(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 582 649**

(51) Int. CI.:

C12N 15/11 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61P 25/16 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.03.2007 E 07733553 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.05.2016 EP 2004823**

(54) Título: **Tratamiento de afecciones del SNC**

(30) Prioridad:

17.03.2006 GB 0605337

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.09.2016

(73) Titular/es:

SYLENTIS S.A. (100.0%)
C/ José Abascal 2
28003 Madrid, ES

(72) Inventor/es:

JIMÉNEZ ANTÓN, ANA ISABEL;
SESTO YAGUE, ÁNGELA;
JIMÉNEZ GÓMEZ, Mª CONCEPCIÓN y
GÓMEZ-ACEBO GULLON, EDUARDO

(74) Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

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

DESCRIPCIÓN

Tratamiento de afecciones del SNC

Campo de la invención

La presente invención se refiere a métodos y composiciones para el tratamiento de afecciones patológicas del sistema nervioso central (SNC) por medio de administración intranasal de una composición que modula, por medio de interferencia por ARN, la expresión y/o actividad de genes implicados en afecciones mencionadas anteriormente. Las composiciones de la invención comprenden moléculas de ácido nucleico interferentes cortas (ANic) limitadas a ARN interferentes pequeños (ARNip).

En realizaciones preferidas, las moléculas de ANic administradas por vía intranasal dirigidas a tau, son útiles en la preparación de un medicamento para el tratamiento de trastornos neurodegenerativos del SNC asociados a expresión de tau anómala, así como enfermedades congénitas asociadas a mutaciones del gen de tau.

Antecedentes de la invención

La iARN como herramienta para modular la expresión génica

Interferencia por ARN se refiere al proceso de silenciación de genes postranscripcional específica de secuencia mediado por ARN bicatenario (ARNbc). Después del descubrimiento del fenómeno en plantas a principios de los 1990, Andy Fire y Craig Mello demostraron que el ARNbc inhibía específica y selectivamente la expresión génica de manera extremadamente eficiente en *Caenorhabditis elegans* (Fire *et al.,* 1998). La secuencia de la primera cadena *(*ARN *sentido*) coincidía con la de la región correspondiente del ARN mensajero diana (ARNm). La segunda cadena (ARN *antisentido*) era complementaria al ARNm. El ARNbc resultante resultó ser varios órdenes de magnitud más eficiente que las moléculas de ARN monocatenario correspondientes (en particular, el ARN *antisentido*).

El proceso de iARN comienza cuando la enzima DICER se encuentra con el ARNbc y lo corta en trozos llamados ARN interferentes pequeños o ARNip. Esta proteína pertenece a la familia de nucleasa de ARNasa III. Un complejo de proteínas reúne estos restos de ARN y usa su código como guía para buscar y destruir cualesquiera ARN en la célula con una secuencia coincidente, tal como ARNm diana (véase Bosher & Labouesse, 2000; y Akashi et al., 2001).

En un intento de aplicar iARN para reducir la expresión de genes, se reconoció que las células de mamífero han desarrollado diversos mecanismos protectores contra infecciones víricas que podrían impedir el uso de este enfoque. De hecho, la presencia de niveles extremadamente bajos de ARNbc vírico desencadena una respuesta de interferón, dando como resultado una supresión inespecífica global de la traducción, que a su vez desencadena apoptosis (Williams, 1997, Gil & Esteban, 2000).

En 2000, se describió que el ARNbc inhibe específicamente tres genes en el oocito y el embrión temprano de ratón. La detención traduccional y, por lo tanto, una respuesta de PKR, no se observó dado que los embriones siguieron desarrollándose (Wianny & Zernicka-Goetz, 2000). Investigación en Ribopharma AG (Kulmbach, Alemania) demostró la funcionalidad de la iARN en células de mamífero, usando ARNbc cortos (20-24 pares de bases) para desactivar genes en células humanas sin iniciar la respuesta de fase aguda. Experimentos similares llevados a cabo por otros grupos de investigación confirmaron estos resultados (Elbashir *et al.,* 2001; Caplen *et al.,* 2001). Ensayados en diversas líneas celulares humanas y de ratón normales y cancerosas, se determinó que ARN horquillados cortos (ARNhc) pueden silenciar genes de forma tan eficiente como sus contrapartidas de ARNip (Paddison et al., 2002). Recientemente, otro grupo de ARN pequeños (21-25 pares de bases) mostró mediar en la regulación negativa de la expresión génica. Estos ARN, ARN regulados temporalmente pequeños (ARNtp), regulan la temporización de la expresión génica durante el desarrollo en *Caenorhabditis elegans* (para una revisión, véase Banerjee & Slack, 2002 y Grosshans & Slack, 2002).

Los científicos han usado la iARN en varios sistemas, incluyendo *Caenorhabditis elegans,* Drosophila, tripanosomas, y otros invertebrados. Varios grupos han presentado recientemente la supresión específica de la biosíntesis de proteínas en diferentes líneas celulares de mamífero (específicamente en células HeLa) demostrando que la iARN es un método aplicable ampliamente para silenciar genes in vitro. Basándose en estos resultados, la iARN se ha convertido rápidamente en una herramienta bien reconocida para validar (identificar y asignar) funciones de genes. La iARN que emplea oligonucleótidos de ARNbc cortos proporcionará una comprensión de la función de los genes que están siendo solamente parcialmente secuenciados.

Recientemente, Krutzfeldt y colegas han mostrado que una clase de compuestos manipulados genéticamente de forma especial llamados “antagomirs” pueden silenciar eficazmente la acción de microARN (miARN), trozos no codificantes de ARN que regulan la expresión génica (Krutzfeldt et al., 2005).

Administración intranasal de productos de ANic

La administración en aerosol de ácidos nucleicos a los pulmones usando vectores virales, polímeros, tensioactivos o excipientes, se ha descrito para el tratamiento de enfermedades pulmonares. Se han sugerido ácidos nucleicos adecuados para administración intranasal incluyendo ADNbc, ARNbc, ADNmc, ARNmc, ARN interferente corto, micro-ARN, y ARN antisentido (véase los documentos US2005/0265927 y WO2005/115358).

Agentes de administración preferidos para agentes que inducen iARN en el pulmón incluyen polímeros catiónicos, polímeros catiónicos modificados, lípidos y tensioactivos adecuados para introducción (véase el documento US20050008617).

Administración al SNC

La administración intranasal para el tratamiento de enfermedades del SNC se ha alcanzado solamente con inhibidores de acetilcolinesterasa tales como galantamina y diversas sales y derivados de galantamina (véase por ejemplo los documentos US2006003989, WO2004/002402 y WO2005/102275) mientras que el tratamiento de trastornos neurodegenerativos por medio de la descarga de ARN interferente pequeño en el SNC se ha obtenido previamente implantando quirúrgicamente un catéter (véase por ejemplo el documento WO2005/116212, el documento WO02/086105 describe métodos para administración de oligonucleótidos al SNC mediante rutas neurales que se originan en la cavidad nasal. El uso de oligonucleótidos antisentido se describe, pero no se hace ninguna referencia a interferencia por ARN. Además, no hay ninguna divulgación en esta publicación de actividad fisiológica de los oligonucleótidos administrados. ANic administrados por vía intravenosa han demostrado atravesar la barrera hematorretiniana y modular la expresión génica en el ojo (documentos WO03/08736 y US2005/0222061). La modulación de la expresión de ciertos genes implicados en enfermedad de Alzheimer, tales como beta-secretasa (BACE), proteína precursora de amiloide (APP), PIN-1, presenilina 1 (PS-1) y/o presenilina 2 (PS-2), así como la de genes implicados en enfermedad de Huntington, tales como huntingtina o ataxina-1, ya se ha conseguido con ANic tanto en cultivo celular como in vivo por medio de estrategias que incluyen administración intratecal e intracerebroventricular, implantación de catéteres y bombas, mediante apertura química u osmótica de la barrera hematoencefálica, o mediante inyección o perfusión directa en el sistema arterial cerebral (es decir: en el cuerpo estriado, la corteza) - véase por ejemplo los documentos WO2005/003350, US2005/042646 y GB2415961).

Dirección a Tau por medio de iARN

Tau tiene un papel central en formas heredadas y adquiridas de demencia asociada a la edad, incluyendo enfermedad de Alzheimer (EA) (Hardy & Selkoe, 2002; Lee et al., 2001; Mullan et al., 1992; Poorkaj et al., 1998; Hutton et al., 1998). La EA se caracteriza por dos distintivos patológicos fundamentales: placas seniles, que contienen beta-amiloide (AP) derivado de la escisión de la proteína precursora de amiloide (APP); y ovillos neurofibrilares, que contienen la proteína filamentosa tau. Raras formas heredadas de EA han revelado un papel, esencial para la producción de AP en la patogenia de todas las formas de EA, tanto esporádicas como heredadas (Hardy & Selkoe, 2002). Las mutaciones en los tres genes que se sabe que causan EA familiar - los genes que codifican APP, presenilina 1 y presenilina 2 - actúan de forma dominante para mejorar la producción de beta-amiloide neurotóxico (Hardy & Selkoe, 2002).

Tau, el componente fundamental de los ovillos neurofibrilares, del mismo modo juega un papel significativo en la patogenia de EA (Lee et al., 2001). Las mutaciones en tau causan una enfermedad neurodegenerativa principalmente hereditaria similar, demencia frontotemporal con parkinsonismo asociada al cromosoma 17 (DFTP-17). En la DFTP-17, las mutaciones de tau alteran la secuencia de la proteína tau o causan corte y empalme aberrante (Lee et al., 2001; Lewis et al., 2001; Oddo et al., 2003). Las anomalías de la expresión de tau también contribuyen a varios otros importantes trastornos neurodegenerativos, incluyendo parálisis supranuclear progresiva y degeneración ganglionar cortical-basal (Houlden et al., 2001). Por lo tanto, esfuerzos por reducir la expresión de tau, de forma general o de manera específica de alelo, pueden demostrar ser terapéuticamente útiles en DFTP-17, EA u otras enfermedades relacionadas con tau.

La silenciación específica de alelo de mutaciones de tau y/o polimorfismos de un solo nucleótido asociados (SNP) por medio de iARN ya se ha conseguido en cultivos celulares (Miller et al. 2003, 2004). Además, ARNip de interés se administraron con éxito a un modelo en ratón por medio de inyección en la vena caudal (documento US2004/0241854).

Lo anterior es una descripción de técnica relevante relativa a iARN así como de enfoques de administración al SNC. La descripción se proporciona solamente para compresión de la invención a continuación, y no es una admisión de que cualquiera de los trabajos descritos es técnica anterior a la invención reivindicada. Existe una necesidad insatisfecha por la técnica de métodos convenientes mediante los cuales moléculas de ANic puedan ser administradas al SNC, y mediante los cuales dicha administración de cómo resultado actividad de interferencia por ARN. Se han desarrollado técnicas para modular la expresión génica in vivo para tratar enfermedades del SNC por medio de dirigir moléculas de ARNip al SNC mediante administración intranasal.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona métodos y composiciones para el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa del sistema nervioso central (SNC) asociada a expresión anómala de tau por medio de administración intranasal de compuestos que causan interferencia por ARN.

Las composiciones de la invención comprenden moléculas de ácido nucleico interferente corto (ANic) limitadas a ARN interferente pequeño (ARNip).

Los métodos de la invención comprenden la administración intranasal a un paciente que lo necesita de una cantidad eficaz de uno o más ANic de la invención para el tratamiento de una afección patológica del SNC. Los métodos de la invención comprenden administración intranasal del ANic terapéutico. En particular, las composiciones de la invención pueden usarse en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno neurodegenerativo del SNC asociado a expresión anómala de tau, así como enfermedades congénitas asociadas a mutaciones de un gen de tau del SNC.

La presente invención se refiere a ARNip que están dirigidos a interferir en la expresión de ARNm de tau, así como de alelos mutados de un gen de tau del SNC que, en última instancia, modulan la cantidad de proteína producida. Las composiciones de la presente invención se administran por vía intranasal para dirigirse específicamente a la versión anómala del gen de tau dentro del SNC.

Breve descripción de las figuras

La invención se describirá a modo de ejemplo solamente con referencia a las siguientes figuras.

Figura 1: niveles de expresión de GFP después de la administración intranasal a ratones de NaCl al 0,9 % (Control), 1 nmol/µl de ARNip-GFP (ratón 1), 2 nmol/µl de ARNip-GFP (ratón 2), y 2 nmol/µl de ARNip-GFP + TransIT-TKO (ratón 3). Se llevaron a cabo análisis de la corteza, el hipocampo, el cuerpo estriado y el bulbo del SNC.

Figura 2. El ARNip reduce niveles de proteína GFP. ARNip diseñado contra GFP se administró por vía intranasal a ratones transgénicos para GFP. Los animales se sacrificaron en momentos diferentes y los tejidos recogidos se analizaron mediante transferencia de Western. Se administró solución salina de control a ratones CI, CII y CIII como control. Los valores muestran los niveles de expresión de la proteína GFP normalizados respecto a la proteína GFP de ratones de control.

Figura 3. El ARNip reduce los niveles de ARNm de GFP. ARNip diseñado contra GFP se administró por vía intranasal a ratones transgénicos para GFP. Los animales se sacrificaron en momentos diferentes y se recogió ARNm de diferentes tejidos. En esta figura, la expresión de ARNm de GFP del cuerpo estriado y la corteza se analizó mediante PCR cuantitativa.

Figura 4. El ARNip reduce los niveles de trasncrito del gen de MAPT con diferentes mutaciones. Se analizaron ARNip diseñados para diferentes mutaciones Seq ID 159 (mutación P301L) y Seq ID 160 (mutación R406W). Se preparó ARN a partir de células tratadas con los ARNip específicos durante 48 h. Las muestras se analizaron mediante PCR cuantitativa usando cebadores específicos para MAPT (descritos en el texto). Los valores muestran los niveles de expresión media de diferentes transcritos normalizados a 18S con respecto a células transfectadas de forma simulada como control.

Figura 5. El ARNip reduce los niveles de transcrito del gen de MAPT. Se preparó ARN a partir de células MDA-MB-435 tratadas con diferentes ARNip durante 24, 48 h y 72 h. Las muestras se analizaron mediante PCR en tiempo real usando cebadores específicos, descritos en el texto. Los valores muestran los niveles de expresión media de diferentes transcritos normalizados a 18S con respecto a un control transfectado de forma simulada.

Figura 6. El ARNip de Seq ID 160 diseñado para la mutación R406W reduce los niveles de proteína MAPT in vivo. El ARNip Seq ID 160 se administró por vía intranasal a ratones MAPT transgénicos. Los animales se sacrificaron a los siete días después de la administración de ARNip y se analizó tejido del hipocampo mediante transferencia de Western.

Figura 7. Lista de mutaciones de MAPT y números de entrada de la secuencia de genes.

Figura 8. Lista de secuencias de regiones de MAPT dirigidas por ANic de la invención, y de dúplex de ANic dirigidos a estas regiones.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a métodos y composiciones para el tratamiento de un trastorno neurodegenerativo del SNC, asociado a expresión anómala de tau por medio de administración intranasal de compuestos que causan iARN. Las composiciones de la invención comprenden ARNip que causan interferencia por ARN en el gen de tau en el sistema nervioso central y en las que el ARNip está dirigido contra una secuencia de nucleótidos seleccionada entre las SEQ. ID NO: 1 a 160 o en las que el ARNip tiene una secuencia seleccionada entre las SEQ ID NO 161-318.

Los métodos de la invención comprenden la administración intranasal a un paciente que lo necesita de una cantidad eficaz de uno o más ARNip de la invención.

Diseño de ARNip

Un gen es “dirigido” por ANic cuando, por ejemplo, el ANic disminuye o inhibe selectivamente la expresión del gen o de un alelo del gen implicado en una afección patológica. Como alternativa, los ANic dirigen un gen cuando los ANic hibridan en condiciones rigurosas con el transcrito del gen. El ANic puede ensayarse in vitro o in vivo para la capacidad de dirigir un gen.

En 1999, Tuschl et al., descifraron el efecto de silenciación de ARNip, mostrando que su eficiencia está en función de la longitud del dúplex, la longitud de los salientes del extremo 3', y la secuencia en estos salientes.

Seleccionar la región homóloga correcta dentro del gen diana es de gran relevancia para silenciación precisa. Un corto fragmento de la secuencia del gen diana (por ejemplo, 19-40 nucleótidos de longitud) se selecciona como la secuencia del ANic de la invención. Como alternativa, la región variable del alelo de interés se selecciona como diana de los compuestos de ANic. En la presente invención, el ANic es ARNip. En dichas realizaciones, el corto fragmento de la secuencia del gen diana es un fragmento del ARNm del gen diana. En realizaciones preferidas, los criterios para seleccionar un fragmento de secuencia del ARNm del gen diana para ser una molécula de ARNip candidata incluyen: 1) una secuencia del ARNm el gen diana que tiene al menos 50-100 nucleótidos desde el extremo 5' o 3' de la molécula de ARNm nativa; 2) una secuencia del ARNm del gen diana que tiene un contenido de G/C de entre el 30 % y el 70 %, de la forma más preferente aproximadamente el 50 %; 3) una secuencia del ARNm del gen diana que no contiene secuencias repetitivas (por ejemplo, AAA, CCC, GGG, TTT, AAAA, CCCC, GGGG, TTTT); 4) una secuencia del ARNm del gen diana que es accesible en el ARNm; y 5) una secuencia del ARNm del gen diana que es única para el gen diana. El fragmento de secuencia del ARNm del gen diana puede cumplir uno o más de los criterios identificados anteriormente. En realizaciones preferidas, el ARNip tiene un contenido de G/C por debajo del 60 % y/o carece de secuencias repetitivas.

