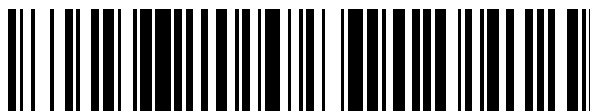


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 583 691**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

C12N 15/63 (2006.01)

A61K 31/713 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.06.2010 E 10792668 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.04.2016 EP 2446037**

54 Título: **Tratamiento de enfermedades relacionadas con un gen del síndrome de Down mediante la inhibición de una transcripción antisentido natural a un gen del síndrome de Down**

30 Prioridad:

26.06.2009 US 220747 P

21.08.2009 US 235752 P

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

21.09.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

COLLARD, JOSEPH y
KHORKOVA SHERMAN, OLGA

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 583 691 T3

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

DESCRIPCIÓN

Tratamiento de enfermedades relacionadas con un gen del síndrome de Down mediante la inhibición de una transcripción antisentido natural a un gen del síndrome de Down.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente solicitud reivindica la prioridad de la solicitud de patente provisional de Estados Unidos 61/220.747, presentada el 26 de junio de 2009, y la solicitud de patente provisional de Estados Unidos n.º 61/235.752, presentada el 21 de agosto de 2009.

Los aspectos de la divulgación comprenden oligonucleótidos que modulan la expresión y/o función de un Gen del Síndrome de Down y moléculas asociadas.

15 ANTECEDENTES

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

RESUMEN

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

En un aspecto, la divulgación proporciona métodos para inhibir la acción de una transcripción antisentido natural usando oligonucleótido(s) antisentido dirigido(s) a cualquier región de la transcripción antisentido natural dando como resultado la regulación por aumento del gen sentido correspondiente. También se contempla en el presente documento que la inhibición de la transcripción antisentido natural puede lograrse por siRNA, ribozimas y moléculas pequeñas, que se considera que están dentro del alcance de la presente divulgación.

Un aspecto proporciona un método de modulación de la función y/o expresión de un polinucleótido de un Gen del Síndrome de Down en células o tejidos de paciente *in vivo* o *in vitro* que comprende poner en contacto dichas células o tejidos con un oligonucleótido antisentido de 5 a 30 nucleótidos de longitud, donde dicho oligonucleótido tiene al menos un 50 % de identidad de secuencia con un complemento inverso de un polinucleótido que comprende de 5 a 30 nucleótidos consecutivos dentro de los nucleótidos 1 a 3814 de la SEQ ID NO: 3, 1 a 633 de la SEQ ID NO: 4, 1 a 497 de la SEQ ID NO: 5 y 1 a 545 de la SEQ ID NO: 6, modulando así la función y/o expresión del polinucleótido de un Gen del Síndrome de Down en células o tejidos de paciente *in vivo* o *in vitro*.

En otro aspecto, un oligonucleótido se dirige a una secuencia antisentido natural de un polinucleótido de un Gen de Síndrome de Down, por ejemplo, nucleótidos expuestos en la SEQ ID NO: 3 a 6, y cualquier variante, alelo, homólogo, mutante, derivado, fragmento y secuencia complementaria al mismo. Los ejemplos de oligonucleótidos antisentido se exponen como SEQ ID NOS: 7 a 24.

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

Otro aspecto proporciona un método de modulación de la función y/o expresión de un polinucleótido de un Gen del

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

En un aspecto, una composición comprende uno o más oligonucleótidos antisentido que se unen a polinucleótidos de un Gen del Síndrome de Down sentido y/o antisentido.

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

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

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

En otro aspecto, los oligonucleótidos se administran a un paciente por vía subcutánea, intramuscular, intravenosa o intraperitoneal.

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

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

30 Otros aspectos se describen más adelante.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 es un gráfico de resultados de PCR en tiempo real que muestra el cambio en veces + desviación estándar en ARNm de DYRK1A después del tratamiento de células HepG2 con oligonucleótidos de fosforotioato introducidos usando Lipofectamine 2000, en comparación con el control. Los resultados de PCR en tiempo real muestran que los niveles de ARNm de DYRK1A en células HepG2 se aumentan significativamente 48 h después de tratamiento con 1 de los oligos diseñados para DYRK 1a antisentido Hs. 713879 (CUR-0885-CUR-0890). Las barras indicadas como CUR-0891, Cur-0892, Cur-0893, CUR-0885, CUR-0889, CUR-0889, CUR-0886, CUR-0888 y CUR-0590 corresponden a muestras tratadas con las SEQ ID NO: 7 a 15 respectivamente.

La figura 2 es un gráfico de resultados de PCR en tiempo real que muestra el cambio en veces + desviación estándar en ARNm de DYRK 1A después del tratamiento de células Vero con oligonucleótidos de fosforotioato introducidos usando Lipofectamine 2000, en comparación con el control. Los resultados de PCR en tiempo real muestran que los niveles de ARNm de DTRK1A en células Vero se aumentan significativamente 48 h después de tratamiento con 1 de los oligos diseñados para DYRK1A antisentido Hs. 713879. Las barras indicadas como CUR-0889 corresponden a una muestra tratada con SEQ ID NO: 11.

La figura 3 es un gráfico de resultados de PCR en tiempo real que muestra el cambio en veces + desviación estándar en ARNm de DSCR 1 después del tratamiento de células HepG2 con oligonucleótidos de fosforotioato introducidos usando Lipofectamine 2000, en comparación con el control. Las barras indicadas como CUR-0902, CUR-0901, CUR-0900, CUR-0899, CUR-0905, CUR-0906, CUR-0904 y CUR-0907 corresponden a muestras tratadas con las SEQ ID NO: 16 a 23 respectivamente.

La figura 4 es un gráfico de resultados de PCR en tiempo real que muestra el cambio en veces + desviación estándar en ARNm de DSCRI 1 después del tratamiento de células Vero con oligonucleótidos de fosforotioato introducidos usando Lipofectamine 2000, en comparación con el control. Las barras indicadas como CUR-0907 y CUR-0904 corresponden a muestras tratadas con las SEQ ID NO: 23 y 22 respectivamente.

Descripción de la lista de secuencias

SEQ ID NO: 1: Cinasa 1A regulada por fosforilación de tirosina-(Y) de especificidad dual (DYRKIA) de Homo sapiens, variante 3 de transcripción, ARNm (NCBI n.º de acceso: NM_101395).

5

SEQ ID NO: 2: Regulador de calcineurina I (RCANI) de Homo sapiens, variante 1 de transcripción, ARNm (NCBI n.º de acceso: NM_004414).

SEQ ID NO: 3 a 6 - SEQ ID NO: 3: Secuencia antisentido de DYRKIA natural (Hs.713879); SEQ ID NO: 4: Secuencia antisentido de DYRKIA natural (Hs.624346); SEQ ID NO: 5: Secuencia antisentido de DSCRI natural (H.664668) y SEQ ID NO: 6: Secuencia antisentido de DSCRI natural (DA403464)

10

SEQ ID NO: 7 a 24: Oligonucleótidos antisentido. "r" indica ARN y * indica enlace fosfotioato.

