menos una composición de la invención suficiente para reducir o inhibir expresión de C6 en el mamífero y mejorar la regeneración neuronal allí. Preferiblemente, la formación del MAC también se reduce o inhibe en el mamífero.

La práctica de la invención proporciona importantes ventajas.

45

Por ejemplo, existen informes de que el hígado a veces puede secuestrar los ácidos nucleicos y reducir la actividad de los productos terapéuticos con base en ácidos nucleicos con objetivos fuera del hígado.

50

Sin embargo, el hígado es un sitio principal de la síntesis de proteína de complemento. En consecuencia, se considera que el secuestro de los compuestos de la invención reducirá ventajosamente o bloqueará la expresión de la proteína C6.

55

Adicionalmente, se pueden utilizar los compuestos de la invención solos o en combinación con otros agentes (que incluyen por lo menos otra composición de la invención) para reducir o inhibir la formación de MAC en un mamífero que tiene o se sospecha tiene una neuropatía aguda o crónica. Se considera que el uso de la invención antes, durante o después de la lesión ayudará a promover la regeneración del nervio en el mamífero.

Adicionalmente se discuten los usos y ventajas de la invención, infra.

Breve descripción de los dibujos

60

La Figura 1 es una gráfica que muestra niveles de mRNA de complemento C6 después de tres días de tratamiento en ratones con LNA antisentido de complemento. Las tandas (eje Y) se explican en el Ejemplo 2.

65

La Figura 2 es una gráfica que muestra la eficacia de la actividad del complejo de ataque a membrana (MAC) en suero de ratón después de tratamiento con oligonucleótidos modificados con LNA que dirigen las proteínas de complemento C6, C8a, o C8b. se administran oligonucleótidos durante una semana.

La Figura 3 es una gráfica que muestra la administración de cantidades variables de oligo 1010 (SEQ ID NO. 413) a un ratón versus un nivel corregido de mARN de C6. También se muestran los resultados para la construcción de siARN correspondiente.

5 Descripción detallada

Como se discute, la invención se relaciona con antagonistas que bloquean o inhiben la actividad de un C6 de mamífero. Se hace referencia aquí a un «antagonista de ácido nucleico» que significa un compuesto que incluye o consiste de ácido nucleico y uno o más análogos de ácido nucleico como se describe aquí. Un «antagonista de ARN» es un antagonista de ácido nucleico cuya función pretendida es reducir o bloquear la expresión de un ARN(s) particular.

En un aspecto, la invención proporciona compuestos oligoméricos (oligómeros) para reducir la función de las moléculas de ácidos nucleicos que codifican el C6 de mamífero, preferiblemente para reducir la cantidad del C6 producido. Un ejemplo es un compuesto antisentido. Se logra este objetivo, por ejemplo, al proporcionar compuestos antisentido que se hibridan específicamente con uno o más ácidos nucleicos que codifican el C6 de mamífero. Como se utiliza aquí, los términos “ácido nucleico objetivo” y “ácido nucleico que codifica C6» abarcan el ADN que codifica el C6 de mamífero, ARN que codifica el C6 de mamífero (que incluye pre-mARN y mARN) transcrito desde dicho ADN, y también cADN derivado de dicho ARN. Un C6 de mamífero particular de interés es el componente de complemento 6 (C6) humano codificado por la secuencia de cADN representada por Tabla 3 (SEQ ID NO: 1). Otro C6 de mamífero de interés es la secuencia C6 de rata y ratón representadas por la SEQ ID Nos. 402 y 403, respectivamente.

Como se utiliza aquí, “oligonucleótido” se relaciona con un componente de un compuesto de la invención tal como un oligómero o polímero de ácido ribonucleico (ARN) o ácido desoxirribonucleico (ADN) o análogos de los mismos. Este término incluye oligonucleótidos compuestos de nucleobases de origen natural, azúcares y enlaces de internucleósido covalente (estructura principal) así como también oligonucleótidos que tienen porciones de origen natural. Dichos oligonucleótidos sustituidos o modificados a menudo se prefieren sobre las formas naturales debido a propiedades deseables tales como, por ejemplo, absorción celular mejorada, afinidad mejorada para objetivo de ácido nucleico y aumento de estabilidad en la presencia de nucleasas, por ejemplo. En consecuencia, un «oligómero» de acuerdo con la invención, que incluye formas plurales, es un oligonucleótido que incluye nucleobases de origen natural, azúcares y enlaces de estructura principal covalentes así como también construcciones que incluyen uno o más análogos de los mismos.

En el presente contexto, el término “nucleótido” significa una unidad de 2-desoxirribosa (ADN) o unidad de ribosa (ARN) que se une a través de su carbono número uno a una base nitrogenada, tal como adenina (A), citosina (C), timina (T), guanina (G) o uracilo (U), y que está unida a través de su átomo de carbono número cinco a un grupo de enlace de nucleósido (como se define adelante) o a grupos terminales (tal como se define aquí). En consecuencia, cuando se utiliza aquí el término “nucleótido” abarca unidades de ARN (o monómeros) que comprenden una unidad de ribosa que está unida a través de su carbono número uno a una base nitrogenada, como por ejemplo A, C, T, G o U, y que está unida a través de su átomo de carbono número cinco a un grupo fosfato o a un grupo terminal. De forma análoga, el término “nucleótido” también abarca unidades de ADN (o monómeros) que comprenden una unidad de 2-desoxirribosa que está unida a través de su carbono número uno a una base nitrogenada, tal como A, C, T, G o U, y que está unida a través de su átomo de carbono número cinco a un grupo fosfato o a un grupo terminal. El término “nucleótido” también cubre variantes o análogos de dichos monómeros de ARN y ADN como se describe aquí.

Por “nucleósido” se entiende una unidad de 2-desoxirribosa (ADN) o una unidad de ribosa (ARN) que está unida a través de su carbono número uno a una base nitrogenada, como por ejemplo adenina (A), citosina (C), timina (T), guanina (G) o uracilo (U). En consecuencia, cuando se utiliza aquí el término “nucleósido” incluye unidades de ARN (o monómeros) que comprenden una unidad de ribosa que está unida a través de su carbono número uno a una base nitrogenada, como por ejemplo A, C, T, G o U. Análogamente, el término “nucleósido” también abarca unidades de ADN (o monómeros) que comprenden una unidad de 2-desoxirribosa que está unida a través de su carbono número uno a una base nitrogenada, tal como A, C, T, G o U. El término “nucleósido” también cubre variantes o análogos de dichos monómeros de ARN y ADN como se describe aquí. Se entenderá que los nucleósidos individuales se ligan entre sí por un grupo de enlace de internucleósido tal como aquellos enlaces de origen natural y sintético como se describe aquí.

55 Oligómeros antisentido

Sin desear estar limitado por la teoría, se considera que la hibridación específica de un compuesto oligomérico con su ácido nucleico objetivo interfiere con la función normal del ácido nucleico. Esta modulación de función de un ácido nucleico objetivo por compuestos que se hibridan específicamente a este se denomina en general como “antisentido”. Las funciones del ADN que se van a interferir incluyen, por ejemplo la réplica y transcripción. Las funciones del ARN que se van a interferir incluyen por lo menos algunas funciones vitales tales como, por ejemplo, la translocación del ARN al sitio de traducción de proteínas, traducción de proteína desde el ARN, corte y empalme del ARN para producir una o más especies de mARN, y la actividad catalítica que se puede comprometer en o facilitar por el ARN. El efecto global de dicha interferencia con la función del ácido nucleico objetivo es la modulación de la expresión de la proteína C6 de mamífero. En el contexto de la presente invención, “modulación” significa ya sea un aumento (estimulación) o una disminución (inhibición) en la expresión de un gen en relación con un control adecuado, tal como la expresión en

ausencia del oligómero. En el contexto de la presente invención, la inhibición es la forma de modulación preferida de la expresión génica y el mARN es un objetivo.

5 Como se utiliza aquí, “hibridación” se refiere en general al enlace de hidrógeno, que puede ser de Watson-Crick, enlace de hidrógeno Hoogsteen o enlace de hidrógeno Hoogsteen invertido, entre bases de nucleósidos o nucleótidos complementarias. Por ejemplo, adenina y timina son las nucleobases complementarias que se emparejan a través de la formación de enlaces de hidrógeno. “Complementario”, como se utiliza aquí, se relaciona con la capacidad de emparejamiento precisa entre dos nucleótidos. Por ejemplo, si un nucleótido en una determinada posición de un oligonucleótido es capaz de unir hidrógeno con un nucleótido en la misma posición de una molécula de ADN o ARN, entonces el oligonucleótido y el ADN o ARN se consideran complementarios entre sí en esa posición. El oligonucleótido y el ADN o ARN son complementarios entre sí cuando un número suficiente de posiciones correspondientes en cada molécula están ocupadas por nucleótidos que pueden unir el hidrógeno entre sí. Por lo tanto, “específicamente hibridable” y “complementario” son términos que se utilizan para indicar un grado suficiente de complementariedad o emparejamiento preciso de tal manera que ocurre unión estable y específica entre el oligonucleótido y el ADN o ARN objetivo.

15 Se entiende que la secuencia de un compuesto de la invención no necesita ser 100% complementario con aquel de su ácido nucleico objetivo que es hibridable específicamente. Un compuesto antisentido, por ejemplo, es específicamente hibridable cuando la unión de la molécula de ADN o ARN objetivo interfiere con la función normal del ADN o ARN objetivo para provocar una pérdida de utilidad, y existe un grado suficiente de complementariedad para evitar la unión no específica del compuesto antisentido a secuencias no objetivo bajo condiciones en las que se desea 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, bajo condiciones en las que se realizan los ensayos.

20 Los oligómeros preferidos de la invención normalmente se identifican a través de diseño in silico y, en algunos casos, en ensayos in vitro o in vivo. Los sitios objetivo a los que son complementarios las secuencias de la invención preferidas se mencionan adelante como “sitios activos” y por lo tanto son sitios preferidos para orientación. Por lo tanto, la invención abarca compuestos que se hibridan con estos sitios activos.

25 Por ejemplo, es un objeto de la invención utilizar oligómeros particulares como compuestos antisentido. “Orientar” un compuesto antisentido u otro compuesto de la invención a un ácido nucleico particular es un proceso de múltiples etapas. El proceso de orientación usualmente inicia con la identificación de una secuencia de ácido nucleico cuya función va a ser modulada. Este puede ser, por ejemplo, un gen celular (o el mARN se transcribe desde el gen) cuya expresión se asocia con una enfermedad particular o estado de enfermedad, o una molécula de ácido nucleico de un agente infeccioso. En la presente invención, el objetivo es una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína C6 de mamífero, particularmente las secuencias C6 de humano, rata y ratón representadas en la Tabla 3 (SEQ ID NOs.1, 402 y 403). El proceso de orientación también incluye la determinación de un sitio o sitios dentro de este gen para que ocurra la interacción antisentido que incluye, pero no se limita a, detección o modulación de la expresión de la proteína.

30 Consideraciones adicionales incluyen seleccionar oligómeros con capacidad reducida para hibridación cruzada con objetivos indeseados y para asumir estructuras secundarias difíciles en solución. Los oligómeros más preferidos de la invención se seleccionan por motivos de región de semilla similares a miARN y tóxicos reducidos y orientación mediada por cadena clonada. Todavía los oligómeros adicionales preferidos para uso de la invención se muestran en las Tablas 4A-4E y Tablas 5A-5F, por ejemplo.

35 Con referencia ahora a las Tablas 4A-4E, las SEQ ID Nos 2, 24, 46, 68, 90, 112, 134, 156, 178, 200 son objetivos preferidos de la secuencia C6 de humano representados por la Tabla 3 (SEQ ID NO: 1) con secuencias inmediatamente por debajo de cada una que muestran oligómeros con el fin de reducir la preferencia. Por lo tanto, la SEQ ID NO: 2 es un objetivo preferido del C6 humano con los oligómeros representados por la SEQ ID Nos: 3-23, en orden de preferencia descendente, para dirigirse a ese sitio. Con referencia de nuevo a las Tablas 4A-4E, los objetivos adicionalmente preferidos incluyen aquellas secuencias representadas por las SEQ ID Nos: 222, 225, 228, 231, 234, 237, 240, 243, 246, y 249 y ARN y versiones de complemento inverso de las mismas mostradas inmediatamente por debajo de cada objetivo. Se espera que el C6 de rata y ratón tenga sitios objetivos idénticos o muy similares.

40 Adicionalmente los oligómeros preferidos para ciertas realizaciones muestran 100% de identidad de secuencia entre las secuencias de humano, rata y ratón (por ejemplo, Tablas 5A-5F; SEQ ID NO: 292). Como se apreciará, se pueden utilizar dichos oligómeros en el humano, rata y ratón sin problemas de emparejamientos erróneos sustanciales o la necesidad de tener múltiples diseños de oligómeros para cada mamífero.

45 Los oligómeros más particulares de acuerdo con la invención son suficientemente complementarios al objetivo, es decir, se hibridan lo suficientemente bien y con suficiente especificidad, para dar los resultados previstos. El efecto deseado es una reducción o inhibición total de la expresión de C6 de mamífero tal como la proteína C6 de humano, rata o ratón, manifestada como una reducción o inhibición total de la cantidad de mARN de C6 correspondiente como se determina por la reacción en cadena de polimerasa (PCR).

65

En un método de PCR, se pueden diseñar cebadores de oligonucleótidos para uso en reacciones de PCR para amplificar secuencias de ADN correspondientes a partir de cADN o ADN genómico extraído de cualquier organismo de interés. Un ejemplo de un cADN adecuado es la secuencia C6 de humano representada por la Tabla 1 (SEQ ID NO: 1). Los métodos para diseñar cebadores de PCR y clonación PCR generalmente son conocidos en la técnica y se describen en Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N.Y.) en adelante "Sambrook". Véase también Innis et al., eds. (1990) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Academic Press, New York); Innis y Gelfand, eds. (1995) *PCR Strategies* (Academic Press, New York); e Innis y Gelfand, eds. (1999) *PCR Methods Manual* (Academic Press, New York). Los métodos de PCR conocidos incluyen, pero no se limitan a, métodos que utilizan cebadores emparejados, cebadores anidados, cebadores específicos individuales, cebadores degenerados, cebadores específicos a genes, cebadores específicos a vector, cebadores parcialmente emparejados de forma errónea, y similares. Un método para realizar qPCR se describe en la sección de Ejemplos.

Si se desea, se puede probar la funcionalidad adicional de un oligómero particular y cuantificar opcionalmente al utilizar lo que se conoce como un ensayo hemolítico total (ensayo (CH50)). En este método, se aísla plasma, sangre u otra muestra biológica adecuada de un mamífero al que se ha administrado uno o más de los oligómeros. El ensayo mide la capacidad de la muestra de prueba para lisar el 50% de una suspensión estandarizada de eritrocitos de oveja recubiertos con anticuerpo anti-eritrocito. Se dice que la actividad de complemento total es anormal si cualquier componente es defectuoso. Véase, por ejemplo, Kabat, E. A y Mayer, M. M. (1961) *Complement and Complement Fixations*. In: *Experimental Immunochimistry*, 2nd Edition, Charles C. Thomas, Springfield, IL. p. 133-240.

En otro método, se puede detectar y cuantificar la formación de MAC si se desea utilizando los métodos inmunológicos descritos por Ramaglia, V. et al. (2007) *J. Neurosci.* 27: 7663.

Los oligómeros de la invención exhibirán buena capacidad para bloquear o reducir el mRNA que codifica el C6 de humano, rata o ratón. Más específicamente, dichos oligómeros serán capaces de reducir el nivel de un mRNA de C6 particular en un mamífero tal como humano, rata o ratón, mediante por lo menos aproximadamente 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, hasta aproximadamente 100% según se determina por un ensayo qPCR. Los oligómeros adicionalmente preferidos son sustancialmente no tóxicos en un anfitrión mamífero tal como un roedor. Es decir, no matan al mamífero en el transcurso de un ensayo en el que se administra una cantidad terapéutica del oligómero al mamífero durante un período adecuado (por ejemplo aproximadamente 1 a aproximadamente 10 mg/kg IP diariamente durante hasta unos pocos días o semanas), el hígado se extirpa de ese mamífero y se utiliza como una fuente de ácido nucleico, normalmente ARN. El ácido nucleico se prepara a partir del hígado utilizando procedimientos estándar y se somete a qPCR para medir los niveles de mRNA de C6 utilizando las sondas Roche LightCycler 480 y universal recomendadas por el fabricante. Se proporciona un ensayo ilustrativo en el Ejemplo 1 en el que se encontraron que diversos oligómeros de la invención son relativamente no tóxicos y capaces de reducir el mRNA de C6 de ratón mediante por lo menos aproximadamente 20%, 30%, 40%, por lo menos aproximadamente 50%, 60%, 70%, por lo menos aproximadamente 80% o más hasta aproximadamente 90%, 95%, a aproximadamente 99% o 100%. Se hace referencia aquí a una «prueba de validación de oligómero» que se referirá al ensayo específico anterior para confirmar no toxicidad y capacidad para inhibir la expresión de mRNA de C6 in vivo.

El uso de los oligómeros preferidos se relaciona con prevenir, tratar, o reducir la severidad de neuropatías que son conocidas o se sospecha están asociadas con la formación del MAC.

Aunque la invención proporciona uno o una combinación de oligómeros adecuados, un oligómero generalmente preferido es uno que tiene entre aproximadamente 10 a aproximadamente 50 nucleobases de longitud, por ejemplo, entre aproximadamente 12 a aproximadamente 45 nucleobases de longitud, entre aproximadamente 15 a aproximadamente 40 nucleobases de longitud, entre aproximadamente 16 a aproximadamente 35 nucleobases de longitud con aproximadamente 18 a aproximadamente 30 nucleobases de longitud que son útiles para muchas aplicaciones. Preferiblemente, el oligómero incluye una secuencia de nucleobases contigua de un total de entre 10-50 nucleobases, por ejemplo, entre aproximadamente 12 a aproximadamente 45 nucleobases de longitud, entre aproximadamente 15 a aproximadamente 40 nucleobases de longitud, entre aproximadamente 16 a aproximadamente 35 nucleobases de longitud con aproximadamente 18 a aproximadamente 30 nucleobases de longitud que son útiles para muchas aplicaciones en las que la secuencia de nucleobases contigua tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia, por ejemplo, tal como aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 95% o aproximadamente 98% de identidad de secuencia con una región correspondiente de un ácido nucleico que codifica el C6 de mamífero de interés. Una secuencia de interés particular es el C6 de humano representada por la SEQ ID NO: 1, C6 de rata representada por la SEQ ID NO: 402 y C6 de ratón representada por la SEQ ID NO: 403 (así como también variantes alélicas de origen natural de las SEQ ID Nos: 1, 402 y 403). Se pueden identificar las «variantes alélicas de origen natural» con el uso de técnicas biológicas moleculares bien conocidas, tales como, por ejemplo, reacción de cadena de polimerasa (PCR) y técnicas de hibridación como se indica aquí.

Se puede determinar el grado de homología entre un par de ácidos nucleicos por una o una combinación de estrategias. En un método, el porcentaje de identidad de secuencia se determina por inspección. Los métodos de alineación de secuencias para comparación son bien conocidos en la técnica. Por lo tanto, la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede lograr utilizando un algoritmo matemático. Ejemplos no limitantes de dichos

algoritmos matemáticos son el algoritmo de Myers y Miller (1988) CABIOS 4: 11-17; el algoritmo de homología local de Smith et al. (1981) Adv. Appl. Math. 2: 482; el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48: 443-453; el método de similitud para búsqueda de Pearson y Lipman (1988) Proc. Natl. A cad. Sci. 85: 2444-2448; el algoritmo de Karlin y Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5877.

Se pueden utilizar implementaciones de ordenador de estos algoritmos matemáticos para comparación de secuencias para determinar la identidad de secuencia. Dichas implementaciones incluyen, pero no se limitan a: CLUSTAL en el programa PC/Gene; (disponible de Intelligenetics, Mountain View, Calif.) el programa ALIGN (versión 2.0); el programa ALIGN PLUS (Versión 3.0, copyright 1997); y GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA, y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package of Genetics Computer Group, Versión 10 (disponible de Accelrys, 9685 Scranton Road, San Diego, Calif., 92121, EE.UU.). La matriz de calificación utilizada en la Versión 10 del Wisconsin Genetics Software Package es BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff (1989) Proc Natl Acad Sci USA 89: 10915). Las alineaciones que utilizan estos programas se pueden realizar utilizando parámetros predeterminados. Otras consideraciones de alineación están dentro de la experticia de aquellos que trabajan en el campo. Véase también la patente Estadounidense No. 7,378,499 y las referencias citadas allí.

A menos que se indique lo contrario, los valores de identidad /similitud de secuencia de nucleótidos y aminoácidos proporcionados aquí se refieren al valor obtenido utilizando GAP con parámetros predeterminados, o cualquier programa equivalente. Por "programa equivalente", cualquier programa de comparación de secuencia se pretende que, para cualquiera de dos secuencias en cuestión, se genere una alineación que tenga emparejamientos de residuo de nucleótidos o aminoácidos idénticos y un porcentaje de identidad de secuencia cuando se compara con la alineación correspondiente generada por el programa preferido. Para mayor información véase Needleman y Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48: 443-453.

Para los propósitos de la presente invención, la comparación de secuencias de nucleótidos o proteínas para determinación del porcentaje de identidad de secuencia para las secuencias de C6 de humano, rata y ratón descritas aquí preferiblemente se realiza utilizando el programa GAP en el Wisconsin Genetics Software Package (versión 10 o posterior) o cualquier otro programa equivalente) Para el análisis GAP de secuencias de nucleótidos, se utilizó un Peso GAP de 50 y una Longitud de 3.

Como se utiliza aquí, "identidad de secuencia" o "identidad" en el contexto de dos secuencias de ácidos nucleicos o polipéptidos hace referencia a los residuos en las dos secuencias que son iguales cuando se alinean para correspondencia máxima sobre una ventana de comparación especificada. Cuando se utiliza porcentaje de identidad de secuencia en referencia a proteínas se reconoce que las posiciones de residuos que no son idénticas a menudo difieren por sustituciones de aminoácidos conservadoras, donde los residuos de aminoácidos se sustituyen por otros residuos de aminoácidos con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobicidad) y por lo tanto no cambian las propiedades funcionales de la molécula. Cuando las secuencias difieren en sustituciones conservadoras, se puede ajustar el porcentaje de identidad de secuencia hacia arriba para corregir la naturaleza conservadora de la sustitución. Se dice que las secuencias que difieren por dichas sustituciones conservadoras tienen "similitud de secuencia" o "similitud". Los medios para realizar este ajuste son bien conocidos por los expertos. Normalmente esto implica calificar una sustitución conservadora como un emparejamiento erróneo parcial en lugar de uno completo, aumentando de este modo el porcentaje de identidad de secuencia. Por lo tanto, por ejemplo, donde un aminoácido idéntico se le da una calificación de 1 y a una sustitución no conservadora se le da una calificación de cero, a una sustitución conservadora se le da una calificación entre cero y 1. La calificación de las sustituciones conservadoras se calcula, por ejemplo como se aplica en el programa PC/GENE (Intelligenetics, Mountain View, Calif.).

Como se utiliza aquí, "porcentaje de identidad de secuencia" significa el valor determinado al comparar dos secuencias óptimamente alineadas sobre una ventana de comparación, en donde la porción de la secuencia de polinucleótidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones o supresiones (es decir, espacios) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o supresiones) para alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje se calcula al determinar el número de posiciones en las que ocurre la base de ácido nucleico o residuo de aminoácidos idéntico en ambas secuencias para producir el número de posiciones emparejadas, dividir el número de posiciones emparejadas por el número total de posiciones en la ventana de comparación, y multiplicar el resultado por 100 para dar el porcentaje de identidad de secuencia.

Otra indicación de que las secuencias de nucleótidos son sustancialmente idénticas es si dos moléculas se hibridan bajo condiciones estrictas. Generalmente, las condiciones rigurosas se seleccionan para ser aproximadamente 5° C más baja que el punto de fusión térmico (Tm) para la secuencia específica a una resistencia iónica y pH definido. Sin embargo, las condiciones rigurosas abarcan temperaturas en el rango de aproximadamente 1° C a aproximadamente 20° C, dependiendo del grado deseado de rigurosidad como se califica de otra manera aquí. Los ácidos nucleicos que no se hibridan entre sí en condiciones rigurosas son aun sustancialmente idénticos si los polipéptidos que los codifican son sustancialmente idénticos. Esto puede ocurrir, por ejemplo, cuando se crea una copia de un ácido nucleico utilizando la máxima degeneración de codón permitida por el código genético. Una indicación de que dos secuencias de ácidos nucleicos son sustancialmente idénticas es cuando el polipéptido codificado por el ácido nucleico tiene reactividad inmunológicamente cruzada con el polipéptido codificado por el segundo ácido nucleico.