En la práctica, el gen de interés se introduce como una secuencia de nucleótidos en un programa de predicción que tiene en cuenta todas las variables descritas anteriormente para el diseño de oligonucleótidos óptimos. Este programa explora cualquier secuencia de nucleótidos de ARNm en busca de regiones susceptibles de ser diana para ARNip. El resultado de este análisis es una puntuación de posibles oligonucleótidos de ARNip. Las puntuaciones más elevadas se usan para diseñar oligonucleótidos de ARN bicatenario (normalmente de 21 pb de longitud, aunque otras longitudes también son posibles) que se preparan normalmente mediante síntesis química. Varias modificaciones químicas que se conocen bien en la técnica, con el objetivo de incrementar la estabilidad o disponibilidad de los oligonucleótidos de ARNbc, también pueden realizarse.

Oligonucleótidos candidatos pueden filtrarse adicionalmente para conservación de secuencias interespecies para facilitar la transición desde estudios clínicos en animales a seres humanos.

Además de ANic que es perfectamente complementario a la región diana, secuencias de ANic degeneradas pueden usarse para dirigirse a regiones homólogas. El documento WO2005/045037 describe el diseño de moléculas de ANic para dirigirse a dichas secuencias homólogas, por ejemplo incorporando, por ejemplo discordancias y/o pares de bases fluctuantes, que pueden proporcionar secuencias diana adicionales. En casos donde se identifican discordancias, pares de bases no canónicos (por ejemplo, discordancias y/o bases fluctuantes) pueden usarse para generar moléculas de ANic que se dirigen a más de una secuencia de genes. En un ejemplo no limitante, pares de bases no canónicos tales como pares de bases UU y CC se usan para generar moléculas de ANic que son capaces de dirigirse a secuencias para diferentes dianas que comparten homología de secuencia. Por lo tanto, una ventaja de usar ANic de la invención es que un único ANic puede diseñarse para incluir una secuencia de ácido nucleico que es complementaria a la secuencia de nucleótidos que se conserva entre genes homólogos. En este enfoque, puede usarse un único ANic para inhibir la expresión de más de un gen en lugar de usar más de una molécula de ANic para dirigirse a diferentes genes.

La identidad de secuencia puede calcularse mediante algoritmos de comparación y alineamiento de secuencia conocidos en la técnica (véase Gribskov y Devereux, Sequence Analysis Primer, Stockton Press, 1991, y referencias mencionadas en ese documento) y calculando la diferencia porcentual entre las secuencias de nucleótidos mediante, por ejemplo, el algoritmo de Smith-Waterman tal como se implementa en el programa informático BESTFIT usando parámetros por defecto (por ejemplo, University of Wisconsin Genetic Computing Group). Se prefiere más del 90 %, 95 % o 99 % de identidad de secuencia entre el ANic y la parte del gen diana. Como alternativa, la complementariedad entre el ANic y la molécula de ARN nativa puede definirse funcionalmente mediante hibridación así como funcionalmente por su capacidad para reducir o inhibir la expresión de un gen diana. La capacidad de un ANic para afectar a la expresión génica puede determinarse empíricamente in vivo o in vitro.

Las moléculas de ANic preferidas de la invención son bicatenarias. En una realización, moléculas de ANic bicatenarias comprenden extremos romos. En otra realización, moléculas de ANic bicatenarias comprenden nucleótidos salientes (por ejemplo, salientes de 1-5 nucleótidos, preferentemente salientes de 2 nucleótidos). En una

realización específica, los nucleótidos salientes son salientes 3'. En otra realización específica, los nucleótidos salientes son salientes 5'. Cualquier tipo de nucleótido puede ser parte del saliente. En una realización, el nucleótido o nucleótidos salientes son ácidos ribonucleicos. En otra realización, el nucleótido o nucleótidos salientes son ácidos desoxirribonucleicos. En una realización preferida, el nucleótido o nucleótidos salientes son nucleótidos de timidina. En otra realización, el nucleótido o nucleótidos salientes son nucleótidos modificados o no convencionales. El nucleótido o nucleótidos salientes pueden tener enlaces internucleotídicos no convencionales (por ejemplo, diferentes de enlace fosfodiéster).

Síntesis de dúplex de ANic

El ANic puede sintetizarse mediante cualquier método conocido en la técnica. Los ARN se sintetizan preferentemente químicamente usando fosforamiditas de nucleósido protegidas apropiadamente y un sintetizador de ADN/ARN convencional. Adicionalmente, el ARNip puede obtenerse a partir de proveedores de síntesis de oligo ARN comerciales, incluyendo, aunque sin limitarse a, Proligo (Hamburgo, Alemania), Dharmacon Research (Lafayette, CO, Estados Unidos), Glen Research (Sterling, VA, Estados Unidos), ChemGenes (Ashland, MA, Estados Unidos) y Cruachem (Glasgow, Reino Unido), Qiagen (Alemania) Ambion (Estados Unidos) e Invitrogen (Escocia). Como alternativa, moléculas de ANic de la invención pueden expresarse en células, transfectando las células con vectores que contienen la secuencia de ANic complementaria inversa bajo el control de un promotor. Una vez expresado, el ANic puede aislarse de la célula usando técnicas bien conocidas en la técnica.

Una etapa de hibridación es necesaria cuando se trabaja con moléculas de ARN monocatenarias. Para hibridar los ARN, 30 μl de cada solución de oligo ARN 50 μM se combinarán en acetato potásico 100 mM, HEPES-KOH 30 mM pH 7,4 y acetato de magnesio 2 mM. La solución se incuba a continuación durante 1 minuto a 90 °C, se centrifuga durante 15 segundos, y se incuba durante 1 hora a 37 °C.

En realizaciones donde el ARNip es un ARN horquillado corto (ARNhc), las dos cadenas de la molécula de ARNip pueden estar conectadas por una región enlazadora (por ejemplo, un enlazador nucleotídico o un enlazador no nucleotídico).

Modificación química de ANic.

Los ANic pueden contener uno o más nucleótidos modificados y/o enlaces no fosfodiéster. Modificaciones químicas bien conocidas en la técnica son capaces de incrementar la estabilidad, la disponibilidad, y/o la captación celular del ANic. El experto en la materia estará al tanto de otros tipos de modificación química que pueden incorporarse en moléculas de ARN (véase las publicaciones internacionales WO03/070744 y WO2005/045037 para una visión general de tipos de modificaciones).

En una realización, pueden usarse modificaciones para proporcionar resistencia mejorada a degradación o captación mejorada. Los ejemplos de dichas modificaciones incluyen enlaces fosforotioato internucleotídico, 2'-O-metil ribonucleótidos (especialmente en la cadena sentido de un ARNip bicatenario), 2'-desoxi-fluoro ribonucleótidos, 2'-desoxi ribonucleótidos, nucleótidos de “base universal”, 5-C-metil nucleótidos, e incorporación de residuos desoxibásicos invertidos (véase en general el documento GB2406568).

En otra realización, pueden usarse modificaciones para mejorar la estabilidad del ARNip o para incrementar la eficiencia de dirección. Las modificaciones incluyen reticulación química entre las dos cadenas complementarias de un ARNip, modificación química de un extremo 3' o 5' de una cadena de un ARNip, modificaciones de azúcar, modificaciones de nucleobases y/o modificaciones de la cadena principal, ribonucleótidos 2'-fluoro modificados y 2'-desoxi ribonucleótidos (véase, en general, la publicación internacional WO2004/029212).

En otra realización, pueden usarse modificaciones para incrementar o reducir la afinidad por los nucleótidos complementarios en el ARNm diana y/o en la cadena del ANic complementaria (véase, en general, la publicación internacional WO2005/044976) Por ejemplo, un nucleótido de pirimidina sin modificar puede sustituirse por una 2-tio, 5-alquinil, 5-metil, o 5-propinil pirimidina. Adicionalmente, una purina sin modificar puede sustituirse por una 7-deza, 7-alquil, o 7-alquenil purina.

En otra realización, cuando el ANic es un ARNip bicatenario, los nucleótidos salientes del nucleótido 3'-terminal son sustituidos por desoxirribonucleótidos (véase, en general, Elbashir et al., 2001).

En una realización, la invención presenta una molécula de ácido nucleico interferente corto bicatenario (ANic) que regula negativamente la expresión de un gen diana, preferentemente un gen expresado en el SNC, más preferentemente un gen de MAPT, en el que la molécula de ANic se ensambla a partir de dos fragmentos de oligonucleótido diferentes en los que un fragmento comprende la región sentido y el segundo fragmento comprende la región antisentido de la molécula de ANic. En otra realización, aproximadamente 19 nucleótidos de cada fragmento de la molécula de ANic están emparejados por bases con los nucleótidos complementarios del otro fragmento de la molécula de ANic y en la que al menos dos nucleótidos 3' terminales de cada fragmento de la molécula de ANic no están emparejados por bases a los nucleótidos del otro fragmento de la molécula de ANic (es

decir, la molécula de ANic incluye salientes de al menos 2 nucleótidos en cada cadena). En una realización, cada uno de los dos nucleótidos 3' terminales de cada fragmento de la molécula de ANic es un nucleótido de 2'-desoxi-pirimidina, tal como una 2'-desoxi-timidina. En otra realización, los 21 nucleótidos de cada fragmento de la molécula de ANic están emparejados por bases a los nucleótidos complementarios del otro fragmento de la molécula de ANic. En otra realización, aproximadamente 19 nucleótidos de la región antisentido están emparejados por bases a la secuencia de nucleótidos o una parte de la misma del ARN codificado por el gen diana. En otra realización, aproximadamente 21 nucleótidos de la región antisentido están emparejados por bases a la secuencia de nucleótidos o una parte de la misma del ARN codificado por el gen diana. En cualquiera de las realizaciones anteriores, el extremo 5’ del fragmento que comprende dicha región antisentido puede incluir opcionalmente un grupo fosfato.

En una realización, la divulgación presenta una molécula de ANic, en la que una o ambas de las cadenas sentido o antisentido comprende uno o más, por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más, preferentemente de 1 a 5, enlaces fosforotioato internucleotídicos, y/o uno o más (por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más), preferentemente de 1 a 5, 2'-desoxi, 2'-O-metil, 2'-desoxi-2'-fluoro, y/o aproximadamente uno o más (por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más), preferentemente de 1 a 5, nucleótidos modificados con base universal, and opcionalmente una molécula casquete terminal en el extremo 3’, el extremo 5’, o ambos de los extremos 3’ y 5’ de cualquiera o ambas de la cadena sentido o antisentido. En otra realización, uno o más, por ejemplo aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más, preferentemente de 1 a 5, nucleótidos de pirimidina de la cadena de ANic sentido y/o antisentido están modificadas químicamente con 2'-desoxi, 2'-O-metil y/o 2'-desoxi-2'-fluoro nucleótidos, opcionalmente con uno o más, por ejemplo aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más, preferentemente de 1 a 5, enlaces internucleotídicos fosforotioato y/o una molécula casquete terminal en el extremo 3’, el extremo 5’, o ambos de los extremos 3’ y 5’, que están presentes en la misma o en una cadena diferente.

En una realización, la divulgación presenta una molécula de ácido nucleico interferente corto modificado químicamente (ANic) que tiene de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 o más (específicamente aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5 o más) enlaces internucleotídicos fosforotioato en cada cadena de la molécula de ANic.

En otra realización, la divulgación presenta una molécula de ANic que comprende enlaces internucleotídicos 2'-5'. Los enlace o enlaces internucleotídicos 2’-5’ pueden estar en el extremo 3’, el extremo 5’, o ambos de los extremos 3’ y 5’ de una o ambas cadenas de la secuencia de ANic. Además, el enlace o enlaces internucleotídicos 2’-5’ pueden estar presentes en diversas otras posiciones dentro de una o ambas cadenas de la secuencia de ANic, por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más incluyendo cada enlace internucleotídico de un nucleótido de pirimidina en una o ambas cadenas de la molécula de ANic puede comprender un enlace internucleotídico 2’-5’, o aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más incluyendo cada enlace internucleotídico de un nucleótido de purina en una o ambas cadenas de la molécula de ANic puede comprender un enlace internucleotídico 2’-5’.

En una realización, una molécula de ANic de la divulgación comprende uno o más (por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más) nucleótidos de ácido nucleico bloqueado (ANB), por ejemplo, en el extremo 5', el extremo 3’, ambos de los extremos 5' y 3', o cualquier combinación de los mismos, de la molécula de ANic.

En otra realización, una molécula de ANic de la divulgación comprende uno o más (por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más) nucleótidos acíclicos, por ejemplo, en el extremo 5’, el extremo 3’, ambos de los extremos 5' y 3', o cualquier combinación de los mismos, de la molécula de ANic.

En una realización, la invención presenta una molécula de ácido nucleico interferente corto modificado químicamente (ANic) de la invención, en la que cualquiera (por ejemplo, uno o más o todos) de los nucleótidos de pirimidina presentes en cualquier o ambas de la región sentido o antisentido son 2'-desoxi-2'-fluoro nucleótidos de pirimidina, y en la que cualquiera (por ejemplo, uno o más o todos) de los nucleótidos de purina presentes en cualquiera o ambas de la región sentido o la antisentido son 2'-desoxi nucleótidos de purina. Opcionalmente, cualesquiera nucleótidos que comprenden un saliente nucleotídico 3'-terminal que están presentes en dicha región sentido o antisentido son 2'-desoxi nucleótidos.

En una realización, la divulgación presenta una molécula de ácido nucleico interferente corto modificado químicamente (ANic) en la que cualquiera (por ejemplo, uno o más o todos) de los nucleótidos de pirimidina presentes en cualquier o ambas de la región sentido o antisentido son 2'-desoxi-2'-fluoro nucleótidos de pirimidina, y en la que cualquiera (por ejemplo, uno o más o todos) de los nucleótidos de purina presentes en cualquier o ambas de la región sentido o antisentido son 2'-O-metil nucleótidos de purina. Opcionalmente, cualesquier nucleótidos que comprenden un saliente nucleotídico 3'-terminal que están presentes en dicha región sentido o antisentido son 2'-desoxi nucleótidos.

En una realización, la invención presenta una molécula de ARN bicatenaria sintetizada químicamente que dirige la escisión de un ARN de MAPT, mediante interferencia por ARN, en la que cada cadena de dicha molécula de ARN

tiene de aproximadamente 21 a aproximadamente 23 nucleótidos de longitud; una cadena de la molécula de ARN comprende una secuencia de nucleótidos que tiene suficiente complementariedad con el ARN diana para que la molécula de ARN dirija la escisión del ARN diana mediante interferencia por ARN; y en la que al menos una cadena de la molécula de ARN comprende uno o más nucleótidos modificados químicamente descritos en el presente documento, tales como desoxinucleótidos, 2'-O-etil nucleótidos, 2'-desoxi-2'-fluoro nucleótidos, 2'-O-metoxietil nucleótidos, etc.

En una realización, la invención presenta un medicamento que comprende una molécula de ARNip de la invención.

En una realización, la invención presenta un ingrediente activo que comprende una molécula de ARNip de la invención.

En una realización, la invención presenta el uso de una molécula de ácido nucleico interferente corto bicatenario (ANic) para regular negativamente la expresión de un gen de MAPT, en el que la molécula de ANic comprende una o más modificaciones químicas y cada cadena del ANic bicatenario tiene de aproximadamente 18 a aproximadamente 28 o más (por ejemplo, aproximadamente 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 o 28 o más) nucleótidos de largo.

En una realización, la invención presenta una molécula de ácido nucleico interferente corto bicatenario (ANic) que inhibe la expresión de un gen de MAPT, en la que una de las cadenas de la molécula de ANic bicatenaria es una cadena antisentido que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a la secuencia de nucleótidos de ARN diana o una parte de la misma, la otra cadena es una cadena sentido que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia de nucleótidos de la cadena antisentido y en la que una mayoría de los nucleótidos de pirimidina presentes en la molécula de ANic bicatenaria comprende una modificación de azúcar. Preferentemente el ARN diana o parte del mismo codifica una proteína o parte de la misma. Opcionalmente, el extremo 5’ de la cadena antisentido incluye un grupo fosfato. La secuencia de nucleótidos o una parte de la misma de la cadena antisentido puede ser complementaria a una secuencia de nucleótidos de la región no traducida o una parte de la misma del ARN diana.

En una realización, cada cadena de la molécula de ANic comprende de aproximadamente 18 a aproximadamente 29 o más (por ejemplo, aproximadamente 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 o 29 o más) nucleótidos, en la que cada cadena comprende al menos aproximadamente 18 nucleótidos que son complementarios a los nucleótidos de la otra cadena. En una realización, la molécula de ANic se ensambla a partir de dos fragmentos de oligonucleótido, en los que un fragmento comprende la secuencia de nucleótidos de la cadena antisentido de la molécula de ANic y un segundo fragmento comprende la secuencia de nucleótidos de la región sentido de la molécula de ANic. En una realización, la cadena sentido está conectada a la cadena antisentido mediante una molécula enlazadora, tal como un enlazador de polinucleotídico o un enlazador no nucleotídico. En una realización adicional, los nucleótidos de pirimidina presentes en la cadena sentido son 2'-desoxi-2'fluoro nucleótidos de pirimidina y los nucleótidos de purina presentes en la región sentido son 2'-desoxi nucleótidos de purina. En otra realización, los nucleótidos de pirimidina presentes en la cadena sentido son 2'-desoxi-2'fluoro nucleótidos de pirimidina y los nucleótidos de purina presentes en la región sentido son 2'-O-etil nucleótidos de purina. En otra realización más, los nucleótidos de pirimidina presentes en la cadena antisentido son 2'-desoxi-2'-fluoro nucleótidos de pirimidina y cualesquiera nucleótidos de purina presentes en la cadena antisentido son 2'-desoxi nucleótidos de purina. En otra realización, la cadena antisentido comprende uno o más 2'-desoxi-2'-fluoro nucleótidos de pirimidina y uno o más 2'-O-metil nucleótidos de purina. En otra realización, los nucleótidos de pirimidina presentes en la cadena antisentido son 2'-desoxi-2'-fluoro nucleótidos de pirimidina y cualesquiera nucleótidos de purina presentes en la cadena antisentido son 2'-O-metil nucleótidos de purina. En una realización adicional, la cadena sentido comprende un extremo 3' y un extremo 5', en los que una fracción casquete terminal (por ejemplo, una fracción desoxibásica invertida o fracción desoxinucleotídica invertida tal como timidina invertida) está presente en el extremo 5’, el extremo 3’, o ambos de los extremos 5’ y 3’ de la cadena sentido. En otra realización, la cadena antisentido comprende un enlace internucleotídico fosforotioato en el extremo 3’ de la cadena antisentido. En otra realización, la cadena antisentido comprende una modificación de glicerilo en el extremo 3’. En otra realización, el extremo 5’ de la cadena antisentido opcionalmente incluye un grupo fosfato.

En cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente de una molécula de ácido nucleico interferente corto bicatenario (ANic) que inhibe la expresión de un gen de MAPT, en la que una mayoría de los nucleótidos de pirimidina presentes en la molécula de ANic bicatenaria comprenden una modificación de azúcar, cada una de las dos cadenas de la molécula de ANic puede comprender aproximadamente 21 nucleótidos. En una realización, aproximadamente 21 nucleótidos de cada cadena de la molécula de ANic están emparejados por bases a los nucleótidos complementarios de la otra cadena de la molécula de ANic. En otra realización, aproximadamente 19 nucleótidos de cada cadena de la molécula de ANic están emparejados por bases a los nucleótidos complementarios de la otra cadena de la molécula de ANic, en la que al menos dos nucleótidos 3' terminales de cada cadena de la molécula de ANic no están emparejados por bases a los nucleótidos de la otra cadena de la molécula de ANic. En otra realización, cada uno de los dos nucleótidos 3' terminales de cada fragmento de la molécula de ANic es una 2'-desoxi-pirimidina, tal como 2'-desoxi-timidina. En una realización, cada cadena de la molécula de ANic está emparejada por bases a los nucleótidos complementarios de la otra cadena de la molécula de

ANic. En una realización, aproximadamente 19 nucleótidos de la cadena antisentido están emparejados por bases a la secuencia de nucleótidos del ARN diana o una parte de la misma. En una realización, aproximadamente 21 nucleótidos de la cadena antisentido están emparejados por bases a la secuencia de nucleótidos del ARN diana o una parte de la misma.

En una realización, la invención presenta una composición que comprende una molécula de ARNip de la invención en un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

En un ejemplo no limitante, la introducción de nucleótidos modificados químicamente en moléculas de ácido nucleico proporciona una potente herramienta para superar potenciales limitaciones de estabilidad y biodisponibilidad in vivo inherentes a molécula de ARN nativas que se administran por vía exógena. Por ejemplo, el uso de moléculas de ácido nucleico modificadas químicamente puede permitir una dosis más baja de una molécula de ácido nucleico particular para un efecto terapéutico dado, puesto que las moléculas de ácido nucleico modificadas químicamente tienden a tener una semi-vida más larga en suero. Además, ciertas modificaciones químicas pueden mejorar la biodisponibilidad de moléculas de ácido nucleico dirigiéndose a células o tejidos particulares y/o mejorando la captación celular de la molécula de ácido nucleico. Por lo tanto, incluso si la actividad de una molécula de ácido nucleico modificada químicamente se reduce en comparación con una molécula de ácido nucleico nativa, por ejemplo, cuando se compara con una molécula de ácido nucleico toda de ARN, la actividad global de la molécula de ácido nucleico modificada puede ser mayor que la de la molécula nativa debido a estabilidad mejorada y/o administración de la molécula. A diferencia de ANic sin modificar nativo, el ANic modificado químicamente también puede minimizar la posibilidad de activar la actividad de interferón en seres humanos.

En cualquiera de las realizaciones de moléculas de ANic descritas en el presente documento, la región antisentido de una molécula de ANic de la invención puede comprender un enlace internucleotídico fosforotioato en el extremo 3’ de dicha región antisentido. En cualquiera de las realizaciones de moléculas de ANic descritas en el presente documento, la región antisentido puede comprender de aproximadamente uno a aproximadamente cinco enlaces internucleotídicos fosforotioato en el extremo 5’ de dicha región antisentido. En cualquiera de las realizaciones de moléculas de ANic descritas en el presente documento, los salientes nucleotídicos 3'-terminales de una molécula de ANic de la invención pueden comprender ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos que están químicamente modificados en un azúcar, base, o cadena principal de ácido nucleico. En cualquiera de las realizaciones de moléculas de ANic descritas en el presente documento, los salientes nucleotídicos 3'-terminales pueden comprender uno o más ribonucleótidos de base universal. En cualquiera de las realizaciones de moléculas de ANic descritas en el presente documento, los salientes nucleotídicos 3'-terminales pueden comprender uno o más nucleótidos acíclicos.

En otras realizaciones, las moléculas de ANic tienen extremos romos.

La invención abarca moléculas de ARNip que tienen 40 nucleótidos o menos y comprenden una secuencia de nucleótidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 1-160 de la figura 8. En una realización específica, el ANic tiene 21-30 nucleótidos de largo y comprende una cualquiera de las SEQ ID NO: 161-318 de la figura 8.

En una realización, la divulgación presenta un método de modulación de la expresión de un gen diana, preferentemente un gen expresado en el SNC, más preferentemente un gen de MAPT en un sujeto u organismo que comprende: (a) sintetizar una molécula de ANic de la invención, que puede estar químicamente modificada, en la que una de las cadenas de ANic comprende una secuencia complementaria al ARN del gen diana; y (b) introducir la molécula de ANic en el sujeto u organismo en condiciones adecuadas para modular la expresión del gen diana en el sujeto u organismo. El nivel de proteína o ARN diana puede determinarse usando diversos métodos bien conocidos en la técnica.

En otra realización, la invención presenta un método de modulación de la expresión de más de un gen diana, preferentemente genes expresados en el SNC, que más preferentemente incluyen al menos un gen de MAPT en un sujeto u organismo que comprende: (a) sintetizar moléculas de ANic de la invención, que pueden estar químicamente modificadas, en las que una de las cadenas de ANic comprende una secuencia complementaria al ARN de los genes diana; y (b) introducir las moléculas de ANic en el sujeto u organismo en condiciones adecuadas para modular la expresión de los genes diana en el sujeto u organismo. El nivel de proteína o ARN diana puede determinarse tal como se conoce en la técnica.

En una realización, la invención presenta un método para modular la expresión de un gen de MAPT dentro de una célula que comprende: (a) sintetizar una molécula de ANic de la invención, que puede estar modificada químicamente, en la que el ANic comprende una secuencia monocatenaria que tiene complementariedad al ARN del gen diana; y (b) introducir la molécula de ANic en una célula en condiciones adecuadas para modular la expresión del gen diana en la célula. En otra realización, la invención presenta un método para modular la expresión de más de un gen diana, preferentemente genes expresados en el SNC, que más preferentemente incluye al menos un gen de MAPT dentro de una célula que comprende: (a) sintetizar moléculas de ANic de la invención, que pueden estar modificadas químicamente, en la que el ANic comprende una secuencia monocatenaria que tiene complementariedad al ARN del gen diana; y (b) poner en contacto la célula in vitro o in vivo con la molécula de ANic

en condiciones adecuadas para modular la expresión de los genes diana en la célula.

Ensayos in vitro de dúplex de ARNip.

Para comprobar la especificidad de la interferencia por ARNip, pueden llevarse a cabo ensayos preliminares en cultivos celulares que expresan genes diana.

Básicamente, las células se incuban con los dúplex de ARNip correspondientes, seguidos por el análisis de los niveles de expresión génica. Para enlazar ARNip de expresión reducida a fenotipos específicos en células cultivadas, es necesario demostrar la disminución de la proteína diana o al menos demostrar la reducción del ARNm diana. Los niveles de ARNm del gen diana pueden cuantificarse mediante PCR en tiempo real (RT-PCR). Además, los niveles de proteína pueden determinarse de diversas maneras bien conocidas en la técnica, tales como análisis por transferencia de Western con antibióticos específicos para las diferentes dianas permiten monitorización directa de la reducción de la proteína diana.

Se introducen ARNip en células por medio de cualquier técnica de transfección bien conocida en la técnica. Una única transfección de dúplex de ARNip puede realizarse, por ejemplo, usando un lípido catiónico, tal como el reactivo Lipofectamine 2000 (Invitrogen), seguido por un ensayo de eficiencia de silenciación 24, 48 y 72 horas después de la transfección.

La eficiencia de la transfección puede depender del tipo de célula, pero también del número de pase y la confluencia de las células. El tiempo y la manera de formación de complejos ARNip-liposoma (por ejemplo inversión frente a agitación en vórtice) también son críticos. Bajas eficiencias de transfección son la causa más frecuente de silenciación sin éxito. Una buena transfección no es un asunto trivial y es necesario examinarla cuidadosamente para cada nueva línea celular a usar. La eficiencia de transfección puede ensayarse transfectando genes informadores, por ejemplo un plásmido de expresión de EGFP impulsado por CMV (por ejemplo de Clontech) o un plásmido de expresión de B-Gal, y a continuación evaluarse mediante contraste de fases y/o microscopia de fluorescencia al día siguiente.

Dependiendo de la abundancia y el periodo de vida (o renovación) de la proteína diana, un fenotipo de expresión reducida puede volverse evidente después de 1 a 3 días, o incluso después. En casos en los que no se observa ningún fenotipo, el agotamiento de la proteína puede observarse mediante inmunofluorescencia o transferencia de Western.

Formulaciones farmacéuticas y vías de administración.

La presente invención puede comprender la administración de una o más especies de molécula de ANic simultáneamente. Estas especies pueden seleccionarse para dirigirse a uno o más genes diana.

En una realización, un único tipo de ARNip se administra por vía intranasal en los métodos terapéuticos de la invención. En otra realización, un ARNip de la invención se administra en combinación con otro ARNip de la invención y/o con uno o más otros agentes terapéuticos no ANic útiles en el tratamiento, prevención o atención de una afección patológica del SNC. La expresión “en combinación con” no está limitada a la administración de agentes terapéuticos exactamente en el mismo momento, sino que, en su lugar, significa que el ANic de la invención y el otro agente se administran a un paciente en una secuencia y dentro de un intervalo de tiempo, de modo que el beneficio de la combinación es mayor que el beneficio si estos se administraran de otro modo. Por ejemplo, cada agente terapéutico puede administrarse al mismo tiempo o secuencialmente en cualquier orden en puntos en el tiempo diferentes; sin embargo, si no se administran al mismo tiempo, deben administrarse suficientemente cerca en el tiempo para proporcionar el efecto terapéutico deseado.

Cada agente terapéutico puede administrarse por separado, en cualquier forma apropiada y mediante cualquier vía adecuada.

Los ANic de la invención pueden formularse en composiciones farmacéuticas mediante cualquiera de las técnicas convencionales conocidas en la técnica (véase por ejemplo, Alfonso, G. et al., 1995, en: The Science and Practice of Pharmacy, Mack Publishing, Easton PA, 19ª ed.). Formulaciones que comprenden uno o más ANic para uso en los métodos de la invención pueden estar en numerosas formas, y pueden depender de los diversos factores específicos para cada paciente (por ejemplo, el tipo y la gravedad de trastorno, el tipo de ANic administrado, la edad, el peso corporal, la respuesta y los antecedentes médicos pasados del paciente), el número y el tipo de ANic en la formulación, la forma de la composición (por ejemplo, en forma líquida, semilíquida o sólida) y/o el régimen terapéutico (por ejemplo si el agente terapéutico se administra a lo largo del tiempo como una infusión lenta, una única embolada, una vez al día, varias veces al día o una vez cada pocos días).

Las moléculas de ANic de la invención y formulaciones o composiciones de las mismas pueden administrarse directamente o por vía tópica tal como se conoce en general en la técnica. Por ejemplo, una molécula de ANic puede comprender un vehículo de administración, que incluye liposomas, para administración a un sujeto. Portadores y

diluyentes y sus sales pueden estar presentes en formulaciones farmacéuticamente aceptables. Las moléculas de ácido nucleico pueden administrarse a células mediante diversos métodos conocidos por los expertos en la materia, incluyendo, aunque sin restringirse a, encapsulación en liposomas, mediante iontoforesis, o mediante incorporación en otros vehículos, tales como polímeros biodegradables, hidrogeles, ciclodextrinas ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) y microesferas de PLCA, nanocápsulas biodegradables, y microesferas bioadhesivas, o mediante vectores proteináceos. En otra realización, la moléculas de ácido nucleico de la invención también puede formularse o complejarse con polietilenimina y sus derivados, tales como derivados de polietilenimina-polietilenglicol-N-acetilgalactosamina (PEI-PEG-GAL) o polietilenimina-polietilenglicol-tri-N-acetilgalactosamina (PEI-PEG-triGAL).

Una molécula de ANic de la invención puede complejarse con agentes que destruyen la membrana y/o un lípido catiónico o molécula lipídica ayudante.

Los sistemas de administración que pueden usarse con la invención incluyen, por ejemplo, genes acuosos y no acuosos, cremas, emulsiones múltiples, microemulsiones, liposomas, pomadas, soluciones acuosas y no acuosas, lociones, aerosoles, bases y polvos de hidrocarburo, y pueden contener excipientes tales como solubilizantes, potenciadores de la penetración (por ejemplo, ácidos grasos, ésteres de ácido graso, alcoholes grasos y aminoácidos), y polímeros hidrófilos (por ejemplo, policarbofilo y polivinilpirrolidona). En una realización, el portador farmacéuticamente aceptable es un liposoma o un potenciador transdérmico.

Una formulación farmacéutica de la invención está en una forma adecuada para administración, por ejemplo, administración sistémica o local, a una célula o sujeto, que incluye por ejemplo un ser humano. Formas adecuadas dependen, en parte, del uso o la vía de entrada, por ejemplo oral, transdérmica, o por inyección. Otros factores son conocidos en la técnica, e incluyen consideraciones tales como toxicidad y formas que impiden que la composición o formulación ejerza su efecto.

La presente invención también incluye composiciones preparadas para almacenamiento o administración que incluyen una cantidad farmacéuticamente eficaz de los compuestos deseados en un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable. Portadores o diluyentes aceptables para uso terapéutico son bien conocidos en la técnica farmacéutica. Por ejemplo, pueden proporcionarse conservantes, estabilizantes, colorantes y agentes aromatizantes. Estos incluyen benzoato sódico, ácido sórbico y ésteres de ácido p-hidroxibenzoico. Además, pueden usarse antioxidantes y agentes de suspensión.

Una dosis farmacéuticamente eficaz es esa dosis requerida para prevenir, inhibir la aparición o tratar (aliviar un síntoma en cierta medida, preferentemente todos los síntomas) de una patología. La dosis farmacéuticamente eficaz depende del tipo de enfermedad, la composición usada, la vía de administración, el tipo de mamífero que está siendo tratado, las características físicas del mamífero específico en consideración, medicamentos concurrentes, y otros factores que reconocerán los expertos en la materia médica.

Las formulaciones de la invención pueden administrarse en formulaciones de dosis unitaria que contienen portadores, adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables no tóxicos convencionales. Las formulaciones para uso oral también pueden presentarse como cápsulas de gelatina dura en las que el ingrediente activo se mezcla con un diluyente sólido inerte, por ejemplo, carbonato cálcico, fosfato cálcico o caolín, o como cápsulas de gelatina blanda en las que el ingrediente activo se mezcla con agua o un medio oleoso, por ejemplo aceite de cacahuete, parafina líquida o aceite de oliva.

Las suspensiones acuosas contienen los materiales activos en una mezcla con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas. Dichos excipientes son agentes de suspensión, por ejemplo carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, hidropropil-metilcelulosa, alginato sódico, polivinilpirrolidona, goma tragacanto y goma arábiga; agentes dispersantes o humectantes puede ser un fosfátido de origen natural, por ejemplo, lecitina, o productos de condensación de un óxido de alquileno con ácidos grasos, por ejemplo estearato de polioxietileno, o productos de condensación de óxido de etileno con alcoholes alifáticos de cadena larga, por ejemplo heptadecaetilenoxicetanol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y un hexitol, tales como monooleato de polioxietilensorbitol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo monooleato de polietilensorbitán. Las suspensiones acuosas también pueden contener uno o más conservantes, por ejemplo p-hidroxibenzoato de etilo, o n-propilo, uno o más agentes colorantes, uno o más agentes aromatizantes, y uno o más agentes edulcorantes, tales como sacarosa o sacarina.

Las suspensiones oleosas se pueden formular suspendiendo los ingredientes activos en un aceite vegetal, por ejemplo aceite de cacahuete, aceite de oliva, aceite de sésamo o aceite de coco, o en un aceite mineral tal como parafina líquida. Las suspensiones oleosas pueden contener un agente espesante, por ejemplo cera de abejas, parafina dura o alcohol cetílico. Estas composiciones se pueden conservar mediante la adición de un antioxidante, tal como ácido ascórbico.

Los polvos y gránulos dispersables adecuados para la preparación de una suspensión acuosa mediante la adición de agua proporcionan el ingrediente activo en mezcla con un agente dispersante o humectante, agente de

suspensión y uno o más conservantes. Los agentes dispersantes o humectantes o agentes de suspensión se ejemplifican mediante los ya mencionados anteriormente. Excipientes adicionales, por ejemplo edulcorantes, aromatizantes y agentes colorantes, también pueden estar presentes.

Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden estar en forma de emulsiones de aceite en agua. La fase oleosa puede ser un aceite vegetal o un aceite mineral o mezclas de estos. Los agentes emulsionantes adecuados pueden ser gomas de origen natural, por ejemplo goma arábiga o goma tragacanto, fosfátidos de origen natural, por ejemplo soja, lecitina, y ésteres o ésteres parciales derivados de ácidos grasos y hexitol, anhídridos, por ejemplo monooleato de sorbitán, y productos de condensación de dichos ésteres parciales con óxido de etileno, por ejemplo monooleato de polioxietilensorbitán. Las emulsiones también pueden contener agentes edulcorantes y aromatizantes.