15 DESCRIPCIÓN DETALLADA

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

25

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

35

Definiciones

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

45

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

55

Como se usa en el presente documento, el término "ARNm" significa la transcripción o transcripciones de ARNm actualmente conocidas de un gen elegido como diana, y cualquier transcripción adicional que pueda dilucidarse.

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

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

El oligonucleótido puede ser "quimérico", es decir, estar compuesto de diferentes regiones. En el contexto de esta divulgación, los compuestos "quiméricos" son oligonucleótidos que contienen dos o más regiones químicas, por ejemplo, una o más regiones de ADN, una o más regiones de ARN, una o más regiones de PNA, etc. Cada región química está constituida de al menos una unidad de monómero, es decir, un nucleótido en el caso de un compuesto de oligonucleótidos. Estos oligonucleótidos normalmente comprenden al menos una región en la que el oligonucleótido se modifica con el fin de presentar una o más propiedades deseadas. Las propiedades deseadas del oligonucleótido incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, elevada resistencia a la degradación por nucleasas, elevada captación celular y/o elevada afinidad de unión para el ácido nucleico diana. Las diferentes regiones del oligonucleótido pueden, por lo tanto, tener diferentes propiedades. Los oligonucleótidos quiméricos de la presente divulgación pueden formarse como estructuras mixtas de dos o más oligonucleótidos, oligonucleótidos modificados, oligonucleósidos y/o análogos de oligonucleótidos, como se ha descrito anteriormente.

El oligonucleótido puede estar compuesto de regiones que pueden enlazarse en "registro", es decir, cuando los monómeros se enlazan consecutivamente, como en ADN nativo, o se enlazan mediante espaciadores. Los espaciadores pretenden constituir un "puente" covalente entre las regiones y tienen en aspectos preferidos una longitud que no supera aproximadamente 100 átomos de carbono. Los espaciadores pueden llevar diferentes funcionalidades, por ejemplo, tener carga positiva o negativa, llevar propiedades de unión a ácido nucleico especiales (intercaladores, ligantes de surcos, toxinas, fluoróforos, etc.), ser lipófilos, inducir estructuras secundarias especiales como, por ejemplo, péptidos que contienen alanina que inducen hélices alfa.

Como se usa en el presente documento, "Genes del Síndrome de Down" son inclusivos de todos los miembros de la familia, mutantes, alelos, fragmentos, especies, secuencias codificantes y no codificantes, hebras de polinucleótidos sentido y antisentido, etc.

Como se usa en este documento, las palabras cinasa 1A regulada por fosforilación de tirosina de especificidad dual", "cinasa relacionadas con YAKI de especificidad dual", DYRK, DYRK1, hMNB, HP86, MNB, MNBH y homólogo de minicerebro de Proteína Cinasa, se consideran iguales en la bibliografía y se usan de forma intercambiable en la presente solicitud.

Como se usa en este documento, las palabras DSCRI, gen de la región crítica del síndrome de Down 1, regulador RCANI de calcineurina 1, Adapt78, ADAPT78, Calcipresina-I, CSPI, DSCI, MCIPI, proteína de interacción con calcineurina enriquecida con miocitos I, RCNI y Regulador de calcineurina I se consideran iguales en la bibliografía y se usan de forma intercambiable en la presente solicitud.

Como se usa en el presente documento, la expresión "oligonucleótido específico para" u "oligonucleótido que se dirige a" se refiere a un oligonucleótido que tiene una secuencia (i) capaz de formar un complejo estable con una porción del gen elegido como diana, o (ii) capaz de formar un dúplex estable con una porción de una transcripción de ARNm del gen elegido como diana. La estabilidad de los complejos y dúplex puede determinarse por cálculos

teóricos y/o ensayos *in vitro*. Se describen ensayos ejemplares para determinar la estabilidad de complejos y dúplex de hibridación se describen en los Ejemplos a continuación.

- Como se usa en el presente documento, la expresión "ácido nucleico diana" incluye ADN, ARN (que comprende preARNm y ARNm) transcrito a partir de tal ADN, y también ADNc derivado de tal ARN, secuencias codificantes, no codificantes, polinucleótidos sentido o antisentido. La hibridación específica de un compuesto oligomérico con su ácido nucleico diana interfiere con la función normal del ácido nucleico. Esta modulación de la función de un ácido nucleico diana por compuestos, que hibridan específicamente con éste, se denomina generalmente "antisentido". Las funciones de ADN que van a interferirse incluyen, por ejemplo, la replicación y la transcripción. Las funciones de ARN que van a interferirse incluyen todas las funciones vitales tales como, por ejemplo, translocalización del ARN al sitio de traducción de proteína, traducción de proteína desde ARN, splicing del ARN para dar una o más especies de ARNm, y actividad catalítica que puede acoplarse en o facilitarse por el ARN. El efecto global de tal interferencia con la función del ácido nucleico diana es la modulación de la expresión de un producto codificado u oligonucleótidos.
- La interferencia de ARN "iARN" está mediada por moléculas de ARN bicatenario (dsARN) que tienen homología específica de secuencia para sus secuencias de ácidos nucleicos "diana". En ciertos aspectos de la presente divulgación, los mediadores son dúplex de ARN "interferente pequeño" (siRNA) de 5-25 nucleótidos. Los siRNA se obtienen a partir del procesamiento de dsARN por una enzima RNasa conocida como Dicer. Los productos de dúplex de siRNA son reclutados en un complejo de siRNA de multi-proteína llamado RISC (complejo de silenciamiento inducido por ARN). Sin desear quedar ligado a teoría alguna en particular, se cree entonces que un RISC es guiado a un ácido nucleico diana (adecuadamente ARNm), en el que el dúplex de siRNA interacciona en una forma específica de secuencia para mediar en la escisión en un modo catalítico. Los ARN interferentes pequeños que pueden usarse de acuerdo con la presente divulgación pueden sintetizarse y usarse según procedimientos que son bien conocidos en la técnica y que serán familiares para el experto en la técnica. Los ARN interferentes pequeños para su uso en los métodos de la presente divulgación comprenden adecuadamente entre aproximadamente 1 y aproximadamente 50 nucleótidos (nt). En los ejemplos de aspectos no limitantes, los siRNA pueden comprender aproximadamente de 5 a aproximadamente 40 nt, aproximadamente de 5 a aproximadamente 30 nt, aproximadamente de 10 a aproximadamente 30 nt, aproximadamente de 15 a aproximadamente 25 nt, o aproximadamente 20-25 nucleótidos.
- La selección de oligonucleótidos apropiados se facilita usando programas informáticos que alinean automáticamente secuencias de ácidos nucleicos e indican regiones de identidad u homología. Tales programas se usan para comparar secuencias de ácidos nucleicos obtenidas, por ejemplo, buscando en bases de datos tales como GenBank o secuenciando productos de PCR. La comparación de secuencias de ácidos nucleicos de un intervalo de especies permite la selección de secuencias de ácidos nucleicos que muestran un grado de identidad apropiado entre especies. En el caso de genes que no se han secuenciado, se realizan Southern blots para permitir una determinación del grado de identidad entre genes en especies diana y otras especies. Realizando Southern blots a grados de astringencia variables, como se sabe bien en la técnica, es posible obtener una medida aproximada de la identidad. Estos procedimientos permiten la selección de oligonucleótidos que presentan un alto grado de complementariedad con secuencias de ácidos nucleicos diana en un sujeto que va a controlarse y un menor grado de complementariedad con secuencias de ácidos nucleicos correspondientes en otras especies. Un experto en la técnica se dará cuenta de que hay libertad considerable en la selección de regiones apropiadas de genes para su uso en la presente divulgación.
- Por "ARN enzimático" se entiende una molécula de ARN con actividad enzimática. Los ácidos nucleicos enzimáticos (ribozimas) actúan uniéndose primero a un ARN diana. Tal unión se produce mediante la porción de unión diana de un ácido nucleico enzimático que se mantiene en estrecha proximidad a una porción enzimática de la molécula que actúa para escindir el ARN diana. Así, el ácido nucleico enzimático reconoce primero y después se une a ARN diana mediante apareamiento de bases, y una vez unido al sitio correcto, actúa enzimáticamente para cortar el ARN diana.
- Por "ARN señuelo" se entiende una molécula de ARN que imita el dominio de unión natural para un ligando. Por lo tanto, el ARN señuelo compite con la diana de unión natural para la unión de un ligando específico. Por ejemplo, se ha mostrado que la sobreexpresión del ARN de respuesta de activación en trans del VIH (TAR) puede actuar de "señuelo" y se une eficazmente a la proteína tat del VIH, previniendo así que se una a secuencias de TAR codificadas en el ARN del VIH. Esto se entiende que es un ejemplo específico. Los expertos en la técnica reconocerán que esto es únicamente un ejemplo, y fácilmente pueden generarse otros aspectos usando técnicas generalmente conocidas en la técnica.