- En una realización de los oligómeros anteriores, la secuencia de nucleobase contigua incluye no más de aproximadamente 3, tal como no más de aproximadamente 1 o aproximadamente 2 emparejamientos erróneos con respecto a la región correspondiente de un ácido nucleico que codifica el C6 de mamífero de interés, particularmente la SEQ ID NO: 1. Por ejemplo, la secuencia de nucleobase contigua puede incluir no más de un solo emparejamiento erróneo a la región correspondiente de un ácido nucleico que codifica el C6 de mamífero de interés. Alternativamente, la secuencia de nucleobase contigua no incluye emparejamientos erróneos, (por ejemplo, es completamente complementaria a) con la región correspondiente de un ácido nucleico que codifica el C6 de mamífero de interés. En otra realización, la secuencia de nucleobase del oligómero consiste de la secuencia nucleobase contigua.
- La práctica de la invención es compatible con un amplio rango de secuencias de C6 de mamífero que incluyen aquellas secuencias de humano, rata y ratón especificadas aquí. Las secuencias de ácidos nucleicos y proteínas de dichas proteínas están disponibles en el Centro Nacional de Información de Biotecnología Estadounidense ((NCBI) - Banco de Datos de Secuencias Genéticas (GenBank). En particular, se pueden obtener los listados de secuencias del GenBank en la Biblioteca Nacional de Medicina, 38A, 8N05, Rockville Pike, Bethesda, Md. 20894. El GenBank también está disponible en Internet. Generalmente, véase Benson, D. A. et al. (1997) Nud. Acids. Res. 25: 1 para descripción del GenBank. Las secuencias de proteínas y ácidos nucleicos no referenciados específicamente se pueden encontrar en GenBank u otras fuentes descritas aquí. Véase, por ejemplo (NM_176074) que describe una secuencia C6 de rata, (NM_016704), que describe una secuencia C6 de ratón.
- Otras realizaciones de oligómeros están dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo, y en una realización, la secuencia de nucleobase contigua del oligómero incluye una subsecuencia contigua de por lo menos 6, por ejemplo, aproximadamente 7, 8, 9, 10, 11, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o aproximadamente 30 a 32 residuos de nucleobases que, cuando se forman en un dúplex con el ARN objetivo de C6 de humano, rata o ratón complementaria, por ejemplo, es capaz de incorporar RNasaH. Por «incorporar RNasa H» se entiende que la enzima hace contacto con el complejo como se determina por uno o una combinación de ensayos que pueden detectar y cuantificar la actividad de la enzima. A modo de ejemplo, la RNasa H es una endonucleasa celular que divide la cadena de ARN de un dúplex de ARN:ADN. Por lo tanto, la activación de la RNasa H, resulta en la división del objetivo de ARN, con lo cual se mejora en gran medida la eficiencia de inhibición del oligonucleótido de la expresión génica. La división del objetivo de ARN se puede detectar de forma rutinaria mediante electroforesis en gel.
- Por lo tanto, en una realización, la secuencia de nucleobases contigua del oligómero puede incluir una subsecuencia contigua de por lo menos 7, tal como por lo menos 8, por lo menos 9 o por lo menos 10 residuos de nucleobases que, cuando se forman en un dúplex con el objetivo C6 de mamífero complementario son capaces de incorporar RNasa H.
- En otra realización, la subsecuencia contigua tiene por lo menos 9 o por lo menos 10 nucleobases de longitud, tal como por lo menos 12 nucleobases o por lo menos 14 nucleobases de longitud, tal como 14, 15 o 16 residuos de nucleobases que, cuando se forman en un dúplex con el ARN objetivo C6 de mamífero complementario son capaces de incorporar RNasaH.
- Los oligómeros adicionalmente preferidos para uso con la invención serán de una longitud adecuada para el uso pretendido. Por lo tanto, en una realización, el oligómero tiene una longitud de entre aproximadamente 10 a aproximadamente 50 nucleótidos, aproximadamente 10 a aproximadamente 35 nucleobases, aproximadamente 10 a aproximadamente 22 nucleobases, por ejemplo, aproximadamente 12 a aproximadamente 18 nucleobases, aproximadamente 14, aproximadamente 15 o aproximadamente 16 nucleobases, aproximadamente 10, 11, 12, 13 o aproximadamente 14 nucleobases.
- Como se apreciará, un nucleósido es una combinación de base-azúcar. La porción de base del nucleósido es normalmente una base heterocíclica. Las dos clases más comunes de dichas bases heterocíclicas son las purinas y las pirimidinas. Los nucleótidos son nucleósidos que incluyen adicionalmente un grupo fosfato ligado covalentemente a la porción de azúcar del nucleósido. Para aquellos nucleósidos que incluyen un azúcar pentofuranosilo, el grupo fosfato se puede ligar a la unidad estructural 2', 3' o 5' hidroxilo del azúcar. En los oligonucleótidos de formación, los grupos fosfato ligan covalentemente nucleósidos adyacentes entre sí para formar un compuesto polimérico lineal. En cambio los respectivos extremos de esta estructura polimérica lineal adicionalmente se pueden unir para formar una estructura circular, sin embargo, generalmente se prefieren las estructuras lineales abiertas. Dentro de la estructura de oligonucleótidos, los grupos fosfato se denominan comúnmente como la formación de la estructura principal de internucleósido del oligonucleótido. El enlace normal o estructura principal de ARN y ADN es un enlace 3' a 5' fosfodiéster.
- Aunque se prefieren los oligómeros anteriores para ciertas aplicaciones, a menudo se preferirá el uso de oligómeros con uno o más análogos de oligonucleótidos (a veces denominados aquí como «miméticos o derivados» de oligonucleótido). Por lo tanto, los oligómeros de la invención incluirán uno o más compuestos no nucleobases solos o en combinación con cadenas principales modificadas o enlaces de internucleósido no naturales en los mismos. Como se define en esta especificación, los oligonucleótidos que tienen cadenas principales modificadas incluyen aquellos que conservan un átomo de fósforo en la estructura principal y los que no tienen un átomo de fósforo en la estructura principal. Para los propósitos de esta especificación, y como a veces se hace referencia en el campo, los oligonucleótidos modificados que

no tienen un átomo de fósforo en su estructura principal de internucleósido también se pueden considerar oligonucleósidos.

5 Las cadenas principales de oligonucleótidos modificados ilustrativos incluyen, por ejemplo, fosforotioatos, fosforotioatos
 10 quirales, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, fosfonatos de metilo y otros fosfonatos de alquilo
 que incluyen fosfonatos de 3'-alquileo, fosfonatos de 5'-alquileo y fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidatos que
 15 incluyen fosforamidato de 3'-amino y aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionoalquil-fosfonatos,
 tionoalquilfosfotriésteres, selenofosfatos y boranofosfatos que tienen 3'-5' enlaces normales, análogos de 2'-5' ligados
 20 de estos, y aquellos que tienen en polaridad invertida en donde uno o más enlaces de internucleótidos es un enlace 3' a
 3', 5' a 5' o 2' a 2'. Los oligonucleótidos preferidos que tienen polaridad invertida comprenden un único enlace 3' a 3' en
 el enlace más internucleótido 3' es decir un residuo de nucleósidos invertido único que puede ser abásico (la
 nucleobase está pérdida o tiene un grupo hidroxilo en lugar de la misma). También se incluyen diversas sales, sales
 25 mezcladas y formas de ácidos libres. Véase por ejemplo Patentes Estadounidenses Nos. 3,687,808; 4,469,863;
 4,476,301; 5,023,243; 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; 5,422,233; 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; 5,194,599; 5,565,555; 5,572,899; 5,721,218; 5,672,697; 7,335,764 y 5,625,050, para descripción
 que se relaciona con elaborar y utilizar dichas composiciones.

20 Por lo tanto en una realización de la invención, un oligómero de la invención tiene una estructura principal que es
 completamente fosforotiolada.

25 Las cadenas principales de oligonucleótidos modificados adicionales que no incluyen un átomo de fósforo allí tienen
 cadenas principales que se forman por enlaces de internucleósido de alquilo o cicloalquilo de cadena corta,
 heteroátomos mezclados y enlaces de internucleósido de alquilo o cicloalquilo, o uno o más enlaces de internucleósido
 heteroatómicos o heterocíclicos. Estos incluyen aquellos que tienen enlaces morfolino (formados en parte de la porción
 30 de azúcar de un nucleósido); cadenas principales de siloxano; cadenas principales de sulfuro, sulfóxido y sulfona;
 cadenas principales de formacetilo y tioformacetilo; cadenas principales de metileno formacetilo y cadenas principales
 de tioformacetilo; cadenas principales de riboacetilo; cadenas principales que contienen alqueno; cadenas principales
 de sulfamato; cadenas principales de metilenoimino y cadenas principales de metilenoimidazino; cadenas principales
 35 de sulfonato y sulfonamida; cadenas principales de amida; y otras que tienen partes de componente de mezcladas N, O S y
 CH₂. Véase por ejemplo, Patentes Estadounidenses Nos. 5,034,506; 5,166,315; 5,185,444; 5,214,134; 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; 5,792,608; 5,646,269, 7,335,764, y 5,677,439, para descripción que se relaciona con elaborar y utilizar
 dichas composiciones.

40 En otros análogos de oligonucleótidos, tanto el azúcar como el enlace de internucleósido, es decir, la estructura
 principal, de las unidades de nucleótidos se reemplazan con otros grupos. Las unidades base se mantienen para
 hibridación con un compuesto objetivo de ácido nucleico apropiado. Uno compuesto oligomérico se denomina como un
 ácido nucleico de péptido (PNA). En compuestos de PNA, la estructura principal de azúcar del oligonucleótido se
 reemplaza con una amida que contiene la estructura principal, en particular una estructura principal de
 45 aminoetoxivinilglicina. Las nucleobases se retienen y se unen directa o indirectamente a átomos de nitrógeno aza de la
 porción amida de la estructura principal. Véase, por ejemplo, Patentes Estadounidenses Nos. 5,539,082; 5,714,331;
 5,719,262, y Nielsen et al., Science, 1991,254, 1497-1500.

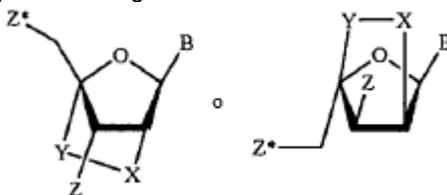
50 Las realizaciones adicionales de la invención son oligómeros con cadenas principales de fosforotioato y
 oligonucleósidos con cadenas principales de heteroátomos, y en particular --CH₂--NH--O--CH₂--, --CH₂--N(CH₃)--O--
 CH₂-- [conocida como una estructura principal de metileno (metilimino) o MMI], --CH₂--O--N(CH₃)--CH₂--, --CH₂--
 N(CH₃)--N(CH₃)--CH₂-- y --O--N(CH₃)--CH₂--CH₂-- [en donde la estructura principal de fosfodiéster nativa se representa
 como --O--P--O--CH₂--] de la Patente Estadounidense No. 5,489,677 mencionada anteriormente, y las cadenas
 principales de amida de la Patente Estadounidense No. 5,602,240 mencionada anteriormente. Los oligonucleótidos
 adicionales que tienen estructuras de estructura principal de morfolino de la Patente estadounidense No. 5,034,506
 mencionada anteriormente, por ejemplo.

55 Los oligómeros modificados de acuerdo con la invención también pueden contener una o más unidades estructurales de
 azúcar sustituidas. Los oligonucleótidos ilustrativos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': OH; F; O-, S-, o
 N-alquilo; O-, S-, o N-alqueno; O-, S- o N-alquino; o O-alquil-O-alquilo, en donde el alquilo, alqueno y alquino
 pueden ser alquilo C₁ a C₁₀ o alquino y alquino C₂ a C₁₀ sustituido o no sustituido. Particularmente se prefieren
 60 O[(CH₂)_nO]_mCH₃, O(CH₂)_nOCH₃, O(CH₂)_nNH₂, O(CH₂)_nCH₃, O(CH₂)_nONH₂, y O(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂, donde n y m son
 desde 1 hasta aproximadamente 10. Otros oligonucleótidos preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición
 2': alquilo inferior C₁ a C₁₀, alquilo inferior sustituido, alqueno, alquino, alcarilo, aralquilo, O-alcarilo o O-aralquilo, SH,
 SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo,
 aminoalquilamino, polialquilamino, sililo sustituido, un grupo de división de ARN, un grupo indicador, un intercalador, un
 grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido, o un grupo para mejorar las propiedades
 65 farmacodinámicas de un oligonucleótido, y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. Una modificación
 preferida incluye 2'-metoxietoxi (2'-O-CH₂CH₂OCH₃, también conocido como 2'-O--(2-metoxietilo) o 2'-MOE) (Martin et

al., Helv. Chim. Acta, 1995, 78, 486-504) es decir un grupo alcoxialcoxi. Una modificación preferida adicional incluye 2'-dimetilaminooxietoxi, es decir, un grupo $O(CH_2)_2ON(CH_3)_2$, también conocido como 2'-DMAOE, como se describe en los ejemplos adelante, y 2'-dimetilaminoetoxietoxi (también conocido en la técnica como 2'-O-dimetilaminoetoxietilo o 2'-DMAEOE), es decir, $2'-O-CH_2-O-CH_2-N(CH_2)_2$, también se describe en los ejemplos adelante.

Una modificación preferida incluye Ácidos Nucleicos Bloqueados (LNA) en la que el grupo 2'-hidroxilo se liga al átomo de carbono 3' o 4' del anillo de azúcar formando así una unidad estructural de azúcar bicíclica. El enlace es, por ejemplo, un grupo metileno $(-CH_2-)_n$ que puentea el átomo de oxígeno 2' y el átomo de carbono 4' en donde n es 1 o 2. Los LNA y la preparación de los mismos se describe en los documentos WO 98/39352 y WO 99/14226.

Los monómeros de LNA adicionalmente adecuados (a veces llamados "monómero de ácido nucleico bloqueado", "residuo de ácido nucleico bloqueado", "monómero de LNA" o "residuo de LNA") se refieren a un análogo de nucleótido bicíclico como se describe, por ejemplo, en los documentos WO 00/56746, WO 00/56748, WO 01/25248, WO 02/28875, WO 03/006475, la Publicación de Patente de Estadounidense No. 2007/0191294, WO 03/095467, Patente de Estadounidense Nos. 6,670,461, 6,794,499, 7,034,133, 7,053,207 (L-Ribo-LNA), 7,060,809, y 7,084,125 (Xylo-LNA). El monómero de LNA también se puede definir con respecto a su fórmula química. Por lo tanto, un ejemplo de un "monómero de LNA" como se utiliza aquí tiene la siguiente estructura:



en donde, X se selecciona del grupo que consiste de O, S y NR^H --, donde R^H es H o alquilo, tal como alquilo C_1-C_6 ; Y es $(-CH_2)_r$, donde r es un entero 1-6; con la condición de que cuando $X=O$ entonces r no es 2. Z y Z^* están independientemente ausentes o se seleccionan del grupo que consiste de un grupo de enlace internucleósido, un grupo terminal y un grupo de protección; y B es una nucleobase. En una realización, $r=1$ y X es O y cada uno de Z, Z^* está independientemente ausente o se selecciona del grupo que consiste de un grupo de enlace de internucleósido, grupo terminal y un grupo de protección y B es una nucleobase. Los monómeros de LNA anteriores pueden estar en la forma beta-D, forma alfa-L como se describe, por ejemplo, en la Publicación de Patente Estadounidense 2007/0191294.

También se incluyen dentro de la expresión "monómero de LNA" oligómeros en los que uno o más nucleótidos se sustituyen por amino-LNA, tio-LNA o ambos. Por «amino-LNA» y «tio-LNA» se entiende el monómero de LNA mostrado en la fórmula anterior en el que el átomo de oxígeno del anillo de pentosa se reemplaza con un átomo de nitrógeno o de azufre, respectivamente. Los métodos para elaborar y utilizar dichos monómeros de LNA se describen, por ejemplo, en las Patentes Estadounidenses Nos. 7,060,809; 7,034,133; 6,794,499; 6,670,461; y las referencias citadas en las mismas. Una sustitución particular es C- o T- amino-LNA; o C o T-tio LNA. Ciertos análogos de amino-LNA y tio-LNA están disponibles de Ribotask A/S.

La expresión "alquilo C_{1-6} " significa una cadena de hidrocarburos lineal o ramificada saturada en donde las cadenas más largas tienen de uno a seis átomos de carbono, tales como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, tert-butilo, pentilo, isopentilo, neopentilo y hexilo. Una cadena de hidrocarburo ramificada significa un alquilo C_{1-6} sustituido en cualquier carbono con una cadena de hidrocarburo.

Ejemplos específicos de grupos terminales incluyen grupos terminales seleccionados del grupo que consiste en hidrógeno, azido, halógeno, ciano, nitro, hidroxilo, Prot-O--, Act-O--, mercapto, Prot-S--, Act-S--, alquiltio C_{1-6} , amino, Prot-N (R^H)--, Act-N(R^H)--, mono- o di (alquilo C_{1-6}) amino, alcoxi C_{1-6} opcionalmente sustituido, alquilo C_{1-6} opcionalmente sustituido, alqueno C_{2-6} opcionalmente sustituido, alquenoilo C_{2-6} opcionalmente sustituido, monofosfato que incluye monofosfato protegido, monotiofosfato que incluye monotiofosfato protegido, difosfato que incluye difosfato protegido, ditiofosfato que incluye ditiofosfato protegido, trifosfato que incluye trifosfato protegido, tritiofosfato que incluye tritiofosfato protegido, donde Prot es un grupo de protección para --OH, --SH y --NH (R^H), y Actividad es un de activación para --OH, --SH y --NH (R^H), y R^H es hidrógeno o alquilo C_{1-6} .

En el presente contexto, el término "alquilo C_{1-4} " significa una cadena hidrocarburo saturado lineal o ramificada en donde las cadenas más largas tienen de uno a cuatro a átomos, tales como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo y tert-butilo una cadena ramificada de hidrocarburo significa un alquilo C_{1-4} sustituido en cualquier carbono con una cadena de hidrocarburo.

Cuando se utiliza aquí el término "alcoxi C_{1-6} " significa alquilo C_{1-6} -oxi, tal como metoxi, etoxi, n-propoxi, isopropoxi, n-butoxi, isobutoxi, secuencia-butoxi, tert-butoxi, pentoxi, isopentoxi, neopentoxi y hexoxi

En el presente contexto, el término "alqueno C_{2-6} " significa un grupo de hidrocarburo lineal o, ramificado que tiene desde dos hasta seis átomos de carbono y que contiene uno o más enlaces dobles. Ejemplos ilustrativos de grupos de

alqueniolo C_{2-6} incluyen alilo, homoalilo, vinilo, crotilo, buteniolo, butadieniolo, penteniolo, pentadieniolo, hexadieniolo y hexeniolo. La posición de la insaturación (el doble enlace) puede estar en cualquier posición a lo largo de la cadena de carbono.

5 En el presente contexto, el término "alqueniolo C_{2-6} " significa un grupo de hidrocarburo lineal o, ramificado que tiene desde dos hasta seis átomos de carbono y que contiene uno o más enlaces triples. Ejemplos ilustrativos de grupos de alqueniolo C_{2-6} incluyen acetileno, propinilo, butilo, pentilo y hexinilo. La posición de la insaturación (el triple enlace) puede estar en cualquier posición a lo largo de la cadena de carbono. Más de un enlace puede ser insaturado de tal manera que el "alqueniolo C_{2-6} " es un dieno o enedieno como se conoce por el experto en la técnica.

10 Ejemplos de grupos de protección para grupos $-OH$ y $-SH$ incluyen tritilo sustituido, tal como 4,4'-dimetoxitritiloxi (DMT), 4-monometoxitritiloxi (MMT); tritiloxi, 9-(9-fenil)xanteniloxi opcionalmente sustituido (pixilo), metoxitetrahidropiraniloxi (mthp); sililoxi, tal como trimetilsililoxi. (TMS), triisopropilsililoxi (TIPS), tert-butildimetilsililoxi (TBDMS), trietilsililoxi, fenildimetilsililoxi; tert-butiléteres; acetatos (que incluyen dos grupos hidroxilo); aciloxi, tal como acetilo o acetilos sustituidos con halógeno, por ejemplo cloroacetiloxi o fluoroacetiloxi, isobutiriloxi, pivaloiloxi, benzoiloxi y benzoilos sustituidos, metoximetiloxi (MOM), éteres de bencilo o éteres de bencilo sustituidos tal como 2,6-diclorobenciloxi (2,6-Cl₂Bzl). Más aún, cuando Z o Z* es hidroxilo se pueden proteger mediante adhesión a un soporte sólido, opcionalmente a través de un ligador

20 Como se indicó anteriormente, Z y Z*, que sirven para una unión internucleósido, están independientemente ausentes o se seleccionan del grupo que consiste de un grupo de enlace internucleósido, un grupo terminal y un grupo de protección dependiendo de la posición real del monómero LNA dentro del compuesto. Se entenderá que, en las realizaciones en donde se ubica el monómero de LNA en el extremo 3', Z es un grupo terminal y Z* es un enlace internucleósido. En realizaciones donde el monómero de LNA se ubica en el extremo 5', Z está ausente y Z* es un grupo terminal. En realizaciones en donde se ubica el monómero de LNA dentro de la secuencia de nucleótidos, Z está ausente y Z* es un grupo de enlace de internucleósido.

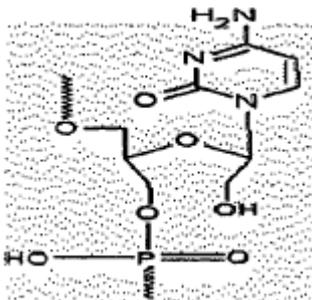
25 Ejemplos de otros grupos terminales adecuados, grupos de protección, y en particular monómeros de LNA adecuados para uso con la presente invención se pueden encontrar, por ejemplo, en la Publicación de Patente Estadounidense 2007/0191294 y las referencias citadas en la misma.

30 Otros análogos de nucleótido para uso con la presente invención, incluyen 2'metoxi (2'-O $-CH_3$), 2'-aminopropoxi (2' OCH₂CH₂CH₂NH₂), 2'-alilo (2'-CH₂-CH = CH₂), 2'-O-alilo (2'-O-CH₂-CH=CH₂) y 2'-fluoro (2'-F). La modificación 2' puede estar en la posición arábico (arriba) o ribo (abajo). Una modificación 2'-arábico preferida es de 2'-F. También se pueden hacer modificaciones similares en otras posiciones del oligonucleótido; particularmente la posición 3' del azúcar en el nucleótido de terminal 3' o en oligonucleótidos 2'-5' ligados y la posición 5' el nucleótido de terminal 5'. Los oligonucleótidos también pueden tener miméticos de azúcar (derivados de azúcar) tales como unidades estructurales de ciclobutilo en lugar del azúcar pentofuranosilo. Véase, por ejemplo, las Patentes Estadounidenses Nos. 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; 7,335,764; 5,792,747; y 5,700,920 para descripción que se relaciona con elaborar y utilizar dichos análogos.

35 Los oligómeros dentro del alcance de la presente invención incluyen aquellos que tienen una o más nucleobases modificaciones, sustituciones, y/o adiciones. Como se utiliza aquí, nucleobases "no modificadas" o "naturales" incluyen bases de purina adenina (A) y guanina (G), y bases de pirimidina timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Las nucleobases modificadas incluyen otras nucleobases sintéticas y naturales tales como 5- metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetil citosina, xantina, hipoxantina, 2- aminoadenina, 6-metilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-propilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracilo y citosina, 5-propinilo (-C= C-CH₃) uracilo y citosina y otros derivados de alquilo de bases pirimidina, 6-azo uracilo, citosina y timina, 5-uracilo (seudouracilo), 4-tiouracilo, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo y otras adeninas 8-sustituidas y guaninas, 5-halo particularmente 5-bromo, 5-trifluorometilo y otros uracilos 5-sustituidos y citosinas, 7-metilguanina y 7- metiladenina, 2-F-adenina, 2-amino-adenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7- desazaguanina y 7-desazaadenina y 3-desazaguanina y 3-desazaadenina. Las nucleobases modificadas incluyen pirimidinas tricíclicas tales como fenoxazina citidina (1H pirimido [5,4-b] [1,4] benzoxazin-2 (3H) -ona), fenotiazina citidina (1H-pirimido [5,4, b] [1,4] benzotiazin-2 (3H) -ona), pinzas G tales como una fenoxazina citidina sustituida (por ejemplo, 9 -(2-aminoetoxi)-H-pirimido [5,4-b] [1, 4] benzoxazin-2 (3H) -ona), carbazol citidina (2H-pirimido [4,5-b] indol-2-ona), piridindol citidina (H-pirido [3',2':4,5] pirrolo [2,3-d] pirimidin-2-ona). Las nucleobases modificadas también pueden incluir aquellos en los que la base de purina o pirimidina se reemplaza con otros heterociclos, por ejemplo, 7 -desaza-adenina, 7 -desazaguanosina, 2-aminopiridina y, 2'-piridona. Las nucleobases incluyen adicionalmente aquellas descritas en la Patente Estadounidense No. 3,687,808 aquellas descritas en The Concise Encyclopedia of Polymer Science and Engineering, páginas 858-859, Kroschwitz, J. I., ed John Wiley & Sons, 1990, aquellas descritas por English et al., Angewandte Chemie, Internacional Edition, 1991, 30,613, y aquellas descritas por "Sanghvi, Y. S., capítulo 15, Antisense Research and Applications, páginas 289-302, Crooke, S. T. y Lebleu, B., ed., CRP Press, 1993.

Para muchas aplicaciones de la invención, se prefiere tener oligómeros en los que el análogo de nucleósido incluye por lo menos citosina metilada para reducir o bloquear la estimulación no deseada del sistema inmunitario. Véase la sección de ejemplos.

- 5 Los oligómeros adicionales dentro del alcance de la presente invención incluyen aquellos con por lo menos un nucleótido acíclico en los mismos (por ejemplo, 1, 2, 3, o 4), preferiblemente análogos de nucleótidos 3',4'-seco tales como aquellos descritos por Neilson, P. et al. (1994) NAR 22: 703; y Neilson, P. et al. (1995) *Bioorganic & Med Chem* (1995) 19-28. Los ejemplos más específicos de dichos nucleótidos acíclicos incluyen 3',4'-secotimidina (seco-ARN-timidina), 3',4'-secocitosina (seco-ARN-citosina), 3',4'-secoadenina (seco-ARN-adenina), y 3'-4' secoguanina (seco-ARN-guanina). El estructura de un grupo 3',4'- secocitosina (seco-ARN-citosina) se proporcionan adelante:



- 15 Se pueden obtener materiales adicionales para elaborar y utilizar ácidos nucleicos 3',4'-seco se pueden obtener de Ribotask A/S (Odense, DK). Sin desear estar limitado por la teoría, se considera que el uso de seco-ARN puede ayudar a aumentar la utilidad de ciertas composiciones de la invención, que incluyen aquellos que se basan, por lo menos en parte, en la degradación enzimática de los ácidos nucleicos, tales como siARN.

- 20 Ciertas de las nucleobases que anteceden pueden ser útiles para aumentar la afinidad de unión de los compuestos oligoméricos de la invención. Estos incluyen pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y N-2, N-6 y O-6 purinas sustituidas, que incluyen aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. Se ha mostrado que las sustituciones de 5-metilcitosina aumentan la estabilidad del dúplex de ácido nucleico en 0.6-1.2° C. (Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. and Lebleu, B., eds., *Antisense. Research and 20 Applications*, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278) y se prefieren actualmente sustituciones de bases, incluso más particularmente cuando se combina con azúcar 2'-O-metoxietilo y otras determinadas modificaciones que se describen aquí tales como LNA. Véase, por ejemplo, Patentes Estadounidenses Nos. 3,687,808, 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; 5,594,121, 5,596,091; 5,614,617; 5,645,985; 5,830,653; 5,763,588; 6,005,096; 7,335,764, 5,750,692 y 5,681,941.