Esta suspensión se puede formular según la técnica conocida usando aquellos agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados que se han mencionado anteriormente.

Una preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable no tóxico, por ejemplo como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse están agua, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro sódico. Además, los aceites no volátiles estériles se emplean convencionalmente como medio disolvente o de suspensión. Para este fin, cualquier aceite no volátil suave puede ser empleado incluyendo mono- o diglicéridos sintéticos. Además, los ácidos grasos tales como ácido oleico encuentran uso en la preparación de inyectables.

Las moléculas de ácido nucleico de la presente invención también pueden administrarse a un sujeto en combinación con otros compuestos terapéuticos para incrementar el efecto terapéutico global. El uso de múltiples compuestos para tratar una indicación puede incrementar los efectos beneficiosos al tiempo que reduce la presencia de efectos secundarios.

Como alternativa, ciertas moléculas de ANic de la invención pueden expresarse dentro de células de promotores eucariotas. Vectores recombinantes capaces de expresar las moléculas de ANic pueden administrarse y persistir en células diana. Como alternativa, pueden usarse vectores que permiten la expresión transitoria de moléculas de ácido nucleico. Dichos vectores pueden administrarse repetidamente según sea necesario. Una vez expresada, la molécula de ANic interactúa con el ARNm diana y genera una respuesta de iARN. La administración de vectores que expresan la molécula de ANic puede ser sistémica, tal como mediante administración intravenosa o intramuscular, mediante administración a células diana explantadas a partir de un sujeto seguido por la reintroducción en el sujeto, o mediante cualesquiera otros medios que permitirían la introducción en la célula diana deseada.

Administración intranasal de ANic.

Se llevaron a cabo estudios de administración intranasal de ANic en ratones GFP C57BL/6-TG (ACTB-EGFP). Esta línea de ratón transgénica se adquirió del “The Jackson Laboratory”. Se han usado ratones transgénicos debido a que ratones homocigóticos para este transgén mueren dentro de las primeras dos semanas después del nacimiento. La línea de ratón transgénica con un ADNc de GFP (EGFP) “mejorado” bajo el control de un promotor de beta-actina de pollo y un potenciador de citomegalovirus hace que todos los tejidos, con la excepción de eritrocitos y cabello, aparezcan verdes con luz de excitación. Esta estirpe se generó en ratones C57BL/6. El ADNc de la estirpe que codifica proteína verde fluorescente potenciada (EGFP) se adjuntó al promotor de beta actina de pollo y potenciador de citomegalovirus. Una señal de poliadenilación de globina bovina también se incluyó en la construcción. Los sitios de EcoRI incluidos en los cebadores de PCR se usaron para introducir ADNc de EGFP amplificado en un vector de expresión pCAGGS que contiene el promotor de beta actina de pollo y un potenciador de citomegalovirus, intrón de beta-actina y señal de poliadenilación de globina bovina. Todo el inserto con el promotor y la secuencia codificante se escindió con Bam-HI y SalI y se purificó con gel.

El ARNip usado para regular negativamente la expresión de ARNm de EGFP se dirigía a la siguiente secuencia en ARNm de EGFP (SEQ ID 319): 5'-GGC UAC GUC CAG GAG CGC ACC-3'. La cadena sentido del dúplex de ARNip era 5'-P GGC UAC GUC CAG CGC ACC-3' y la cadena antisentido era 5'-P U GCG CUC CUG GAC GUA GCC UU-3' (SEQ ID 320). El dúplex de ARNip usado en los experimentos descritos a continuación tenía dos salientes en 3' de nucleótidos de 2 timidina.

Protocolo del experimento

Para los experimentos de administración intranasal, se usaron ratones macho C57BL/6-TG (ACTB-EGFP) (8 semanas de edad). Se compararon ratones instilados por vía intranasal con ARNip diluido en NaCl al 0,9 % con ratones de control instilados con el vehículo (NaCl al 0,9 %). Los animales se anestesiaron con isofluorano y 20 μl de cada solución se introdujeron gota a gota en cada narina.

Diferentes dosis de ARNip frente a ARNm de EGFP (-/+ lípido de transfección) se administraron por vía intranasal en un volumen final de 20 μl. Los animales de control se trataron con el vehículo solo. En todos los casos, los animales

fueron sacrificados durante un intervalo de días después de la administración del fármaco para encontrar el momento óptimo para la interferencia.

Para el análisis tisular, los ratones se sacrificaron con CO_2 y los cerebros se diseccionaron rápidamente en una placa enfriada con hielo. Una mitad se procesó para transferencia de Western, mientras que la otra mitad se procesó para inmunohistoquímica.

Los tejidos de muestra se recogieron de diferentes zonas cerebrales y se analizaron mediante transferencia de Western y PCR en tiempo real. La expresión de GFP en las diferentes condiciones de tratamiento se midió con la ayuda de un programa Adobe Photoshop. Los niveles de inhibición se obtuvieron después de la normalización con respecto al gen de beta-actina, que se expresa de forma constitutiva en los diferentes tejidos.

Las condiciones experimentales se distribuyeron tal como se describe en la tabla 1 (las condiciones se analizaron por duplicado o triplicado). Los ratones tratados por vía intranasal con una dosis de 530 μg (40 nanomoles) del ARNip desnudo para GFP se nombraron como ratones 1, 2 y 3 y se sacrificaron a los 3 y 5 días después de la inoculación de ARNip. Otro grupo experimental (numerado como 4, 5, 6, 7, 8 y 9) consistía en animales tratados con dos dosis de 265 μg (20 nanomoles) de ARNip estabilizado y se sacrificaron a los 3, 5 y 8 días (tabla 1).

Las muestras de tejido se recogieron mediante dos métodos: uno en medio de lisis con tampón de proteínas y el otro en ARNlater (Ambion). Seguidamente, pequeños trozos de tejido se incluyeron en compuesto OCT para analizar la señal de inmunofluorescencia de la proteína GFP en el tejido. Todas las muestras se almacenaron a -80 °C hasta el procesamiento de datos.

Tabla 1: distribución esquemática de condiciones experimentales para administración intranasal de ARNip. Las dosis de ARNip se indican en la tabla.

Número de ratón	Tratamiento terapéutico intranasal
CI,CII,CIII	Dosis de control de vehículo
1,2,3	Dosis única de 530 μg de ARNip
4,5	Dosis única de 265 μg de ARNip sacrificado a los 3 días
6,7	Dosis única de 265 μg de ARNip sacrificado a los 5 días
8,9	Dosis única de 265 μg de ARNip sacrificado a los 8 días

Se prepararon extractos para análisis por transferencia de Western homogenizando las zonas del cerebro en tampón de extracción enfriado con hielo que consistía en HEPES 20 mM, pH 7,4, NaCl 100 mM, NaF 20 mM, Triton X-100 al 1 %, ortovanadato sódico 1 mM, EDTA 5 mM, ácido okadaico 1 μM e inhibidores de proteasa (PMSF 2 mM, 10 μg/ml de aprotinina, 10 μg/ml de leupeptina, y 10 μg/ml de pepstatina). Las muestras se homogeneizaron y centrifugaron a 15.000 x g durante 20 min a 4 °C. La proteína contenida en el sobrenadante fue determinada por Bradford. Treinta microgramos de proteína total se separaron mediante electroforesis en gel de dodecilsulfato sódico al 10%-poliacrilamida y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. El anticuerpo primario usado para detectar el transgén fue anticuerpo para EGFP (1/1000) (Sigma) y anti-β-actina (1/2500) (Sigma). Las membranas se incubaron con los anticuerpos a 4 °C durante una noche en leche deshidratada desnatada al 5 %. Un anticuerpo secundario de cabra anti-ratón (1/1000; Invitrogen, San Diego, CA) y reactivos de detección de ECL (Amersham Biosciences, Arlington Heights, IL) se usaron para inmunodetección. Los niveles de proteína se cuantificaron mediante densitometría y los valores de GFP se normalizaron con respecto a actina para corregir cualquier desviación en cantidades cargadas de proteína.

Los cerebros para inmunohistoquímica se fijaron en paraformaldehído al 4 % en tampón de Sorensen durante una noche y se crioprotegieron en solución de sacarosa al 30 %. Los cerebros se cortaron en secciones sagitales de treinta micrómetros en un microtomo de congelación (Leica, Nussloch, Alemania) y se recogieron en una solución crioprotectora que consistía en etilenglicol al 30 %, tampón de glicerol y fosfato al 26 %, pH 7,2. A continuación, se analizaron secciones de cerebro mediante microscopia por fluorescencia.

Tejidos aislados en ARNlater se almacenaron a -80 °C. El ARNlater se retiró antes de la extracción del ARN, debido a su densidad. El ARN se aísla con el reactivo Trizol (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se realiza tratamiento con ADNasa antes de la medición de la expresión de GFP mediante PCR cuantitativa.

La aplicación de ARNip se realiza a fin de determinar si tiene lugar la administración de ARNip al cerebro. Dado que el objetivo es determinar la regulación negativa del transcrito del gen de GFP, los niveles de fluorescencia se midieron después de la aplicación de ARNip. No se observaron efectos secundarios en los animales a lo largo de los protocolos del experimento.

Resultados

Modelo de administración in vivo al sistema nervioso central

Ejemplo 1.

La aplicación de ARNip se realizó a fin de determinar la administración intranasal de ARNip apropiada en el sistema nervioso central (SNC). Ratones tratados con 20 µl de NaCl (0,9 %) (control), o con 20 µl de ARNip a una concentración de 1 nmol/µl (ratón 1), 2 nmol/µl (ratón 2), o 2 nmol/µl + lípido de transfección TransIT-TKO (ratón 3), se sacrificaron 48 h después del tratamiento. No se observaron efectos secundarios en los animales durante los protocolos del experimento.

Muestras de diferentes regiones del SNC (corteza, hipocampo, estirado o bulbo), así como de diferentes tejidos (tráquea, pulmón, epitelio nasal, esófago) se extrajeron, y se analizaron adicionalmente mediante transferencia de Western con anticuerpos que reconocen específicamente GFP y la inmunofluorescencia, tal como se ha descrito anteriormente. Como control de carga, se usaron anticuerpos frente a beta-activa.

Los resultados de los niveles de inhibición de la expresión de GFP en diferentes regiones del SNC, después de la normalización con respecto a beta-actina, se presentan en la figura 1. Tal como puede observarse, el efecto inhibidor más elevado se obtuvo con la dosis de 2 nmol/µl, sin lípido de transfección. Además, se observó inhibición en diversos tejidos del SNC, incluyendo la corteza, hipocampo, cuerpo estriado y bulbo. Este resultado también se confirmó mediante PCR en tiempo real.

Ejemplo 2

Diferentes concentraciones y temporización de administración intranasal de ARNip se usaron en modelos en ratón de GFP. Los ratones tratados con 20 µl de NaCl (0,9 %) (control), o con 20 µl de ARNip a una concentración de 40 nmol o 20 nmol, se sacrificaron a los 3, 5 y 8 días después del tratamiento. No se observaron efectos secundarios en los animales durante los protocolos del experimento.

Muestras de diferentes regiones del SNC (corteza, hipocampo, cuerpo estriado, cerebelo, tronco del encéfalo o bulbo) se extrajeron, y se analizaron adicionalmente por medio de transferencia de Western e inmunofluorescencia con anticuerpos que reconocen específicamente GFP. Como control de carga, se usaron anticuerpos frente a beta-activa.

Los resultados de los niveles de inhibición de la expresión de GFP en diferentes regiones del SNC, después de la normalización respecto a beta-actina, se presentan en la figura 2. Tal como puede observarse, el efecto inhibidor dependía de la zona cerebral. La silenciación máxima de GFP se observó en la corteza, el hipocampo, el cuerpo estriado y el bulbo. Los resultados de los experimentos de transferencia de Western se confirmaron mediante PCR cuantitativa (figura 3). En la figura 3, la regulación negativa de los niveles de ARNm de GFP se analizó en la corteza y el cuerpo estriado y se observó una clara reducción de estos niveles en condiciones de ratón 8 y 9.

Ejemplo 3. Ensayo de dúplex de ARNip de MAPT in vitro.

Para comprobar la especificidad del ARNip, se analizó la interferencia de MAPT (proteína tau asociada a los microtúbulos) en cultivos de células que expresan MAPT. Las células usadas para estos experimentos fueron células MDA-MB-435 humanas. Los niveles de ARNm de MAPT se analizaron después de incubación con los dúplex de ARNip correspondientes. Para unir ARNip con expresión reducida a fenotipos específicos en células cultivadas, es necesario demostrar la disminución de la proteína diana o al menos demostrar la reducción del ARNm diana.

Transfección de dúplex de ARNip en cultivos celulares

En la técnica son bien conocidos varios ejemplos de técnicas para transfección de ARNip. La transfección de dúplex de ARNip consiste en una única transfección de dúplex de ARNip usando un lípido catiónico, tal como reactivo Lipofectamine 2000 (Invitrogen) y realizando una lectura para silenciación 24, 48 y 72 horas después de la transfección.

Un protocolo de transfección típico puede realizarse de la siguiente manera: para un pocillo de una placa de 6 pocillos, se transfectan usando 100 nM para células MDA-MB-435 humanas como concentración final de ARNip. Siguiendo el protocolo del reactivo Lipofectamine 2000, el día antes de la transfección, se siembran 2-4 x 10^5 células por pocillo en 3 ml de un medio de cultivo apropiado, que contenía DMEM, suero al 10 %, antibióticos y glutamina, y se incuban las células en condiciones de cultivo normales (37 °C y 5 % de CO_2). El día de la transfección, las células tienen que estar el 30-50 % de confluencia. Se diluyen 12,5 µl de dúplex de ARNip 20 µM (correspondiente a una concentración final de 100 nM) o 25 µl de dúplex de ARNip 20 µM (correspondiente a una concentración final de 200 nM) en 250 µl de DMEM y se mezclan. Además, 6 µl de Lipofectamine 2000 se diluyen en 250 µl de DMEM y se

mezclan. Después de 5 minutos de incubación a temperatura ambiente, el oligómero diluido (dúplex de ARNip) y el Lipofectamine diluido se combinan para permitir la formación del complejo durante 20 minutos de incubación a temperatura ambiente. Seguidamente, se añaden los complejos gota a gota sobre las células con 2 ml de medio de cultivo fresco bajo en anticuerpos y se mezcla suavemente agitando la placa atrás y adelante, para garantizar la distribución uniforme de los complejos de transfección. Se incuban las células en sus condiciones de cultivo normales y el día después, los complejos se retiran y se añade medio de cultivo fresco y completo. Para monitorizar la silenciación de genes, las células re recogen a las 24, 48 y 72 h postransfección.

La eficiencia de la transfección puede depender del tipo de célula, pero también del número de pase y la confluencia de las células. El tiempo y la manera de formación de complejos ARNip-liposoma (por ejemplo inversión frente a agitación en vórtice) también son críticos. Bajas eficiencias de transfección son la causa más frecuente de silenciación sin éxito. Una buena transfección no es un asunto trivial y es necesario examinarla cuidadosamente para cada nueva línea celular a usar. La eficiencia de transfección puede ensayarse transfectando genes informadores, por ejemplo un plásmido de expresión de EGFP impulsada por CMV (por ejemplo de Clontech) o un plásmido de expresión de B-Gal, y a continuación evaluarse mediante contraste de fases y/o microscopia de fluorescencia al día siguiente.

Dependiendo de la abundancia y el periodo de vida (o renovación) de la proteína diana, un fenotipo de expresión reducida puede volverse evidente después de 1 a 3 días, o incluso después. En casos en los que no se observa ningún fenotipo, el agotamiento de la proteína puede observarse mediante inmunofluorescencia o transferencia de Western.

Después de las transfecciones, las fracciones de ARN total extraídas de células se pretrataron con ADNasa I y se usaron para transcripción inversa usando un cebador aleatorio. Se amplificaron por PCR con un par de cebadores específico que cubre al menos una unión exón-exón a fin de controlar la amplificación de pre-ARNm. La RT/PCR de un ARNm no diana también es necesaria como control. El agotamiento eficaz del ARNm aunque una reducción indetectable de la proteína diana puede indicar que un gran reservorio de proteína estable puede existir en la célula. Como alternativa, puede usarse amplificación por PCR en tiempo real para ensayar de manera más precisa la disminución desaparición del ARNm. La PCR cuantitativa monitoriza la fluorescencia emitida durante la reacción como indicador de la producción de amplicones durante cada ciclo de PCR. Esta señal se incrementa en proporción directa a la cantidad de producto de PCR en una reacción. Registrando la cantidad de emisión de fluorescencia en cada ciclo, es posible monitorizar la reacción de PCR durante la fase exponencial donde el primer incremento significativo en la cantidad de producto de PCR se correlaciona con la cantidad inicial de plantilla diana.

Para verificar el patrón de interferencia del gen MAPT expresado de forma diferencial en los cultivos celulares, se realizó qRT-PCR de acuerdo con el protocolo del fabricante (Applied Biosystems). Las condiciones de reacción se establecieron para el Applied Biosystems 7300 y se realizó una reacción de RT-PCR de una etapa. El volumen de reacción de 25 μl consiste en 2X SyBr green, transcriptasa inversa MultiscribeTM 6,25 U, inhibidor de ARNasa y 50 nM de cebadores directo e inverso mezclados con 100 ng del ARN plantilla. Se diseñaron cebadores específicos para MAPT y se analizó 18S como gen de mantenimiento. El cebador directo tenía la secuencia: AAGAGCCGCCTGCAGACA (SEQ ID NO 321) mientras que el cebador inverso tenía la secuencia GAGCCGATCTTGGACTTGACA (SEQ ID NO 322).

Se llevó a cabo transcripción inversa con una etapa inicial de 30' a 48 °C. Los parámetros de ciclado térmico fueron, 95 °C durante 10 min, 40 ciclos de 95 °C durante 15 s y 60 °C durante 1 min. Las curvas de disociación también se analizaron para comprobar la especificidad de amplificación. Los valores de ciclo umbral (Ct) de cada muestra se compararon con la muestra de control a las 24 h para determinar el porcentaje de regulación negativa de cada gen después de la transfección de ARNip.