Como se usa en el presente documento, el término "monómeros" normalmente indica monómeros enlazados por

enlaces fosfodiéster o análogos de los mismos para formar oligonucleótidos que varían en tamaño de algunas unidades monoméricas, por ejemplo, de aproximadamente 3-4, a aproximadamente varios cientos de unidades monoméricas. Los análogos de enlaces fosfodiéster incluyen: fosforotioato, fosforoditioato, metilfosfonatos, fosforoselenoato, fosforamidato y similares, como se describe más completamente a continuación.

5

El término "nucleótido" incluye nucleótidos que existen de forma natural, así como nucleótidos que no existen de forma natural. Debe ser evidente para el experto en la técnica que los diversos nucleótidos que se han considerado previamente "que no existen de forma natural" se han encontrado posteriormente en la naturaleza. Por lo tanto, "nucleótidos" incluye no sólo las moléculas que contienen heterociclos de purina y pirimidina conocidas, sino también análogos y tautómeros heterocíclicos de las mismas. Los Ejemplos ilustrativos de otros tipos de nucleótidos son moléculas que contienen adenina, guanina, timina, citosina, uracilo, purina, xantina, diaminopurina, 8-oxo-N6-metiladenina, 7-deazaxantina, 7-deazaguanina, N4,N4-etanocitosina, N6,N6-etano-2,6-diaminopurina, 5-metilcitosina, 5-alquilil (C3-C6)-citosina, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, pseudoisocitosina, 2-hidroxi-5-metil-4-triazolopiridina, isocitosina, isoguanina, inosina y los nucleótidos "que no existen de forma natural" descritos en la Pat. de Estados Unidos n.º 5.432.272. El término "nucleótido" pretende incluir todos y cada uno de estos ejemplos, así como análogos y tautómeros de los mismos. Los nucleótidos especialmente interesantes son aquellos que contienen adenina, guanina, timina, citosina y uracilo, que se consideran como los nucleótidos que existen de forma natural en relación con la aplicación terapéutica y diagnóstica en seres humanos. Los nucleótidos incluyen los azúcares naturales 2'-desoxi y 2'-hidroxilo, por ejemplo, como se describe en Komberg y Baker, DNA Replication, 2ª Ed. (Freeman, San Francisco, 1992), así como sus análogos.

10

15

20

"Análogos", en referencia a nucleótidos, incluye nucleótidos sintéticos que tienen restos de bases modificados y/o restos de azúcar modificados. Tales análogos incluyen nucleótidos sintéticos diseñados para potenciar propiedades de unión, por ejemplo, la estabilidad del dúplex o triplex, especificidad, o similares.

25

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

30

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

35

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

40

45

50

"Complementario", como se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad de apareamiento preciso entre dos nucleótidos en una o dos hebras oligoméricas. Por ejemplo, si una nucleobase en una cierta posición de un compuesto antisentido es capaz de formar enlace de hidrógeno con una nucleobase en una cierta posición de un ácido nucleico diana, siendo dicho ácido nucleico diana un ADN, ARN, o molécula de oligonucleótido, entonces la posición de enlace del hidrógeno entre el oligonucleótido y el ácido nucleico diana se considera que es una posición complementaria. El compuesto oligomérico y el ADN, ARN, o molécula de oligonucleótido adicional son

55

complementarios entre sí cuando un número suficiente de posiciones complementarias en cada molécula están ocupadas por nucleótidos que pueden formar enlace de hidrógeno entre ellos. Por lo tanto, "específicamente hibridable" y "complementario" son términos que se usan para indicar un grado suficiente de apareamiento preciso o complementariedad sobre un número suficiente de nucleótidos de forma que se produzca la unión estable específica entre el compuesto oligomérico y un ácido nucleico diana.

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

Como se usa en el presente documento, la expresión "punto de fusión térmico (T_m)" se refiere a la temperatura, bajo fuerza iónica definida, pH y concentración de ácido nucleico, a la que el 50 % de los oligonucleótidos complementarios a la secuencia diana hibridan con la secuencia diana en equilibrio. Normalmente, condiciones astringentes serán aquellas en las que la concentración de sales es la concentración de ión Na (u otras sales) de al menos aproximadamente 0,01 a 1,0 M a pH de 7,0 a 8,3, y la temperatura es al menos aproximadamente 30 °C para oligonucleótidos cortos (por ejemplo, de 10 a 50 nucleótidos). También pueden lograrse condiciones astringentes con la adición de agentes desestabilizantes, tales como formamida.

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

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

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

que es susceptibilidad frente a resistencia.