- 30 Aunque a menudo se prefiere utilizar uno o una combinación de los oligómeros de la invención anterior en una aplicación dada, dichas composiciones se pueden modificar adicionalmente según se desee para adaptarse a un uso previsto. Por lo tanto, en una realización, un oligómero particular de la invención se puede ligar químicamente con una o más unidades estructurales o conjugados que mejoran la actividad, distribución celular o absorción celular del oligonucleótido. Los compuestos de la invención por lo tanto pueden incluir grupos conjugados unidos covalentemente a grupos funcionales tales como grupos hidroxilo primarios o secundarios. Los grupos conjugados de la invención incluyen intercaladores, moléculas indicadoras, poliaminas, poliamidas, polietilenglicoles, poliéteres, grupos que aumentan las propiedades farmacodinámicas de los oligómeros y grupos que aumentan las propiedades farmacocinéticas de los oligómeros. Los grupos conjugados típicos incluyen colesteroles, lípidos, fosfolípidos, biotina, ácido fólico, fenazina, fenantridina, antraquinona, acridina, fluoresceínas, rodaminas, cumarinas y colorantes. Los grupos que potencian las propiedades farmacodinámicas, en el contexto de esta invención, incluyen grupos que mejoran la absorción de oligómeros, aumentan la resistencia de oligómeros a la degradación, y/o fortalecen la hibridación específica a secuencia con ARN. Los grupos que mejoran las propiedades farmacocinéticas, en el contexto de esta invención, incluyen grupos que mejoran la absorción del oligómero, distribución, metabolismo o excreción. Los grupos conjugados representativos se describen en la Solicitud de Patente Internacional PCT/US92/09196, por ejemplo. las unidades estructurales conjugadas incluyen, pero no se limitan a unidades estructurales lipídicas tales como una unidad estructural de colesterol (Letsinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86, 6553-6556), ácido cólico (Manoharan et al., *Bioorg. Med. Chem. Let.*, 1994, 4, 1053-1060), un tioéter, por ejemplo, hexil-S-tritilitiol (Manoharan et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1992, 660, 306-309; Manoharan et al., *Bioorg. Med. Chem. Let.*, 1993, 3, 2765-2770), un tiocolesterol (Oberhauser et al., *Nucl. Acids Res.*, 1992, 20, 533-538), una cadena alifática, por ejemplo, residuos de dodecandiol o undecilo (Saison-Behmoaras et al., *EMBO J.*, 1991, 10, 1111-1118; Kabanov et al., *FEBS Lett.*, 1990, 259, 327-330; Svinarchuk et al., *Biochimie*, 1993, 75, 49-54), un fosfolípido, por ejemplo, di-hexadecil-rac-glicerol o trietilamonio 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato (Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36, 3651-3654; Shea et al., *Nucl. Acids Res.*, 1990, 18, 3777-3783), una poliamina o una cadena de glicopolietileno (Manoharan et al., *Nucleosides and Nucleotides*, 1995, 14, 969-973), o ácido acético adamantano (Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36, 3651-3654), una unidad estructural de palmitilo (Mishra et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264, 229-237), o una unidad estructural de octadecilamina o hexilamino-carbonil-oxicolesterol (Crooke et al., *J. Phannacol. Exp. Ther.*, 1996, 277, 923-937. Los

compuestos de la invención, que incluyen compuestos antisentido descritos aquí, también se pueden conjugar con sustancias farmacológicas activas, por ejemplo, aspirina, warfarina, fenilbutazona, ibuprofeno, suprofen, fenbufeno, cetoprofeno, (S) - (+) pranoprofeno, carprofeno, dansilarsocina, ácido 2,3,5-triyodobenzoico, ácido flufenámico, ácido folínico, una benzotiadiazida, clorotiazida, una diazepina, indometicina, un barbiturato, una cefalosporina, un fármaco sulfa, un antidiabético, un antibacteriano o un antibiótico. Los conjugados de oligonucleótido-fármaco y su preparación se describen en la Solicitud De Patente No. de serie 09/334,130 (presentada junio 15 de 1999), por ejemplo. Véase también, Patentes Estadounidenses Nos. 4,828,979; 4,948,882; 5,218,105; 5,525,465; 5,541,313; 5,545,730; 5,552,538; 5,578,717; 5,580,731; 5,580,731; 5,591,584; 5,109,124; 5,118,802; 5,138,045; 5,414,077; 5,486,603; 5,512,439; 5,578,718; 5,608,046; 4,587,044; 4,605,735; 4,667,025; 4,762,779; 4,789,737; 4,824,941; 4,835,263; 4,876,335; 10 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, 7,335,764 y 5,688,941, para descripción que se relaciona con elaborar y utilizar dichos compuestos.

15 Como se apreciará, no siempre será necesario o deseable que todas las posiciones en un compuesto dado se modifiquen uniformemente. Más de una de las modificaciones mencionadas anteriormente se pueden incorporar en un único compuesto o incluso en un único nucleósido dentro de un oligonucleótido. La presente invención incluye también los oligómeros que son compuestos quiméricos. Los compuestos oligómeros "quiméricos", por ejemplo, o "quimeras" oligoméricas, en el contexto de esta invención, son oligonucleótidos tales como compuestos antisentido, que contienen 20 dos o más regiones químicamente distintas, cada una compuesta de por lo menos una unidad de monómero, es decir, un nucleótido o análogo del mismo en el caso de un compuesto de oligonucleótido. Estos oligonucleótidos normalmente contienen por lo menos una región en donde el oligonucleótido se modifica con el fin de conferir al oligonucleótido aumento de resistencia a la degradación por nucleasas, aumento de absorción celular, y/o aumento de afinidad de unión del ácido nucleico objetivo. Una región adicional del oligonucleótido puede servir como sustrato para enzimas capaces de dividir híbridos de ARN: ADN o ARN: ARN. A modo de ejemplo, la RNasa H es una endonucleasa celular que divide 25 la cadena de ARN de un dúplex de ARN: ADN. Por lo tanto, la activación de la RNasa H, resulta en la división del objetivo de ARN, mejorando en gran medida de esta manera la eficiencia de inhibición de oligonucleótido de expresión génica. En consecuencia, a menudo se pueden obtener resultados comparables con los oligonucleótidos cortos cuando se utilizan oligonucleótidos quiméricos, en comparación con fosforotioato desoxioligonucleótidos que se hibridan en la misma región objetivo. La división del ARN objetivo se puede detectar rutinariamente por electroforesis en gel y, si es necesario, técnicas de hibridación de ácidos nucleicos asociadas conocidas en la técnica.

El término "por lo menos uno", como se utiliza aquí abarca un número entero mayor que o igual a 1, tales como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y así sucesivamente.

35 Los compuestos antisentido quiméricos de la invención se pueden formar como estructuras compuestas de dos o más oligonucleótidos, oligonucleótidos modificados, miméticos de oligonucleótidos y/o oligonucleósidos como se describió anteriormente. Dichos compuestos también se han denominado en la técnica como híbridos, wíngmeros o gápmeros. Véase, por ejemplo, Patentes Estadounidenses Nos. 5,013,830; 5,149,797; 5,220,007; 5,256,775; 5,366,878; 5,403,711; 40 5,491,133; 5,565,350; 5,623,065; 5,652,355; 5,652,356; 5,700,922, 7,335,764, y Publicación de Patente Estadounidense 2007/0191294.

Los oligómeros utilizados de acuerdo con esta invención se pueden elaborar convenientemente y rutinariamente a través de la técnica bien conocida de síntesis en fase sólida. El equipo para dicha síntesis es vendido por varios vendedores que incluyen, por ejemplo, Applied Biosystems (Foster City, Calif.). Se puede emplear adicional o 45 alternativamente cualesquier otros medios adicionales para dicha síntesis conocidos en la técnica. Es bien conocido utilizar técnicas similares para preparar oligonucleótidos tales como fosforotioato y derivados alquilados. Preferiblemente, los oligómeros de acuerdo con la invención se sintetizan in vitro y no incluyen composiciones de origen biológico, o construcciones de vectores genéticos diseñados para dirigir la síntesis in vivo de dichas composiciones. Los 50 oligómeros de cadena sencilla se preferirán para muchas aplicaciones de la invención.

Como se discute, en algunas realizaciones de la invención será útil mejorar la afinidad de un oligómero para su objetivo. Esto se puede lograr por uno o una combinación de métodos como se describe aquí. En un método, la secuencia de nucleobases contigua comprende por lo menos un análogo de nucleótido que mejora la afinidad tal como aquellas 55 descritas aquí que incluyen monómeros de 2'-MOE y LNA. En una realización de un oligómero que incluye por lo menos un análogo de nucleótido que mejora la afinidad, la secuencia de nucleobases contigua comprende un total de aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o aproximadamente 10 análogos de nucleótidos que mejoran la afinidad, tal como entre 5 y 8 análogos de nucleótido que mejoran la afinidad. En otra realización, un oligómero de la invención incluye por lo menos un análogo de nucleótido que mejora la afinidad, en donde las nucleobases restantes se seleccionan del grupo 60 que consiste de nucleótidos de ADN o nucleótidos de ARN o nucleótidos acíclicos como se describe aquí.

En una realización más específica de los oligómeros anteriores, el oligómero incluye una secuencia, de nucleobases de la fórmula, en dirección 5' a 3', A-B-C, y opcionalmente de la fórmula A-B-C-D en la que:

«A» consiste o incluye por lo menos un análogo de nucleótido, tal como 1, 2, 3, 4, 5 o 6 análogos de nucleótidos, por ejemplo, entre 2-5 análogos de nucleótidos, tal como 2, 3 o 4 análogos de nucleótidos, o 2, 3 o 4 análogos de nucleótidos consecutivos y;

5 «B» consiste o comprende por lo menos cinco nucleobases consecutivas que son capaces de incorporar RNasa H (cuando se forman en un dúplex con un objetivo C6 de mamífero, por ejemplo, el ácido nucleico de C6 de humano representado por la SEQ ID NO. 1. En una realización, las nucleobases de ADN del oligómero, tal como 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, o 12 nucleobases consecutivas que son capaces de incorporar RNasaH, o entre 6-10, o entre 7-9, tal como 8 nucleobases consecutivas que son capaces de incorporar RNasaH, y;

10

C» consiste o comprende de por lo menos un análogo de nucleótido, tal como 1, 2, 3, 4, 5, o 6 análogos de nucleótidos, preferiblemente entre 2-5 análogos de nucleótidos, tal como 2, 3 o 4 análogos de nucleótidos, aún más preferiblemente 2, 3 o 4 análogos de nucleótidos consecutivos, y;

15 «D» cuando está presente, consiste o comprende, preferiblemente de uno o más nucleótidos de ADN, tal como entre 1-3 o 1-2 nucleótidos de ADN.

En una realización de la composición anterior, el oligómero incluye adicionalmente por lo menos un nucleótido acíclico en por lo menos uno de A, B, C o D, preferiblemente 1, 2, 3 o 4 de la misma región en B tal como aproximadamente 1 o aproximadamente 2 nucleótidos acíclicos. Preferiblemente, el nucleótido acíclico se selecciona del grupo que consiste de 3',4' -secotimidina (seco-ARN- timidina), 3'4' -secocitosina (seco-ARN-citosina), 3',4' -secoadenina (seco-ARN-adenina), y 3'-4'-secoguanina (seco-ARN-guanina) como se describió anteriormente.

25 En una realización, la región A consiste o comprende de 2, 3 o 4 análogos de nucleótidos consecutivos. Adicionalmente, B puede consistir de o incluye aproximadamente 7, 8, 9 o aproximadamente 10 nucleótidos de ADN consecutivos o nucleobases equivalentes que son capaces de incorporar RNasaH cuando se forma en un dúplex con el objetivo de ácido nucleico C6 de mamífero. También, C en el oligómero anterior puede consistir o incluir aproximadamente 2, 3 o aproximadamente 4 análogos de nucleótidos consecutivos. La región D, como se proporcionó anteriormente, puede consistir de, cuando está presente, uno o dos nucleótidos de ADN. En consecuencia, y en una realización, la región A, como se definió anteriormente, consiste o incluye 3 análogos de nucleótidos contiguos; B, como se definió anteriormente, consiste o incluye aproximadamente 7, 8, 9 o aproximadamente 10 nucleótidos de ADN contiguos o nucleobases equivalentes que son capaces de incorporar RNasaH cuando se forma en un dúplex con el objetivo de C6 de mamífero; y C, como se definió anteriormente, consiste o incluye aproximadamente de 3 análogos de nucleótidos contiguos; y la región D, cuando está presente, consiste de uno o dos nucleótidos de ADN.

35

En una realización particular del oligómero anterior, la secuencia de nucleobases contigua consiste de aproximadamente 10, 11, 12, 13 o aproximadamente 14 nucleobases, y en donde; la región A consiste de aproximadamente 1,2 o aproximadamente 3 análogos de nucleótidos contiguos; la región B consiste de aproximadamente 7, 8, o aproximadamente 9 nucleótidos de ADN consecutivos o nucleobases equivalentes que son capaces de incorporar RNasaH cuando se forman en un dúplex con el objetivo de ácido nucleico C6 de mamífero; la región C consiste de aproximadamente 1, 2 o aproximadamente 3 análogos de nucleótidos contiguos; y la región D consiste, cuando está presente, de un nucleótido de ADN.

40

45 Para muchas aplicaciones de la invención, generalmente se preferirá tener un oligómero en el que la región B incluye por lo menos un monómero de LNA (nucleobase). Como un ejemplo, dicho LNA puede estar en la configuración alfa-L, tal como LNA alfa-L-oxi. Los análogos de nucleótidos adicionales adecuados (ya sea en una de o todas las regiones A, B, C y D como se definió anteriormente) se seleccionan independientemente o colectivamente de entre el grupo que consiste en: unidades de Ácido Nucleico Bloqueado (LNA); unidades de 2'-O-alkil-ARN, unidades de 2'-OMe-ARN,, unidades de 2'-amino-ADN, unidades de 2'-fluoro-ADN, unidades de PNA, unidades de HNA, y unidades INA. En una realización preferida de la invención, el análogo de nucleótido incluirá y más preferiblemente consistirá de monómeros de LNA.

50

55 En las realizaciones de la invención en la que un oligómero particular incluye por lo menos un monómero de LNA (denominado a veces una unidad), generalmente serán útiles de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 unidades de LNA, tal como entre 2 y 8 unidades de LNA nucleótidos. Otros monómeros de LNA para determinadas aplicaciones de la invención, que incluyen aquellas seleccionadas de oxi-LNA, tio-LNA, [beta] -D-oxi-LNA, y amino-LNA, en cualquiera de las configuraciones beta-D y alfa- L o combinaciones de las mismas. En una realización, todo los monómeros de LNA del oligómero son [beta] -D-oxi-LNA. De tal manera en una realización particular de la invención, los análogos de nucleótidos o nucleobases de las regiones A y C son [beta]-D-oxi- LNA.

60

Como se menciona, será útil tener oligómeros que incluyan por lo menos una nucleobase modificada. En una realización, la nucleobase modificada se selecciona del grupo que consiste de 5-metilcitosina, isocitosina, seudoisocitosina, 5- bromouracilo, 5-propiniluracilo, 6-aminopurina, 2-aminopurina, inosina, diaminopurina, y 2-cloro-6-aminopurina

65

La práctica de la invención es compatible con el uso de uno o una combinación de diferentes oligómeros como se describe aquí. Por ejemplo, y en una realización, una invención se hibrida con un ácido nucleico C6 de mamífero correspondiente (por ejemplo, mARN) con una T_m de por lo menos 40° C, tal como de por lo menos 50° C. En una realización particular, el oligómero se hibrida con un ácido nucleico C6 de mamífero correspondiente (por ejemplo, mARN) con una T_m no mayor de 90° C, tal como no mayor de 80° C.

En la mayoría de realizaciones de la invención, se prefieren generalmente los oligómeros con cadenas principales modificadas como se describió anteriormente, especialmente para uso in vivo. En una realización, los enlaces de internucleósido se seleccionan independientemente del grupo que consiste de: fosfodiéster, fosforotioato y boranofosfato. En un ejemplo particular, el oligómero incluye por lo menos un enlace de fosforotioato internucleósido. Los enlaces de internucleósido que pueden estar adyacente a o entre unidades de ADN o ARN, o dentro de la región B (como se describió anteriormente) son enlaces de fosforotioato. En un ejemplo de un oligómero de la invención, por lo menos un par de análogos de nucleótidos consecutivos es un enlace de fosfodiéster. En algunas realizaciones, todos los enlaces entre los análogos de nucleótidos consecutivos serán preferiblemente enlaces de fosfodiéster, por ejemplo, todos los enlaces de internucleósido pueden ser enlaces de fosforotioato.

Los oligómeros más específicos para uso de la invención incluyen aquellos dirigidos a los sitios objetivo preferidos mostrados en las Tablas 4A-4E y Tablas 5A-5F y mencionados anteriormente. Dichos oligómeros consistirán generalmente de entre aproximadamente 10 a aproximadamente 20 nucleótidos, tal como aproximadamente 12 a aproximadamente 18 nucleótidos, en los que la estructura principal está completamente o parcialmente fosfotiolada. Adicionalmente los oligómeros preferidos incluirán además entre aproximadamente uno a aproximadamente seis (6) monómeros de LNA preferiblemente colocados en los extremos 5' y 3' de los oligómeros. Los oligómeros más específicos incluirán aproximadamente 2 o 3 de dichos monómeros de LNA posicionados en cada uno de los extremos (es decir., wingmeros o gápmeros).

También se prevé que cualquiera de los anteriores oligómeros en los que por lo menos una unidad estructural no nucleotídica o no polinucleotídica se une covalentemente a dicho compuesto. Ejemplos incluyen los grupos mencionados anteriormente.

Los oligómeros adicionales de la invención se proporcionan a continuación en los Ejemplos y Tablas.

Compuestos de doble cadena

Como se mencionó, la invención también contempla un compuesto de cadena doble que comprende una cadena clonada y una cadena antisentido dirigida a una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína del complemento de componente 6 (C6) de mamífero, tales como secuencias de humano, rata y ratón proporcionados en esta. En una realización, cada cadena comprende desde entre aproximadamente 12 hasta aproximadamente 35 nucleobases, preferiblemente de aproximadamente 12 a aproximadamente 30 nucleótidos, más preferiblemente de aproximadamente 14 a aproximadamente 25 nucleótidos con aproximadamente 15 a aproximadamente 20 nucleótidos (por ejemplo, 18 o 19 nucleótidos), que se prefieren para muchas aplicaciones. Preferiblemente, la cadena antisentido consiste de una secuencia de nucleobases contiguas a por lo menos aproximadamente 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% hasta aproximadamente 100% de identidad de secuencia con una región correspondiente de un ácido nucleico que codifica la secuencia de COMPONENTE DE COMPLEMENTO 6 secuencia (C6) representada por la SEQ ID NOs: 1 (humano), 402 (rata) o 403 (ratón) o una variante alélica de origen natural de la misma. El oligómero incluye por lo menos un análogo de oligonucleótido, tal como un monómero de LNA.

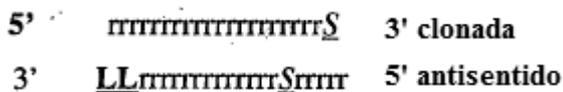
Los compuestos de doble cadena preferidos para uso de la invención se pueden hacer utilizando uno o una combinación de aquellos oligómeros descritos aquí. Los oligómeros más preferidos se diseñan para dirigir a los sitios objetivo ya discutidos en relación con las Tablas 4A-4E y las Tablas 5A-5F, por ejemplo. Los oligómeros adicionalmente preferidos para uso con el compuesto de doble cadena serán esencialmente no tóxicos según se determina por las pruebas con animales descritas aquí y en particularmente en la sección de Ejemplos. Dichos oligómeros pueden mostrar adicionalmente una buena capacidad para disminuir la expresión de mARN de C6 de acuerdo con el ensayo.

Una o ambas de la cadena clonada y la cadena antisentido comprenden por lo menos un enlace de internucleósido modificado como se describió previamente (estructuras principales de oligonucleótidos), tales como un enlace de fosforotioato. En un ejemplo particular, todos los enlaces de internucleósido de la cadena clonada y la cadena antisentido son enlaces de fosforotioato. Normalmente, la cadena clonada incluirá adicionalmente por lo menos un monómero de LNA, por ejemplo, entre aproximadamente 1 a aproximadamente 10 monómeros de LNA (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, o 9 monómeros de LNA). En un ejemplo, el por lo menos un monómero de LNA se ubica en el extremo 5' de la cadena clonada, por ejemplo, por lo menos dos monómeros de LNA se ubican en el extremo 5' de la cadena clonada. Alternativa o adicionalmente por lo menos un monómero de LNA se ubica en el extremo 3' de la cadena clonada, por ejemplo, por lo menos dos monómeros de LNA se ubican en el extremo 3' de la cadena clonada. Ejemplos adicionales del compuesto de doble cadena incluyen construcciones en las que la cadena antisentido comprende por lo menos un monómero de LNA, por ejemplo, entre aproximadamente 1 a aproximadamente 10 monómeros de LNA (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, o 9 monómeros de LNA). En un ejemplo de la invención, por lo menos el monómero de LNA del compuesto se ubica en el extremo 3' de la cadena antisentido tal como las realizaciones en las que por lo menos dos

- monómeros de LNA se ubican en el extremo 3' de la cadena antisentido, por ejemplo, por lo menos tres monómeros de LNA se ubican en el extremo 3' de la cadena antisentido. Sin embargo, en otros ejemplos, puede ser útil tener 1 o no tener monómero (0) de LNA ubicado en el extremo 5' de la cadena antisentido. Los compuestos de doble cadena para uso de la invención incluyen aquellas construcciones en las que la cadena clonada comprende por lo menos un LNA y la cadena antisentido comprende por lo menos un monómero de LNA, por ejemplo, aproximadamente 1 a aproximadamente 10 monómeros de LNA (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, o 9 monómeros de LNA) y la cadena antisentido comprende aproximadamente 1 a aproximadamente 10 monómeros de LNA (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, o 9 monómeros de LNA).
- En un ejemplo del compuesto de doble cadena anterior que comprende el primer oligómero (cadena clonada) y el segundo oligómero (cadena antisentido), la cadena clonada comprende por lo menos un monómero de LNA en el extremo 5' (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 monómeros de LNA) y por lo menos un monómero de LNA en el extremo 3' (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 monómeros de LNA) tal como el ejemplo en el que la cadena antisentido comprende por lo menos un monómero de LNA en el extremo 3'. Como un ejemplo, la cadena clonada comprende por lo menos un monómero de LNA en el extremo 5' (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 monómeros de LNA) y por lo menos un monómero de LNA en el extremo 3' (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 monómeros de LNA). En un ejemplo particular, la cadena antisentido comprende por lo menos dos monómeros de LNA en el extremo 3'. En determinados ejemplos, la cadena clonada comprende por lo menos dos monómeros de LNA en el extremo 5' y por lo menos dos monómeros de LNA en el extremo 3', por ejemplo, la cadena antisentido puede incluir por lo menos dos monómeros de LNA en el extremo 3'. Por lo tanto, en un ejemplo de la invención particular, la cadena clonada comprende por lo menos dos monómeros de LNA en el extremo 5' y por lo menos dos monómeros de LNA en el extremo 3', y, por ejemplo, la cadena antisentido comprende por lo menos tres monómeros de LNA en el extremo 3'. Sin embargo, en determinados ejemplos de la invención será útil tener 1 o no tener (0) monómeros de LNA ubicados en el extremo 5' de la cadena antisentido.
- En un ejemplo preferido, T en la composición se reemplaza por U (T => U). Sin embargo, para algunos o preferiblemente todos los monómeros de LNA, T no se sustituirá por U es decir., T = T.
- Las composiciones de doble cadena más específicas están dentro del alcance de la presente invención incluyendo aquellas en las que la cadena clonada comprende por lo menos un monómero de LNA en por lo menos una de las posiciones 9 a 13 contadas, secuencialmente, desde el extremo 5'. Alternativa o adicionalmente, la cadena clonada puede incluir un monómero de LNA en la posición 10 contada, secuencialmente, desde el extremo 5'. Alternativa o adicionalmente la cadena clonada puede incluir un monómero de LNA en la posición 11 y/o posición 12 en la misma.
- En determinados ejemplos del compuesto de doble cadena, el primer y el segundo oligómeros del mismo (cadenas clonada y antisentido) cada uno incluyen entre aproximadamente 17 a aproximadamente 25 nucleótidos, tales como 18 a aproximadamente 24 nucleótidos, aproximadamente 19 a aproximadamente 23 nucleótidos, y aproximadamente 20 a aproximadamente 22 nucleótidos.
- Si se desea lograr un objetivo de la invención, cada una de las cadenas clonadas y antisentido pueden incluir, independientemente, una saliente 3'. Alternativa o adicionalmente el compuesto puede incluir por lo menos un nucleósido acíclico (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, o 5) ubicada situada en el mismo por ejemplo, seco-ARN-timidina, seco-ARN-citosina, seco-ARN-adenina y seco-ARN-guanina). En un ejemplo, el nucleótido acíclico se ubica en la cadena clonada. En otro ejemplo, el nucleótido acíclico se ubica en la cadena antisentido del compuesto.
- En un ejemplo de la invención, las nucleobases del primer oligómero, el segundo oligómero, o ambas se hibridarán diseñadas para dirigir ejemplificadas por las SEQ ID Nos: 222, 225, 228, 231, 234, 237, 240, 243, 246, y 249 (véanse Tablas 4A-4E) y el ARN y versiones de complemento inverso de las mismas se muestran inmediatamente debajo de cada objetivo. Se espera que el C6 de rata y ratón C6 tenga sitios objetivos idénticos o muy similares. Incluidos dentro del grupo de dichos oligómeros específicos para uso como constituyentes de los compuestos de doble cadena son derivados de estas secuencias en las que se ha modificado uno o más del grupo de azúcar, nucleobase, o enlace de internucleósido, por ejemplo, como se describe aquí. Las modificaciones particulares incluirán modificar la secuencia para incluir o consistir esencialmente en enlaces fosforotioato y por lo menos un monómero de LNA.
- En consecuencia, y en un ejemplo, el compuesto de doble cadena cuenta con todos los enlaces de fosforotioato y aproximadamente uno, dos o tres monómeros de LNA en el extremo 3' de la cadena antisentido, por ejemplo, dos de los mismos. En un ejemplo, la cadena clonada incluye uno, dos, o tres monómeros de LNA en el extremo 5' de la cadena clonada, por ejemplo, dos de los mismos.
- En algunos ejemplos de la invención, puede ser útil tener más sustitución con monómero de LNA tal como cuando es deseable hibridación más fuerte entre cadenas. Por lo tanto, en un ejemplo, el compuesto de doble cadena cuenta con todos los enlaces de fosforotioato y aproximadamente uno, dos o tres monómeros de LNA en el extremo 3' de la cadena antisentido, por ejemplo, dos de los mismos. La cadena clonada incluye uno, dos, o tres monómeros de LNA en el extremo 5' de la cadena clonada, por ejemplo, dos de los mismos. Sin embargo, en un ejemplo, la cadena clonada incluye uno, dos, tres, cuatro o cinco monómeros de LNA adicionales entre el extremo 3' y 5' de la cadena clonada, tales como en la posición 3, 9, 13, y 15 en relación con el extremo 5' (posición 1) posiciones de saliente 3'.

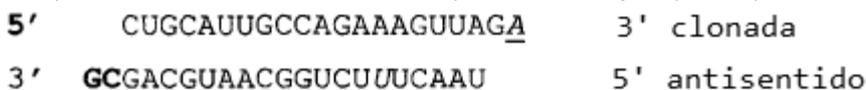
secoguanina (secuencia-ARN-guanina). En un ejemplo, la cadena antisentido incluye 1 nucleótido acíclico, preferiblemente posicionado entre los extremos 3' y 5', por ejemplo, entre desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 20 nucleótidos desde el extremo 3', preferiblemente entre desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 19 nucleótidos desde el extremo 3'. En un ejemplo, la cadena antisentido incluye adicionalmente uno, dos, o tres monómeros de LNA, por ejemplo, dos iguales posicionados en el extremo 3'. La cadena clonada, en un ejemplo, incluye uno, dos o tres nucleótidos acíclicos en el extremo 3', preferiblemente uno del mismo.