A fin de evaluar la especificidad del producto de PCR amplificado, se realizó un análisis de la curva de fusión. Las curvas de fusión resultantes permiten la discriminación entre cebador-dímeros y el producto de PCR específico.

Ensayos in vitro para ARNip de MAPT.

Para determinar la inhibición de MAPT diana usando tecnología de iARN, la primera etapa fue realizar experimentos en cultivos celulares de MDA-MB-435. Estos ensayos se realizaron en dos partes. En primer lugar, ARNip diseñados contra las mutaciones de MAPT descritas en la figura 7 se transfectaron. Seguidamente, ARNip contra MAPT de tipo silvestre se diseñaron y se analizó la regulación negativa de MAPT después de la transfección. La figura 4 muestra resultados representativos de experimentos de PCR cuantitativa para algunas de las mutaciones de MAPT descritos previamente en la figura 7. La figura 8 muestra las secuencias diana en MAPT (SEQ ID NO 1-160) contra las cuales se diseñaron ANic. Los dúplex de ANic se dan como SEQ ID NO 161-318.

Se analizaron ARNip diseñados contra las mutaciones MAPT P301L (región diana dada como Seq ID 159) y MAPT R406W (región diana dada como Seq ID 160) para regular negativamente los niveles de ARNm de MAPT. Los valores mostrados en la figura 4 representan la media del porcentaje de interferencia por ARNip respecto a la expresión génica una vez normalizada con las células de control y sus desviaciones típicas. En comparación con las

células de control, el nivel del transcrito de MAPT a las 48 h se redujo en un 20 % después del tratamiento con ARNip Seq ID 159 (específico para MAPT P301L). Sin embargo, la reducción de MAPT tras la transfección con ARNip Seq ID 160 (específico para MAPT R406W) alcanzaba el 40 % respecto a los niveles de control.

En una segunda roda de experimentos, se diseñaron diferentes ARNip dirigidos a MAPT ts. Dado que MAPT tiene diferentes isoformas, se llevó a cabo un alineamiento de secuencias y se diseñaron ARNip para la región común. Los números de entrada de las secuencias de referencia de las isoformas de MAPT se enumeran como NM_005910, NM_016834, NM_016835 y NM_016841. Dos ARNip diferentes para MAPT ts, que corresponden a la Seq ID 128 y la Seq ID 139 se transfectaron en células MDA-MB-435. La figura 5 a continuación muestra resultados representativos de análisis por PCR cuantitativa. Los valores representan la media del porcentaje de interferencia por ARNip respecto a la expresión de cada gen una vez normalizada con las células de control y sus desviaciones típicas. En comparación con las células de control, el nivel de transcrito de MAPT a las 24, 48 o 72 h se redujo significativamente después del tratamiento con ARNip específico. El ARNip correspondiente a la Seq ID 128, redujo al transcrito de MAPT en un 70 %, siendo esta reducción muy sostenida durante 48 h y 72 h. El ARNip Seq ID 129 también alcanzó un muy buen nivel de regulación negativa de MAPT de aproximadamente el 60 % en comparación con las células transfectadas de forma simulada.

Ejemplo 4. Ensayo de dúplex de ARNip de MAPT in vivo.

A fin de proporcionar una prueba de concepto de la administración intranasal en un modelo patológico, MAPT implicada en demencia frontotemporal estaba regulada negativamente en un modelo en ratón transgénico para MAPT apropiado.

Descripción de la estirpe de ratón

Para la generación de ratones transgénicos para MAPT, un plásmido pSGT42 (Montejo de Garcini et al., 1994) que codifica una isoforma de tau de 4 repeticiones humana con dos exones N-terminales se usó como plantilla para introducir las mutaciones de DFTP-17, G272V y P301L por separado con el procedimiento Quikchange (Stratagene). Un ADNc de tau triple mutante se ensambló a continuación mediante ligamiento de los fragmentos de restricción SacII/AseI (que contenía la mutación G272V) y AseI/HindIII (que contenía la mutación P301L) en el plásmido pSGTR406W (Perez, M., Lim, F., Arrasate, M., y Avila, J. (2000). The DFTP-17-linked mutation R406W abolishes the interaction of phosphorylated tau with microtubules. J. Neurochem. 74: 2583-2589) previamente cortados con SacII/HindIII para dar origen al plásmido pSGTVLW. El marco abierto de lectura de tau mutante se escindió de pSGTVLW como un fragmento de BamHI/BglII y se ligó en el sitio de BamHI de PBKCMV (Stratagene) en la dirección directa con respecto al promotor de CMV para producir pBKVLW. El fragmento SalI/XhoI de pBKVLW se ligó a continuación en el sitio de XhoI de pTSC21k (Luthi et al., 1997) en la orientación directa con respecto al promotor de thy1. Se confirmó que el plásmido resultante pTTVLW codifica los tres cambios de aminoácido específicos G272V, P301L y R406W mediante secuenciación de la región de SacII-HindIII. Las secuencias de vectores se eliminaron mediante digestión con NotI y purificación en gel del fragmento grande, que se introdujo a continuación mediante inyección pronuclear en embriones CBA 3C57BL/6 de célula única. Ratones fundadores se identificaron mediante PCR y se cruzaron con ratones C57BL/6 de tipo silvestre. Todos los ratones transgénicos fueron heterocigotos. Los ratones se alojaron cuatro por jaula con alimento y agua disponible ad libitum y se mantuvieron en un entorno a temperatura controlada en un ciclo de luz-oscuridad de 12/12 h, con inicio de la luz a las 07:00 h. Se realizó cribado por PCR en ADN caudal usando los oligonucleótidos TT1, 5'-CTCTGCCCTCTGTTCTCTGG-3' (SEQ ID 323, en el exón 2 del gen thy1 murino); TT2, 5'-CCTGTCCCCCAACCCGTACG-3' (SEQ ID 324; en el extremo 59 del ADNc de tau humana); y THY, 5'-CGCTGATGGCTGGGTTCATG-3' (SEQ ID 325; en el intrón 2 del gen thy1 murino). Se usaron TT1 y TT2 para amplificar un producto de 470 pb específicamente a partir del transgén y no a partir de ADN murino endógeno, mientras que, como control interno para ADN, se usaron TT1 y THY para amplificar un producto de 450 pb específicamente a partir de ADN genómico murino pero no a partir del transgén. Los transgenes se expresaron de forma predominante en el hipocampo y la corteza frontotemporal.

Protocolo del experimento

Diferentes concentraciones y temporización de administración intranasal de ARNip se usaron en modelos en ratón transgénico para MAPT. Los ratones se trataron con 20 μl de NaCl (0,9 %) (control), o con 20 μl de ARNip a una concentración de 20 nmol.

Las condiciones del experimento se distribuyeron tal como se describe en la tabla 2 (las condiciones se analizaron por triplicado). Los ratones se trataron por vía intranasal con una o dos dosis del ARNip para MAPT (Seq ID 160) y se sacrificaron en momentos diferentes después de las inoculaciones de ARNip.

Tabla 2. Distribución esquemática de condiciones experimentales para administración intranasal de ARNip. Las dosis de ARNip se indican en la tabla.

Número de ratón	Tratamiento terapéutico intranasal
CI,CII,CIII	Dosis de control de vehículo
1,2,3	Dosis única de 265 μg de ARNip sacrificado a los 3 días
4,5,6	Dosis única de 265 μg de ARNip sacrificado a los 5 días
7,8,9	Dosis única de 265 μg de ARNip sacrificado a los 7 días
10,11	Dos doses de 132 μg de ARNip sacrificado a los 8 días

Muestras de diferentes regiones del SNC (corteza, hipocampo, cuerpo estriado, cerebelo, tronco del encéfalo o bulbo) se extrajeron, y se analizaron adicionalmente mediante transferencia de Western, inmunofluorescencia y PCR cualitativa. Se emplearon anticuerpos que reconocen específicamente la MAPT humana mutada. Como control de carga, se usaron anticuerpos frente a beta-activa. La expresión de MAPT en las diferentes condiciones de tratamiento se midió con ayuda de un programa Adobe Photoshop. Los niveles de inhibición se obtuvieron después de la normalización con respecto al gen de beta-actina, que se expresa de forma constitutiva en los diferentes tejidos.

Los resultados de los niveles de inhibición de la expresión de MAPT en diferentes regiones del SNC, después de la normalización con respecto a beta-actina, se presentan en la figura 6. Tal como puede observarse, el efecto inhibidor sobre la expresión de MAPT se observó en el hipocampo donde la proteína transgénica se expresó a niveles elevados. Las condiciones de los animales en las que la regulación negativa de la expresión génica era la más elevada correspondían a los animales sacrificados a los 7 días después de la instilación de ARNip. Los resultados de los experimentos de transferencia de Western se confirmaron mediante PCR cuantitativa.

REFERENCIAS

Akashi H, Miyagishi M, Taira K. Suppression of gene expression by RNA interference in cultured plant cells. Antisense Nucleic Acid Drug Dev, 2001, 11(6): 359-67.

Banerjee D, Slack F. Control of developmental timing by small temporal RNAs: a paradigm for RNA-mediated regulation of gene expression. Bioessays, 2002, 24(2): 119-29.

Bosher JM, Labouesse M. RNA interference: genetic wand and genetic watchdog. Nat Cell Biol, 2000, 2(2): E31-6.

Caplen, N.J., Parrish, S., Imani, F., Fire, A. y Morgan, R.A. Specific inhibition of gene expression by small double stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos, 2001, 98: 9742-9747.

Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. Genes Dev, 2001, 15(2): 188-200.

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double stranded RNA in Caenorhabditis elegans. Nature, 1998, 391(6669): 806-11.

Gil J, Esteban M. Induction of apoptosis by the dsRNA-dependent protein kinase (PKR): mechanism of action. Apoptosis, 2000, 5(2): 107-14.

Grosshans H, Slack FJ. Micro-RNAs: small is plentiful. J Cell Biol, 2002, 156(1): 17-21.

Hardy, J y Selkoe, D. J. The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics. Science, 2002; Vol. 297. no. 5580, págs. 353 356.

Houlden, H., Baker, M., Morris, H.R., et al. Corticobasal degeneration and progressive supranuclear palsy share a common tau haplotype. Neurology, 2001; 56: 1702 - 1706.

Hutton, M., Lendon, C. L., Rizzu P., et al. Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia DFTP-17. Nature, 1998; 393: 702-705.

Krutzfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M, Stoffel M. Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. Nature 2005, 438(7068): 685-9.

Lee VM, Goedert M, Trojanowski JQ. Neurodegenerative tauopathies. Annu Rev Neurosci., 2001; 24: 1121-59.

Lewis, J., Dickson, D. W., Lin, W., et al. Enhanced Neurofibrillary Degeneration in Transgenic Mice Expressing Mutant Tau and APP. Science, 2001; 293. n.º 5534, págs. 1487 - 1491.

Miller VM, Gouvion CM, Davidson BL, Paulson HL. Targeting Alzheimer's disease genes with RNA interference: an efficient strategy for silencing mutant alleles. Nucleic Acids Res., 30 de enero de 2004; 32(2): 661-8.

Miller VM, Xia H, Marrs GL, Gouvion CM, Lee G, Davidson BL, Paulson HL. Allele-specific silencing of dominant disease genes. Proc Natl Acad Sci Estados Unidos, 10 de junio de 2003; 100(12): 7195-200.

Mullan M, Crawford F, Axelman K, Houlden H, Lilius L, Winblad B, Lannfelt L. A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. Nat Genet., agosto de 1992; 1(5): 345-7.

Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kayed R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla FM. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. Neuron, 2003; 39(3): 409-21.

Paddison PJ, Caudy AA, Bernstein E, Hannon GJ, Conklin DS. Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. Genes Dev, 2002, 16(8): 948-58.

Poorkaj P, Bird TD, Wijsman E, Nemens E, Garruto RM, Anderson L, Andreadis A, Wiederholt WC, Raskind M, Schellenberg GD. Tau is a candidate gene for chromosome 17 frontotemporal dementia. Ann Neurol., junio de 1998; 43(6): 815-25.

Tuschl T, Zamore PD, Lehmann R, Bartel DP, Sharp PA. Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. Genes Dev., 1999; 13(24): 3191-7.

Wianny F, Zernicka-Goetz M. Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development. Nat Cell Biol., 2000, 2(2): 70-5.

Williams BR. Role of the double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR) in cell regulation. Biochem Soc Trans, 1997, 25(2): 509-13.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un ARNip, que causa interferencia por ARN en el gen de tau en el sistema nervioso central (SNC), en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno neurodegenerativo del SNC asociado a expresión anómala de tau, en donde el medicamento está formulado para administración intranasal, y en donde el ARNip está dirigido contra una secuencia de nucleótidos seleccionada entre las SEQ ID NO: 1 a 160 de la figura 8 o en donde el ARNip tiene una secuencia seleccionada entre las SEQ ID NO 161 a 318 de la figura 9.

2. El uso de la reivindicación 1, en donde el trastorno es una enfermedad congénita asociada a mutaciones de un gen de tau del SNC.

3. El uso de la reivindicación 1, en donde la expresión del gen de tau es modulada en una célula del SNC.

4. El uso de cualquier reivindicación anterior, en donde el ARNip comprende un oligonucleótido modificado.

5. El uso de cualquier reivindicación anterior, en donde el ARNip tiene 40 pares de bases o menos de longitud.

6. El uso de cualquier reivindicación anterior, en donde el ARNip tiene salientes 3'.

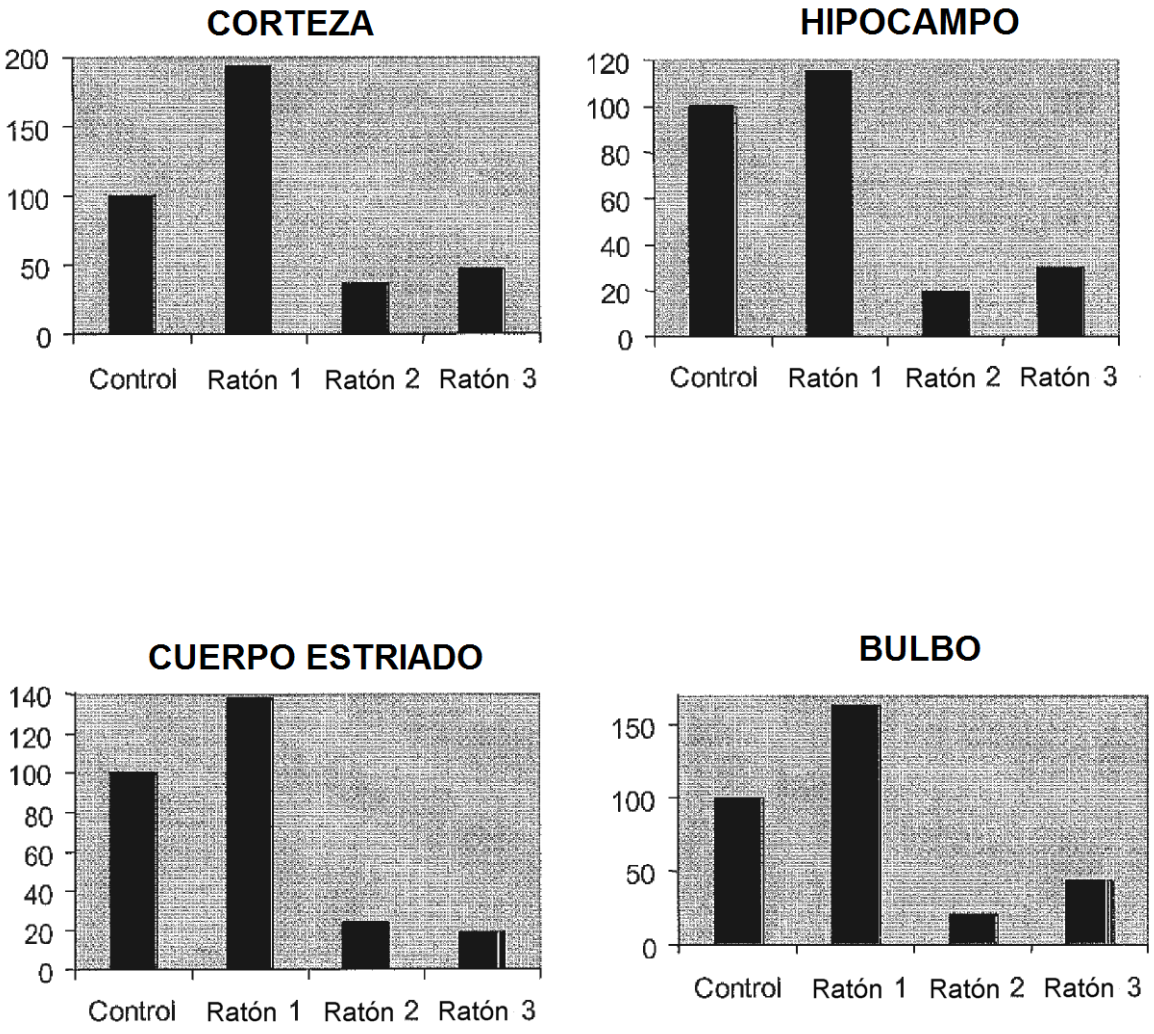
7. El uso de la reivindicación 6, en donde los salientes 3' son dinucleótidos de timidina.

8. El uso de cualquier reivindicación anterior, en donde se usan una pluralidad de especies de ARNip.

9. El uso de la reivindicación 8, en donde dicha pluralidad de especies están dirigidas a la misma especie de ARNm o a especies de ARNm diferentes.

10. Una composición farmacéutica, que comprende uno o una pluralidad de un ARNip que causa interferencia por ARN en el gen de tau en el sistema nervioso central (SNC), en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno neurodegenerativo del SNC asociado a expresión anómala de tau, en donde el medicamento está formulado para administración intranasal, y en donde el ARNip está dirigido contra una secuencia de nucleótidos seleccionada entre las SEQ ID NO: 1 a 160 de la figura 8 o en el que el ARNip tiene una secuencia seleccionada entre las SEQ ID NO 161 a 318 de la figura 9.