- Los polinucleótidos derivados incluyen ácidos nucleicos sometidos a modificación química, por ejemplo, sustitución de hidrógeno por un grupo alquilo, acilo o amino. Los derivados, por ejemplo, oligonucleótidos derivados, pueden comprender porciones que no existen de forma natural, tales como restos de azúcar alterados o enlaces interazúcar. A modo de ejemplo, entre éstos están fosforotioato y otras especies que contienen azufre que se conocen en la técnica. Los ácidos nucleicos derivados también pueden contener etiquetas, que incluyen radionucleótidos, enzimas, agentes fluorescentes, agentes quimioluminiscentes, agentes cromogénicos, sustratos, cofactores, inhibidores, partículas magnéticas y similares.
- Un polipéptido o péptido "derivado" es uno que se modifica, por ejemplo, por glicosilación, pegilación, fosforilación, sulfatación, reducción/alquilación, acilación, acoplamiento químico o tratamiento suave con formalina. Un derivado también puede modificarse para contener una etiqueta detectable, tanto directa como indirectamente, incluyendo, pero sin limitación, un radioisótopo, etiqueta fluorescente y enzimática.
- Como se usa en el presente documento, el término "animal" o "paciente" pretende incluir, por ejemplo, seres humanos, ovejas, alces, venados, ciervos mulos, visones, mamíferos, monos, caballos, ganado vacuno, cerdos, cabras, perros, gatos, ratas, ratones, aves, pollo, reptiles, peces, insectos y arácnidos.
- "Mamífero" incluye mamíferos de sangre caliente que normalmente están bajo cuidado médico (por ejemplo, seres humanos y animales domesticados). Los ejemplos incluyen felinos, caninos, equinos, bovinos y humanos, así como únicamente humanos.
- "Tratar" o "tratamiento" incluye el tratamiento de una patología en un mamífero, e incluye: (a) prevenir que se produzca la patología en un mamífero, en particular, cuando tal mamífero tiene predisposición a la patología, pero todavía no se ha diagnosticado que la tenga; (b) inhibir la patología, por ejemplo, detener el desarrollo; y/o (c) aliviar la patología, por ejemplo, causando la regresión de la patología hasta que se alcance un criterio de valoración deseado. Tratar también incluye la mejora de un síntoma de una enfermedad (por ejemplo, reducir el dolor o molestia), en el que tal mejora puede o no afectar directamente a la enfermedad (por ejemplo, causa, transmisión, expresión, etc.).
- Como se usa en el presente documento, el término "cáncer" se refiere a todos los tipos de cáncer o neoplasia o tumores malignos que se encuentran en mamíferos, incluyendo, pero sin limitación: leucemias, linfomas, melanomas, carcinomas y sarcomas. El propio cáncer se manifiesta como un "tumor" o tejido que comprende células malignas del cáncer. Los ejemplos de tumores incluyen sarcomas y carcinomas, tales como, pero sin limitación: fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiosarcoma, rabdomiosarcoma, carcinoma de colon, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de las glándulas sudoríparas, carcinoma de las glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de las vías biliares, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, cáncer de cuello uterino, tumor testicular, carcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón de células pequeñas, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma y retinoblastoma. Los cánceres adicionales que pueden tratarse por la composición desvelada de acuerdo con la divulgación incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, mieloma múltiple, neuroblastoma, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, rabdomiosarcoma, trombocitosis primaria, tumores de pulmón de células pequeñas de macroglobulinemia primaria, tumores cerebrales primarios, cáncer de estómago, cáncer de colon, insulanoma pancreático maligno, carcinoide maligno, cáncer de vejiga urinaria, lesiones cutáneas premalignas, cáncer testicular, linfomas, cáncer de tiroides, neuroblastoma, cáncer del esófago, cáncer de tracto genitourinario, hipercalcemia maligna, cáncer del cuello uterino, cáncer endometrial, cáncer cortical adrenal y cáncer de próstata.
- "Enfermedad o trastorno neurológico" se refiere a cualquier enfermedad o trastorno del sistema nervioso y/o del sistema visual. "Enfermedad o trastorno neurológico" incluye una enfermedad o trastornos que implican al sistema nervioso central (cerebro, tronco encefálico y cerebelo), el sistema nervioso periférico (incluyendo nervios craneales), y el sistema nervioso autónomo (partes del cual están situadas tanto en el sistema nervioso central como el periférico). Los ejemplos de trastornos neurológicos incluyen, pero sin limitación, dolor de cabeza, estupor y coma,

demencia, convulsiones, trastornos del sueño, traumatismo, infecciones, neoplasias, neurooftalmología, trastornos del movimiento, enfermedades desmielinizantes, trastornos de la médula espinal, y trastornos de los nervios periféricos, uniones musculares y neuromusculares. La enfermedad de adicción y metal, incluyen, pero sin limitación, trastorno bipolar y esquizofrenia, también se incluyen en la definición de trastorno neurológico. La siguiente es una

5 lista de varios trastornos neurológicos, síntomas, signos y síndromes que pueden tratarse usando composiciones y métodos de acuerdo con la presente divulgación: afasia epileptiforme adquirida; encefalomiелitis diseminada aguda; adrenoleucodistrofia; degeneración macular relacionada con la edad; agenesia del cuerpo calloso; agnosia; síndrome de Aicardi; enfermedad de Alexander; enfermedad de Alpers; hemiplejia alterna; demencia vascular; esclerosis lateral amiotrófica; anencefalia; síndrome de Angelman; angiomas; anoxia; afasia; apraxia; quistes

10 aracnoideos; aracnoiditis; malformación de Anroni-Chiari; malformación arteriovenosa; síndrome de Asperger; ataxia; telegiectasia; trastorno de hiperactividad por déficit de atención; autismo; disfunción autonómica; dolor de espalda; enfermedad de Batten; enfermedad de Behcet; parálisis de Bell; blefaroespasma esencial benigno; amiotrofia focal benigna; hipertensión intracraneal benigna; enfermedad de Binswanger; blefaroespasma; síndrome de Bloch Sulzberger; lesión del plexo braquial; absceso del cerebro; lesión cerebral; tumores cerebrales (incluyendo

15 glioblastoma multiforme); tumor espinal; síndrome de Brown-Séquard; enfermedad de Canavan; síndrome del túnel carpiano; causalgia; síndrome de dolor central; mielolisis central pontina; trastorno cefálico; aneurisma cerebral; arteriosclerosis cerebral; atrofia cerebral; gigantismo cerebral; parálisis cerebral; enfermedad de Charcot-Marie-Tooth; neuropatía inducida por la quimioterapia y dolor neuropático; malformación de Chiari; corea; polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica; dolor crónico; síndrome de dolor regional crónico; síndrome de Coffin Lowry;

20 coma, incluyendo estado vegetativo persistente; diplejia facial congénita; degeneración corticobasal; arteritis craneal; craneosinostosis; enfermedad de Creutzfeldt-Jakob; trastornos traumáticos acumulativos; síndrome de Cushing; enfermedad por cuerpos de inclusión citomegálica; infección por citomegalovirus; síndrome de ojos y pies bailarines; síndrome de Dandy-Walker; enfermedad de Dawson; síndrome de De Morsier; parálisis de Dejerine-Klumpke; demencia; dermatomiositis; neuropatía diabética; esclerosis difusa; disautonomía; disgrafía; dislexia; distonías;