En un ejemplo, el siguiente compuesto es posible (L negrilla, subrayado = LNA, r=ARN, S cursiva subrayado = Seco):



en el que el compuesto puede incluir por lo menos un fosforotioato opcional, por ejemplo, puede ser completamente fosforotiolado. Los compuestos adicionales, cuando está presente un residuo C, pueden incluir un C metilo opcional para reducir o eliminar una respuesta inmunitaria cuando se utilizan para aplicaciones in vivo. Otras modificaciones, como se discute aquí son posibles.

Por lo tanto, en un ejemplo, el siguiente compuesto está dentro del alcance de la invención en el que el texto subrayado/en cursiva es un derivado seco y el texto en negrilla y subrayado es LNA:



Los compuestos de la invención particular se denominarán algunas veces aquí como "SiLNA" para denotar ampliamente un compuesto con por lo menos un monómero de LNA. Como se utiliza aquí, el término "siARN" se relaciona con un tramo de cadena doble de ARN o monómeros de ARN modificados. En un compuesto de siARN típico, las dos cadenas usualmente tienen 19 nucleótidos complementarios entre sí creando de esta manera una doble cadena que es de aproximadamente 19 nucleótidos de longitud y cada cadena tiene un extremo 3' de dos nucleótidos salientes. Se apreciará que un siARN de la invención puede ser ligeramente más largo o más corto, y con o sin salientes. La elección de una construcción de siARN particular dependerá de parámetros reconocidos tales como el uso destinado. En el siARN, una cadena de oligómero es la guía y es complementaria al ARN objetivo (cadena antisentido), y la otra cadena de oligómero (cadena clonada) tiene la misma secuencia que el ARN objetivo y por lo tanto es complementaria a la cadena de guía/antisentido. Aquí, los ARN reguladores tales como "micro ARN" ("miARN") y "ARN corto" ("shARN") y un variedad de ARN estructurales como tARN, snARN, scARN, rARN se utilizan de forma intercambiable con el término "siARN". El término "mARN" significa la transcripción de mARN conocido en la actualidad de un gen objetivo y cualesquier transcripciones adicionales, que se puedan identificar.

Dichos compuestos de doble cadena para uso de la invención se pueden conjugar (es decir unir covalentemente) a por lo menos una unidad estructural de no nucleótido o no polinucleótido. Los ejemplos incluyen aquellos descritos anteriormente.

Como se apreciará, para ser estable in vitro o in vivo, la secuencia de un compuesto de SiLNA o, siARN no necesita ser 100% complementaria a su ácido nucleico objetivo. Los términos "complementario" y "específicamente hibridable" implican de esta manera que el compuesto SiLNA o siARN se une suficientemente fuerte y específico pa la molécula objetivo para proporcionar la interferencia deseada con la función normal del objetivo al mismo tiempo dejar la función de mARNs no afectada.

Complejos de ARN de cadena discontinua

En otro aspecto, la presente invención contempla una composición que comprende un complejo de ácido nucleico, que normalmente comprende o consiste de ARN o uno o más análogos de oligonucleótidos de los mismos, y preferiblemente un diluyente, portador, o adyuvante farmacéuticamente aceptable. En un ejemplo, el complejo incluye una región de doble cadena de núcleo que incluye una cadena antisentido que consiste de una secuencia de nucleobases contigua con por lo menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia, por lo menos aproximadamente 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, hasta aproximadamente 100% de identidad de secuencia con una región correspondiente de un ácido nucleico que codifica la secuencia de componente de complemento 6 (C6) representada por SEQ ID NOs: 1 (humano), 402 (rata) o 403 (ratón) o una variante alélica de origen natural de la misma. Los complejos preferidos incluyen por lo menos un análogo de oligonucleótido, el complejo ARN comprende adicionalmente una cadena clonada discontinua que normalmente se hibrida con la cadena antisentido. Para la mayoría de aplicaciones, la cadena clonada discontinua incluye una discontinuidad tal como una nick o espacio o un ligador u otra dicha interrupción como se describe aquí.

En un ejemplo de lo anterior, el complejo de ARN es generalmente capaz de mediar las modificaciones de ácido nucleico de un ácido nucleico objetivo correspondiente. Preferiblemente, la modificación de ácido nucleico se selecciona

de una o más del grupo que consiste de interferencia de ARN, silenciamiento de gen, supresión de gen, detención de traducción, inhibición de traducción, degradación de ARN, división de ARN y metilación de ADN. Los complejos de ARN típicos median la degradación de un ARN objetivo o median la inhibición de traducción de un ARN objetivo o una combinación de ambas.

5 En un complejo de ARN particular para uso de la invención, la región de cadena doble de núcleo incluye entre aproximadamente 15 a aproximadamente 40 pares base, tal como 18 pares base, 19 pares base, 20 pares base, 21 pares base, 22 pares base y 23 pares base. En un ejemplo, el complejo de ARN incluye uno o más salientes, por ejemplo, una o dos salientes. Un ejemplo de una saliente es una saliente 3'. En un ejemplo, el clonado del complejo de ARN comprende la saliente 3'.

15 Aunque son compatibles una variedad de longitudes de saliente con la invención, generalmente la longitud de la saliente es de entre aproximadamente 1 y aproximadamente 8 nucleótidos tal como 1 nucleótido, 2 nucleótidos y 3 nucleótidos. Los complejos de ARN de acuerdo pueden incluir por lo menos un extremo como que incluye tener ambos extremos romos. La longitud del complejo de ARN puede ser casi cualquier longitud suficiente para alcanzar los resultados previstos que incluyen entre aproximadamente 18 y aproximadamente 22 pares base. En este ejemplo, se prefiere que la cadena antisentido y la cadena clonada incluyan cada una saliente 3' de entre aproximadamente 1 a aproximadamente 3 nucleótidos.

20 Como se menciona, en particular los complejos de ARN para uso de la invención incluyen una cadena clonada discontinua. En un ejemplo; el complejo incluye por lo menos una primera y una segunda molécula de ARN, que juntas, opcionalmente con una o más moléculas de ARN adicionales, forman la cadena clonada discontinua. Preferiblemente, el primera molécula de ARN se hibrida a la parte en dirección 3' de la cadena antisentido y la segunda molécula de ARN se hibrida a la parte en dirección 5' de la cadena antisentido. En un ejemplo, la cadena clonada comprende entre aproximadamente 1 a aproximadamente 4 moléculas de ARN adicionales, que junto con la primera molécula primera y segunda moléculas de ARN preferiblemente forman la cadena clonada discontinua. En otro ejemplo, la cadena clonada incluye sólo la primera y segunda moléculas de ARN, y, por ejemplo, no incluye moléculas de ARN adicionales.

30 Se puede formar una discontinuidad sobre la cadena clonada, por ejemplo, por un nick o nicks en los que por lo menos de esta manera se separan la primera y segunda moléculas de ARN, y, opcionalmente, las moléculas de ARN adicionales de la cadena clonada. Sin embargo, si se desea por lo menos la primera y segunda moléculas de ARN y opcionalmente dichas moléculas de ARN adicionales de la cadena clonada se separan por un espacio, o u opcionalmente espacios, tales como aquellos seleccionados del grupo que consiste de : un espacio de 1 nucleótido, un espacio de 2 nucleótidos, un espacio de 3 nucleótidos, un espacio de 4 nucleótidos, un espacio de 5 nucleótidos, un espacio de 6 nucleótidos, un espacio de 7 nucleótidos, un espacio de 8 nucleótidos, un espacio de 9 nucleótidos, un espacio de 10 nucleótidos, un espacio de 11 nucleótidos y un espacio de 12 nucleótidos. En los ejemplos en los que la discontinuidad está relacionada con un ligador, la primera molécula de ARN de la cadena clonada se puede conectar a la cadena antisentido mediante el ligador. En un ejemplo, el ligador se conecta el extremo 5' de la primera molécula de ARN de la cadena clonada al extremo 3' de la cadena antisentido. En otro ejemplo, la segunda molécula de ARN de la cadena clonada se puede conectar a la cadena antisentido mediante el ligador. Si se desea, el ligador puede conectar el extremo 3' de la segunda molécula de ARN de la cadena clonada al extremo 5' de la cadena antisentido. Por lo menos la primera y segunda moléculas de ARN de la cadena clonada, y opcionalmente dichas moléculas de ARN adicionales de la cadena clonada se pueden conectar por el ligador, u, opcionalmente, una pluralidad de ligadores. Una variedad de ligadores son compatibles con la invención, tal como aquellos que no son un solo ligador de ARN de cadena.

45 En algunos ejemplos de la invención del complejo de ARN, la cadena antisentido no se liga covalentemente a la cadena clonada. Si se desea, las moléculas de ARN que forman las cadenas clonadas discontinuas no se ligan covalentemente a cualquier otra de las moléculas de ARN que forman las cadenas clonadas discontinuas.

50 Ciertos complejos de ARN para el uso de la invención cuentan con tres moléculas no ligadas a ARN, es decir, la cadena antisentido, y la primera y segunda moléculas de ARN que juntas forman la cadena clonada discontinua. En un ejemplo, la cadena clonada discontinua tiene una discontinuidad en una posición seleccionada de entre el grupo de: la posición 3, posición 4, posición 5, posición 6, posición 7, posición 8, posición 9, posición 10, posición 11, posición 12, posición 13, posición 14, posición 15, posición 16, posición 17, posición 18, posición 19, posición 20, posición 21, posición 22, posición 23, posición 24, posición 25. Preferiblemente, LA posición se calcula en la dirección 5' a 3' desde el primer nucleótido de la base de cadena clonada emparejado con la cadena antisentido en la de la cadena clonada.

60 Para algunos ejemplos de la invención, será útil tener un complejo de ARN en el que los extremos 5 del complejo ARN sean fosforilados o estén disponibles para fosforilación. En un ejemplo, la primera molécula de ARN comprende un grupo fosfato en el extremo 5' y un grupo hidroxilo en el extremo 3'. En otro ejemplo, la segunda molécula de ARN comprende un grupo fosfato en el extremo 5' y un grupo hidroxilo en el extremo 3'. En determinados ejemplos, todas las moléculas de ARN que forman la cadena clonada discontinua cada una comprende un grupo fosfato en el extremo 5' y un grupo hidroxilo en el extremo 3'.

65 A menudo será útil tener complejos de ARN que incluyen o consisten en algunos casos de por lo menos un análogo de nucleótido tal como aquellos descritos aquí. En un ejemplo, la cadena clonada del complejo de ARN comprende por lo

menos un análogo de nucleótido tal como entre 2 y 10 análogos de nucleótidos. Alternativa o adicionalmente, la primera molécula de ARN de la cadena clonada comprende uno o más análogos de nucleótidos, tales como por lo menos 2 análogos de nucleótidos. Alternativa o adicionalmente, la segunda molécula de ARN de la cadena clonada comprende uno o más análogo de nucleótido tal como por lo menos 2 análogos de nucleótidos.

5

En los ejemplos en los que un complejo de ARN incluye un análogo de nucleótido, la localización del análogo está preferiblemente dentro de los tres unidades de nucleobases terminales (5' o 3' respectivamente) de la primera y/o segunda molécula de ARN. Alternativa o adicionalmente, por lo menos una de las moléculas de ARN adicionales de la cadena clonada comprende por lo menos un análogo de nucleótido. Por ejemplo, cada molécula de ARN adicional que forma parte de la cadena clonada discontinua comprende por lo menos un análogo de nucleótido tal como en las posiciones 10 y 12 desde el extremo 5' de la cadena clonada. En un ejemplo, cada molécula de ARN que forma parte de la cadena clonada discontinua y comprende por lo menos un análogo de nucleótido, tal como por lo menos dos análogos de nucleótidos.

10

15

En un ejemplo, la cadena clonada incluye uno, dos, tres, cuatro o cinco monómeros de LNA adicionales entre el extremo 3' y 5' de la cadena clonada tal como en la posición 3, 9, 13, y 15 con respecto al extremo 5' (posición 1) y las posiciones de saliente 3'. Sin embargo, en este ejemplo de la invención, la cadena clonada se rompe en dos partes, por ejemplo, entre las posiciones 10 y 11. Por lo tanto, en un ejemplo, cada porción de la cadena clonada incluye por lo menos un monómero de LNA, por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete de los mismos, más preferiblemente cinco o seis de los mismos en los que uno, dos, o tres, o cuatro monómeros de LNA se posicionan en una de las cadenas clonadas y los monómeros restantes se posicionan en la otra cadena.

20

A menudo será útil elaborar y utilizar un complejo de ARN que tiene propiedades de temperatura de fusión deseables. Por lo tanto, en un ejemplo, la temperatura de fusión (T_m) para cada uno de la primera, segunda y opcionalmente moléculas de ARN adicionales que forman la cadena clonada discontinua, cuando se forma en un dúplex con una molécula de ARN complementario con enlaces de fosfodiéster es de por lo menos 40° C.

25

Las longitudes preferidas de los complejos de ARN de la invención serán guiadas por el uso destinado. Por lo tanto, en un ejemplo, la longitud de cada una de la primera, segunda y opcionalmente moléculas de ARN adicionales que forman la cadena clonada discontinua tiene por lo menos tres unidades de nucleobases. En un ejemplo, la cadena antisentido comprende por lo menos 1 análogo de nucleótido tal como el ejemplo donde la cadena antisentido comprende por lo menos 1 análogo de nucleótido dentro de la región de dúplex formada con la cadena clonada discontinua. Alternativa o adicionalmente, la cadena antisentido comprende por lo menos un análogo de nucleótido en una posición que está dentro de 4 nucleobases contadas a partir del extremo 3' de la cadena antisentido. En un ejemplo, por lo menos una de las nucleobases presente en aproximadamente las 9 5' unidades de nucleobases más hacia 5' de la cadena antisentido es un análogo de nucleótido. En otro ejemplo, por lo menos una de las nucleobases presentes en la región dentro de 4 a 10 nucleobases desde el extremo 3' 10 de la cadena antisentido es un análogo de nucleótido. En aún otro ejemplo, la cadena antisentido tiene un análogo de nucleótido en la posición 11 desde el extremo 5' de la cadena antisentido. En aún otro ejemplo, la cadena antisentido tiene nucleótidos de ARN en la posición 10 y 12 a desde el extremo 5' de la cadena antisentido. En otro ejemplo, las unidades de nucleobases más hacia 5' de la cadena antisentido es una unidad de nucleótido de ARN. Alternativa o adicionalmente, la cadena antisentido comprende por lo menos 2 análogos de nucleótidos.

30

35

40

Una amplia variedad de análogos de nucleótido son compatibles con la invención. Normalmente los análogos adecuados son aquellos que son o se sospecha son compatibles con la formación de una forma A o A/B para conformación del complejo de ARN. Los análogos ilustrativos incluyen el grupo que consiste de: monómeros de 2'-O-alquilo- ARN, monómeros de 2'-amino- ADN, monómeros de 2'-fluoro-ADN, monómeros de LNA, monómeros de ácido nucleico arabino (ANA), monómeros de 2' fluoro-ANA, monómeros de HNA, monómeros de INA. Un análogo de nucleótido preferido está presente en la cadena clonada discontinua y/o cadena antisentido y consiste de por lo menos un monómero de LNA tal como aquellos ya descritos aquí. Alternativa o adicionalmente, los análogos de nucleótidos presentes en la cadena clonada discontinua y/o cadena antisentido incluyen por lo menos una unidad de 2'-MOE-ARN (2'-O- metoxietil-ARN) o unidades de ADN 2'-Fluoro.

45

50

Como se menciona, a menudo será útil tener un complejo de ARN en las que por lo menos un nucleótido se sustituya con por lo menos una unidad de LNA. En un ejemplo, la unidad o unidades de LNA se seleccionan independientemente del grupo que consiste en oxi-LNA, tio-LNA, y amino-LNA, en cualquiera de las configuraciones D-β y L-α o combinaciones de las mismas. Si se desea, los análogos de nucleótidos presentes en la cadena antisentido incluyen por lo menos una unidad LNA y/o análogos de nucleótido presentes en la cadena clonada incluyen por lo menos una unidad de LNA. En un ejemplo, los análogos de nucleótidos presentes en las unidades de las cadenas antisentido con unidades de LNA. Alternativa o adicionalmente, todos los análogos de nucleótidos presentes en cadena clonada son unidades de LNA. Anteriormente se han descrito diversos monómeros de LNA.

55

60

En muchos ejemplos del complejo de ARN descrito aquí, por lo menos uno de los análogos de nucleótidos presentes en las cadenas clonadas discontinuas forman un par base con un análogo de nucleótidos complementario presente en la cadena antisentido. En un ejemplo, la cadena clonada no comprende análogos de nucleótidos y/o en otro ejemplo, la cadena antisentido no comprende análogos de nucleótidos. En otro ejemplo, la cadena antisentido y cadena discontinua

65

forman un dúplex complementario de entre aproximadamente 18 a aproximadamente 22 pares bases. En un ejemplo, el dúplex puede comprender un emparejamiento erróneo.

5 En un ejemplo el número de análogos de nucleótidos presentes en la cadena antisentido o cadena clonada (o ambas, ya sea como entidades separadas o como una combinación total de análogos de nucleótidos dentro del complejo de ARN) se selecciona del grupo que consiste de: por lo menos un análogo de nucleótido, tal como por lo menos 2, por lo menos 3, por lo menos 4, por lo menos 5, por lo menos 6, por lo menos 7, por lo menos 8, por lo menos 9, por lo menos 10, por lo menos 11, por lo menos 12, por lo menos 13, por lo menos 14, por lo menos 15, por lo menos 16, por lo menos 17, por lo menos 18, por lo menos 19 o por lo menos 20, por lo menos 21, por lo menos 22, por lo menos 23, por lo menos 24 y por lo menos 25 análogos de nucleótidos. De forma adecuada, el número de análogos de nucleótidos puede ser menor de 20, tal como menor de 18, tal como menor de 16, tal como menor de 14, tal como menor de 12, tal como menor de 10.

15 En un ejemplo los análogos de nucleótidos presentes en la cadena clonada discontinua (o cadena antisentido, o ambas cosas, ya sea como entidades separadas una combinación total combinado de análogos de nucleótidos en el complejo de ARN) incluyen por lo menos un monómero de 2'-O-alquilo-ARN (tal como 2'OME), tal como 1,2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 monómeros de 2'-O-alquilo-ARN (tales como 2'OME). También se prevén los complejos que comprenden o consisten de 2'OME y LNA.

20 En un ejemplo, que puede ser el mismo o diferente, los análogos de nucleótidos presentes en cadenas clonadas discontinuas (o cadenas antisentido, o ambas cosas, ya sea como entidades separadas o como una combinación total de análogos de nucleótidos dentro del complejo de ARN) incluyen por lo menos un monómero de 2'-fluoro-ADN, tales como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 de monómeros de 2'-fluoro-ADN.

25 Para muchas aplicaciones de la invención por lo general se preferirá tener por lo menos un monómero de LNA presente en la cadena clonada discontinua. En un ejemplo, que puede ser el mismo o diferente, los análogos de nucleótidos presentes en la cadena clonada discontinua (o cadena antisentido, o ambas cosas, ya sea como entidades separadas o como una combinación total de análogos de nucleótidos en el complejo de ARN) incluyen por lo menos un monómero de LNA, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 monómeros de LNA.

30 En un ejemplo la unidad o unidades de LNA se seleccionan independientemente del grupo que consiste de oxi-LNA, tio-LNA, y amino-LNA, en cualquiera de las configuraciones D-β y L-α o combinaciones de las mismas. En un ejemplo los análogos de nucleótidos presentes en la cadena antisentido incluyen por lo menos una unidad de Ácido Nucleico Bloqueado (LNA), tal como por lo menos 2, por lo menos 3, por lo menos 4, por lo menos 5, por lo menos 6, en menos 7, por lo menos 8, por lo menos 9, por lo menos 10, por lo menos 11, por lo menos 12, por lo menos 13, por lo menos 14, por lo menos 15, por lo menos 16, por lo menos 17, por lo menos 18, por lo menos 19 o por lo menos 20 unidades de LNA. De forma adecuada, el número de unidades de LNA puede ser menor de 20, tal como menor de 18, tal como menor de 16, tal como menor de 14, tal como menor de 12, tal como menor de 10. En un ejemplo todos los análogos de nucleótidos presentes en la cadena antisentido son unidades de Ácido Nucleico Bloqueado (LNA).

35 En otro ejemplo, la cadena antisentido solamente comprende unas pocas unidades de análogos de nucleótidos, tales como unidades de LNA. Normalmente se prefiere las unidades de nucleótidos presentes en la cadena antisentido una posicionada dentro de la mitad de 3' de la cadena antisentido tal como entre las posiciones 1 y 9 de la cadena antisentido, tales como la posición 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 de la cadena antisentido, tal como dentro de la región de una saliente 3, o dentro de la primera 3, segunda o tercera posiciones de nucleobases del dúplex según se mide a partir del extremo 3' de la cadena antisentido.

40 En un ejemplo los análogos de nucleótidos presentes en la cadena clonada (o cadena antisentido, o ambas, ya sea como entidades separadas o como una combinación total de análogos de nucleótidos dentro de del complejo de ARN) incluyen por lo menos una unidad LNA tal como por lo menos 2, en menos 3, por lo menos 4, por lo menos 5, por lo menos 6, por lo menos 7, por lo menos 8, por lo menos 9, por lo menos 10, por lo menos 11, por lo menos 12, por lo menos 13, por lo menos 14, por lo menos 15, por lo menos 16, por lo menos 17, por lo menos 18, por lo menos 19 o por lo menos 20 unidades de LNA. De forma adecuada el número de unidades de LNA puede ser menor de 20, tal como menor de 18, tal como menor de 16, tal como menor de 14, tal como menor de 12, tal como menor de 10. En un ejemplo todos los análogos de nucleótidos presentes en la cadena clonada son monómeros de Ácido Nucleico Bloqueado (LNA) (unidades).

45 En un ejemplo, por lo menos uno de los análogos de nucleótidos presentes en los la cadena clonada discontinua un par base con un análogo de nucleótido complementario presente en la cadena antisentido.

50 En un ejemplo todos los análogos de nucleótidos presentes en cadena clonada discontinua forman un par base con un análogo de nucleótido complementario presente en la cadena antisentido, diferente de aquellos análogos de nucleótido presentes en la saliente 3' (si está presente).

65

En un ejemplo todos los análogos de nucleótidos presentes en la cadena antisentido forman un par de bases con un análogo de nucleótido complementario presente en la cadena clonada discontinua, diferente de aquellos análogos de nucleótido presentes en la saliente 3' (si está presente). En un ejemplo la cadena clonada consiste o comprende de una molécula de ARN de 9 - 11 nucleótidos (nucleobase), tal como una molécula de ARN de 10 nucleótidos, con entre 1 y cinco análogos de nucleótidos, tales como unidades de LNA, por ejemplo, dos tales como unidades de LNA y una molécula de ARN de 11 - 13 nucleótidos, tal como una molécula de ARN de 12 nucleótidos, que comprende entre 1 y 5 unidades de análogos de nucleótidos, tales como unidades de LNA, tales como tres residuos de LNA.

A modo de ejemplo, y sin limitación, el siguiente complejo de la invención particular tiene la siguiente estructura en la que el texto en negrilla y subrayado es LNA:

5' CUGCAUTGCC 3' 5' AGAAAGTUAGA 3' clonada

3' GCGACGUAACGGUCUUUCAAU 5' antisentido

La descripción adicional que se relaciona con elaborar y utilizar los complejos de ARN de la invención (algunas veces llamados sisiARN) se pueden encontrar en las siguientes: W02007/107162 (PCT/DK2007/000146), PA 2006 00433 (DK), y PA 2006 01254 (DK) para la descripción relacionada con elaborar y utilizar dichos complejos.

La práctica de la presente invención se puede lograr mediante el uso de uno o una combinación de complejos de ARN descritos aquí. En un ejemplo, el complejo de ARN ha reducido efectos fuera de objetivo, en comparación con un complejo de ARN nativo que comprende una cadena clonada no modular. En un ejemplo, el complejo de ARN produce una respuesta inmunitaria reducida en comparación con un de complejo ARN nativo que comprende una cadena no modular clonada. En otro ejemplo, el complejo de ARN tiene un efecto prolongado sobre los ácidos nucleicos objetivo como comparación con un complejo de ARN que comprende una cadena clonada no modular. Por lo tanto, en un ejemplo, el complejo de ARN tiene un mayor efecto sobre los ácidos nucleicos objetivos en comparación con un complejo de ARN que comprende una cadena clonada no modular. Un ácido nucleico objetivo preferido es la secuencia C6 descrita como la SEQ ID NO: 1 (humana), SEQ ID NO: 402 (rata), o SEQ ID NO: 403 (ratón).

Los complejos de ARN para uso de la invención se pueden elaborar por una o una combinación de estrategias. En un enfoque, el método incluye incubar una cadena antisentido con los por lo menos dos moléculas de ARN que forman una cadena clonada discontinua, y opcionalmente moléculas de ARN adicionales de la cadena clonada bajo condiciones en donde se forma un complejo de ARN que comprende una región de doble cadena de núcleo. Preferiblemente, el complejo de ARN es capaz de mediar la interferencia de ARN de un ARN celular correspondiente, en donde ocurre cualquiera de dicha incubación dentro de un diluyente, portador o adyuvante farmacéuticamente aceptable, o dicho complejo de ARN se mezcla posteriormente con un diluyente, portador, o auxiliar aceptable farmacéuticamente aceptable.

Los complejos de ARN anteriores tienen una variedad de usos. En un ejemplo, la invención cuenta con el uso de un complejo de ARN como se define aquí para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad asociada con formación no deseada de un complejo de ataque a membrana (MAC), tales como aquellos mencionados adelante.

La invención es útil para un método para tratar, prevenir o reducir el inicio de la enfermedad o reducir los síntomas en un paciente, el método comprende administrar uno o más de los complejos de ARN descritos aquí preferiblemente en combinación con un regulador, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable como se describió aquí.

La presente invención también es útil para un método para reducir el nivel de un ARN objetivo (o la expresión génica) en una célula o un organismo que comprende poner en contacto la célula u organismo con por lo menos un complejo de ARN como se define aquí suficiente para modular esa expresión génica. Preferiblemente, la cadena antisentido del complejo de ARN es esencialmente complementaria a una región del ARN objetivo.