Fig. 1


CORTEZA
200
150
100
50
0
Control
Ratón 1
Ratón 2
Ratón 3
HIPOCAMPO
120
100
80
60
40
20
0
Control
Ratón 1
Ratón 2
Ratón 3
CUERPO ESTRIADO
140
120
100
80
60
40
20
0
Control
Ratón 1
Ratón 2
Ratón 3
BULBO
150
100
50
0
Control
Ratón 1
Ratón 2
Ratón 3

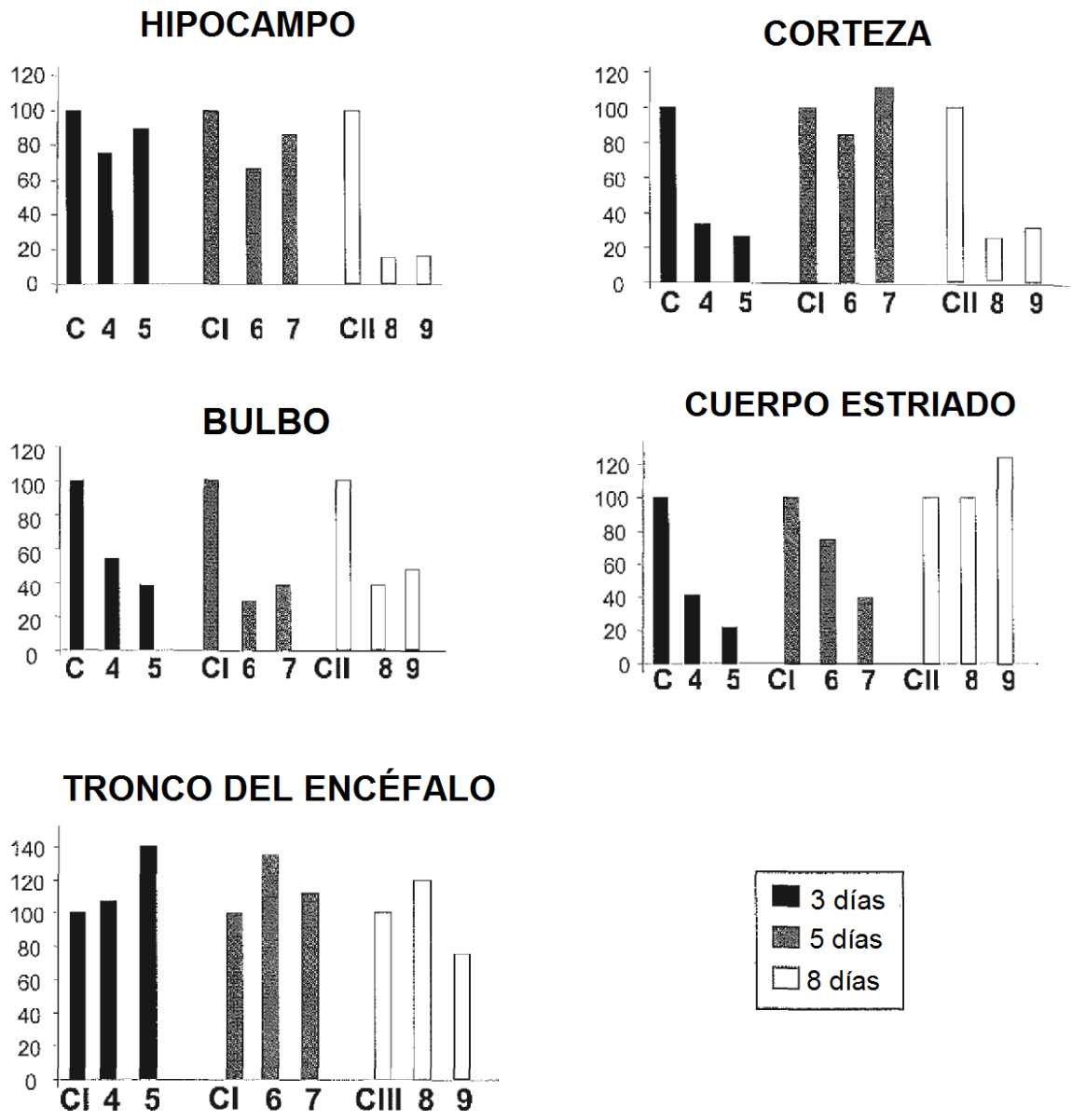

HIPOCAMPO
120
100
80
60
40
20
0
C 4 5 CI 6 7 CII 8 9
CORTEZA
120
100
80
60
40
20
0
C 4 5 CI 6 7 CII 8 9
BULBO
120
100
80
60
40
20
0
C 4 5 CI 6 7 CII 8 9
CUERPO ESTRIADO
120
100
80
60
40
20
0
C 4 5 CI 6 7 CII 8 9
TRONCO DEL ENCÉFALO
140
120
100
80
60
40
20
0
CI 4 5 CI 6 7 CIII 8 9
3 días
5 días
8 días

Fig. 2

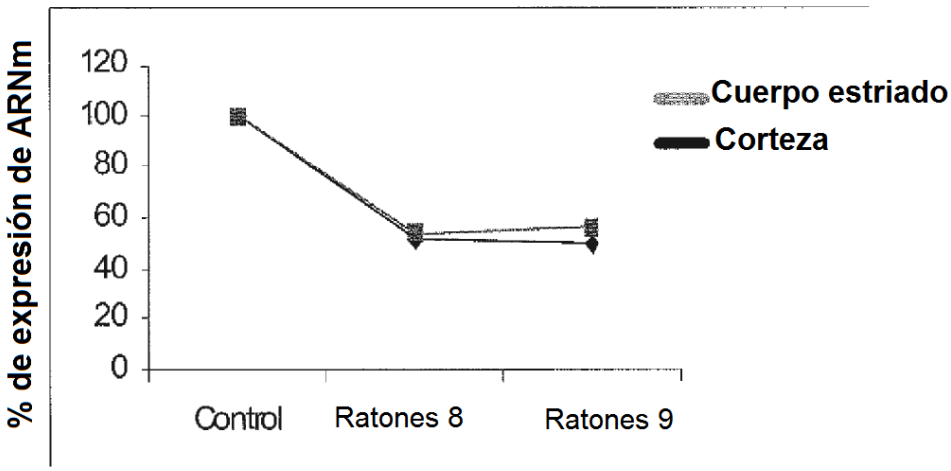

% de expresión de ARNm
120
100
80
60
40
20
0
Control
Ratones 8
Ratones 9
Cuerpo estriado
Corteza

Fig. 3

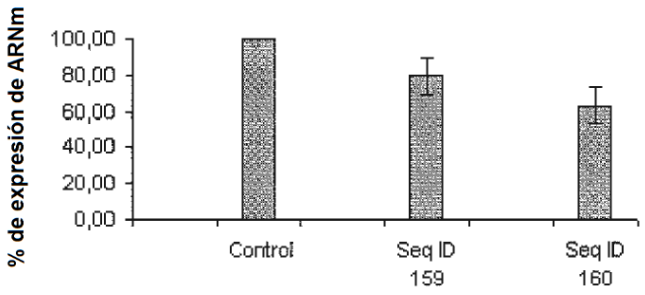

% de expresión de ARNm
100,00
80,00
60,00
40,00
20,00
0,00
Control
Seq ID 159
Seq ID 160

Fig. 4

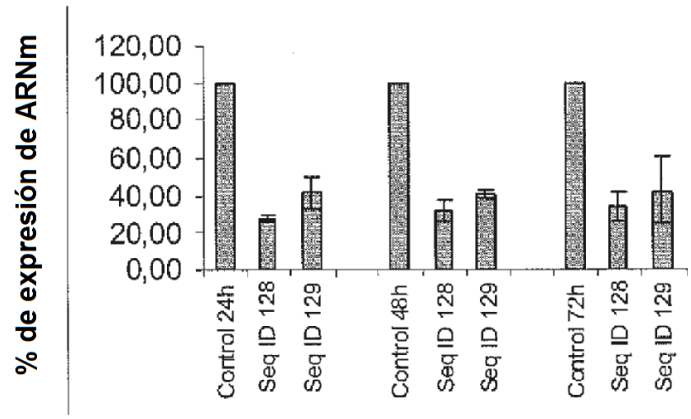

% de expresión de ARNm
120,00
100,00
80,00
60,00
40,00
20,00
0,00
Control 24h
Seq ID 128
Seq ID 129
Control 48h
Seq ID 128
Seq ID 129
Control 72h
Seq ID 128
Seq ID 129

Fig. 5

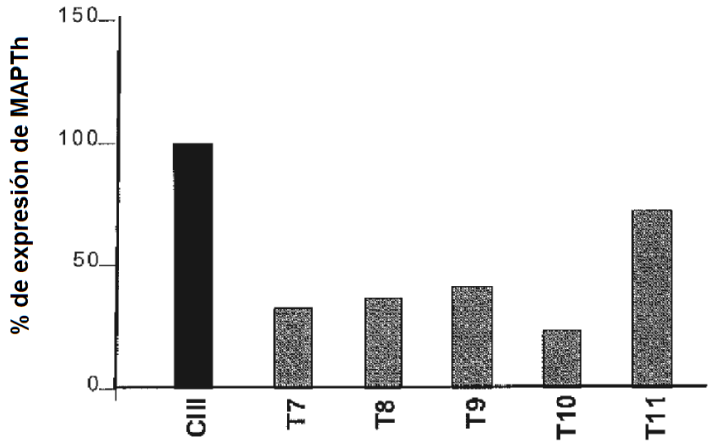

% de expresión de MAPTh
150
100
50
0
CIII
T7
T8
T9
T10
T11

Fig. 6

Fig. 7

Sentido erróneo/Sin sentido

Número de entrada	Cambio de codones	Cambio de aminoácidos	Número de codón	Fenotipo
CM020737	CGC-CAC	Arg-His	5	Demencia frontotemporal
CM022222	CGC-CTC	Arg-Leu	5	Paralisis supranuclear progresiva
CM003942	AAG-ACG	Lys-Thr	257	Demencia frontotemporal con parkinsonismo
CM014799	gATC-GTC	Ile-Val	260	Demencia frontotemporal con parkinsonismo
CM030233	cCTG-GTG	Leu-Val	266	Demencia frontotemporal
CM981233	GGC-GTC	Gly-Val	272	Demencia frontotemporal con parkinsonismo
CM981234	AATa-AAG	Asn-Lys	279	Demencia frontotemporal con parkinsonismo
CM014584	tAAT-CAT	Asn-His	296	Demencia frontotemporal con parkinsonismo
CM993836	cCCG-TCG	Pro-Ser	301	Demencia frontotemporal/ degeneración corticobasal
CM981235	CCG-CTG	Pro-Leu	301	Demencia frontotemporal con parkinsonismo
CM992927	AGT-AAT	Ser-Asn	305	Demencia frontotemporal
CM032951	CTG-CGG	Leu-Arg	315	Demencia frontotemporal
CM043764	AAG-ATG	Lys-Met	317	Demencia frontotemporal con parkinsonismo
CM020738	TCC-TTC	Ser-Phe	320	Demencia frontotemporal
CM042738	CAG-CGG	Gln-Arg	336	Demencia frontotemporal
CM981236	gGTG-ATG	Val-Met	337	Demencia frontotemporal con parkinsonismo
CM003156	GAG-GTG	Glu-Val	342	Demencia frontotemporal
CM034824	TCG-TTG	Ser-Leu	352	Insuficiencia respiratoria
CM013000	AAA-ATA	Lys-Ile	369	Demencia frontotemporal con parkinsonismo
CM004888	cGGG-AGG	Gly-Arg	389	Demencia frontotemporal
CM994385	cGGG-CGG	Gly-Arg	389	Demencia frontotemporal
CM981237	aCGG-TGG	Arg-Trp	406	Demencia frontotemporal con parkinsonismo
CM043765	ACG-ATG	Thr-Met	427	Demencia frontotemporal

Corte y empalme

Número de entrada	IVS	Donador/ aceptor	Ubicación	Sustitución	Fenotipo
CS991445	9	ds	+33	G-A	Demencia frontotemporal
CS034626	9	as	-177	C-T	Demencia frontotemporal

					asociación con
CS994525	10	ds	-64	T-C	Demencia frontotemporal con parkinsonismo
CS003183	10	ds	-28	T-C	Demencia frontotemporal/ degeneración corticobasal
CS004157	10	ds	-1	T-C	Paralisis supranuclear progresiva
CS982264	10	ds	+3	G-A	Demencia frontotemporal con parkinsonismo
CS012211	10	ds	+11	T-C	Demencia frontotemporal con parkinsonismo
CS000864	10	ds	+12	C-T	Demencia frontotemporal
CS982261	10	ds	+13	A-G	Demencia frontotemporal con parkinsonismo
CS982262	10	ds	+14	C-T	Demencia frontotemporal con parkinsonismo
CS982263	10	ds	+16	C-T	Demencia frontotemporal con parkinsonismo
CS033125	10	ds	+19	C-G	Demencia frontotemporal
CS033126	10	ds	+29	G-A	Demencia frontotemporal
CS000463	11	ds	+34	A-G	Enfermedad de Alzheimer, riesgo incrementado, asociación

Regulador

Número de entrada	**Sequence**	**Fenotipo**
CR994768	CCCGAAGGAGGACACCCACCCCCACAACGA(G-C)ACAAAGACTCCAACTACAGGAGGTGGAGAA -266 con respecto al sitio de inicio de la transcripción	Paralisis supranuclear progresiva, asociación con

Deleciones pequeñas

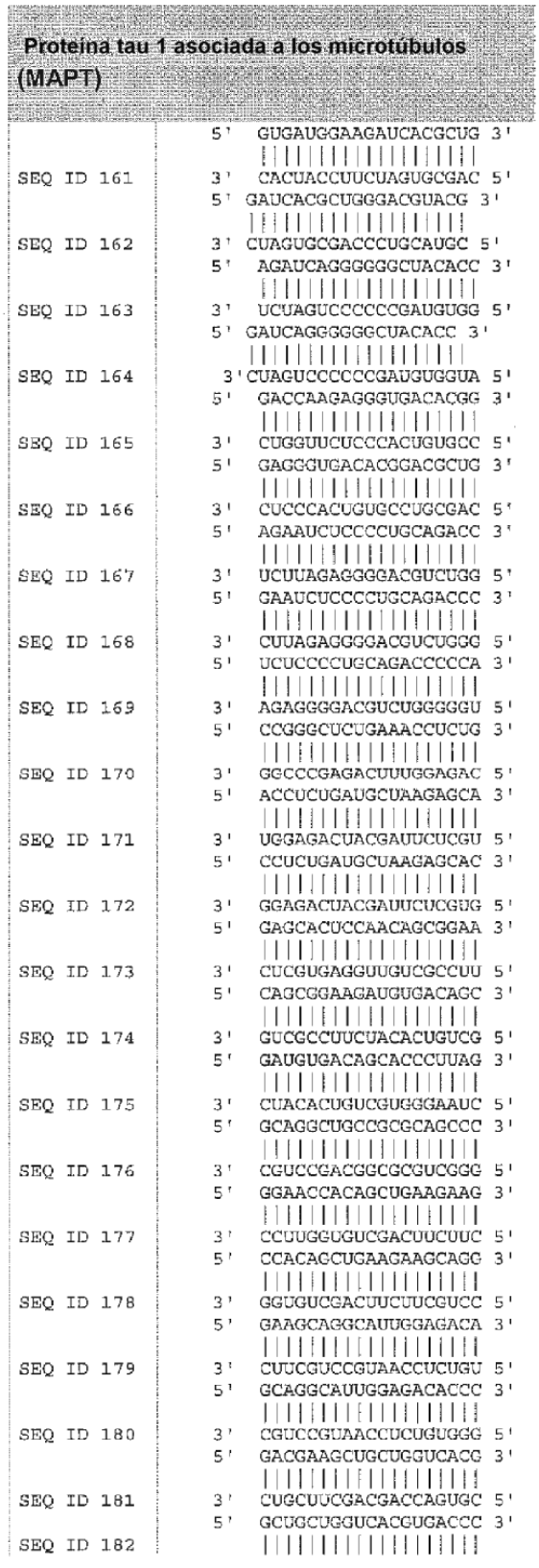
Número de entrada	**Deleción**	**Codón**	**Fenotipo**
CD991787	GATAATT^AATaagAAGCTGGATC	279	Demencia frontotemporal
CD013179	CTCAAAG^GATaatATCAAACACG	295	Demencia frontotemporal con parkinsonismo