25 encefalopatía epiléptica infantil temprana; síndrome de silla turca vacía; encefalitis; encefalocelos; angiomas encefalotrigeminal; epilepsia; parálisis de Erb; temblor esencial; enfermedad de Fabry; síndrome de Fahr; desmayo; parálisis espástica familiar; convulsiones febriles; síndrome de Fisher; ataxia de Friedreich; demencia fronto-temporal y otras "tauopatías"; enfermedad de Gaucher; síndrome de Gerstmann; arteritis de células gigantes; enfermedad de inclusión de células gigantes; leucodistrofia de células globoides; síndrome de Guillain-Barre; mielopatía asociada a

30 HTLV-1; enfermedad de Hallervorden-Spatz; lesión en la cabeza; dolor de cabeza; espasmo hemifacial; paraplegia espástica hereditaria; heredoopatía atáctica polineurítica; herpes zoster ótico; herpes zoster; síndrome de Hirayama; demencia y neuropatía asociadas al VIH (también manifestaciones neurológicas del SIDA); holoprosencefalia; enfermedad de Huntington y otras enfermedades de repetición de poliglutamina; hidranencefalia; hidrocefalia; hipercortisolismo; hipoxia; encefalomiелitis mediada inmune; miositis por cuerpos de inclusión;

35 incontinencia pigmentaria; enfermedad por almacenamiento de ácido fitánico infantil; enfermedad de refsum infantil; espasmos infantiles; miopatía inflamatoria; quiste intracraneal; hipertensión intracraneal; síndrome de Joubert; síndrome de Keams-Sayre; enfermedad de Kennedy; síndrome de Kinsbourne; síndrome de Klippel Feil; enfermedad de Krabbe; enfermedad de Kugelberg-Welander; kurú; enfermedad de Lafora; síndrome miasténico de Lambert-Eaton; síndrome de Landau-Kleffner; síndrome medular lateral (Wallenberg); problemas de aprendizaje; enfermedad

40 de Leigh; síndrome de Lennox-Gustaut; síndrome de Lesch-Nyhan; leucodistrofia; demencia de cuerpos de Lewy; Lisencefalia; síndrome de enclaustramiento; enfermedad de Lou Gehrig (es decir, enfermedad de neuronas motoras o esclerosis lateral amiotrófica); enfermedad lumbar del disco; secuelas neurológicas de la enfermedad de Lyme; enfermedad de Machado-Joseph; macrencefalia; megalencefalia; síndrome de Melkersson-Rosenthal; enfermedad de Menieres; meningitis; enfermedad de Menkes; leucodistrofia metacromática; microcefalia; migraña; síndrome de

45 Miller Fisher; mini-apoplejías; miopatías mitocondriales; síndrome de Mobius; amiotrofia monomérica; enfermedad de neuronas motoras; enfermedad de Moyamoya; mucopolisacaridosis; demencia por multi-infarto; neuropatía motora multifocal; esclerosis múltiple y otros trastornos desmielinizantes; atrofia del sistema múltiple con hipotensión postural; distrofia muscular; miastenia gravis; esclerosis mielinoclastica difusa; encefalopatía mioclónica de lactantes; mioclonía; miopatía; miotonía congénita; narcolepsia; neurofibromatosis; síndrome neuroléptico maligno;

50 manifestaciones neurológicas del SIDA; secuelas neurológicas del lupus; neuromiotonía; lipofuscinosis neuronal ceroida; trastornos de migración neuronal; enfermedad de Niemann-Pick; síndrome de O'Sullivan-McLeod; neuralgia occipital; secuencia de disrafismo espinal oculto; síndrome de Ohtahara; atrofia olivopontocerebelar; opsoclonos mioclono; neuritis óptica; hipotensión otostática; síndrome de uso excesivo; parestesia; enfermedad o

55 trastorno neurodegenerativo (enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica (ALS), demencia, esclerosis múltiple y otras enfermedades y trastornos asociados a la muerte de las células neuronales); paramiotonía congénita; enfermedades paraneoplásicas; ataques paroxísticos; síndrome de Parry Romberg; enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher; parálisis periódicas; neuropatía periférica; neuropatía dolorosa y dolor neuropático; estado vegetativo persistente; trastornos generalizados del desarrollo; reflejo del estornudo fótico; enfermedad por almacenamiento de ácido fitánico; enfermedad de Pick; nervio