Como se discute, un complejo de ARN adecuado para uso con la invención puede incluir por lo menos un análogo de nucleótido. En un ejemplo, la primera molécula de ARN de la cadena clonada no comprende una ribosa 2'-O-metilo en la posición 9 desde el extremo 5'. En otro ejemplo, la primera molécula de ARN de la cadena clonada no comprende una ribosa 2'-O-metilo en la posición 9 del extremo 5'.

La práctica de la invención proporciona importantes ventajas en particularmente en realizaciones en las que un compuesto de la invención (por ejemplo, antisentido, siARN, sisiARN) incluye un monómero de LNA.

Por ejemplo, una ventaja de las realizaciones en las que un compuesto de la invención incluye un monómero de LNA (por ejemplo, compuesto antisentido, SiLNA, sisiLNA) tiene su mejor estabilidad en fluidos biológicos, tal como suero. Por lo tanto, una realización de la invención incluye la incorporación de monómeros de LNA en un oligonucleótido de ADN o ARN estándar para aumentar la estabilidad del compuesto de SiLNA resultante u oligómero antisentido en los

fluidos biológicos por ejemplo, a través del aumento de la resistencia hacia nucleasas (endonucleasas y exonucleasas). Por consiguiente, los compuestos de la invención, debido a la incorporación de monómeros de LNA, exhibirán un aumento de la vida media de circulación como resultado de su aumento de temperatura de fusión y/o el aumento de su resistencia a las nucleasas. El grado de estabilidad dependerá del número de monómeros de LNA utilizadas, su posición en los oligonucleótidos y el tipo de monómero de LNA utilizado. En comparación con el ADN y fosforotioatos se puede establecer el siguiente orden de capacidad para estabilizar un oligonucleótido contra la degradación nucleolítica: ADN <<fosforotioatos, LNA-fosfodiéster <LNA-fosforotioatos.

Para muchas aplicaciones, los compuestos preferidos de acuerdo con la invención incluyen compuestos que, cuando se incuban en suero (por ejemplo, suero de humano, bovino o ratones), tales como en suero bovino fetal al 10% en una solución salina fisiológica a 37° C durante 5 horas, se degradan hasta un grado menor que el compuesto de ssADN, ssARN o dsARN correspondiente. Preferiblemente, menos de 25% de la cantidad inicial del compuesto de la invención se degrada después de 5 horas, más preferiblemente menos de 50% de la cantidad inicial del compuesto de la invención se degrada después de 5 horas, incluso más preferiblemente menos del 75 % de la cantidad inicial del compuesto de la invención se degrada después de 5 horas. En otra realización, se prefiere que menos del 25% de la cantidad inicial del compuesto de la invención se degrade después de 10 horas, y se prefiere aún más que menos del 50% de la cantidad inicial del compuesto de la invención se degrade después de 10 horas.

Como será evidente a partir de lo anterior, los compuestos de la invención pueden incluir uno o más monómeros de LNA solos o en combinación con nucleótidos que son ya sea de origen natural o análogos de nucleótidos. Dichos otros residuos pueden ser cualquiera de los residuos tratados aquí e incluyen, por ejemplo, monómeros de ARN naturales, monómeros de ADN naturales así como también variantes de nucleótidos y análogos tales como aquellos mencionados en relación con la definición de "nucleótido" anterior. Ejemplos específicos de dichas variantes de nucleótidos y análogos incluyen, 2'-F, 2'-O-Me, 2'-O-metoxietilo (MOE), 2'-O- (3-aminopropilo) (AP), ácido hexitol nucleico (HNA), ácido 2 'F-arabino nucleico (2'F- ANA) y nucleósido D-ciclohexenilo (CeNA). Adicionalmente, el enlace de internucleósido puede ser un fosforodiéster, fosforotioato o enlaces internucleósido de fosforoamidato N3'-P5' como se describió anteriormente.

En general, las cadenas individuales de los compuestos de la invención que incluyen monómeros de LNA contendrán uno o más por lo menos aproximadamente 5%, por lo menos aproximadamente 10%, por lo menos aproximadamente 15% o por lo menos aproximadamente 20% monómeros de LNA, con base en el número total de nucleótidos en la cadena. En determinadas realizaciones, los compuestos de la invención contendrán por lo menos aproximadamente 25%, por lo menos aproximadamente 30%, por lo menos aproximadamente 40%, por lo menos aproximadamente 50%, por lo menos aproximadamente 60% , por lo menos aproximadamente 70%, por lo menos aproximadamente 80% o por lo menos aproximadamente 90% de monómeros de LNA con base en el número total de nucleótidos en la cadena.

Los compuestos de la invención se pueden fabricar utilizando las técnicas descritas aquí que incluyen la síntesis proporcionada por la Publicación de Patente Estadounidense No. 2007/0191294 y WO2007/107162.

40 Composiciones farmacéuticas y administración

Un uso preferido de los compuestos de la invención será como fármacos para el tratamiento, prevención, y/o alivio de síntomas asociados con la neuropatía aguda o crónica. El diseño de un fármaco potente y seguro requiere a menudo el ajuste fino de diversos parámetros tales como. afinidad/especificidad, estabilidad en fluidos biológicos, absorción celular, modo de acción, propiedades farmacocinéticas y toxicidad. Estos y otros parámetros son bien conocidos por los expertos en la técnica.

Por consiguiente, en un aspecto adicional la presente invención se relaciona con una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con la invención y un diluyente, portador o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

En todavía un aspecto, la presente invención se relaciona con un compuesto de acuerdo con la invención para uso como un medicamento.

Como se comprenderá, la dosificación depende de la gravedad y capacidad de respuesta de la neuropatía que se va a tratar y el transcurso del tratamiento que dura desde varios días hasta varios meses, o hasta que se efectúa una cura o se logra una disminución del estado de enfermedad. Los programas de dosificación óptimos se pueden calcular a partir de mediciones de la acumulación de fármaco en el cuerpo del paciente. Las dosis óptimas pueden variar dependiendo de la potencia relativa de los compuestos de la invención individuales y/o la indicación que se va a tratar (véase abajo). En general se puede estimar con base sobre los EC₅₀ encontrados que son efectivos en modelos animales in vitro e in vivo. En general, la dosificación des desde 0.01 microgramos hasta 1 g por kg de peso corporal, y se puede administrar una o más veces diariamente, semanalmente, mensualmente o anualmente; o incluso una vez cada 2 a 10 años o mediante infusión continua durante horas hasta varios meses. Los índices de repetición para la dosificación se estimar con base en los tiempos de residencia medidos y las concentraciones del fármaco en fluidos o tejidos corporales. Después de un tratamiento exitoso, puede ser deseable que el paciente se someta a terapia de mantenimiento para prevenir la recurrencia del estado de enfermedad.

5 Como se apreciará, la presente invención también incluye una composición farmacéutica, que comprende por lo menos un compuesto de la invención (por ejemplo., compuesto antisentido, siLNA, siARN, sislNA) como ingrediente activo. Se debe entender que la composición farmacéutica de acuerdo con la invención comprende opcionalmente un portador farmacéutico, y que la composición farmacéutica comprende opcionalmente otros compuestos, tales como compuestos antiinflamatorios (por ejemplo, agentes antiinflamatorios no esteroides y esteroides) y/o compuestos inmunomoduladores.

10 Se puede emplear un compuesto de la invención en una variedad de sales farmacéuticamente aceptables. Como se utiliza aquí, el término se relaciona con sales que retienen la actividad biológica deseada de los compuestos identificados aquí y exhiben efectos toxicológicos no deseados mínimos. Ejemplos no limitantes de dichas sales se pueden formar con aminoácidos orgánicos y sales de adición básicas formadas con cationes metálicos tales como zinc, calcio, bismuto, bario, magnesio, aluminio, cobre, cobalto, níquel, cadmio, sodio; potasio, y similares o con un catión formado a partir de amoniaco, N,N-dibenciletilendiamina, D-glucosamina, tetraetilamonio, o etilendiamina.

15 En una realización de la invención el compuesto de la invención puede estar en la forma, de un profármaco. Los oligonucleótidos son en virtud iones cargados negativamente. Debido a la naturaleza lipófila de las membranas celulares se reduce la absorción celular de los oligonucleótidos en comparación con equivalentes neutros o lipófilos. Se puede evitar este "impedimento" de polaridad al utilizar el método pro-fármaco (véase, por ejemplo Crooke, R. M. (1998) in
20 Crooke, S: T. Antisense research and Application. Springer-Verlag, Berlín, Alemania, vol. 131, pp. 103-140). En este método, los oligonucleótidos se preparan de una forma protegida de tal manera que el oligo es neutro cuando se administra. Estos grupos de protección se diseñan de tal manera que se pueden eliminar cuando el oligo es captado por las células. Ejemplos de dichos grupos de protección son S-acetiltioetilo (SATE) o S-pivaloiltioetilo (t-butil-SATE). Estos grupos de protección son resistentes a nucleasa y se eliminan selectivamente intracelularmente.

25 Los agentes de unión y adyuvantes farmacéuticamente aceptables pueden comprender parte de los fármacos formulados. Las cápsulas, comprimidos y píldoras, etc. pueden contener, por ejemplo, los siguientes compuestos: celulosa microcristalina, goma o gelatina como aglutinantes; almidón o lactosa como excipientes; estearatos como lubricantes; diversos agentes edulcorantes o aromatizantes. Para las cápsulas la unidad de dosificación puede contener un portador líquido como aceites grasos. Así mismo los recubrimientos de azúcar o agentes entéricos pueden ser parte de la unidad de dosificación. Los compuestos de la invención también pueden ser emulsiones de los ingredientes farmacéuticos activos y un lípido que forma una emulsión micelular. Un compuesto de la invención se puede mezclar con cualquier material que no perjudique la acción deseada, o con materiales que complementen la acción deseada. Estos pueden incluir otros fármacos, que incluyen otros compuestos de nucleótido, para administración parenteral, subcutánea, intradérmica o tópica, la formulación pueden incluir un diluyente estéril, reguladores, reguladores de
35 tonicidad y antibacteriales, el compuesto activo se puede preparar con portadores que protegen contra la degradación o eliminación inmediata del cuerpo, que incluyen implantes o microcápsulas con propiedades de liberación controlada. Para la administración intravenosa los portadores preferidos son solución salina fisiológica o solución salina regulada con fosfato.

40 Preferiblemente, un compuesto de la invención se incluye en una formulación unitaria, tal como en un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable en una cantidad suficiente para suministrar a un paciente una cantidad terapéuticamente efectiva sin provocar efectos secundarios graves en el paciente tratado.

45 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar en un número de formas, dependiendo de si se desea tratamiento local o sistémico y sobre el área que se va a tratar. La administración puede ser (a) oral (b) pulmonar, por ejemplo, mediante inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, que incluyen por nebulizador, intratecal, intranasal, (c) tópica que incluye epidérmica, transdérmica, oftálmica y a membranas mucosas que incluyen suministro vaginal y rectal; (d) parenteral que incluye inyección intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular o infusión, o intracraneal, por ejemplo administración intratecal o intraventricular. En un ejemplo la composición farmacéutica se administra IV, IP, por vía oral, tópica o como una inyección en bolo o se
50 administra directamente en el órgano objetivo. Las composiciones farmacéuticas y formulaciones para administración tópicas pueden incluir parches transdérmicos, pomadas, lociones, cremas, geles, gotas, aerosoles, supositorios, líquidos y polvos. Los portadores farmacéuticos convencionales, bases acuosas, en polvo u oleosas, espesantes y similares pueden ser necesarios o deseables, los condones, guantes recubiertos y similares también pueden ser útiles. Las formulaciones tópicas preferidas incluyen aquellas en las que los compuestos de la invención están en mezcla con un agente de suministro tópico tales como lípidos, liposomas, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, esteroides, agentes quelantes y surfactantes. Las composiciones y formulaciones para administración oral incluyen, pero no se limita a polvos o gránulos, micropartículas, nanopartículas, suspensiones o soluciones en agua o medios no acuosos, cápsulas, cápsulas de gel, sobrecitos, comprimidos o minicomprimidos. Las composiciones y formulaciones para administración parenteral, intratecal o intraventricular pueden incluir soluciones acuosas estériles que también pueden contener reguladores, diluyentes y otros aditivos adecuados tales como, pero no limitados a, potenciadores de penetración, compuestos portadores, otros portadores o excipientes farmacéuticamente aceptables.

65 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, soluciones, emulsiones, y formulaciones que contienen liposomas. Estas composiciones se pueden generar a partir de una variedad de

componentes que incluyen, pero no se limitan a, líquidos preformados, sólidos autoemulsificantes y semisólidos autoemulsificantes. El suministro de medicamentos para el tejido tumoral se puede mejorar mediante suministro mediado por portador que incluye pero no se limita a, los liposomas catiónicos, ciclodextrinas, derivados de porfirina, dendrímeros de cadena ramificada, polímeros de polietilenimina, nanopartículas y microesferas (Das C. R. *J Pharm Pharmacol* 2002; 54(1):3-27). Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención, que se pueden presentar convenientemente en forma de dosificación unitaria, se pueden preparar de acuerdo con técnicas convencionales bien conocidas en la industria farmacéutica. Dichas técnicas incluyen la etapa de poner en asociación los ingredientes activos con los portadores farmacéuticos o excipientes. En general, las formulaciones se preparan, al provocar uniforme e íntimamente en asociación los ingredientes activos con portadores líquidos o portadores sólidos finamente divididos o ambos, y luego, si es necesario, diseñar el producto. Las composiciones de la presente invención se pueden formular en cualquiera de muchas posibles formas de dosificación tales como, pero no limitadas a, comprimidos, cápsulas, cápsulas en gel, jarabes líquidos, geles blandos y supositorios. Las composiciones de la presente invención también se pueden formular como suspensiones en medios acuosos, no acuosos o mixtos. Las suspensiones acuosas pueden contener además sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión que incluyen por ejemplo, carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol y/o dextrano. La suspensión también puede contener estabilizantes. Los compuestos de la invención también se pueden conjugar con sustancias farmacológicas activas, por ejemplo, aspirina, ibuprofeno, un fármaco sulfa, un antidiabético, un antibacteriano o un antibiótico. Se han descrito anteriormente otros conjugados útiles.

Los diluyentes, portadores y reguladores que hacen un oligonucleótido disponible por vía oral a un mamífero tal como un roedor o paciente humano están dentro del alcance de la presente invención. Un ejemplo particular de dicho portador es una sal de caprato, por ejemplo, caprato de sodio. Véase Tillman, LG et al. (2008) *J. of Pharmaceutical Sciences*, enero 97 (1) 225; González, FM et al. (2003) *Eur. J. Pharm. Biopharm*, Jan: 55 (1): 19-26; Aouadi, M et al. (2009), *Nature* 458: 1180; y las referencias descritas allí para información que se relaciona con elaborar formulaciones adecuadas para administración oral de un oligonucleótido.

Se apreciará que una ruta de formulación o administración particular de la invención puede incluir un único compuesto de la invención como el único agente activo. Sin embargo, en otras realizaciones de la invención, la ruta de formulación o administración incluye dos o más compuestos de la invención tales como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 de dichos compuestos. En general, el número de compuestos de la invención empleados será menor de 5, tal como uno, dos o tres. Por ejemplo, dicha formulación o administración puede contener uno o más compuestos de siLNA o sisiLNA, dirigidos a un primer ácido nucleico y uno o más compuestos de siLNA adicionales o sisiLNA dirigidos a un segundo objetivo de ácido nucleico. Se pueden utilizar dos o más compuestos combinados juntos o de forma secuencial.

Los compuestos de la invención son útiles para un número de aplicaciones terapéuticas como se indicó anteriormente. En general, los métodos terapéuticos para uso de la invención incluyen la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto deseado (o uno o más compuestos tales como 1, 2, 3, o 4 de los mismos) a un mamífero, particularmente un humano. En una cierta realización, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que contienen (a) uno o más compuestos de la invención, y (b) uno o más de otros agentes tales como agentes anti-inflamatorios o antagonistas de complemento como aquellos descritos aquí. Cuando se utiliza con los compuestos de la invención, dichas composiciones y agentes se pueden utilizar individualmente, de forma secuencial, o en combinación con uno o más de dichas composiciones y agentes que incluyen otras terapias que incluyen aquellas aceptadas para la prevención o tratamiento de neuropatías agudas o crónicas.

Se pueden utilizar los compuestos de la presente invención como reactivos de investigación para tratamiento diagnóstico, terapéutico y profilaxis. En la investigación, se puede utilizar el compuesto para inhibir específicamente la síntesis de los genes objetivo en células y animales experimentales facilitando de esta manera el análisis funcional del objetivo o una valoración de su utilidad como objetivo para la intervención terapéutica. En una realización, se pueden utilizar los oligómeros, composiciones de siARN y sisiARN de la invención para detectar y cuantificar el objetivo. La expresión en células y tejidos mediante transferencia de Northem, técnicas de hibridación in situ o técnicas similares. Para el tratamiento terapéutico, un animal o humano, sospechoso de tener una enfermedad o trastorno, que se puede tratar al modular la expresión del objetivo se trata al administrar los compuestos de acuerdo con esta invención.

Regeneración neuronal

Como se ha discutido, la presente invención es útil como un método para tratar, prevenir o reducir los síntomas de un trastorno mediado por la actividad no deseada del sistema de complemento. En una aplicación, el método incluye administrar por lo menos un compuesto de la invención, particularmente por lo menos una composición farmacéutica como se describe aquí a un mamífero (por ejemplo, un primate o mamífero no primate, especialmente un paciente humano) que lo necesita. Por el texto «trastorno mediado por actividad no deseada del sistema de complemento» se entiende un trastorno neuronal manifestado en todo o en parte por una incapacidad o insuficiencia en la regeneración neuronal. Ejemplos de dichos trastornos incluyen aquellos que manifiestan una incapacidad o insuficiencia en la regeneración neuronal después de una lesión aguda o crónica a los nervios en el sistema nervioso periférico (SNP) o el sistema nervioso central. (SNC). Una incapacidad o insuficiencia para regenerar los nervios (o mejorar la función neuronal dañada se puede detectar y cuantificar en algunos casos mediante pruebas conocidas en el campo. Véase, por ejemplo, Ramaglia, V. et al. (2007) *J. Neurosci.* 27: 7663 (que describe, entre otras cosas, los ensayos para detectar y opcionalmente cuantificar la degeneración y regeneración neuronal en ratas); Wolf, SL (2001) *Stroke* 32: 1635 (prueba

de función motora); S. Van Tuijl, et al. (2002) Spinal Cord 40:51 (prueba de función motora); Sheikh, K et al. (1980) Rheumatology 19:83 (prueba de función motora); Chan A.We et al. (2001) J. Neurol. Neurosurg. Psychology (prueba de función sensorial) 55:56; y Mayuko W et al. (2005) J. Jap. Soc. For Surgery of the Hand (2005) 22:842 (pruebas de función sensorial múltiple); y las referencias citadas en las mismas.

Se han descrito métodos para monitorizar una mejora en la regeneración axonal y, generalmente, incluyen diversas pruebas funcionales que se pueden realizar en pacientes humanos. Dichas pruebas generalmente monitorizan la recuperación de la función sensorial y/o motora tal como la Prueba Sensorial Mejorada de Weinstein (WEST), Prueba de Monofilamento de Semmes-Weinstein (SWMT) y otros. Véase WO2008/044928 (PCT/NL2007/050490), Ristic S, et al. (2000) Clin Orthop Relat Res. 370: 138; y las referencias citadas en las mismas para los métodos para detectar y monitorizar la regeneración neuronal y los métodos de clasificación de diversas lesiones neuronales. La dosis apropiada de un compuesto de la invención es una que se puede demostrar promueve la regeneración axonal de acuerdo con estas u otras pruebas aceptables como se describe aquí. «Dosis efectiva», «cantidad terapéutica» o expresiones relacionados significan la cantidad suficiente para lograr un resultado terapéutico deseado de acuerdo con lo determinado por estas u otras pruebas aceptables.

Se pueden utilizar las composiciones de la invención para prevenir, tratar, o reducir síntomas asociados con una lesión nerviosa aguda o crónica. Las afecciones que requieren, regeneración axonal, ya sea agudas o crónicas, se han descrito, por ejemplo, en el documento WO2007/044928 y las referencias citadas en el mismo. Un traumatismo agudo en los nervios periféricos es relativamente común que incluyen traumatismo cerrado o a partir de proyectiles penetrantes, como balas u otros objetos. Las lesiones provocadas por heridas de arma blanca o cuerpos extraños (por ejemplo, vidrio, lámina de metal) que resultan en laceraciones limpias de los nervios son conocidas como lesiones nerviosas derivadas de fracturas óseas y fracturas-luxaciones que incluyen neurapraxia del nervio cubital y lesiones del nervio radial y parálisis. En general, la lesión del nervio aguda a menudo produce un dolor neuropático de larga duración, que se manifiesta como alodinia, una disminución en el umbral del dolor e hiperplasia, y un aumento de la respuesta a estímulos nocivos. Véase Colohan AR, et al. (1996) Injury to the peripheral nerves. In: Feliciano DV, Moore EE, Mattox KL. Trauma. 3rd ed. Stamford, Conn: Appleton & Lange; 1996:853.

Lesiones adicionales de los nervios agudos dentro del alcance de la presente invención incluyen lesión cerebral traumática (TBI) y lesiones agudas de médula espinal y periféricos/sensoriales, lesiones deportivas que involucran diversos traumas nerviosos. Véase también el documento WO2007/044928 y las referencias citadas en el mismo.

En las realizaciones en que se desea promover la regeneración axonal en respuesta a una lesión nerviosa aguda, en general preferiblemente será administrar por lo menos un compuesto de la invención (por ejemplo, uno, dos, o tres de los mismos) tan pronto como sea posible después de la lesión dentro de aproximadamente 24, 12, 6, 3, 2, 1 hora, o menos, preferiblemente dentro de delgadas 5, 10, 20, 30 o 40 minutos después de la lesión. Adicionalmente, por lo menos uno de los compuestos de la invención se puede administrar profilácticamente (como medida de precaución) antes de una intervención médica (por ejemplo, cirugía) asociado con algún riesgo de daño a los nervios. En esta realización de la invención, la regeneración nerviosa mejora favorablemente y acorta los tiempos de recuperación.

Como se menciona, la invención es útil para tratar, prevenir, o reducir los síntomas asociados con la lesión crónica en el sistema nervioso. Ejemplos no limitantes incluyen aquellos que ya descritos en el documento WO2007/044928 que incluyen muchas neuropatías desmielinizantes crónicas (tipo CMT1), enfermedad HMSN (CMT) del tipo, HNPP y otras parálisis por presión, miopatía de Bethlem, distrofia muscular de Miembro-Gelidle, miopatía de Miyoshi, condrodisplasia rizomélica punctata, HMSN-Lom, PXE (pseudoxantomatosis elástica), CCFDN (dismorfia facial de catarata congénita y neuropatía), enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, enfermedad de Charcot-Malie-Tooth, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica (ALS), síndrome de Guillain-Barré (GBS, también conocido como polineuropatía desmielinizante inflamatoria aguda o AIDP), leucodistrofia, enfermedad de Parkinson, enfermedad de motoneurona, neuropatías diabéticas, axonopatías distales tales como las resultantes de una alteración neuronal metabólica o tóxica (por ejemplo, en relación con la diabetes, falla renal, exposición a un fármaco o toxina (por ejemplo, un fármaco contra el cáncer), desnutrición o alcoholismo) , mononeuropatías, radiculopatías (por ejemplo, de los nervios craneales VII; nervio facial), enfermedad de Hansen (lepra), y plexopatías como neulitis braquial; y neuropatías por atrapamiento focal (por ejemplo, síndrome de túnel carpiano).

En aplicaciones en las que el objetivo terapéutico es tratar una lesión de nervio crónica, generalmente se preferirán protocolos de administración a más largo plazo. Así, en una aplicación, por lo menos un compuesto de la invención (por ejemplo, uno, dos, o tres de los mismos) se administrará mediante cualquier ruta aceptable mencionada aquí durante por lo menos 24 horas, preferiblemente durante unos pocos días, semanas o meses hasta unos pocos años cuando sea necesario para tratar o reducir los síntomas asociados con la indicación particular.

Como se menciona, se pueden utilizar los compuestos de la invención solos o en combinación con otros agentes para tratar, prevenir o reducir los síntomas de un trastorno mediado por la actividad no deseada del sistema de complemento. En una aplicación en la que la inflamación acompaña o se sospecha que acompaña el trastorno, el método incluirá la etapa de administrar por lo menos un agente anti-inflamatorio (por ejemplo, 1, 2 o 3 de los mismos) y/o un inhibidor de complemento. Un ejemplo no limitante de un agente antiinflamatorio es un esteroide (por ejemplo, un corticosteroide) o un fármaco antiinflamatorio no esteroide (NSAID). Ejemplos de otros esteroides adecuados incluyen cortisona,

5 hidrocortisona, triamcinolona (kenacort), metilprednisolona (medrol), prednisolona (prelone), prednisona y dexametasona (decadrón). Los NSAID ilustrativos incluyen ácido acetilsalicílico (aspirina, ecotrina), salicilato de colina magnesio (trilisato), inhibidores de COX-2, diclofenaco (voltaren, cataflam, coltaren-XR), diflunisal (dolobid), etodolaco, (lodina), fenoprofeno (nalfon), flurbiprofeno (ansaid), ibuprofeno, indometacina, (indocina, indocina-SR), ketoprofeno, meclofenamato, (meclomen), nabumetona, (relafen), naproxeno (naprosin, naprelan, anaprox, aleve), oxaprozina, (daypro), fenilbutazona, (butazolidina), piroxicam, (feldeno), salsalato, (disalcida, salflex), tolmetina, (tolectina) y valdecoxib, (bextra).

10 En aplicaciones en las que se utiliza una composición de la invención para prevenir, tratar o reducir los síntomas asociados con esclerosis múltiple, la composición se puede utilizar sola o en combinación con uno o más fármacos aprobados, como Rebif® (interferón beta-1a, Serono, Pfizer), Avonex (interferón beta-1a, Biogen-Idec), Betaseron® (interferón beta-1b, Bayer Schering), Copaxone® (acetato de glatirámico, Teva), Novantrone® (mitozantrona, Serono), y Tysabri® (natalizumab, Biogen-Idec). Como se discute en más detalle adelante, se permitirá la co-administración de un compuesto de la invención a un paciente que se va a exponer a menos de un fármaco aprobado en un período de tiempo particular, disminuyendo de ese modo las posibilidades de efectos secundarios indeseables.

Descanso de fármacos

20 Como se ha discutido, es posible prevenir, tratar o reducir la gravedad de los trastornos mencionados aquí al administrar por lo menos un compuesto de la invención. Sin embargo, se ha encontrado que no es necesario exponer a los sujetos al compuesto continuamente para lograr un efecto deseado. Es decir, es posible reducir la administración del compuesto, a veces sustancialmente, durante un período de tiempo denominado aquí como un "descanso de fármacos". Durante el descanso de fármacos, el mRNA complementado sigue siendo bajo (menos de aproximadamente 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, o más en comparación con el control y utilizando qPCR) durante varios días, durante unas pocas semanas, hasta aproximadamente un mes después de administración del compuesto de la invención. Se considera que la cantidad de mRNA de complemento producida en estas condiciones es insuficiente para producir niveles normales de la proteína codificada. La administración de un compuesto de la invención, ya sea solo o en combinación con otro fármaco no es necesaria durante este periodo. Después del descanso de fármacos, se puede reanudar la administración de uno o más compuestos de la invención solos o en combinación con otro fármaco (s).