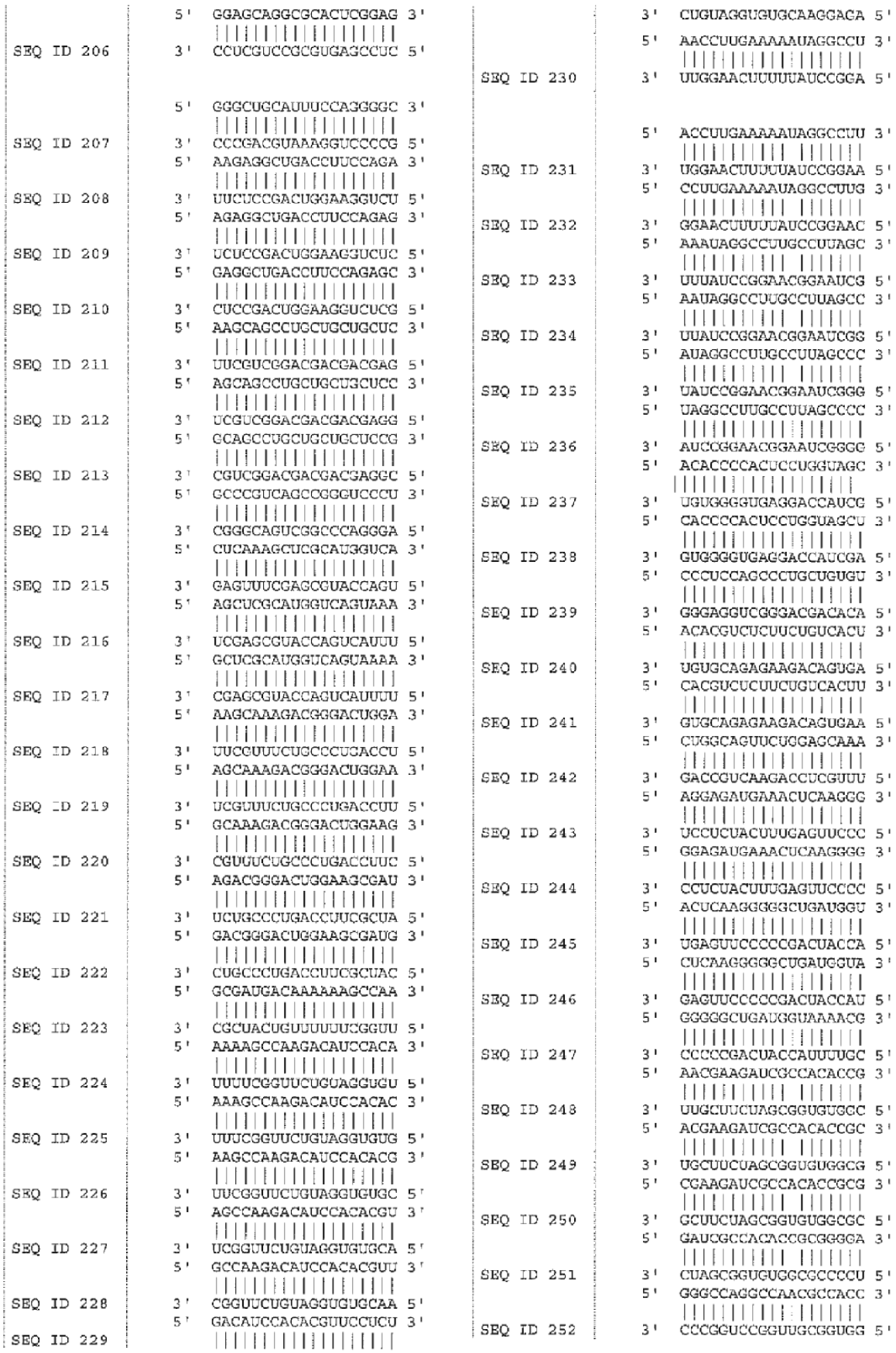
Fig. 8

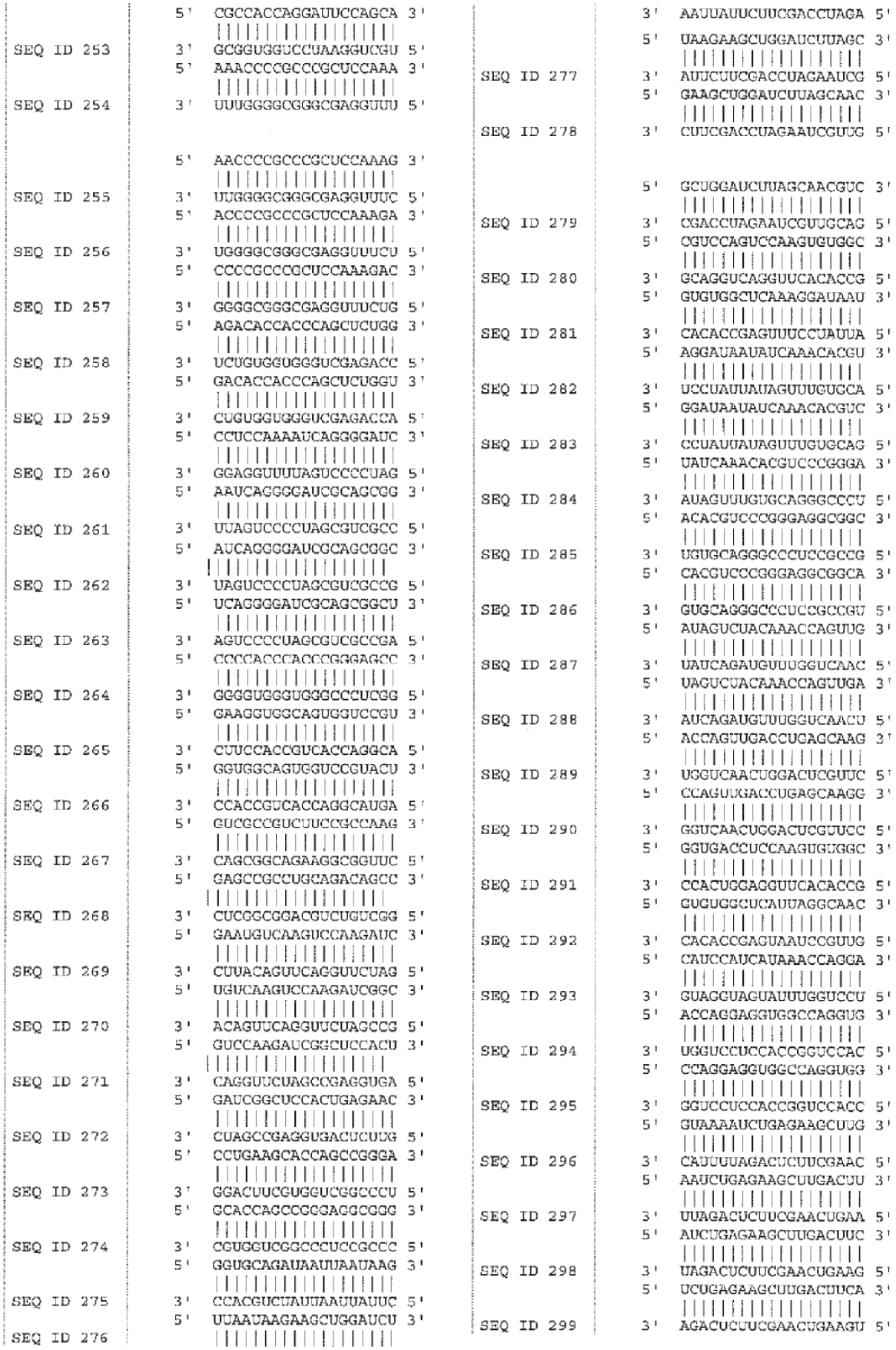
Proteína tau 1 asociada a los microtúbulos (MAPT)	
SEQ ID 1	GTGATGGAAGATCACGCTG
SEQ ID 2	GATCACGCTGGGACGTACG
SEQ ID 3	AGATCAGGGGGGCTACACC
SEQ ID 4	GATCAGGGGGGCTACACCA
SEQ ID 5	GACCAAGAGGGTGACACGG
SEQ ID 6	GAGGGTGACACGGACGCTG
SEQ ID 7	AGAATCTCCCCTGCAGACC
SEQ ID 8	GAATCTCCCCTGCAGACCC
SEQ ID 9	TCTCCCCTGCAGACCCCCA
SEQ ID 10	CCGGGCTCTGAAACCTCTG
SEQ ID 11	ACCTCTGATGCTAAGAGCA
SEQ ID 12	CCTCTGATGCTAAGAGCAC
SEQ ID 13	GAGCACTCCAACAGCGGAA
SEQ ID 14	CAGCGGAAGATGTGACAGC
SEQ ID 15	GATGTGACAGCACCCTTAG
SEQ ID 16	GCAGGCTGCCGCGCAGCCC
SEQ ID 17	GGAACCACAGCTGAAGAAG
SEQ ID 18	CCACAGCTGAAGAAGCAGG
SEQ ID 19	GAAGCAGGCATTGGAGACA
SEQ ID 20	GCAGGCATTGGAGACACCC
SEQ ID 21	GACGAAGCTGCTGGTCACG
SEQ ID 22	GCTGCTGGTCACGTGACCC
SEQ ID 23	GAGCCTGAAAGTGGTAAGG
SEQ ID 24	AGTGGTAAGGTGGTCCAGG
SEQ ID 25	GTGGTAAGGTGGTCCAGGA
SEQ ID 26	GGTGGTCCAGGAAGGCTTC
SEQ ID 27	GGCTTCCTCCGAGAGCCAG
SEQ ID 28	CCTTCGGGGACAGGACCTG
SEQ ID 29	GCACCAGCTTCTAGGAGAC
SEQ ID 30	GGGGGCAGGGGGCAAAGAG
SEQ ID 31	AGAGAGGCCGGGGAGCAAG
SEQ ID 32	GAGAGGCCGGGGAGCAAGG
SEQ ID 33	GGAGGAGGTGGATGAAGAC
SEQ ID 34	GACCGCGACGTCGATGAGT
SEQ ID 35	GACTCCCCTCCCTCCAAGG
SEQ ID 36	GGCCTCCCCAGCCCAAGAT
SEQ ID 37	GATGGGCGGCCTCCCCAGA
SEQ ID 38	GCCACCAGCATCCCAGGCT
SEQ ID 39	AGTTTCCACAGAGATCCCA
SEQ ID 40	GTTTCCACAGAGATCCCAG
SEQ ID 41	AGGGCAGGATGCCCCCCTG
SEQ ID 42	GGGCAGGATGCCCCCCTGG
SEQ ID 43	ATCACACCCAACGTGCAGA
SEQ ID 44	TCACACCCAACGTGCAGAA
SEQ ID 45	CGTGCAGAAGGAGCAGGCG
SEQ ID 46	GGAGCAGGCGCACTCGGAG
SEQ ID 47	GGGCTGCATTTCCAGGGGC
SEQ ID 48	AAGAGGCTGACCTTCCAGA
SEQ ID 49	AGAGGCTGACCTTCCAGAG
SEQ ID 50	GAGGCTGACCTTCCAGAGC
SEQ ID 51	AAGCAGCCTGCTGCTGCTC
SEQ ID 52	AGCAGCCTGCTGCTGCTCC
SEQ ID 53	GCAGCCTGCTGCTGCTCCG
SEQ ID 54	GCCCGTCAGCCGGGTCCCT
SEQ ID 55	CTCAAAGCTCGCATGGTCA
SEQ ID 56	AGCTCGCATGGTCAGTAAA
SEQ ID 57	GCTCGCATGGTCAGTAAAA
SEQ ID 58	AAGCAAAGACGGGACTGGA
SEQ ID 59	AGCAAAGACGGGACTGGAA
SEQ ID 60	GCAAAGACGGGACTGGAAG
SEQ ID 61	AGACGGGACTGGAAGCGAT
SEQ ID 62	GACGGGACTGGAAGCGATG
SEQ ID 63	GCGATGACAAAAAAGCCAA
SEQ ID 64	AAAAGCCAAGACATCCACA
SEQ ID 65	AAAGCCAAGACATCCACAC
SEQ ID 66	AAGCCAAGACATCCACACG
SEQ ID 67	AGCCAAGACATCCACACGT
SEQ ID 68	GCCAAGACATCCACACGTT
SEQ ID 69	GACATCCACACGTTCCTCT
SEQ ID 70	AACCTTGAAAAATAGGCCT
SEQ ID 71	ACCTTGAAAAATAGGCCTT
SEQ ID 72	CCTTGAAAAATAGGCCTTG
SEQ ID 73	AAATAGGCCTTGCCTTAGC
SEQ ID 74	AATAGGCCTTGCCTTAGCC
SEQ ID 75	ATAGGCCTTGCCTTAGCCC
SEQ ID 76	TAGGCCTTGCCTTAGCCCC
SEQ ID 77	ACACCCCACTCCTGGTAGC
SEQ ID 78	CACCCCACTCCTGGTAGCT
SEQ ID 79	CCCTCCAGCCCTGCTGTGT
SEQ ID 80	ACACGTCTCTTCTGTCACT
SEQ ID 81	CACGTCTCTTCTGTCACTT
SEQ ID 82	CTGGCAGTTCTGGAGCAAA
SEQ ID 83	AGGAGATGAAACTCAAGGG
SEQ ID 84	GGAGATGAAACTCAAGGGG
SEQ ID 85	ACTCAAGGGGGCTGATGGT
SEQ ID 86	CTCAAGGGGGCTGATGGTA
SEQ ID 87	GGGGGCTGATGGTAAAACG
SEQ ID 88	AACGAAGATCGCCACACCG
SEQ ID 89	ACGAAGATCGCCACACCGC
SEQ ID 90	CGAAGATCGCCACACCGCG
SEQ ID 91	GATCGCCACACCGCGGGGA
SEQ ID 92	GGGCCAGGCCAACGCCACC
SEQ ID 93	CGCCACCAGGATTCCAGCA
SEQ ID 94	AAACCCCGCCCGCTCCAAA
SEQ ID 95	AACCCCGCCCGCTCCAAAG

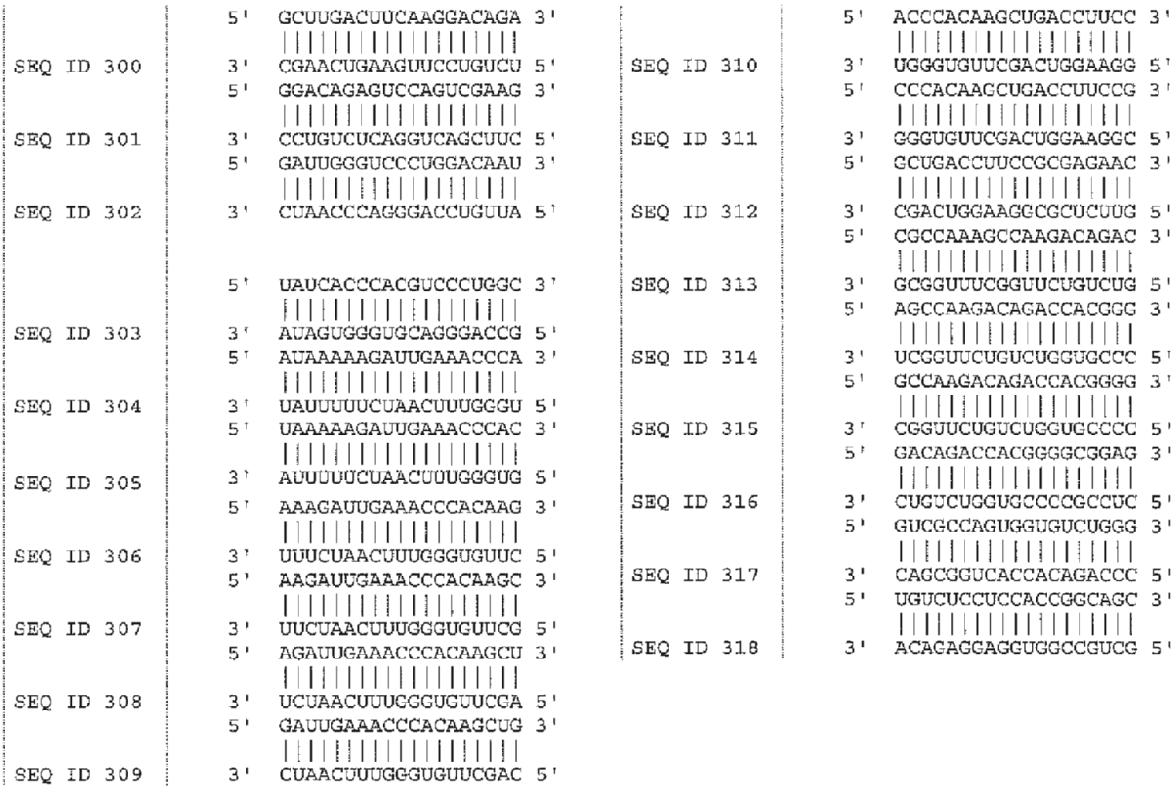
SEQ ID 96	ACCCCGCCCGCTCCAAAGA
SEQ ID 97	CCCCGCCCGCTCCAAAGAC
SEQ ID 98	AGACACCACCCAGCTCTGG
SEQ ID 99	GACACCACCCAGCTCTGGT
SEQ ID 100	CCTCCAAAATCAGGGGATC
SEQ ID 101	AATCAGGGGATCGCAGCGG
SEQ ID 102	ATCAGGGGATCGCAGCGGC
SEQ ID 103	TCAGGGGATCGCAGCGGCT
SEQ ID 104	CCCCACCCACCCGGGAGCC
SEQ ID 105	GAAGGTGGCAGTGGTCCGT
SEQ ID 106	GGTGGCAGTGGTCCGTACT
SEQ ID 107	GTCGCCGTCTTCCGCCAAG
SEQ ID 108	GAGCCGCCTGCAGACAGCC
SEQ ID 109	GAATGTCAAGTCCAAGATC
SEQ ID 110	TGTCAAGTCCAAGATCGGC
SEQ ID 111	GTCCAAGATCGGCTCCACT
SEQ ID 112	GATCGGCTCCACTGAGAAC
SEQ ID 113	CCTGAAGCACCAGCCGGGA
SEQ ID 114	GCACCAGCCGGGAGGCGGG
SEQ ID 115	GGTGCAGATAATTAATAAG
SEQ ID 116	TTAATAAGAAGCTGGATCT
SEQ ID 117	TAAGAAGCTGGATCTTAGC
SEQ ID 118	GAAGCTGGATCTTAGCAAC
SEQ ID 119	GCTGGATCTTAGCAACGTC
SEQ ID 120	CGTCCAGTCCAAGTGTGGC
SEQ ID 121	GTGTGGCTCAAAGGATAAT
SEQ ID 122	AGGATAATATCAAACACGT
SEQ ID 123	GGATAATATCAAACACGTC
SEQ ID 124	TATCAAACACGTCCCGGGA
SEQ ID 125	ACACGTCCCGGGAGGCGGC
SEQ ID 126	CACGTCCCGGGAGGCGGCA
SEQ ID 127	ATAGTCTACAAACCAGTTG
SEQ ID 128	TAGTCTACAAACCAGTTGA
SEQ ID 129	ACCAGTTGACCTGAGCAAG
SEQ ID 130	CCAGTTGACCTGAGCAAGG
SEQ ID 131	GGTGACCTCCAAGTGTGGC
SEQ ID 132	GTGTGGCTCATTAGGCAAC
SEQ ID 133	CATCCATCATAAACCAGGA
SEQ ID 134	ACCAGGAGGTGGCCAGGTG
SEQ ID 135	CCAGGAGGTGGCCAGGTGG
SEQ ID 136	GTAAAATCTGAGAAGCTTG
SEQ ID 137	AATCTGAGAAGCTTGACTT
SEQ ID 138	ATCTGAGAAGCTTGACTTC
SEQ ID 139	TCTGAGAAGCTTGACTTCA
SEQ ID 140	GCTTGACTTCAAGGACAGA
SEQ ID 141	GGACAGAGTCCAGTCGAAG
SEQ ID 142	GATTGGGTCCCTGGACAAT
SEQ ID 143	TATCACCCACGTCCCTGGC
SEQ ID 144	ATAAAAAGATTGAAACCCA
SEQ ID 145	TAAAAAGATTGAAACCCAC
SEQ ID 146	AAAGATTGAAACCCACAAG
SEQ ID 147	AAGATTGAAACCCACAAGC
SEQ ID 148	AGATTGAAACCCACAAGCT
SEQ ID 149	GATTGAAACCCACAAGCTG
SEQ ID 150	ACCCACAAGCTGACCTTCC
SEQ ID 151	CCCACAAGCTGACCTTCCG
SEQ ID 152	GCTGACCTTCCGCGAGAAC
SEQ ID 153	CGCCAAAGCCAAGACAGAC
SEQ ID 154	AGCCAAGACAGACCACGGG
SEQ ID 155	GCCAAGACAGACCACGGGG
SEQ ID 156	GACAGACCACGGGGCGGAG
SEQ ID 157	GTCGCCAGTGGTGTCTGGG
SEQ ID 158	TGTCTCCTCCACCGGCAGC
SEQ ID 159	TATTAAACACGTCCTGGGA
SEQ ID 160	ACGTCTCCATGGCATCTCA