- pellizcado; tumores pituitarios; polimiositis; porencefalia; síndrome post-polio; neuralgia posherpética; encefalomiелitis postinfecciosa; hipotensión postural; síndrome de Prader-Willi; esclerosis lateral primaria; enfermedades por priones; atrofia hemifacial progresiva; leucoencefalopatía multifocal progresiva; polidistrofia esclerosante progresiva; parálisis supranuclear progresiva; pseudotumor cerebral; síndrome de Ramsay-Hunt (tipos I y 11); encefalitis de Rasmussen; síndrome de distrofia simpática refleja; enfermedad de Refsum; trastornos de movimiento repetitivo; lesiones por esfuerzo repetitivo; síndrome de piernas inquietas; mielopatía asociada a retrovirus; síndrome de Rett; síndrome de Reye; baile de San Vito; enfermedad de Sandhoff; enfermedad de Schilder; esquizencefalia; displasia septo-óptica; síndrome del bebé sacudido; culebrilla; síndrome de Shy-Drager; síndrome de Sjogren; apnea del sueño; síndrome de Soto; espasticidad; espina bífida; lesión de la médula espinal; tumores de la médula espinal; atrofia muscular espinal; síndrome de la persona rígida; ictus; síndrome de Sturge-Weber; panencefalitis esclerosante subaguda; encefalopatía aterosclerótica subcortical; corea de Sydenham; síncope; siringomielia; discinesia tardía; enfermedad de Tay-Sachs; arteritis temporal; síndrome de la médula espinal anclada; enfermedad de Thomsen; síndrome del opérculo torácico; neuralgia del trigémino; parálisis de Todd; síndrome de Tourette; ataque isquémico transitorio; encefalopatías espongiiformes transmisibles; mielitis transversal; lesión cerebral traumática; temblor; neuralgia trigeminal; paraparesia espástica tropical; esclerosis tuberosa; demencia vascular (demencia multi-infarto); vasculitis incluyendo arteritis temporal; enfermedad de Von Hippel-Lindau; síndrome de Wallenberg; enfermedad de Werdnig-Hoffman; síndrome de West; latigazo cervical; síndrome de Williams; enfermedad de Wildon; y síndrome de Zellweger.
- 20 Una "inflamación" se refiere a afecciones y inflamatorias sistémicas y afecciones asociadas a la migración y atracción de monocitos, leucocitos y/o neutrófilos. Los ejemplos de inflamación incluyen, pero sin limitación, inflamación resultante de infección con organismos patógenos (incluyendo bacterias gram-positivas, bacterias gram-negativas, virus, hongos y parásitos, tales como protozoos y helmintos), rechazo al trasplante (incluyendo rechazo de órganos sólidos, tales como riñón, hígado, corazón, pulmón o cornea, así como rechazo de trasplantes médula ósea incluyendo enfermedad de injerto contra huésped (GVHD)), o de reacciones autoinmunes o alérgicas crónicas o agudas localizadas. Las enfermedades autoinmunes incluyen glomerulonefritis aguda; artritis reumatoide o reactiva; glomerulonefritis crónica; enfermedades inflamatorias del intestino, tales como enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y enterocolitis necrotizante; síndromes asociados a la transfusión de granulocitos; dermatosis inflamatoria, tales como dermatitis por contacto, dermatitis atópica, psoriasis; lupus eritematoso sistémico (SLE), tiroiditis autoinmune, esclerosis múltiple, y algunas formas de diabetes, o cualquier otro estado autoinmune en el que el ataque por el sistema inmune del propio sujeto dé como resultado una destrucción tisular patológica. Las reacciones alérgicas incluyen asma alérgica, bronquitis crónica, hipersensibilidad aguda y retardada. Las patologías inflamatorias sistémicas incluyen inflamación asociada a trauma, síndrome de bums, reperusión tras eventos isquémicos (por ejemplo, eventos trombóticos en corazón, cerebro, intestinos o vasculatura periférica, incluyendo infarto de miocardio e ictus), sepsis, ARDS o síndrome de disfunción orgánica múltiple. El reclutamiento de células inflamatorias también se produce en las placas ateroscleróticas. La inflamación incluye, pero sin limitación, linfoma no Hodgkin, granulomatosis de Wegener, tiroiditis de Hashimoto, carcinoma hepatocelular, atrofia del timo, pancreatitis crónicas, artritis reumatoide, hiperplasia linfoide reactiva, osteoartritis, colitis ulcerosa, carcinoma papilar, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, colecistitis aguda, colecistitis crónica, cirrosis, sialadenitis crónica, peritonitis, pancreatitis aguda, pancreatitis crónica, Gastritis crónica, adenomiosis, endometriosis, cervicitis aguda, cervicitis crónica, hiperplasia linfoide, esclerosis múltiple, hipertrofia secundaria a púrpura trombocitopénica idiopática, nefropatía IgA primaria, lupus eritematoso sistémico, psoriasis, enfisema pulmonar, pielonefritis crónica, y cistitis crónica.
- 45 Una enfermedad o trastorno cardiovascular incluye aquellos trastornos que pueden causar isquemia o están causados por reperusión del corazón. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, aterosclerosis, enfermedad arterial coronaria, miocarditis granulomatosa, miocarditis crónica (no granulomatosa), cardiomiopatía hipertrófica primaria, enfermedad arterial periférica (PAD), ictus, angina de pecho, infarto de miocardio, daño del tejido cardiovascular causado por derivación coronaria, choque cardiogénico, y afecciones relacionadas que se conocerán por los expertos en la técnica o que implicarán una disfunción de o daño tisular al corazón o la vasculatura, especialmente, pero sin limitación, daño tisular relacionado con una activación de un Gen del Síndrome de Down. Las enfermedades del sistema cardiovascular incluyen, pero sin limitación, aterosclerosis, miocarditis granulomatosa, infarto de miocardio, fibrosis del miocardio secundaria a enfermedad cardíaca valvular, fibrosis del miocardio sin infarto, cardiomiopatía hipertrófica primaria, y miocarditis crónica (no granulomatosa).

Los ejemplos de enfermedades o trastornos asociados al estrés oxidativo incluyen, pero sin limitación, aterosclerosis, enfermedad de Parkinson, insuficiencia cardíaca, infarto de miocardio, enfermedad de Alzheimer, síndrome de fatiga crónica, esclerosis lateral amiotrófica (ALS), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD),

esclerosis múltiple, enfermedades o trastornos hepáticos, enfermedades o trastornos gastrointestinales, diabetes, cáncer, autoinmunidad, enfermedades o trastornos relacionados con el sistema inmune, enfermedades o trastornos neurológicos, enfermedades o trastornos neurodegenerativos, reparación y parálisis de los nervios, diferenciación neuroendocrina, enfermedades inflamatorias, enfermedades o trastornos musculares, enfermedades o trastornos asociados a organismos infecciosos, y similares.

Composiciones y moléculas de polinucleótidos y oligonucleótidos

Dianas

10

En un aspecto, las dianas comprenden secuencias de un Gen del Síndrome de Down, incluyendo, sin limitación, secuencias no codificantes y/o codificantes sentido y/o antisentido asociadas a un Gen del Síndrome de Down.

En un aspecto, las dianas comprenden secuencias de ácido nucleico de DYRK1, incluyendo, sin limitación, secuencias no codificantes y/o codificantes sentido y/o antisentido asociadas al gen DYRK1.

En un aspecto, las dianas comprenden secuencias de ácido nucleico de DSCRI, incluyendo, sin limitación, secuencias no codificantes y/o codificantes sentido y/o antisentido asociadas al gen DSCRI.

20 DYRK1A (cinasa regulada por fosforilación de tirosina de especificidad dual 1A) es una serina/treonina cinasa que se autofosforila en residuos de tirosina. La proteína contiene una señal de localización nuclear y se ha localizado en el compartimento del factor de splicing (motas nucleares), pero también está presente en el citoplasma. DYRK1A muestra un amplio espectro del sustrato, incluyendo factores de transcripción, factores de splicing y proteínas sinápticas. Se expresa de forma ubicua, aunque no uniforme, en todos los tejidos y células, con altos niveles en cerebro embrionario y adulto. El gen DYRK1A humano se considera un gen candidato para varias características del síndrome de Down, incluyendo retraso mental, debido a su ubicación en la región crítica del síndrome de Down en el cromosoma 21 y su función en la función cerebral. En particular, los mutantes de mosca del ortólogo *Drosophila* de DYRK1A, *Minicerebro*, tienen un número reducido de neuronas en el sistema nervioso central. Los ratones heterocigotos para un alelo alterado de *Dyrk1a* muestran una disminución de la viabilidad, retraso del crecimiento y alteraciones conductuales.

DYRK1A codifica un miembro de la familia de la cinasa regulada por fosforilación de tirosina de especificidad dual (DYRK). Este miembro contiene una secuencia señal de direccionamiento nuclear, un dominio proteína cinasa, un motivo zipper de leucina, y una repetición de histidina 13-consecutiva altamente conservativa. Cataliza su autofosforilación en residuos de serina/treonina y tirosina y puede tener una función significativa en una ruta de señalización regulando la proliferación celular y puede estar implicado en el desarrollo cerebral. Este gen es un homólogo del gen *Drosophila* *mnb* (*minicerebro*) y el gen *Dyrk* de rata. DYRK1A se localiza en la región crítica del síndrome de Down del cromosoma 21, y se considera que es un gen candidato fuerte para aprender los defectos asociados al síndrome de Down. El splicing alternativo de este gen genera varias variantes de transcripción que difieren entre sí en la región 5' UTR o en la región codificante 3'. Estas variantes codifican al menos cinco isoformas diferentes.