30 La práctica de este aspecto de la invención proporciona ventajas importantes.

35 Por ejemplo, el uso de la invención puede proporcionar a los pacientes humanos mucho del alivio buscado por los protocolos de tratamiento invasivos, a veces dolorosos y, a menudo repetitivos y costosos. Los efectos secundarios potencialmente serios se pueden reducir, retardar, o en algunos casos eliminar. A modo de ejemplo, se ha reportado el riesgo de desarrollar náuseas, síntomas similares a gripe, reacciones en el lugar de inyección, alopecia, infecciones, neumonía, problemas de menstruación, depresión, colestasis, y/o leucoencefalopatía multifocal progresiva (PNL) en algunos pacientes que reciben medicamentos para tratar esclerosis múltiple. Estos y otros efectos secundarios se pueden reducir o evitar en algunos casos por la práctica de la invención.

40 Adicionalmente, los costes asociados con la dosificación repetida y frecuente de los fármacos se pueden reducir por la invención. A modo de ejemplo, se dice que cada uno de Rebif®, Abones®, Betaseron® y Copaxone® son para ser administrados a pacientes con esclerosis múltiple, una vez o más todas las semanas, usualmente mediante inyección dolorosa. Se considera que la co-administración de un compuesto de la invención resultará en menos fármaco requerido para administración. Alternativa o adicionalmente, se necesitará una dosificación menos frecuente del fármaco. En cualquier caso, se bajan los costes de tratamiento de los pacientes y se aumenta la comodidad del paciente. Se dice que otros fármacos utilizados para tratar esclerosis múltiple se van a administrar a los pacientes cada pocos meses (por ejemplo, Novantrone®, y Tysabri®). Incluso en estas realizaciones, la práctica de la invención puede reducir la cantidad de fármaco requerida, o resulta en una dosificación menos frecuente, proporcionando de esta manera un menor riesgo de efectos secundarios y costes más bajos.

50 Es un objeto adicional de la invención prevenir, tratar, o reducir los síntomas de un trastorno denominado aquí en el que la administración de un compuesto de la invención solo o en combinación con un fármaco conocido se reduce durante el periodo de descanso de fármacos. En una aplicación, la administración del fármaco se elimina por completo durante el Periodo de descanso de fármacos. Después o a veces durante el período de descanso de fármacos, el compuesto de la invención, fármaco conocido (o ambos) se administran de nuevo al mamífero en una cantidad que es sustancialmente el mismo o diferente (por ejemplo, menor) de la cantidad administrada previamente. Esa segunda administración del fármaco puede ser seguida por otro descanso de fármacos si se desea. Por lo tanto, es una característica de la invención proporcionar por lo menos un descanso de fármacos en los que cada descanso de fármaco preferiblemente es seguido por la administración de una cantidad de por lo menos uno de un compuesto de la invención, fármaco conocido (o ambos) para lograr un resultado terapéutico deseado.

60 De esta manera en una aplicación particular, un compuesto de la invención se administra a un paciente humano que sufre de (o se sospecha sufre de) esclerosis múltiple. El compuesto de la invención se puede administrar solo o en combinación con un fármaco para esclerosis múltiple conocido tal como Rebif®, Avonex®, Betaseron®, Copaxone®, Novantrone® o Tysabri® en una cantidad que es terapéuticamente efectiva. Durante el período de descanso de

fármacos, además la administración del compuesto de la invención y/o fármaco para esclerosis múltiple se puede reducir sustancialmente o incluso evitar. El método se puede repetir una vez, dos veces, tres veces, o tan a menudo como sea necesario para proporcionar un régimen terapéutico que cuenta con uno, dos, tres o más descansos de fármacos. Los métodos se pueden repetir según sea necesario, por ejemplo, cada pocos días, cada pocas semanas, cada pocos meses hasta el tiempo de vida del paciente para prevenir, tratar o reducir los síntomas asociados con esclerosis múltiple.

Antes de la inducción de un descanso de fármaco, la cantidad de compuesto de la invención o fármaco conocido es preferiblemente, pero no exclusivamente, uno que es terapéuticamente efectivo. En una realización, la cantidad de compuesto de la invención es generalmente suficiente para reducir la presencia de mRNA de complemento en comparación con un control y como se determina, por ejemplo, mediante pPCR. Para comenzar el descanso de fármacos, la cantidad de compuesto de la invención o fármaco conocido se reduce o elimina por completo. El período de descanso de fármacos no está unido a ningún nivel particular de mRNA de complemento in vivo, siempre y cuando los niveles permanezcan por debajo de un control como se mencionó anteriormente. Después del periodo de descanso de fármacos, se puede someter el mamífero a terapia adicional que incluye administración adicional de por lo menos un compuesto de la invención, ya sea solo o en combinación con el fármaco conocido, tal como aquellos utilizados para tratar esclerosis múltiple como se ha mencionado aquí.

El uso de un protocolo de descanso de fármacos particular estará guiado por parámetros reconocidos tales como salud general del paciente, sexo, gravedad del trastorno, tipo de fármaco conocido que se administra, etc.

La invención adicionalmente es útil en un método para mejorar la regeneración neuronal en un mamífero que comprende administrar al mamífero (terapéutica o profilácticamente) una cantidad de por lo menos uno de los compuestos de la invención suficiente para reducir o inhibir la expresión de C6 en el mamífero y mejorar la regeneración nerviosa allí. Los métodos para evaluar la mejora de la regeneración nerviosa se han descrito aquí que incluyen diversas pruebas para detectar y opcionalmente cuantificar la función neuronal motora y sensorial.

La referencia aquí a una «compuesto de la invención» o una expresión similar o «composición de la invención» expresión similar significa una composición descrita aquí.

Otras realizaciones más específicas están dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo, la invención proporciona un oligómero de acuerdo con la invención, de entre aproximadamente 10 a 50 nucleótidos de longitud que tiene una secuencia de nucleobases contiguas con por lo menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con una región correspondiente de un ácido nucleico que codifica la secuencia de COMPONENTE DE COMPLEMENTO 6 (C6) representada por SEQ ID NO: 1 en la que el oligómero incluye por lo menos un análogo de nucleótido. El oligómero es capaz de reducir el nivel de expresión de ARNm de C6 en un mamífero en por lo menos 20% según se determina mediante un ensayo de qPCR. En una realización, el oligómero incluye adicionalmente por lo menos uno de un enlace de internucleósido modificado y una nucleobase modificada. Se proporcionan ejemplos aquí e incluyen una unidad estructural de azúcar modificado seleccionada del grupo que consiste de unidad estructural de azúcar modificado con 2'-O-metoxietilo, una unidad estructural de azúcar modificado con 2'-metoxi, una unidad estructural de azúcar modificado con 2'-O-alkilo, y una unidad estructural de azúcar modificado bicíclica. Una unidad estructural de azúcar bicíclica normalmente preferida para uso con esta realización es un monómero de LNA. En una realización más particular, el oligómero es un gápmero que comprende 2 o 3 monómeros de LNA en cada uno de los extremos 3' y 5' del oligómero. En un ejemplo, el oligómero incluye adicionalmente uno o más 2'-desoxinucleótidos posicionado entre los segmentos de ala 5' y 3'. Opcionalmente, el gápmero puede incluir un 2'-desoxinucleótido adicional posicionado en el extremo 3', el extremo 5' o ambos los extremos 3' y 5' del oligómero. Un enlace internucleótido modificado normalmente útil para uso con el ejemplo de la invención anterior es un enlace de internucleósido de fosforotioato. La nucleobase modificada puede ser una 5-metilcitosina. Los oligómeros más pequeños a menudo son útiles tal como entre aproximadamente 12 a aproximadamente 20 nucleótidos, más específicamente entre aproximadamente 15 a aproximadamente 18 nucleótidos de longitud, tal como 15, 16, 17, 18, o 19 nucleótidos de longitud.

Los oligómeros normalmente útiles para muchas realizaciones de la invención son aquellos que están dirigidos a aproximadamente los nucleótidos 112-152, 433-473, 546-586, 706-746, 1015-1055; por ejemplo, los sitios objetivo específicos mencionados en las Tablas 1 y 2, a continuación. Como se apreciará, dichos oligómeros pueden poseer menos de 100% de identidad de secuencia con la secuencia representada por la SEQ ID NO: 1 dado que se alcanzan los resultados previstos. De esta manera, en una realización, el oligómero comprende uno, dos, tres, cuatro o cinco emparejamientos erróneos con respecto a la secuencia del Componente de Componente C6 representado por SEQ ID NO: 1. Un oligómero generalmente útil es un oligonucleótido antisentido.

También se proporciona una composición farmacéutica que incluye por lo menos un oligómero como se describe aquí y un diluyente, portador, sal o adyuvante farmacéuticamente aceptable. Para muchas realizaciones de la invención, un oligómero proporcionado como una formulación oralmente aceptable será útil.

La invención es útil en un método para reducir o inhibir la expresión de COMPONENTE DE COMPLEMENTO 6 (C6) en una célula o un tejido in vivo, el método comprende la etapa de poner en contacto dicha célula o tejido con el oligómero

de la reivindicación 1 de tal manera que se reduce o se inhibe la expresión del COMPONENTE DE COMPLEMENTO 6 (C6). El método puede incluir la etapa adicional de medir por lo menos uno del Componente de Complemento 6 (C6) (por ejemplo, mediante métodos de inmunodetección), el mRNA que codifica la proteína (por ejemplo, mediante pPCR) y un complejo de ataque a membrana (MAC, por ejemplo, ensayo CH50) después de la administración del oligómero.

5 La presente invención también es útil para un método de reducción o inhibición de la producción de un complejo de ataque a membrana (MAC) en una célula o un tejido in vivo, el método comprende la etapa de poner en contacto dicha célula o tejido con el oligómero de la reivindicación 1 de tal manera que se reduce o inhibe la expresión del MAC. El método puede incluir la etapa adicional de medir por lo menos uno del Componente de Complemento 6 (C6) (por ejemplo, mediante métodos inmunodetección), el mRNA que codifica la proteína, (por ejemplo, mediante pPCR) y un complejo de ataque a membrana (MAC, por ejemplo, ensayo CH50) después de administración del oligómero.

15 La invención también es útil en un método para tratar, prevenir o reducir los síntomas de un trastorno mediado por actividad no deseada del sistema de complemento. Preferiblemente, el método incluye la administración de por lo menos una de las composiciones farmacéuticas descritas aquí en un mamífero en necesidad del mismo. En una realización, el trastorno es una neuropatía desmielinizante crónica como esclerosis múltiple (por ejemplo, del tipo RRMS). El método es flexible y se puede utilizar de tal manera que la composición farmacéutica incluye uno o más compuestos de la invención. Alternativamente, la composición farmacéutica puede incluir adicionalmente un fármaco conocido tal como por lo menos uno de Rebif® (interferón beta-1a), Avonex® (interferón beta-1a), Betaseron® (interferón beta-1b), Copaxone® (acetato de glatiramer), Novantrone® (mitoxantrona), y Tysabri® (natalizumab) (todos para tratamiento de esclerosis múltiple).

25 La invención también es útil en un método para tratar, prevenir o reducir los síntomas de un trastorno mediado por la actividad no deseada del sistema de complemento. Preferiblemente, el método incluye administrar por lo menos una de las composiciones farmacéuticas descritas aquí a un mamífero en necesidad del mismo y que incluye adicionalmente la administración de uno o más de un agente anti-inflamatorio y un inhibidor del complemento.

30 Un trastorno particular para el que los métodos de la invención son útiles es trauma neuronal que puede ser agudo o crónico. Un ejemplo de trauma neuronal agudo es lesión cerebral traumática (TBI).

Además se proporciona el uso de por lo menos una de las composiciones de la invención (por ejemplo, 1, 2 o 3) para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una afección que requiere regeneración axonal

35 Se proporciona adicionalmente el uso de por lo menos una de las composiciones de la invención (por ejemplo, 1, 2 o 3) para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una afección desmielinizante crónica tal como esclerosis múltiple

40 Los siguientes ejemplos se proporcionan con solo propósito de ilustración con el fin de que la presente invención se puede entender más completamente. Estos ejemplos no pretenden limitar en modo alguno el alcance de la invención a menos que se indique específicamente lo contrario.

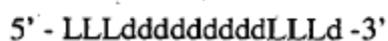
Ejemplo 1: Inhibidores antisentido de la síntesis de complemento en el hígado

45 Se expresa principalmente el componente de complemento C6 en el hígado y se secreta de este órgano a la circulación. La atenuación de la expresión hepática de C6 sustancialmente reducirá la capacidad de formar complejos de MAC reduciendo de esta manera la eficacia del sistema de complemento. Muchos estudios han confirmado que los oligonucleótidos antisentido administrados sistémicamente son eficaces en el hígado.

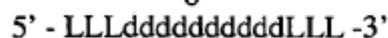
Oligonucleótidos antisentido

50 Se diseñaron oligómeros antisentido contra el componente del complemento C6 contra las secuencias con la alta homología entre roedores y humanos (Véase Tablas 5A-5F. 3A-3F). Los oligonucleótidos antisentido (15-18 meros) se modificaron químicamente con Ácidos Nucleicos Bloqueados (LNA). El LNA protege el oligo contra la nucleasa y aumenta la afinidad (T_m) para las secuencias de mRNA complementarias lo que permite el uso de oligonucleótidos cortos 15-18 mer con alta eficacia. Los oligómeros cortos de 18 nucleótidos son menos propensos a activar las respuestas inmunitarias innatas en comparación con oligómeros más largos. El oligonucleótido se diseña como un gámpero. Esto significa que las tres últimas posiciones en el extremo 5' y las 3 penúltimas posiciones en el extremo 3' del oligo contienen unidades estructurales de LNA mientras que el centro y la última posición 3' consiste de análogos de ADN. Un ejemplo de un diseño de gámpero típico se indica adelante:

L=LNA, d=DNA



o



60

en el que L = LNA y d = ADN. El oligo completo está fosfotiolado para reducir la depuración renal y aumentar el tiempo de circulación in vivo. Todos los residuos C se convirtieron a metilo-C para reducir la estimulación inmunitaria.

5 La Tabla 1, adelante, muestra la estructura de los oligonucleótidos antisentido modificados con LNA hechos contra C6 de ratón (la secuencia objetivo y la secuencia oligo es de ratón). (texto en mayúscula en negrilla = LNA texto en minúscula = ADN):

Oligómero	SEQ ID NO:	Oligómero modificado con LNA	SEQ ID NO:
Posición objetivo 132 GAGCAGACAGAGACAA	404	Oligo5'3' T T G t c t c t g t c t g C T C Tanda No. 1008	405
Posición objetivo 453 TATTCCCAGCAAGTTA	406	Oligo5'3' T A A c t t g c t g g g a A T A Tanda No. 1009	407
Posición objetivo 566 GTGTGCAGCTGATGGG	408	Oligo5'3' C C C a t c a g c t g c a C A C Tanda No. 1010	409
Posición objetivo 726 GGTACAACTATAGAA	410	Oligo5'3' T T C t a t a g t t t g t A C C Tanda No. 1011	411
Posición objetivo 1035 GCCTTTAGAATACAAC	412	Oligo5'3' G T T g t a t t c t a a a G G C Tanda No. 1012	413

Tabla 1

10

Todos los oligómeros modificados de LNA que se muestran en la Tabla 1 fueron totalmente fosforotiolados.

15

Todos los oligómeros (de ODN) se sintetizaron utilizando el método de fosforamidita en un Oligopilot AKTA (GE Healthcare) a escalas de 130-185 µmol utilizando un soporte de cebador de poliestireno. El ODN se purificó mediante intercambio iónico (IEX) y desaló, utilizando una membrana Millipore. Los ODN se caracterizaron por LC/MS (Agilent). La masa molecular de los ODN se verificó mediante espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo y desorción mediante láser asistida por matriz (MALDI-TOF) en un Biflex, III MALDI (instrumentos Brucker, Leipzig, Alemania)

Objetivo oligo		Inicio oligo					
tanda		Seq ID	ATG relativo			seq ID	
GAGCAGACAGAGACAA	ratón	404	132	T T G t c t c t g t c t g C T C	405	1008	
GAGCAGACAGACAAATA	humano	414		T T G t c t g t g t c t g C T C	415		
TATTCACAGCAAGTTA		408	453	T A A c t t g c t g g g a A T A	409	1009	
CTGCATTGCCAGAAAGTTA		416		T A A c t t t c t g g c a A T G	417		
GTGTGCAGCTGATGGG		412	566	C C C a t c a g c t g c a C A C	413	1010	
GTGTACAGTTGATGGGCAA		418		C C C a t c a a c t g t a C A C	419		
GGTACAAACTATAGAA		416	726	T T C t a t a g t t t g t A C C	417	1011	
GGTACAAACTGCAGAAGAT		420		T T C t g c a g t t t g t A C C	421		
GCCITTAGAATACAAC		420	1035	G T T g t a t t c t a a a G G C	421	1012	
CATCTGCCICTAGAACTACTCG		422		G T T g t a t t c t a g a G G C	423		

Tabla 2

5 La Tabla 2 muestra los oligómeros de ratón mostrados en la Tabla 1 junto con oligómeros humanos correspondientes preferidos sin monómeros de LNA (SEQ ID Nos: 414, 416, 418, 420, y 422) o con monómeros de LNA (SEQ ID Nos. 415, 417, 419, 421, y 423). Para los oligómeros con sustituciones de LNA, los monómeros de LNA se muestran en texto en mayúsculas en negrita, mientras que se muestra el ADN en minúscula sin negrilla.

10 Ensayo de eficacia de oligo in vivo

Debido a que las estirpes celulares de los cultivos no expresan (o sólo a un nivel muy bajo) proteínas del complemento, la eficacia de los oligonucleótidos se puede probar directamente in vivo. El objetivo del primer cribado fue identificar de la lista de diseños rupo iniciales un gde potencial de oligo con eficacia in vivo. Se inyectaron ratones de cepa NMRI de ocho a diez semanas de edad (Charles River, Países Bajos) (IP por vía intraperitoneal o por vía intravenosa (IV)) una vez al día con 5mg/kg de oligo disuelto en PBS. Como control se proporcionaron inyecciones de PBS sólo en el primer cribado. Para cada tratamiento se utilizaron cinco ratones por grupo. Después de tres días de tratamiento los ratones se sacrificaron el día cuatro. Se tomaron muestras de hígado y se utilizaron para determinar los niveles de atenuación de los componentes de proteínas utilizando transferencia de Western para detección de los niveles de proteína y qPCR cuantitativo para los niveles de mRNA.

20 La inmunotransferencia de Westeen se puede hacer después de electroforesis en acrilamida de desnaturalización bajo condiciones estándar utilizando el sistema de mini-proteico (Biorad). Las proteínas de complemento se detectan utilizando anticuerpos monoclonales y policlonales específicos disponibles. La inmunodetección de proteínas se realiza mediante el equipo de quicio-luminiscencia de Lumi-Light mejorado (Roche) y el sistema de formación de imagen darkbox LAS-3000 (Fujifilm, Tokio, Japón). El qPCR se realizó utilizando sondas universales (Roche) sobre el sistema Lightcycler 480 (Roche).

30 Después de selección de candidatos líderes potenciales, se pueden diseñar versiones de emparejamiento erróneo específicas (un mínimo de 3 emparejamientos erróneos) como el control.

35 La administración prolongada de oligonucleótidos (> 4 días) se realizó utilizando minibombas osmóticas (Alzet, Durect Co., Cupertino, CA, EE.UU.). Estas bombas se implantan dorsalmente de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las minibombas osmóticas se incuban en PBS 20 horas a 37° C antes de implante para poner en marcha la bomba, con el fin de llegar rápidamente a una velocidad de suministro constante después de implante. El uso de estas bombas reduce la presión en los animales en experimentos prolongados ya que no se requiere realizar inyecciones diarias. Las pruebas in vitro muestran que las minibombas Alzet alcanzan una velocidad de bombeo constante dentro de las 24 horas. Las minibombas osmóticas se llenaron con muestras oligonucleótidos disueltos en PBS.

40 Cribado de toxicología Mini

Se toman muestras de sangre para medir los niveles en suero de aspartato aminotransferasa (ASAT) y alanina aminotransferasa (ALAT). Los niveles ASAT y ALAT en suero se determinan utilizando los procedimientos de diagnóstico estándar, con el H747 (Hitachi/Roche) con los equiós apropiados (Roche Diagnostics). Se monitoriza el peso corporal y la temperatura corporal de los ratones se mide diariamente para cada ratón utilizando chips de transpondedor IPTT- 200 y un lector de chip de DAS 5002 (Biomedic Data Systems, Seaford, Delaware, EE.UU.).

Ejemplo 2: Niveles de mARN de complemento in vivo después de 3 días de tratamiento con oligonucleótidos

Los oligonucleótidos de LNA mostrados en la Tabla 1, anterior, se utilizaron para reducir los niveles de mARN de C6 en ratones nu/nu NMRI. Se utilizaron cuatro animales por grupo de tratamiento que incluye un ratón control con PBS (15 ratones en total). Los ratones recibieron inyecciones IP de cada oligo en los días 1, 2 y 3 (animal 5mg/kg). Los ratones se sacrificaron en el día 4 y se extirparon los hígados. Se preparó ARN utilizando los métodos convencionales. Se cuantificó el mARN de C6 utilizando qPCR con el LightCycler 480 de Roche y sondas universales de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

La Figura 1 muestra los niveles de ARNm de complemento in vivo después de 3 días de tratamiento con los oligonucleótidos de LNA antisentido de complemento. Los oligo 1008 (SEQ ID NO: 405) eran tóxicos ya que dos animales murieron el día 3 y un animal apareció enfermo en el día 4.

Ejemplo 3: Ensayo CH50 en ratones Balb/C

Se diseñaron oligómeros antisentido contra componentes del complemento contra secuencias con alta homología entre roedores y humanos. Los oligonucleótidos antisentido se modificaron químicamente con Ácidos Nucleicos Bloqueados (LNA). El LNA protege el oligo contra la nucleasa y aumenta la afinidad (T_m) para las secuencias de ARNm complementarias. Los oligonucleótidos se diseñaron como gámpmeros. Esto significa que las tres últimas posiciones en el extremo 5' y las 3 penúltimas posiciones en el extremo 3' del oligo contienen unidades estructurales de LNA mientras que el centro y la última posición del extremo 3' se componen de análogos de ADN.

Todos los oligonucleótidos antisentido (ODNs) se sintetizaron como todos los derivados de fosforotioato en un sintetizador automático de ADN utilizando ADN comercial y fosforamiditas de LNA (Exiqon A/S, Dinamarca). En todos los ODN se utilizó 5-metil-C. Los DMT-ON ODN se purificaron mediante HPLC de fase inversa (RP-HPLC) (> 95% de pureza). Después de la eliminación del grupo DMT, los ODN se caracterizaron por AE-HPLC, y la masa molecular esperada se confirmó mediante ESI-MS y espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo y desorción mediante láser asistida por matriz (MALDI-TOF) en un Biflex III MALDI (Brucker instruments, Leipzig, Alemania).

Ratones. Todos los experimentos que involucraron animales fueron sancionados por el comité de ética local y están en cumplimiento de la ley en los Países Bajos. A ratones hembra Balb/C de de 7-8 semanas de edad (Harlan) se les dio oligonucleótidos utilizando minibombas osmóticas ALZET 1002 (Durect Corporation, Cupertino, CA, EE.UU.) implantadas subcutáneamente. Se disolvieron ODNs y siARN en PBS. Las dosificaciones como se indica en las figuras.

Ensayo hemolítico CH50. Se utilizó ensayo hemolítico CH50 para determinar el efecto de la atenuación del complemento en el hígado sobre la actividad del complejo de ataque a membrana (MAC) en la circulación. Este ensayo mide la actividad hemolítica del MAC en el suero. Se agregan eritrocitos sensibilizados al suero de los ratones y se puede medir la actividad de MAC como la cantidad de lisis de eritrocitos utilizando un espectrofotómetro. Se extrajo la sangre de los ratones y se coaguló en hielo durante 1 hr. Luego, el suero se aisló en alícuotas en muestras de 20 ul y se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido. El ensayo de CH50 se llevó a cabo utilizando eritrocitos de conejo sensibilizados utilizando un antisuero policlonal de eritrocito anti conejo de ratón (Paul Morgan, Universidad de Cardiff). Los eritrocitos de conejo tenían por lo menos 1 mes de edad (pero no más de 3 meses) antes de uso ya que esto aumenta la sensibilidad del ensayo. Los eritrocitos de conejo sensibilizados (50 ul) se incuban en solución salina regulada con Veronal (40 ul) en presencia de 10 ul de suero de ratón a 37° C. Para obtener un valor de lisis del 100% se agrega 100 ul de agua. Después de 30-60 minutos los eritrocitos restantes se centrifugaron y la OD405 nm se mide utilizando un espectrofotómetro.

La Figura 2 muestra que el oligo 1009 (SEQ ID. NO 409), Oligo 1010 (SEQ ID NO. 413), Oligo 1014 (aplicación C8a, SEQ ID NO. 327), Oligo 1018 (aplicación C8b, SEQ ID, NO. 336), Oligo 1019 (aplicación C8b, SEQ ID NO. 338) mostraron capacidad para inhibir la formación de MAC en relación con los dos controles. Todos los oligonucleótidos muestran una atenuación de su objetivo destinado en el hígado durante para lo menos 70%, según se mide con qPCR. Dosificaciones de 5 mg/kg/día durante dos semanas. El oligo 1614 es un control de oligonucleótido mezclado sin actividad en los niveles de complemento. La actividad de MAC se midió utilizando un ensayo hemolítico CH50 descrito anteriormente. Los datos se representan como la media de 5 ratones por grupo \pm SEM

Ejemplo 4: La construcción de siARN reduce el mARN de C6

Los procedimientos descritos anteriormente se utilizaron para hacer el oligo 1010 (SEQ ID N° 413). Se inyectaron desde 0.5 mg/kg hasta 5 mg/kg en ratones como se describió anteriormente. Se utilizó qPCR para medir la expresión de C6 como sigue: Los animales se sacrificaron y se tomaron muestras de hígado utilizando el último ARN (Ambion) como

5 solución de almacenamiento. Los hígados se homogeneizaron en trizol utilizando Magnalyzer y gránulos de magnalyzer (Roche) el ARN se aisló utilizando Trizol de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen). El cADNse elaboró utilizando el cebador oligodT y la enzima SuperScriptII (Invitrogen). Se realizó el qPCR se utilizando cebadores de sonda Universal (Roche) y un Lightcycler 480 (Roche). Todos los datos se corrigieron utilizando Hprt1 (hipoxantina guanina fosforribosil transferasa 1) como el gen constitutivo/control de carga. Todas las reacciones se hicieron por triplicado las condiciones para el qPCR fueron como el estándar recomendado por el fabricante (Roche). Adicionalmente, se hicieron los homólogos de siARN modificados con LNA para la secuencia dirigida por el oligo Oligo 1010 antisentido (SEQ ID N° 413).