Proteína tau 1 asociada a los microtúbulos (MAPT)




SEQ ID 206
5' GGAGCAGGCGCACUCGGAG 3'
3' CCUCGUCCGCGUGAGCCUC 5'
SEQ ID 207
5' GGGCUGCAUUUCCAGGGGC 3'
3' CCCGACGUAAAGGUCCCCG 5'
SEQ ID 208
5' AAGAGGCUGACCUUCCAGA 3'
3' UUCUCCGACUGGAAGGUCU 5'
SEQ ID 209
5' AGAGGCUGACCUUCCAGAG 3'
3' UCUCCGACUGGAAGGUCUC 5'
SEQ ID 210
5' GAGGCUGACCUUCCAGAGC 3'
3' CUCCGACUGGAAGGUCUCG 5'
SEQ ID 211
5' AAGCAGCCUGCUGCUGCUC 3'
3' UUCGUCGGACGACGACGAG 5'
SEQ ID 212
5' AGCAGCCUGCUGCUGCUCC 3'
3' UCGUCGGACGACGACGAGG 5'
SEQ ID 213
5' GCAGCCUGCUGCUGCUCCG 3'
3' CGUCGGACGACGACGAGGC 5'
SEQ ID 214
5' GCCCGUCAGCCGGGUCCCU 3'
3' CGGGCAGUCGGCCCAGGGA 5'
SEQ ID 215
5' CUCAAAGCUCGCAUGGUCA 3'
3' GAGUUUCGAGCGUACCAGU 5'
SEQ ID 216
5' AGCUCGCAUGGUCAGUAAA 3'
3' UCGAGCGUACCAGUCAUUU 5'
SEQ ID 217
5' GCUCGCAUGGUCAGUAAAA 3'
3' CGAGCGUACCAGUCAUUUU 5'
SEQ ID 218
5' AAGCAAAGACGGGACUGGA 3'
3' UUCGUUUCUGCCCUGACCU 5'
SEQ ID 219
5' AGCAAAGACGGGACUGGAA 3'
3' UCGUUUCUGCCCUGACCUU 5'
SEQ ID 220
5' GCAAAGACGGGACUGGAAG 3'
3' CGUUUCUGCCCUGACCUUC 5'
SEQ ID 221
5' AGACGGGACUGGAAGCGAU 3'
3' UCUGCCCUGACCUUCGCUA 5'
SEQ ID 222
5' GACGGGACUGGAAGCGAUG 3'
3' CUGCCCUGACCUUCGCUAC 5'
SEQ ID 223
5' GCGAUGACAAAAAAGCCAA 3'
3' CGCUACUGUUUUUUCGGUU 5'
SEQ ID 224
5' AAAAGCCAAGACAUCCACA 3'
3' UUUUCGGUUCUGUAGGUGU 5'
SEQ ID 225
5' AAGCCAAGACAUCCACAC 3'
3' UUUCGGUUCUGUAGGUGUG 5'
SEQ ID 226
5' AAGCCAAGACAUCCACACG 3'
3' UUCGGUUCUGUAGGUGUGC 5'
SEQ ID 227
5' AGCCAAGACAUCCACACGU 3'
3' UCGGUUCUGUAGGUGUGCA 5'
SEQ ID 228
5' GCCAAGACAUCCACACGUU 3'
3' CGGUUCUGUAGGUGUGCAA 5'
SEQ ID 229
5' GACAUCCACACGUUCCUCU 3'
3' CUGUAGGUGUGCAAGGACA 5'
SEQ ID 230
5' AACCUUGAAAAAUAGGCCU 3'
3' UUGGAACUUUUUAUCCGGA 5'
SEQ ID 231
5' ACCUUGAAAAAUAGGCCUU 3'
3' UGGAACUUUUUAUCCGGAA 5'
SEQ ID 232
5' CCUUGAAAAAUAGGCCUUG 3'
3' GGAACUUUUUAUCCGGAAC 5'
SEQ ID 233
5' AAAUAGGCCUUGCCUUAGC 3'
3' UUUAUCCGGAACGGAAUCG 5'
SEQ ID 234
5' AAUAGGCCUUGCCUUAGCC 3'
3' UUAUCCGGAACGGAAUCGG 5'
SEQ ID 235
5' AUAGGCCUUGCCUUAGCCC 3'
3' UAUCCGGAACGGAAUCGGG 5'
SEQ ID 236
5' UAGGCCUUGCCUUAGCCCC 3'
3' AUCCGGAACGGAAUCGGGG 5'
SEQ ID 237
5' ACACCCCACUCCUGGUAGC 3'
3' UGUGGGGUGAGGACCAUCG 5'
SEQ ID 238
5' CACCCCACUCCUGGUAGCU 3'
3' GUGGGGUGAGGACCAUCGA 5'
SEQ ID 239
5' CCCUCCAGCCCUGCUGUGU 3'
3' GGGAGGUCGGGACGACACA 5'
SEQ ID 240
5' ACACGUCUCUUCUGUCACU 3'
3' UGUGCAGAGAAGACAGUGA 5'
SEQ ID 241
5' CACGUCUCUUCUGUCACUU 3'
3' GUGCAGAGAAGACAGUGAA 5'
SEQ ID 242
5' CUGGCAGUUCUGGAGCAAA 3'
3' GACCGUCAAGACCUCGUUU 5'
SEQ ID 243
5' AGGAGAUGAAACUCAAGGG 3'
3' UCCUCUACUUUGAGUUCCC 5'
SEQ ID 244
5' GGAGAUGAAACUCAAGGGG 3'
3' CCUCUACUUUGAGUUCCCC 5'
SEQ ID 245
5' ACUCAAGGGGGCUGAUGGU 3'
3' UGAGUUCCCCCGACUACCA 5'
SEQ ID 246
5' CUCAAGGGGGCUGAUGGUA 3'
3' GAGUUCCCCCGACUACCAU 5'
SEQ ID 247
5' GGGGGCUGAUGGUAAAACG 3'
3' CCCCCGACUACCAUUUUGC 5'
SEQ ID 248
5' AACGAAGAUCGCCACACCG 3'
3' UUGCUUCUAGCGGUGUGCC 5'
SEQ ID 249
5' ACGAAGAUCGCCACACCGC 3'
3' UGCUUCUAGCGGUGUGGCG 5'
SEQ ID 250
5' CGAAGAUCGCCACACCGCG 3'
3' GCUUCUAGCGGUGUGGCGC 5'
SEQ ID 251
5' GAUCGCCACACCGCGGGGA 3'
3' CUAGCGGUGUGGCGCCCCU 5'
SEQ ID 252
5' GGGCCAGGCCAACGCCACC 3'
3' CCCGGUCCGGUUGCGGUGG 5'


5' CGCCACCAGGAUUCCAGCA 3'
SEQ ID 253 3' GCGGUGGUCCUAAGGUCGU 5'
5' AAACCCCGCCCGCUCCAAA 3'
SEQ ID 254 3' UUUGGGGCGGGCGAGGUUU 5'
5' AACCCCGCCCGCUCCAAAG 3'
SEQ ID 255 3' UUGGGGCGGGCGAGGUUUC 5'
5' ACCCCGCCCGCUCCAAAGA 3'
SEQ ID 256 3' UGGGGCGGGCGAGGUUUCU 5'
5' CCCCGCCCGCUCCAAAGAC 3'
SEQ ID 257 3' GGGGCGGGCGAGGUUUCUG 5'
5' AGACACCACCCAGCUCUGG 3'
SEQ ID 258 3' UCUGUGGUGGGUCGAGACC 5'
5' GACACCACCCAGCUCUGGU 3'
SEQ ID 259 3' CUGUGGUGGGUCGAGACCA 5'
5' CCUCCAAAAUCAGGGGAUC 3'
SEQ ID 260 3' GGAGGUUUUAGUCCCCUAG 5'
5' AAUCAGGGGAUCGCAGCGG 3'
SEQ ID 261 3' UUAGUCCCCUAGCGUCGCC 5'
5' AUCAGGGGAUCGCAGCGGC 3'
SEQ ID 262 3' UAGUCCCCUAGCGUCGCCG 5'
5' UCAGGGGAUCGCAGCGGCU 3'
SEQ ID 263 3' AGUCCCCUAGCGUCGCCGA 5'
5' CCCCACCCACCCGGGAGCC 3'
SEQ ID 264 3' GGGGUGGGUGGGCCCUCGG 5'
5' GAAGGUGGCAGUGGUCCGU 3'
SEQ ID 265 3' CUUCCACCGUCACCAGGCA 5'
5' GGUGGCAGUGGUCCGUACU 3'
SEQ ID 266 3' CCACCGUCACCAGGCAUGA 5'
5' GUCGCCGUCUUCCGCCAAG 3'
SEQ ID 267 3' CAGCGGCAGAAGGCGGUUC 5'
5' GAGCCGCCUGCAGACAGCC 3'
SEQ ID 268 3' CUCGGCGGACGUCUGUCGG 5'
5' GAAUGUCAAGUCCAAGAUC 3'
SEQ ID 269 3' CUUACAGUUCAGGUUCUAG 5'
5' UGUCAAGUCCAAGAUCGGC 3'
SEQ ID 270 3' ACAGUUCAGGUUCUAGCCG 5'
5' GUCCAAGAUCGGCUCCACU 3'
SEQ ID 271 3' CAGGUUCUAGCCGAGGUGA 5'
5' GAUCGGCUCCACUGAGAAC 3'
SEQ ID 272 3' CUAGCCGAGGUGACUCUUG 5'
5' CCUGAAGCACCAGCCGGGA 3'
SEQ ID 273 3' GGACUUCGUGGUCGGCCCU 5'
5' GCACCAGCCGGGAGGCGGG 3'
SEQ ID 274 3' CGUGGUCGGCCCUCCGCCC 5'
5' GGUGCAGAUAAUUAAUAAG 3'
SEQ ID 275 3' CCACGUCUAUUAAUUAUUC 5'
5' UUAAUAAGAAGCUGGAUCU 3'
SEQ ID 276
3' AAUUAUUCUUCGACCUAGA 5'
5' UAAGAAGCUGGAUCUUAGC 3'
SEQ ID 277 3' AUUCUUCGACCUAGAAUCG 5'
5' GAAGCUGGAUCUUAGCAAC 3'
SEQ ID 278 3' CUUCGACCUAGAAUCGUUG 5'
5' GCUGGAUCUUAGCAACGUC 3'
SEQ ID 279 3' CGACCUAGAAUCGUUGCAG 5'
5' CGUCCAGUCCAAGUGUGGC 3'
SEQ ID 280 3' GCAGGUCAGGUUCACACCG 5'
5' GUGUGGCUCAAAGGAUAAU 3'
SEQ ID 281 3' CACACCGAGUUUCCUAUUA 5'
5' AGGAUAAUAUCAAACACGU 3'
SEQ ID 282 3' UCCUAUUAUAGUUUGUGCA 5'
5' GGAUAAUAUCAAACACGUC 3'
SEQ ID 283 3' CCUAUUAUAGUUUGUGCAG 5'
5' UAUCAAACACGUCCCGGGA 3'
SEQ ID 284 3' AUAGUUUGUGCAGGGCCCU 5'
5' ACACGUCCCGGGAGGCGGC 3'
SEQ ID 285 3' UGUGCAGGGCCCUCCGCCG 5'
5' CACGUCCCGGGAGGCGGCA 3'
SEQ ID 286 3' GUGCAGGGCCCUCCGCCGU 5'
5' AUAGUCUACAAACCAGUUG 3'
SEQ ID 287 3' UAUCAGAUGUUUGGUCAAC 5'
5' UAGUCUACAAACCAGUUGA 3'
SEQ ID 288 3' AUCAGAUGUUUGGUCAACU 5'
5' ACCAGUUGACCUGAGCAAG 3'
SEQ ID 289 3' UGGUCAACUGGACUCGUUC 5'
5' CCAGUUGACCUGAGCAAGG 3'
SEQ ID 290 3' GGUCAACUGGACUCGUUCC 5'
5' GGUGACCUCCAAGUGUGGC 3'
SEQ ID 291 3' CCACUGGAGGUUCACACCG 5'
5' GUGUGGCUCAUUAGGCAAC 3'
SEQ ID 292 3' CACACCGAGUAAUCCGUUG 5'
5' CAUCCAUCAUAAACCAGGA 3'
SEQ ID 293 3' GUAGGUAGUAUUUGGUCCU 5'
5' ACCAGGAGGUGGCCAGGUG 3'
SEQ ID 294 3' UGGUCCUCCACCGGUCCAC 5'
5' CCAGGAGGUGGCCAGGUGG 3'
SEQ ID 295 3' GGUCCUCCACCGGUCCACC 5'
5' GUAAAAUCUGAGAAGCUUG 3'
SEQ ID 296 3' CAUUUUAGACUCUUCGAAC 5'
5' AAUCUGAGAAGCUUGACUU 3'
SEQ ID 297 3' UUAGACUCUUCGAACUGAA 5'
5' AUCUGAGAAGCUUGACUUC 3'
SEQ ID 298 3' UAGACUCUUCGAACUGAAG 5'
5' UCUGAGAAGCUUGACUUCA 3'
SEQ ID 299 3' AGACUCUUCGAACUGAAGU 5'


5' GCUUGACUUCAAGGACAGA 3'
SEQ ID 300 3' CGAACUGAAGUUCCUGUCU 5'
5' GGACAGAGUCCAGUCGAAG 3'
SEQ ID 301 3' CCUGUCUCAGGUCAGCUUC 5'
5' GAUUGGGUCCCUGGACAAU 3'
SEQ ID 302 3' CUAACCCAGGGACCUGUUA 5'
5' UAUCACCCACGUCCCUGGC 3'
SEQ ID 303 3' AUAGUGGGUGCAGGGACCG 5'
5' AUAAAAAGAUUGAAACCCA 3'
SEQ ID 304 3' UAUUUUUCUAACUUUGGGU 5'
5' UAAAAAGAUUGAAACCCAC 3'
SEQ ID 305 3' AUUUUUCUAACUUUGGGUG 5'
5' AAAGAUUGAAACCCACAAG 3'
SEQ ID 306 3' UUUCUAACUUUGGGUGUUC 5'
5' AAGAUUGAAACCCACAAGC 3'
SEQ ID 307 3' UUCUAACUUUGGGUGUUCG 5'
5' AGAUUGAAACCCACAAGCU 3'
SEQ ID 308 3' UCUAACUUUGGGUGUUCGA 5'
5' GAUUGAAACCCACAAGCUG 3'
SEQ ID 309 3' CUAACUUUGGGUGUUCGAC 5'
5' ACCCACAAGCUGACCUUCC 3'
SEQ ID 310 3' UGGGUGUUCGACUGGAAGG 5'
5' CCCACAAGCUGACCUUCCG 3'
SEQ ID 311 3' GGGUGUUCGACUGGAAGGC 5'
5' GCUGACCUUCCGCGAGAAC 3'
SEQ ID 312 3' CGACUGGAAGGCGCUCUUG 5'
5' CGCCAAAGCCAAGACAGAC 3'
SEQ ID 313 3' GCGGUUUCGGUUCUGUCUG 5'
5' AGCCAAGACAGACCACGGG 3'
SEQ ID 314 3' UCGGUUCUGUCUGGUGCCC 5'
5' GCCAAGACAGACCACGGGG 3'
SEQ ID 315 3' CGGUUCUGUCUGGUGCCCC 5'
5' GACAGACCACGGGGCGGAG 3'
SEQ ID 316 3' CUGUCUGGUGCCCCGCCUC 5'
5' GUCGCCAGUGGUGUCUGGG 3'
SEQ ID 317 3' CAGCGGUCACCACAGACCC 5'
5' UGUCUCCUCCACCGGCAGC 3'
SEQ ID 318 3' ACAGAGGAGGUGGCCGUCG 5'