La proteína de la región crítica del síndrome de Down I (DSCRI) es gen diana VEGF y una molécula de señalización antiinflamatoria en las células endoteliales. El gen humano (DSCRI) es uno de 50 a 100 genes que residen en la región mínima en el cromosoma humano 21 (HC21), que, cuando está presente en más de 2 copias, causa retraso mental, colectivamente conocido como síndrome de Down (DS). DSCRI pertenece a una familia de proteínas conservadas, también denominadas calcipresinas o proteínas de interacción con calcineurina moduladora (MCIP), que comprende 3 miembros en seres humanos, DSCR1/MCIP1, ZAK1-4/DSCR IL1/MC1P2 y DSCR IL2/MC1P3, que comparten en común la capacidad de unirse a calcineurina. DSCR1 actúa como una molécula de señalización citoplasmática pequeña regulada por la fosfatasa 2B de serina/treonina proteína de Ca²⁺/dependiente de calmodulina (PP2B) o calcineurina A (CnA).

La incidencia de muchos tipos de cáncer se reduce significativamente en individuos con síndrome de Down y se cree que esta amplia protección contra el cáncer se confiere por la expresión aumentada de uno o más de los 231 genes supernumerarios en la copia extra del cromosoma 21. Uno de dichos genes es la proteína de la región crítica del síndrome de Down 1 (DSCR1), también conocido como RCAN1), que codifica una proteína que suprime la señalización angiogénica mediada por el factor del crecimiento endotelial vascular (VEGF) por la ruta de calcineurina. DSCR1 se aumenta en los tejidos de síndrome de Down y en un modelo de ratón del síndrome de Down. Sin desear quedar ligado a la teoría, la atenuación de la actividad de la calcineurina por DSCRI, junto con

otro gen del cromosoma 21 DYRK1a, puede ser suficiente para disminuir notablemente la angiogénesis. Los nombres alternativos de (DSCR1) incluyen: región candidata del síndrome de Down-I, regulador RCANI de la calcineurina I, Adapt 78, ADAPT78, Calcipresina-1, CSP1, DSC1, DSCR1, MCIP1, proteína de interacción con calcineurina enriquecida con miocitos 1, RCN1, Regulador de la calcineurina 1.

5

DYRK1a codifica un miembro de la familia de cinasa regulada por fosforilación de tirosina de especificidad dual (DYRK). Este miembro contiene una secuencia señal de direccionamiento nuclear, un dominio de proteína cinasa, un motivo zipper de leucina, y una repetición de histidina 13-consecutiva altamente conservativa. Cataliza su autofosforilación en residuos de serina/treonina y tirosina y puede tener una función significativa en una ruta de señalización regulando la proliferación celular y puede estar implicado en el desarrollo cerebral. Este gen es un homólogo del gen *Drosophila mnb* (minicerebro) y el gen *Dyrk* de rata. DYRK1a se localiza en la región crítica del síndrome de Down del cromosoma 21, y se considera que es un gen candidato fuerte para aprender los defectos asociados al síndrome de Down. El splicing alternativo de este gen genera varias variantes de transcripción que difieren entre sí en la región 5' UTR o en la región codificante 3'. Estas variantes codifican al menos cinco isoformas diferentes.

15

Los genes DYRK1A y RCANI, que se sitúan en DSCR están estrechamente relacionados con las características típicas de pacientes con DS, y su implicación en la patogénesis de defectos neurales en DS. DYRK1A fosforila varios factores de transcripción, tales como CREB y NFAT, proteínas del complejo endocítico, y productos génicos vinculados a AD. Mientras tanto, RCANI es un inhibidor endógeno de la calcineurina A, y se cree que su actividad desequilibrada causa un mal funcionamiento neuronal mayor y/o no neuronal en DS y AD. De forma interesante, ambos contribuyen a un déficit del aprendizaje y de la memoria, la plasticidad sináptica alterada, regulación del ciclo celular alterada, y una neuropatología tipo AD en DS.

20

En algunos aspectos, se usan oligonucleótidos antisentido para prevenir o tratar enfermedades o trastornos asociados a los miembros de la familia de un Gen del Síndrome de Down. Las enfermedades o trastornos mediados por un Gen del Síndrome de Down ejemplares que pueden tratarse con células/tejidos regenerados a partir de células madre obtenidas usando los compuestos antisentido comprenden: una enfermedad o trastorno asociado a expresión o función aberrante mutante de DYRK1a o DSCR1: cáncer, una enfermedad o trastorno angiogénico, una enfermedad o trastorno apoptótico, una enfermedad o trastorno proliferativo celular, inflamación, una enfermedad o trastorno cardiovascular, una enfermedad o trastorno neurológico, síndrome de Down, enfermedad de Alzheimer, retraso mental, trastorno de la memoria, trisomía, neuropatología, una enfermedad o trastorno neurodegenerativo, hipertrofia de los cardiomiocitos, una anomalía vascular (por ejemplo, hemangioma infantil, un tumor vascular dependiente de la angiogénesis, malformación vascular, etc.), hiperhomocisteinemia, diferenciación osteoblástica alterada, osteoclastogénesis, función mitocondrial alterada, estrés oxidativo, una enfermedad o trastorno asociado a una ruta de señalización mediada por calcineurina alterada, una enfermedad o trastorno asociado a una regulación alterada de la angiogénesis, estrés mediado por calcio y una enfermedad o trastorno asociado a una función de APC y/o Axina defectuosa o alterada.

30

35

En otro aspecto, los oligonucleótidos antisentido con respecto al antisentido natural del Gen del Síndrome de Down tratan a pacientes en riesgo de desarrollar o que han desarrollado enfermedades o trastornos cardíacos. Por ejemplo, la activación de la fosfatasa calcineurina y sus dianas aguas abajo, los factores de transcripción de la familia NFAT, dando como resultado la hipertrofia de los cardiomiocitos. La cinasa regulada por fosforilación de tirosina (Y) de especificidad dual 1A (DYRK1a) es capaz de antagonizar la señalización de calcineurina fosforilando directamente NFAT. Los oligonucleótidos antisentido modulan DYRK1a en el tratamiento de enfermedades o trastornos cardíacos, tal como la respuesta hipertrófica de los cardiomiocitos.

40

45

En aspectos, los oligonucleótidos antisentido que comprenden DYRK1a y/o DSCR1, impiden o tratan enfermedades asociadas a niveles fisiológicamente anormales, actividad, función expresión *in vivo* que también pueden alterar las rutas fisiológicas. Estas moléculas están implicadas directa o indirectamente. Por lo tanto, puede usarse uno o más oligonucleótidos antisentido de DYRK1a y/o DSCR1 para prevenir enfermedades o trastornos o tratar a dichos pacientes.