10 También se diseñó homólogo de siARN modificado con LNA para secuencia dirigida por el oligo Oligo 1010 antisentido (SEQ ID N° 413). Este siARN tiene modificaciones de LNA sobre las salientes 3' de ambas cadenas y un LNA en el extremo 5' de la cadena en sentido (clonada).

15 El siARN modificado con LNA se sintetizó en un ciclo de síntesis de ARN del sintetizador ADN/ARN automatizado (escala de 1-5 μ mol). Se utilizaron fosforamiditas de ARN protegidas con O2'-TBDMS y reactivos comunes y el rendimiento de acoplamiento por etapas de todos los monómeros fue > 99% Para la incorporación de los nucleótidos modificados, se utilizó un tiempo de acoplamiento de 10 min Luego de desprotección estándar, purificación y tratamiento, se confirmó la composición y pureza (> 80%) del siARN resultante mediante análisis de MALDI-MS y HPLC de intercambio iónico.

20 La Figura, 3 muestra que existe una correlación lineal entre la cantidad de Oligo 1010 administrado a ratones Balb/C y el nivel corregido del mRNA de C6. La Figura también muestra que la construcción de siARN redujo el mRNA de C6 en relación con el control. En particular, el Oligo 1010 tuvo un efecto sobre la expresión de mRNA de C6 según se mide con qPCR en el hígado de ratones Balb/C in vivo en comparación con el efecto del tratamiento con la secuencia de siARN homóloga modificado con LNA. Los datos se representan como la media de 5 ratones por grupo \pm SEM.

Ejemplo 5: Ensayo de aplastamiento de nervio

30 El ensayo de aplastamiento de nervio mide el efecto de la inhibición del complemento sobre la recuperación de los nervios periféricos después de lesión por aplastamiento. El ensayo generalmente se describe por Ramaglia, V. et al. (2007) Jul. 18: 27 (29) 7663 y las referencias descritas en el mismo. En resumen, los animales fueron tratados durante 14 días con oligonucleótidos antisentido o PBS como control después de que recibieron una lesión de aplastamiento de nervio. Todos los procedimientos quirúrgicos se realizaron asépticamente bajo una anestesia con isoflurano profunda (1.5 v/l de isoflurano y 1.0 v/l de O₂) el nervio ciático izquierdo se expuso a través de una incisión en la parte superior del muslo. El nervio se aplastó durante periodos de 3 x 10 s a nivel de la escotadura ciática utilizando pinzas lisas. La pata derecha sirvió como control; se realizó cirugía simulada que expuso el nervio, pero no lo alteró. El músculo y la piel luego se cerraron con puntos de sutura. Los ratones estaban bajo analgesia durante los periodos de recuperación post-operatoria. Fueron tratados con una dosis (0.05 mg/kg) de buprenorfina (Temgesic®, Schering-Plough, Países Bajos) justo antes de la lesión y una segunda dosis de analgésico en el día 1 posterior a lesión. La función sensorial se midió utilizando una prueba de Footlick. En esta prueba se proporciona una corriente eléctrica variable (0.1 a 0.5 mA) a la planta del pie utilizando dos electrodos de estimulación. Una respuesta positiva se clasificó positiva si el animal retraía su pata. Se registró la cantidad de corriente mínima (mA) necesaria para provoca una respuesta de retracción. Los valores se expresan como el porcentaje de la función normal (pata derecha de control). Utilizando este ensayo, por lo menos un oligómero de la invención mostró una actividad significativa en la prueba de Footlick. En particular, los ratones que recibieron el oligómero en un portador adecuado mostraron una recuperación del 50% en el ensayo de Footlick en aproximadamente días 7. Los animales no tratados mostraron la misma recuperación alrededor del día 11.

50 Las descripciones de todas las referencias mencionadas aquí (incluyendo todas las patentes y documentos científicos) se incorporan aquí mediante referencia. La invención se ha descrito en detalle con referencia a las realizaciones preferidas de la misma. Sin embargo, se apreciará por aquellos expertos en la técnica, luego de consideración de esta descripción, que se pueden hacer modificaciones y mejoras dentro del espíritu y alcance de la invención.

Tabla 3: Secuencia de ácidos nucleicos que codifica el mRNA de componente del complemento 6 (C6) de humano (SEQ ID NO: 1). Se indica el sitio de inicio ATG. (Genbank Ref.NM_000065.2)

SEQ ID No: 1

AACATTTATTTTGACAACCCCTCTAGGIGTTGCTAGGCTTCTGGGATATGACAGCATTGCCTTGTGTTAGC
 TAGCAATAAGAAAAGAAGCTTTGTTTGGATTAACATATATACCCTCTTCATTCTGCATACCTATTTTTTC
 CCCAATAATTTGCAGCTTAGGTCCGAGGACACCACAACTCTGCTTAAAGGGCCTGGAGGCTCTCAAGGC
ATGGCCAGACGCCTCTGCTTGTACTTCACTCTGCTGAATGCTCTGATCAACAAGGGCCAAGCCTGCTTCT
 GTGATCACTATGCATGGACTCAGTGGACCAGCTGCTCAAAAACCTTGCAATTCTGGAACCCAGAGCAGACA
 CAGACAAATAGTAGTAGATAAGTACTACCAGGAAAACTTTTGTGAACAGATTTGCAGCAAGCAGGAGACT
 AGAGAATGTAACGGCAAAGATGCCCATCAACTGCCTCCTGGGAGATTTTGGACCATGGTCAGACTGTG
 ACCCTTGTATTGAAAAACAGICTAAAAGTTAGATCTGTCTTTCGCTCCAGTCAGTTTGGGGGACAGCCATG
 CACTGCGCCTCTGGTAGCCTTTCAACCATGCATTCCATCTAAGCTCTGCAAAATTGAAGAGGCTGACTGC
 AAGAATAAATTTGCTGTGACAGTGGCCGCTGCATTGCCAGAAAGTTAGAATGCAATGGAGAAAATGACT
 GTGGAGACAATTCAGATGAAAGGGACIGTGGGAGGACAAAGGCAGTATGCACACGGAAGTATAATCCCAT
 CCTAGTGTACAGTTGATGGGCAATGGGTTTTCATTTTTCTGGCAGGAGAGCCAGAGGAGAAGTCCTTGTAT
 AACTCTTTCACITGGAGGAATATGTAAAACCTGTCAAAAGCAGTAGGACAAGTAATCCATACCCTGTTCCGG
 CCAATCTGGAAAATGTCGGCTTTGAGGTACAACTGCAGAAGATGACTTGA AACAGATTTCTACAAGGA
 TTTAACTTCTCTTGGACACAATGAAAATCAACAAGGCTCAT TCTCAAGTCAGGGGGGAGCTCTTTCAGT
 GTACCAATTTTTTATTCTCAAAGAGAAGTGA AAAATATCAACCATAAT TCTGCCTTCAAACAAGCCATT
 AAGCCTCTCACAAAAAGGATTCTAGTTTTATTAGGATCCATAAAGTATGAAAGTCTTAAACTTCACAAC
 GAAAGCTAAAGATCTGCACCTTTCTGATGTCTTTTTGAAAGCACTTAACCATCTGCCTCTAGAATACAAC
 TCTGCTTTGTACAGCCGAATATTCGATGACTTTGGGACTCA TTACTTCACTCTGCTCCCTGGGAGGCG
 TGTATGACCTTCTCTATCAGTTTAGCAGTGAGGAAC TAAAGAACTCAGGTTTAACCGAGGAAGAAGCCAA
 ACACGTGTGCAGGATTGAAACAAAGAAACGCGTTTTATTGCTAAGAAAACAAAAGTGGAAACATAGGTGC
 ACCACCAACAAGCTGTCAGAGAAACATGAAGGTTCA TTTATACAGGGAGCAGAGAAATCCATATCCCTGA
 TTCGAGGTGGAAGGAGTGAATATGGAGCAGCTTTGGCATGGGAGAAAGGGAGCTCTGGTCTGGAGGAGAA
 GACATTTCTGAGTGGTTAGAATCAGTGAAGGAAAATCCTGCTGTGATTGACTTTGAGCTTGCCCCATC
 GTGGACTTGGTAAGAAACATCCCTGTGCAGTGACAAAACGGAACAACCTCAGGAAAGCTTTGCAAGAGT
 ATGCAGCCAAGTTCGATCCTTGCCAGTGTGCTCCATGCCCTAATAATGGCCGACCCACCCTCTCAGGGAC
 TGAATGTCGTGTGTGTGTGCAGAGTGGCACCTATGGTGAGAACTGTGAGAAACAGTCTCCAGATTATAAA
 TCCAATGCAGTAGACGGACAGTGGGGTTGTTGGTCTTCTGGAGTACCTGTGATGCTACTTATAAGAGAT
 CGAGAACCCGAGAAATGCAATAATCCTGCCCCCAACGAGGAGGGAAACGCTGTGAGGGGGAGAAGCGACA
 AGAGGAAGACTGCACATTTCAATCATGGAAAACAATGGACAACCATGTATCAATGATGATGAAGAAATG
 AAAGAGGTCGATCTTCTGAGATAGAAGCAGATTCCGGGTGTCCTCAGCCAGTTTCTCCAGAAAATGGAT
 TTATCCGGAATGAAAAGCAACTATACTTGGTTGGAGAAGATGTTGAAATTTTCATGCCTTACTGGCTTTGA
 AACTGTTGGATAACCACTTACAGATGCTTACCAGACGGGACCTGGAGACAAGGGGATGTGGAATGCCAA
 CGGACGGAGTGCATCAAGCCAGTTGTGTCAGGAAGTCTGACAATTACACCATTTTCAGAGATTGTATAGAA
 TTGGTGAATCCATTGAGCTAACTTGCCCCAAAGGCTTTGTTGTTGCTGGCCATCAAGGTACACATGCCA
 GGGGAATTCCTGGACACCACCCATTTCAAACCTCTCTCACCTGTGAAAAAGATACTCTAACAAAATTA AAA

GGCCATTGTCAGCTGGGACAGAAA CAATCAGGATCTGAATGCATTTGTATGTCTCCAGAAGAAGACTGTA
GCCATCAITCAGAAGATCTCTGTGTGTTTGACACAGACTCCAACGATTACTTTACTTCACCCCGCTTGTA
GTTTTGGCTGAGAAATGTTTAAATAATCAGCAACTCCATTTTCTACATATTGGTTCCTGCCAAGACGGC
CGCCAGTTAGAATGGGGTCTTGAAAGGACAAGACTTTCATCCAACAGCACAAAAGAAAGAAATCCTGTGGCT
ATGACACCTGCTATGACTGGGAAAAATGTTTCAGCCTCCACTTCCAAATGTGTCTGCCTATTGCCCCACA
GTGCTTCAAGGGTGGAAACCAACTCTACTGTGTCAAAATGGGATCATCAACAAGTGAGAAAACATTGAAC
ATCTGTGAAGTGGGA ACTATAAGATGTGCAAACAGGAAGATGGAAATACTGCATCCTGGAAAAGTGTITGG
CCTAGCACAATTACTGCTAGGCC CAGCACAATGAACAGATTTACCATCCCGAAGAACCAACTCCTACAAA
TGAGAATTCCTTGACAAAACAGCAGACTGGCATGCTCAAAGTTACTGACAAAAATTATTTCTGTITAGTT
GAGATCAITTAITCTCCCTGACTCTCCTGTTTGGGCAITGCTTATTCAGTTCAGCTCATGACGCCCTGT
AGCATACCCC TAGGTACCAACTTCCACAGCAGTCTCGTAAATTCCTGTTTACATTTGTACAAAAATAAT
GTGACTTCTGAGGCCCTTATGTAGCCTGTGACATTAAGCATTCTCGCAATTAGAAATAAGAATAAAACCC
ATAATTTCTTCAATGAGTTAATAAACAGAAATCTCCAGAACCTCTGAAACACATTCITGAAAGCCCAGCT
TTCATATCTTCAITCAACAAATAATTTCTGAGTGTGTATACAGGATGTCAAGTACTGACCAAAGTCTGA
GAACTCGGCAGATAATAAAACAGACAAAAGCCTTTGCCTTCATGAAGCATAACATTCATTTCAGGGGTAGAC
ACACAAAAAATGAAATAAACAGGTAAAATATGTAGC

ES 2 566 008 T3

Tabla 4A Oligonucleótidos C6 seleccionados, SEQ ID Nos.: 2-67

1030 CATCTGCCTCTAGAATACTCTG SEQ ID NO:2

Secuencia de ADN	SEQ ID NO:	Secuencia de ARN	SEQ ID NO:	Complemento Inverso	SEQ ID NO:
ATCTGCCTCTAGAATACTCTG	3	AUCUGCCUCUAGAAUACAA	10	UUGUAUUCUAGAGGCAGAU	17
CATCTGCCTCTAGAATACTCTG	4	CAUCUGCCUCUAGAAUACA	11	UGUAUUCUAGAGGCAGAU	18
CTGCCTCTAGAATACTCTG	5	CUGCCUCUAGAAUACAACU	12	AGUUGUAUUCUAGAGGCAG	19
GCCTCTAGAATACTCTG	6	GCCUCUAGAAUACAACUCU	13	AGAGUUGUAUUCUAGAGGC	20
TCTGCCTCTAGAATACTCTG	7	UCUGCCUCUAGAAUACAAC	14	GUUGUAUUCUAGAGGCAGA	21
TGCCTCTAGAATACTCTG	8	UGCCUCUAGAAUACAACUC	15	GAGUUGUAUUCUAGAGGCA	22
CCTCTAGAATACTCTG	9	CCUCUAGAAUACAACUCUG	16	CAGAGUUGUAUUCUAGAGG	23

1112 TGGGAGGCGGTATGACCTTCTCTA SEQ ID NO: 24

Secuencia de ADN	SEQ ID NO:	Secuencia de ARN	SEQ ID NO:	Complemento Inverso	SEQ ID NO:
GCGTGTATGACCTTCTCTA	25	GCGUGUAUGACCUUCUCUA	32	UAGAGAAGGUCAUACACGC	39
GAGGCGTGTATGACCTTCTCTA	26	GAGGCGUGUAUGACCUUCU	33	AGAAGGUCAUACACGCCUC	40
AGGCGTGTATGACCTTCTCTA	27	AGGCGUGUAUGACCUUCUC	34	AGAAGGUCAUACACGCCUC	41
GGCGTGTATGACCTTCTCTA	28	GGCGUGUAUGACCUUCUCU	35	AGAGAAGGUCAUACACGCC	42
TGGGAGGCGGTATGACCTTCTCTA	29	UGGAGGCGUGUAUGACCU	36	AGGUCAUACACGCCUCCCA	43
GGGAGGCGGTATGACCTTCTCTA	30	GGGAGGCGUGUAUGACCUU	37	AAGGUCAUACACGCCUCCC	44
GGAGGCGGTATGACCTTCTCTA	31	GGAGGCGUGUAUGACCUUC	38	GAAGGUCAUACACGCCUCC	45

1115 GAGGCGTGTATGACCTTCTCTATCA SEQ ID NO: 46

Secuencia de ADN	SEQ ID NO:	Secuencia de ARN	SEQ ID NO:	Complemento Inverso	SEQ ID NO:
TGTATGACCTTCTCTATCA	47	UGUAUGACCUUCUCUAUCA	54	UGAUAGAGAAGGUCAUACA	61
GCGTGTATGACCTTCTCTA	48	GCGUGUAUGACCUUCUCUA	55	UAGAGAAGGUCAUACACGC	62
CGTGTATGACCTTCTCTAT	49	CGUGUAUGACCUUCUCUAU	56	AUAGAGAAGGUCAUACACG	63
GAGGCGTGTATGACCTTCTCTA	50	GAGGCGUGUAUGACCUUCU	57	AGAAGGUCAUACACGCCUC	64
AGGCGTGTATGACCTTCTCTA	51	AGGCGUGUAUGACCUUCUC	58	GAGAAGGUCAUACACGCCU	65
GGCGTGTATGACCTTCTCTA	52	GGCGUGUAUGACCUUCUCU	59	AGAGAAGGUCAUACACGCC	66
GTGTATGACCTTCTCTATC	53	GUGUAUGACCUUCUCUAUC	60	GAUAGAGAAGGUCAUACAC	67

Tabla 4B Oligonucleótidos C6 seleccionados, SEQ ID Nos.: 68-133

1186 GCCAAACACTGTGTCAGGATTGAAA (SEQ ID NO: 68)

Secuencia de ADN	SEQ ID NO:	Secuencia de ARN	SEQ ID NO:	Complemento Inverso	SEQ ID NO:
CAAACACTGTGTCAGGATT	69	CAAACACUGUGUCAGGAUU	76	AAUCCUGACACAGUGUUUG	83
AACACTGTGTCAGGATTGA	70	AACACUGUGUCAGGAUUGA	77	UCAUCCUGACACAGUGUU	84
ACACTGTGTCAGGATTGAA	71	ACACUGUGUCAGGAUUGAA	78	UUCAAUCCUGACACAGUGU	85
CACGTGTCAGGATTGAAA	72	CACUGUGUCAGGAUUGAAA	79	UUUCAUCCUGACACAGUG	86
CCAAACACTGTGTCAGGAT	73	CCAAACACUGUGUCAGGAU	80	AUCCUGACACAGUGUUUGG	87
GCCAAACACTGTGTCAGGA	74	GCCAAACACUGUGUCAGGA	81	UCCUGACACAGUGUUUGGC	88
AAACACTGTGTCAGGATTG	75	AAACACUGUGUCAGGAUUG	82	CAAUCCUGACACAGUGUUU	89

1259 GCACCACCAACAGCTGTCAGAGAA (SEQ ID NO: 90)

Secuencia de ADN	SEQ ID NO:	Secuencia de ARN	SEQ ID NO:	Complemento Inverso	SEQ ID NO:
CCAACAAGCTGTCAGAGAA	91	CCAACAAGCUGUCAGAGAA	98	UUCUCUGACAGCUUGUUGG	105
CCACCAACAAGCTGTCAGA	92	CCACCAACAAGCUGUCAGA	99	UCUGACAGCUUGUUGGUGG	106
ACCAACAAGCTGTCAGAGA	93	ACCAACAAGCUGUCAGAGA	100	UCUCUGACAGCUUGUUGGU	107
CACCACCAACAAGCTGTCA	94	CACCACCAACAAGCUGUCA	101	UGACAGCUUGUUGGUGUG	108
ACCACCAACAAGCTGTCAG	95	ACCACCAACAAGCUGUCAG	102	CUGACAGCUUGUUGGUGGU	109
GCACCACCAACAAGCTGTC	96	GCACCACCAACAAGCUGUC	103	GACAGCUUGUUGGUGGUGC	110
CACCAACAAGCTGTCAGAG	97	CACCAACAAGCUGUCAGAG	104	CUCUGACAGCUUGUUGGUG	111

2325 GGGACAGAAAACAATCAGGATCTGAA (SEQ ID NO: 112)

Secuencia de ADN	SEQ ID NO:	Secuencia de ARN	SEQ ID NO:	Complemento Inverso	SEQ ID NO:
GAAACAATCAGGATCTGAA	113	GAAACAUCAGGAUCUGAA	120	UUCAGAUCUGAUUGUUUC	127
GGACAGAAAACAATCAGGAT	114	GGACAGAAAACAUCAGGAU	121	AUCCUGAUUGUUUCUGUCC	128
ACAGAAAACAATCAGGATCT	115	ACAGAAAACAUCAGGAUCU	122	AGAUCUGAUUGUUUCUGU	129
AGAAAACAATCAGGATCTGA	116	AGAAAACAUCAGGAUCUGA	123	UCAGAUCUGAUUGUUUCU	130
GGGACAGAAAACAATCAGGA	117	GGGACAGAAAACAUCAGGA	124	UCCUGAUUGUUUCUGUCCC	131
CAGAAAACAATCAGGATCTG	118	CAGAAAACAUCAGGAUCUG	125	CAGAUCUGAUUGUUUCUG	132
GACAGAAAACAATCAGGATC	119	GACAGAAAACAUCAGGAUC	126	GAUCCUGAUUGUUUCUGUC	133

Tabla 4C Oligonucleótidos C6 seleccionados, SEQ ID Nos.: 134-199

2331 GAAACAATCAGGATCTGAATGCATT (SEQ ID NO: 134)

Secuencia de ADN	SEQ ID NO:	Secuencia de ARN	SEQ ID NO:	Complemento Inverso	SEQ ID NO:
GAAACAATCAGGATCTGAA	135	GAAACAAUCAGGAUCUGAA	142	UUCAGAUCUGAUUGUUUC	149
AAACAATCAGGATCTGAAT	136	AAACAAUCAGGAUCUGAAU	143	AUUCAGAUCUGAUUGUUU	150
CAATCAGGATCTGAATGCA	137	CAAUCAGGAUCUGAAUGCA	144	UGCAUUCAGAUCUGAUUG	151
ATCAGGATCTGAATGCATT	138	AUCAGGAUCUGAAUGCAUU	145	AAUGCAUUCAGAUCUGAU	152
ACAATCAGGATCTGAATGC	139	ACAUCAGGAUCUGAAUGC	146	GCAUUCAGAUCUGAUUGU	153
AATCAGGATCTGAATGCAT	140	AAUCAGGAUCUGAAUGCAU	147	AUGCAUUCAGAUCUGAUU	154
AACAATCAGGATCTGAATG	141	AACAUCAGGAUCUGAAUG	148	CAUUCAGAUCUGAUUGU	155

2335 CAATCAGGATCTGAATGCATTGTGTA (SEQ ID NO:156)

Secuencia de ADN	SEQ ID NO:	Secuencia de ARN	SEQ ID NO:	Complemento Inverso	SEQ ID NO:
GGATCTGAATGCATTGTGTA	157	GGAUCUGAAUGCAUUUGUA	164	UACAAAUGCAUUCAGAUC	171
CAATCAGGATCTGAATGCA	158	CAAUCAGGAUCUGAAUGCA	165	UGCAUUCAGAUCUGAUUG	172
TCAGGATCTGAATGCATTT	159	UCAGGAUCUGAAUGCAUUU	166	AAAUGCAUUCAGAUCUGA	173
ATCAGGATCTGAATGCATT	160	AUCAGGAUCUGAAUGCAUU	167	AAUGCAUUCAGAUCUGAU	174
AGGATCTGAATGCATTGT	161	AGGAUCUGAAUGCAUUUGU	168	ACAAAUGCAUUCAGAUCU	175
AATCAGGATCTGAATGCAT	162	AAUCAGGAUCUGAAUGCAU	169	AUGCAUUCAGAUCUGAUU	176
CAGGATCTGAATGCATTTG	163	CAGGAUCUGAAUGCAUUUG	170	CAAAUGCAUUCAGAUCUG	177

2663 GCTTCAAGGGTGGAAACCAACTCTA (SEQ ID NO: 178)

Secuencia de ADN	SEQ ID NO:	Secuencia de ARN	SEQ ID NO:	Complemento Inverso	SEQ ID NO:
CTTCAAGGGTGGAAACCAA	179	CUUCAAGGGUGGAAACCAA	186	UUGGUUCCACCCUUGAAG	193
TCAAGGGTGGAAACCAACT	180	UCAAGGGUGGAAACCAACU	187	AGUUGGUUCCACCCUUGA	194
AGGGTGGAAACCAACTCTA	181	AGGGUGGAAACCAACUCUA	188	UAGAGUUGGUUCCACCCU	195
GCTTCAAGGGTGGAAACCA	182	GCUUCAAGGGUGGAAACCA	189	UGGUUCCACCCUUGAAGC	196
CAAGGGTGGAAACCAACTC	183	CAAGGGUGGAAACCAACUC	190	GAGUUGGUUCCACCCUUG	197
AAGGGTGGAAACCAACTCT	184	AAGGGUGGAAACCAACUCU	191	AGAGUUGGUUCCACCCUU	198
TCAAGGGTGGAAACCAAC	185	UUCAAGGGUGGAAACCAAC	192	GUUGGUUCCACCCUUGAA	199

Tabla 4D Oligonucleótidos C6 seleccionados, SEQ ID Nos.: 200-221

2727 GAACATCTGTGAAGTGGGAACATA (SEQ ID NO: 200)

Secuencia de ADN	SEQ ID NO:	Secuencia de ARN	SEQ ID NO:	Complemento Inverso	SEQ ID NO:
GAACATCTGTGAAGTGGGA	201	GAACAUCUGUGAAGUGGGA	208	UCCCACUUCACAGAUGUUC	215
CTGTGAAGTGGGAACATA	202	CUGUGAAGUGGGAACUUA	209	UAUAGUCCCACUUCACAG	216
ATCTGTGAAGTGGGAACATA	203	AUCUGUGAAGUGGGAACUA	210	UAGUCCCACUUCACAGAU	217
TCTGTGAAGTGGGAACAT	204	UCUGUGAAGUGGGAACUAU	211	AUAGUCCCACUUCACAGA	218
AACATCTGTGAAGTGGGAA	205	AACAUCUGUGAAGUGGGA	212	UUCCCACUUCACAGAUGUU	219
ACATCTGTGAAGTGGGAAC	206	ACAUCUGUGAAGUGGGAAC	213	GUUCCCACUUCACAGAUGU	220
CATCTGTGAAGTGGGAAC	207	CAUCUGUGAAGUGGGAACU	214	AGUCCCACUUCACAGAUG	221

ES 2 566 008 T3

Tabla 4E Oligonucleótidos C6 seleccionados, SEQ ID Nos.: 222-251

			SEQ ID NO:
2758	GCAAAACAGGAAGATGGAAA	objetivo	222
	GCAAAACAGGAAGAUGGAAA	ARN	223
	UUUCCAUCUUCUGUUUUGC	Complemento inverso	224
132	GAGCAGACACAGACAAATA	objetivo	225
	GAGCAGACACAGACAAAUA	ARN	226
	UAUUUGUCUGUCUGCUG	Complemento inverso	227
726	GGTACAAACTGCAGAAGAT	objetivo	228
	GGUACAAACUGCAGAAGAU	ARN	229
	AUCUUCUGCAGUUUGUACC	Complemento inverso	230
1266	CAACAAGCTGTCAGAGAAA	objetivo	231
	CAACAAGCUGUCAGAGAAA	ARN	232
	UUUCUCUGTCIGCUUGUUG	Complemento inverso	233
1992	IGGAGAAGATGTTGAAATT	objetivo	234
	UGGAGAAGAUGUUGAAAUU	ARN	235
	AAUUUUCTICATCUUCUCCA	Complemento inverso	236
450	CTGCATIGCCAGAAAGTTA	objetivo	237
	CUGCAUUGCCAGAAAGUUA	ARN	238
	UAAUUUCUGGCAAUGCAG	Complemento inverso	239
157	GATAAGTACTACCAGGAAA	objetivo	240
	GAUAAGUACUACCAGGAAA	ARN	241
	UUUCCUGGUITGUACUUUUC	Complemento inverso	242
1809	GGAGAAGCGACAAGAGGAA	objetivo	243
	GGAGAAGCGACAAGAGGAA	ARN	244
	UUCUCUUGUCGCUUCUCC	Complemento inverso	245
566	GTGTACAGTTGATGGGCAA	objetivo	246
	GUGUACAGUUGAUGGGCAA	ARN	247
	UUGCCCAUCAACUGUACAC	Complemento inverso	248
1644	IGGIGAGAACTGIGAGAAA	objetivo	249
	UGGUGAGAACUGUGAGAAA	ARN	250
	UUUCUCACAGUUCUCACCA	Complemento inverso	251

Tabla 5B

human_c6	TGGC		272-273
hu_c6_mrna	TGGC		
rat_C6	TGGC		
mouse_c6	TGGC		274-275
*** **			
human_c6	AGAT	AGTATAATCCCATCCC	276-277
hu_c6_mrna	AGAT	AGTATAATCCCATCCC	
rat_C6	AGAC	CATCACTCCTATCCC	278-280
mouse_c6	AGAT	TATCACTCCCATCCC	
*** **			
246			
human_c6	T	AGT	290-291
hu_c6_mrna	T	AGT	
rat_C6	C	TGT	
mouse_c6	T	AGT	292
*** **			
human_c6	CCT	ACTGTCAAAGCAGTAGGACAAGTAA	293-295
hu_c6_mrna	CCT	ACTGTCAAAGCAGTAGGACAAGTAA	
rat_C6	CCG	TCCGTCAGGAGCAGCCGAAACGAGTAA	
mouse_c6	TCT	CTTGTCAAGACCAGTCGAGCCAGTAA	
*** **			
human_c6			296-298
hu_c6_mrna			
rat_C6			
mouse_c6			299-301
*** **			
human_c6		GATTTAACTTCTCTTGGACACAATGAAAATCAACA	302-303
hu_c6_mrna		GATTTAACTTCTCTTGGACACAATGAAAATCAACA	
rat_C6		GATTTAGCCACTATTGGAAAAATAAAAATGAAGA	
mouse_c6		AATTTAATCTCTTTGAAAAATAAAAATGAAGA	
*** **			
human_c6	AGGCTCATTCTCAAGTCAGGGGGGAGCTCTTTCAGTG	AA	304-306
hu_c6_mrna	AGGCTCATTCTCAAGTCAGGGGGGAGCTCTTTCAGTG	AA	
rat_C6	CCGTTCAATTGTCTGAGGAGAAAGACTCTTTCACG	AA	
mouse_c6	CAGTCTTTCAGTGGATGAAAGGACAAAATTTCCCTA	GA	
*** **			
human_c6	GAGAAGTGAAAATATCAACCATAATTCTGCCTTCAACAAGC		307-309
hu_c6_mrna	GAGAAGTGAAAATATCAACCATAATTCTGCCTTCAACAAGC		
rat_C6	GAAAAGTGAAAATTTCCAACGTAACCTCAGGCTTCAAAAACGC		
mouse_c6	GAAAATGAACATTCCCATTATAGCTCTGCCTTCAACAAGT		
*** **			
human_c6	AAAGGATTCTAGTTTTATT	CGAA	310-312
hu_c6_mrna	AAAGGATTCTAGTTTTATT	CGAA	
rat_C6	GAAGGATTCTAGCTTTGTT	TGAA	
mouse_c6	GAAGGATTCTAGCTTTTATC	TGAA	
*** **			
human_c6	AGCTAAAGATCTGCACCTTTCTGATGTCTTTTGAAGCACTTAACCAT		313-314
hu_c6_mrna	AGCTAAAGATCTGCACCTTTCTGATGTCTTTTGAAGCACTTAACCAT		
rat_C6	AACGACAGACCTGCAGCTCTCAGACGTCTTCTAAAAGCCCTCATCCAC		
mouse_c6	AGCAACAGACCTACAGCTTTAGATGTCTTCTGAAAGCCCTTGTCCAC		
*** **			
human_c6		TCATTACTTCACCTC	315-317
hu_c6_mrna		TCATTACTTCACCTC	
rat_C6		CCACTATTTCACCTC	318-320

Tabla 5C

mouse_c6	CCCACTACTTCACCTC	
human_c6	CTCTATCAGTTTAGCAGTGAGGAACTAAAGAA	321-322
hu_c6_mrna	CTCTATCAGTTTAGCAGTGAGGAACTAAAGAA	
rat_C6	CTCTACCAATTCAGCCGCCAGGAGCTACAGAA	
mouse_c6	ATCTACCAATTCAGCCGCCAGGAGCTACAGAA	
human_c6	GCCAAAC	323-324
hu_c6_mrna	GCCAAAC	
rat_C6	ACTCGAA	
mouse_c6	GCTCAAA	325-327
human_c6	TTTATTTGCTAAGAAAACAAAAGTGGAAACATAGGTGCACCACCAACAAGCTGTCAGAGAA	
hu_c6_mrna	TTTATTTGCTAAGAAAACAAAAGTGGAAACATAGGTGCACCACCAACAAGCTGTCAGAGAA	
rat_C6	CTTATTTTTTACGAAAACATACAAGGAGACCCGGTGTACCACAAATAGGCTGCTGTA	
mouse_c6	GTTCTTTTATATGGAATACACAAGGAGACACGTGCACCACCAACAAGCTGCTGTA	
human_c6	ACATGAG	328-330
hu_c6_mrna	ACATGAG	
rat_C6	GTACAA	331-333
mouse_c6	ATATGG	
human_c6	GAGTGAATATGG	337-338
hu_c6_mrna	GAGTGAATATGG	
rat_C6	GAGTCAGCAGGC	
mouse_c6	GAGTCAGCAGGC	399-341
human_c6	ATTTC	342-344
hu_c6_mrna	ATTTC	
rat_C6	CTTC	
mouse_c6	CTAT	345-347
human_c6	CCCCATCGTG	348-349
hu_c6_mrna	CCCCATCGTG	
rat_C6	TCCGATCATC	350
mouse_c6	CCCAATTACA	
human_c6	GAAAGCTTTG	351-352
hu_c6_mrna	GAAAGCTTTG	
rat_C6	GAAAGCCCTT	
mouse_c6	GAGAGCGCTT	353-354
human_c6	CC	355-356
hu_c6_mrna	CC	
rat_C6	GG	357-358
mouse_c6	GG	359-361
human_c6	GAAACAGTCTCCAGA	
hu_c6_mrna	GAAACAGTCTCCAGA	362
rat_C6	MAACGGTCCCCAGA	363-365
mouse_c6	GCGCAGGTCCCCAGG	

Tabla 5D

human_c6	[REDACTED]TACCTGT [REDACTED]ATCGAGAACCCGAGA	366-367
hu_c6_mrna	[REDACTED]TACCTGT [REDACTED]ATCGAGAACCCGAGA	
rat_C6	[REDACTED]CGCATGC [REDACTED]GTCAAGGAGCCGGGA	368-369
mouse_c6	[REDACTED]TGCCTGC [REDACTED]ATCAAGAACCCGAGA	
*** ** ***** ** * ** ***** ** * ** * ** * ** * ** *		
243		
human_c6	ATGCAATAATCCTGCCCCCAA [REDACTED]AGGGGGAGAAGCGACAAGA	370-372
hu_c6_mrna	ATGCAATAATCCTGCCCCCAA [REDACTED]AGGGGGAGAAGCGACAAGA	
rat_C6	GTGTAATAACCTGAGCCACAG [REDACTED]AGGGCAAGCATTGCCAAGA	
mouse_c6	GTGTAATAACCTGAGCCACAG [REDACTED]GTGGCAAGGATCAGCAAGA	
** ***** ** * ** ***** ** * ** * ** * ** * ** *		
human_c6	G [REDACTED]CATGGAAAACAA [REDACTED]	373-375
hu_c6_mrna	G [REDACTED]CATGGAAAACAA [REDACTED]	
rat_C6	A [REDACTED]AATGGAAAAGT [REDACTED]	
mouse_c6	A [REDACTED]AATGGAAAATGT [REDACTED]	376-377
***** ** * ** ***** ** * ** * ** * ** * ** *		
human_c6	[REDACTED]GAAAGAGGTCGATCTTCTCGAGAT [REDACTED]CCTCAGCCAGT	378-380
hu_c6_mrna	[REDACTED]GAAAGAGGTCGATCTTCTCGAGAT [REDACTED]CCTCAGCCAGT	
rat_C6	[REDACTED]AAAAGAGTAGACCTTCTGAGCC [REDACTED]CCTCAGCCACC	
mouse_c6	[REDACTED]GACAGAGGTAGACCTTCTGAGCC [REDACTED]TCTCAACCACC	
***** ** * ** ***** ** * ** * ** * ** * ** *		
234		
human_c6	TCTCCAGAAAATGGATTATCC [REDACTED]TGTTGGAGAAGATGT	381-383
hu_c6_mrna	TCTCCAGAAAATGGATTATCC [REDACTED]TGTTGGAGAAGATGT	
rat_C6	TCTCCAGAAAATGCATTGTCT [REDACTED]CAGTCGGGGAGGAAGT	
mouse_c6	TCTCCAGAAAACGCATTACCT [REDACTED]CAGTTGGGGAGGAAGT	
** ***** ** * ** ***** ** * ** * ** * ** * ** *		
human_c6	[REDACTED]TGAAACTGTTGGATA [REDACTED]	384-386
hu_c6_mrna	[REDACTED]TGAAACTGTTGGATA [REDACTED]	
rat_C6	[REDACTED]CAAAGCTGTGGATA [REDACTED]	
mouse_c6	[REDACTED]CACAGCTGTTGGATT [REDACTED]	387-388
***** ** * ** ***** ** * ** * ** * ** * ** *		
human_c6	AGACGGG [REDACTED]CGGACGGAGTGCATCAAGCCAGT	389-391
hu_c6_mrna	AGACGGG [REDACTED]CGGACGGAGTGCATCAAGCCAGT	
rat_C6	AGACAGA [REDACTED]CGGACCGAGTGCCTCAAACCAGT	
mouse_c6	AGACAGA [REDACTED]AGGACCTCGTGCCTCAAGCCCGT	
**** * ***** ** * ** ***** ** * ** * ** * ** * ** *		
human_c6	TGTGCAGGAA [REDACTED]ATTGTATAGA [REDACTED]	392-393
hu_c6_mrna	TGTGCAGGAA [REDACTED]ATTGTATAGA [REDACTED]	
rat_C6	CGTTCAGGAT [REDACTED]TGTGTACAAG [REDACTED]	
mouse_c6	TGTTTCAGGAT [REDACTED]AGTGTATCAG [REDACTED]	394-395
** ***** ** * ** ***** ** * ** * ** * ** * ** *		
human_c6	[REDACTED]AAGCTGCCCCAA [REDACTED]CAGGG	396-398
hu_c6_mrna	[REDACTED]AAGCTGCCCCAA [REDACTED]CAGGG	
rat_C6	[REDACTED]GACCTGTCCAG [REDACTED]AAGGG	
mouse_c6	[REDACTED]GACATGCCCCAG [REDACTED]AAGGA	
***** ** * ** ***** ** * ** * ** * ** * ** *		
human_c6	GAAT [REDACTED]CTCTCTCACCTGTGAAAAAGATACTTAACAAA	399-401
hu_c6_mrna	GAAT [REDACTED]CTCTCTCACCTGTGAAAAAGATACTTAACAAA	
rat_C6	AGAC [REDACTED]TTCACTGAGCTGTGAAAAAGATATTCTGACAAA	
mouse_c6	AGAC [REDACTED]TTCATTGACCTGTGAACAAGGTCTCAGAGACCA	
* ***** ** * ** ***** ** * ** * ** * ** * ** *		
111 134 156		
human_c6	ATTAAGGCCATTGTGACGCTGGGACAGAAACAATCAGGATCTGAATGCATTGTATGTC	
hu_c6_mrna	ATTAAGGCCATTGTGACGCTGGGACAGAAACAATCAGGATCTGAATGCATTGTATGTC	
rat_C6	GTCAAAGGCCCTTGTCAACCAGGACAAAAGCAATCAGGATCCGAGTGTGTTTGTATGTC	

Tabla 5E

```

mouse_c6      TCCGTGAGAAAGTGATC--CCTTCACAATCTCCTTAACAAGTCAAAGGGCCTTGAA----
                * * * * *
human_c6      TCCAGAAGAAGACTGTAGCCATCATTGAGAAGATCTCTGTGTGTTTGACACAGACTCCAA
hu_c6_mrna   TCCAGAAGAAGACTGTAGCCATCATTGAGAAGATCTCTGTGTGTTTGACACAGACTCCAA
rat_C6       CCCAGAAGAAGACTGTAGCAGTTATTCGGAAGATCTCTGTATATTTGATGAGGGATCCAG
mouse_c6     -CTAAGAGCTGTTGCCACCCCTTCCTCCTTATTCCCTCCTAACACCTAAGACTGTAA
                * * * * *

human_c6      CGATTACTTTACTTCACCCGCTTGTAAAGTTTTGGCTGAGAAATGTTTAAATAATCAGCA
hu_c6_mrna   CGATTACTTTACTTCACCCGCTTGTAAAGTTTTGGCTGAGAAATGTTTAAATAATCAGCA
rat_C6       TCAGTACTTCACTTCATCTGCTTGCATAAATTTTGGCTGAAAAATGTTTAAACAGCAACCA
mouse_c6     AATTGATAACAGTCCCCTCTTCCCTATCTCTTCCGAGTCCCATGACATC-CAAGGA
                * * * * *

human_c6      ACTCCATTTTCTACATATTGGTTCCTGCCAAGACGGCCGCGCAGTTAGAATGGGGTCTTGA
hu_c6_mrna   ACTCCATTTTCTACATATTGGTTCCTGCCAAGACGGCCGCGCAGTTAGAATGGGGTCTTGA
rat_C6       GTTCCACTTTGTCCATGCTGGTTCCTGCCAAGAAGGCCACAGTTAGAATGGGGTCTTGA
mouse_c6     CATGAGCTGTGCCTGAGCCAGCTTGACTCCCAAGGCTGTTGAGGAGGATCAAGGCTCTG
                * * * * *

human_c6      AAGGACAAGACTTTCAT--CCAACAGCACAAAGAAAGAATCCTGTGGCTATGACACCTGC
hu_c6_mrna   AAGGACAAGACTTTCAT--CCAACAGCACAAAGAAAGAATCCTGTGGCTATGACACCTGC
rat_C6       GAGGCTAAAACCTCGCAA--TGAAGAGCACAAAGAGAGTGCCTGTGGATATGATACTTGC
mouse_c6     GAG-ATAAGATGCAAGTGCCTTGTGCTTGGCGCCTGACTTCAGCCCCCATGTCAGCAGT
                ** * * * *

human_c6      TATGACTGGGAAAAATGTTTCAGCTCCACTTCCAAATGTGTCTGCCTATTGCCCCACAG
hu_c6_mrna   TATGACTGGGAAAAATGTTTCAGCTCCACTTCCAAATGTGTCTGCCTATTGCCCCACAG
rat_C6       TAGTACTGGGAAAAATGTTTCAGCTCCACTTCCAAATGTGTCTGCCTATTGCCCCACAA
mouse_c6     CGTCCCTTCCCTTGTTCCTTGTACAACTCTCCCTCGACCCCTCCCTATTTCCGCGATG
                * * * * *

                178
human_c6      TGCTTCAAGGGTGGAAACCAACTCTACTGTGTCAAATGGGATCATCAACAAGTGAGAAA
hu_c6_mrna   TGCTTCAAGGGTGGAAACCAACTCTACTGTGTCAAATGGGATCATCAACAAGTGAGAAA
rat_C6       TGCCCAAGGATGAAAACCAACTCTACTGTGTCAAATGGGATCATCAATGCGTGGGAAA
mouse_c6     TATGCTTTATAAGGAAAGCACCTCAGCTTAAT--AAATGAGACC-TTGATAGGTTTAATC
                * * * * *

                200                222
human_c6      ACATTGAACATCTGTGAAGTGGGAACATAAGATGTGCAAACAGGAAGATGGAATACTG
hu_c6_mrna   ACATTGAACATCTGTGAAGTGGGAACATAAGATGTGCAAACAGGAAGATGGAATACTG
rat_C6       ACAGTAAACATCTGTACACTGGGAGCCGTGAGGTGTGCAAACAGGAAGGTGGAATACTG
mouse_c6     T-----

human_c6      CATCCTGGAAAGTGTGTTGGCCTAGCACAACTTACTGCTAGGCCAGCACAAATGAACAGATT
hu_c6_mrna   CATCCTGGAAAGTGTGTTGGCCTAGCACAACTTACTGCTAGGCCAGCACAAATGAACAGATT
rat_C6       AATCCTGGGAGGTGCTTGGATTAGCA-----CTGCTAG-----TGATGAATGAATT
mouse_c6     -----

human_c6      TACCATCCCGAAGAACCAACTCCTACAAATGAGAATTCTTGACAAACAGCAGACTGGCA
hu_c6_mrna   TACCATCCCGAAGAACCAACTCCTACAAATGAGAATTCTTGACAAACAGCAGACTGGCA
rat_C6       TATTATTC--AAAAACAACGGACAGGAAGTGAGGAAAGT-GAATGGATGGGAGCAAAGTA
mouse_c6     -----

human_c6      TGCTCAAAGTTACTGACAAAAATATTTTCTGTAGTTTGGATCATTATTCTCCCTGA
hu_c6_mrna   TGCTCAAAGTTACTGACAAAAATATTTTCTGTAGTTTGGATCATTATTCTCCCTGA
rat_C6       TGATAACACATATCTTCAGGAATG-----TAATGATAAAAACCCATTACTTTGTAT--A
mouse_c6     -----
    
```

Tabla 5F

human_c6	CTCTCCTGTTTGGGCATGCTTATTTCAGTTCAGCTCATGACGCCCTGTAGCATACCCCT
hu_c6_mrna	CTCTCCTGTTTGGGCATGCTTATTTCAGTTCAGCTCATGACGCCCTGTAGCATACCCCT
rat_C6	ATAACCTAAACAAAC---TCTTTTTAAAAAAACTCATTATA---TGTAACCTAACA-T
mouse_c6	-----
human_c6	AGGTACCAACTTCCACAGCAGTCTCGTAAATTCTCCTGTTACATTGTACAAAAATAATG
hu_c6_mrna	AGGTACCAACTTCCACAGCAGTCTCGTAAATTCTCCTGTTACATTGTACAAAAATAATG
rat_C6	AGCCATAAATTGCTG--GCAAAAAAAAAA-----AAAAAAAAAAAAAAAAA--
mouse_c6	-----
human_c6	TGACTTCTGAGGCCCTTATGTAGCCTGTGACATTAAGCATTCTCGCAATTAGAAATAAGA
hu_c6_mrna	TGACTTCTGAGGCCCTTATGTAGCCTGTGACATTAAGCATTCTCACAATTAGAAATAAGA
rat_C6	-----
mouse_c6	-----
human_c6	ATAAAAAC-----
hu_c6_mrna	ATAAAAACCCATAATTTTCTTCAATGAGTTAATAAACAGAAATCTCCAGAACCTTGAAAC
rat_C6	-----
mouse_c6	-----
human_c6	-----
hu_c6_mrna	ACATTCTTGAAGCCCAGCTTTCATATCTTCATTCAACAAATAATTTCTGAGTGTGTATAC
rat_C6	-----
mouse_c6	-----
human_c6	-----
hu_c6_mrna	AGGATGTCAAGTACTGACCAAAGTCTGAGAACTCGGCAGATAATAAAAACAGACAAAAGC
rat_C6	-----
mouse_c6	-----
human_c6	-----
hu_c6_mrna	CTTTGCCTTCATGAAGCATACATTTCATTTCAGGGGTAGACACACAAAAATGAAATAACA
rat_C6	-----
mouse_c6	-----
human_c6	-----
hu_c6_mrna	GGTAAATATGTAGC
rat_C6	-----
mouse_c6	-----

Reivindicaciones

- 5 1. Un oligómero antisentido de cadena sencilla de 10 a 50 nucleótidos de longitud que tiene una secuencia de nucleobases contigua con por lo menos 80% de identidad de secuencia con una región complementaria de un ácido nucleico que codifica la secuencia de COMPONENTE DE COMPLEMENTO 6 (C6) representada por la SEQ ID NO: 1; el oligómero comprende por lo menos un análogo de nucleótido y es capaz de reducir el nivel de expresión de mRNA de C6 en un mamífero mediante por lo menos 20% según se determina por un ensayo qPCR, en donde el oligómero se dirige a los nucleótidos 112-152, 433-473, 546-586, 706-746, o 1015- 1055 del sitio de inicio de ATG de la SEQ ID NO: 1.
- 10 2. El oligómero de la reivindicación 1, en donde el oligómero comprende adicionalmente por lo menos uno de un enlace de internucleósido modificado y una nucleobase modificada.
- 15 3. El oligómero de la reivindicación 1, en donde el análogo de nucleótido es una unidad estructural de azúcar modificada seleccionada del grupo que consiste de: una unidad estructural de azúcar modificado con 2'-O-metoxietilo, a una unidad estructural de azúcar modificado con 2'-metoxi, una unidad estructural de azúcar modificado con 2'-O-alquilo, y una unidad estructural de azúcar modificado bicíclica.
- 20 4. El oligómero de la reivindicación 3, en donde la unidad estructural de azúcar modificado bicíclica es un monómero de ácido nucleico bloqueado (LNA).
- 25 5. El oligómero de la reivindicación 2, en donde el enlace de internucleósido modificado es un enlace de fosforotioato internucleósido.
- 30 6. El oligómero de la reivindicación 2, en donde la nucleobase modificada es 5- metilcitosina.
- 35 7. El oligómero de la reivindicación 1, en donde el oligómero tiene entre 12 a 45 nucleótidos de longitud.
8. El oligómero de la reivindicación 1, en donde el oligómero tiene entre 10 a 18 nucleótidos de longitud.
9. El oligómero de la reivindicación 1, en donde el oligómero se dirige a los nucleótidos 132, 453, 566, 726 o 1035 del sitio de inicio de ATG de la SEQ ID NO: 1.
10. El oligómero de la reivindicación 1 o 9, en donde el oligómero tiene por lo menos 90%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con la secuencia de Componente de Complemento C6 representada por la SEQ ID NO:1.
- 40 11. Una composición farmacéutica que comprende el oligómero de la reivindicación 1 o 2 y un diluyente, portador, sal o adyuvante farmacéuticamente aceptable.
- 45 12. Uso de por lo menos un oligómero de acuerdo con la reivindicación 1 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una afección que requiere regeneración axonal.
13. Uso de por lo menos uno de los oligómeros de acuerdo con la reivindicación 1 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una afección desmielinizante crónica.
- 50 14. El uso de la reivindicación 13, en donde la afección desmielinizante crónica es esclerosis múltiples, una neuropatía desmielinizante crónica, enfermedad HMSN (CMT) del tipo IA y IB, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, enfermedad de CHarcot-Marie-Tooth, esclerosis lateral amiotrófica (ALS), síndrome de Guillain-Barre (GBS, también conocido como polineuropatía desmielinizante inflamatoria aguda o AIDP), leucodistrofia; o enfermedad de Parkinson.

Fig 1

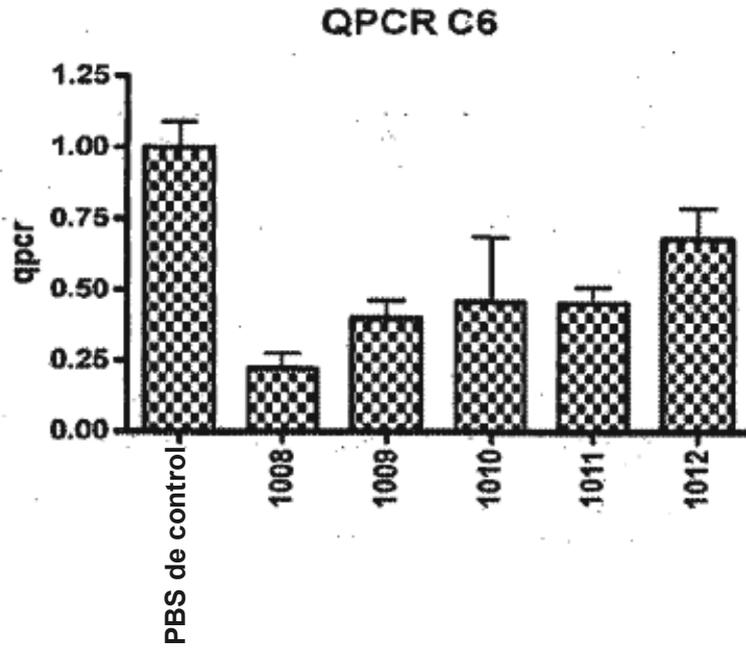


Fig 2

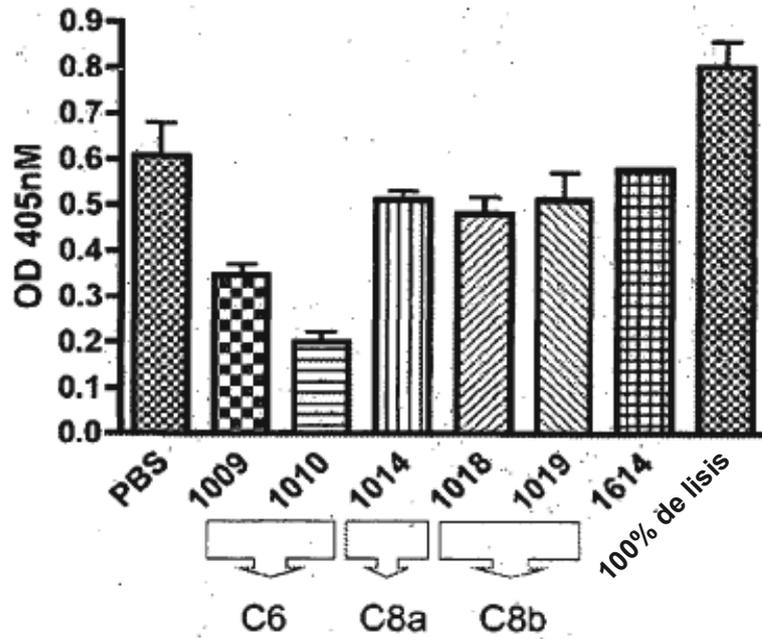


Fig 3