50

En otro aspecto, los oligonucleótidos antisentido para DYRK1a y/o DSCR1 natural antisentido tratan pacientes en riesgo de desarrollar o que han desarrollado enfermedades o trastornos cardíacos. Por ejemplo, la activación de la fosfatasa calcineurina y sus dianas aguas abajo, los factores de transcripción de la familia NFAT, dando como resultado la hipertrofia de los cardiomiocitos. La cinasa regulada por fosforilación de tirosina (Y) de especificidad dual 1A (DYRK1a) es capaz de antagonizar la señalización de calcineurina fosforilando directamente NFAT. Los oligonucleótidos antisentido modulan DYRK en el tratamiento de enfermedades o trastornos cardíacos, tal como la

55

respuesta hipertrófica de los cardiomiocitos.

En un aspecto, los oligonucleótidos son específicos para polinucleótidos de un Gen del Síndrome de Down, que incluye, sin limitación, regiones no codificantes. Las dianas de un Gen del Síndrome de Down comprenden variantes de un Gen del Síndrome de Down; mutantes de un Gen del Síndrome de Down, incluyendo SNP; secuencias no codificantes de un Gen del Síndrome de Down; alelos, fragmentos y similares. Preferiblemente, el oligonucleótido es una molécula ARN antisentido.

De acuerdo con aspectos de la divulgación, la molécula de ácido nucleico diana no se limita a polinucleótidos de un Gen del Síndrome de Down solos, sino que se extiende a cualquiera de las isoformas, receptores, homólogos, regiones no codificantes y similares de un Gen del Síndrome de Down.

En otro aspecto, un oligonucleótido se dirige a una secuencia antisentido natural (antisentido natural para las regiones codificantes y no codificantes) de dianas de un Gen del Síndrome de Down, incluyendo, sin limitación, variantes, alelos, homólogos, mutantes, derivados, fragmentos y secuencias complementarias a los mismos. Preferiblemente, el oligonucleótido es una molécula de ARN o de ADN antisentido.

En otro aspecto, los compuestos oligoméricos de la presente divulgación también incluyen variantes en las que una base diferente está presente en una o más de las posiciones de nucleótido en el compuesto. Por ejemplo, si el primer nucleótido es una adenina, pueden producirse variantes que contienen timidina, guanosina, citidina u otros nucleótidos naturales o no naturales en esta posición. Esto puede hacerse en cualquiera de las posiciones del compuesto antisentido.

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

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

Un compuesto antisentido, tanto ADN, ARN, quimérico, sustituido, etc., es específicamente hibridable cuando la unión del compuesto a la molécula de ADN o de ARN diana interfiere con la función normal del ADN o ARN diana para producir una pérdida de utilidad, y hay un grado de complementariedad suficiente para evitar la unión no específica del compuesto antisentido a secuencias no diana en condiciones en las que se desea la unión específica, es decir, en condiciones fisiológicas en el caso de ensayos *in vivo* o tratamiento terapéutico, y en el caso de ensayos *in vitro*, en condiciones en las que se realizan los ensayos.

En otro aspecto, el direccionamiento de un Gen del Síndrome de Down que incluye, sin limitación, secuencias antisentido que se identifican y se expanden, usando por ejemplo, PCR, hibridación etc., una o más de las secuencias expuestas como SEQ ID NO: 3 a 6, y similares, modulan la expresión o función de un Gen del Síndrome de Down. En un aspecto, la expresión o función está regulada por aumento en comparación con un control. En otro aspecto, la expresión o función se regula por disminución en comparación con un control.

En otro aspecto, los oligonucleótidos comprenden secuencias de ácidos nucleicos expuestas como SEQ ID NO: 7 a 24 que incluye secuencias antisentido que se identifican y se expanden, usando por ejemplo, PCR, hibridación, etc. Estos oligonucleótidos pueden comprender uno o más nucleótidos modificados, fragmentos más cortos o más largos, enlaces modificados y similares. Los ejemplos de enlaces modificados o enlaces internucleotídicos comprenden fosforotioato, fosforoditioato o similares. En otro aspecto, los nucleótidos comprenden un derivado de fósforo. El derivado de fósforo (o grupo fosfato modificado) que puede unirse al resto de azúcar o de análogo de

azúcar en los oligonucleótidos modificados de la presente divulgación puede ser un monofosfato, difosfato, trifosfato, alquilfosfato, alcanofosfato, fosforotioato y similares. La preparación de los análogos de fosfato anteriormente indicados, y su incorporación en nucleótidos, nucleótidos modificados y oligonucleótidos, también se conoce *per se* y no necesita describirse aquí.

5

La especificidad y sensibilidad de antisentido también se emplea por aquellos expertos en la técnica para usos terapéuticos. Se han empleado oligonucleótidos antisentido como restos terapéuticos en el tratamiento de patologías en animales y el hombre. Los oligonucleótidos antisentido se han administrado con seguridad y eficazmente a seres humanos, y están actualmente en marcha numerosos ensayos clínicos. Por lo tanto, se establece que los

10 oligonucleótidos pueden ser modalidades terapéuticas útiles que pueden configurarse para ser útiles en pautas de tratamiento para el tratamiento de células, tejidos y animales, especialmente seres humanos.

En aspectos de la presente divulgación, los compuestos antisentido oligoméricos, particularmente oligonucleótidos, se unen a moléculas de ácidos nucleicos diana y modulan la expresión y/o función de moléculas codificadas por un

15 gen diana. Las funciones de ADN que van a interferirse comprenden, por ejemplo, replicación y transcripción. Las funciones de ARN que van a interferirse comprenden todas las funciones vitales, tales como, por ejemplo, translocalización del ARN al sitio de traducción de proteína, traducción de proteína desde ARN, splicing del ARN para producir una o más especies de ARNm, y actividad catalítica que puede acoplarse en o facilitarse por el ARN. La función puede regularse por aumento o inhibirse dependiendo de las funciones deseadas.

20

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

25 monocatenarios, o circulares.

El direccionamiento de un compuesto antisentido a una molécula de ácido nucleico particular, en el contexto de la presente divulgación, puede ser un proceso multietapa. El proceso normalmente empieza con la identificación de un ácido nucleico diana cuya función va a modularse. Este ácido nucleico diana puede ser, por ejemplo, un gen celular

30 (o ARNm transcrito del gen) cuya expresión está asociada a un trastorno o patología particular, o una molécula de ácido nucleico de un agente infeccioso. En la presente divulgación, el ácido nucleico diana codifica un Gen del Síndrome de Down.

El proceso de direccionamiento normalmente también incluye la determinación de al menos una región diana, segmento, o sitio dentro del ácido nucleico diana para que la interacción antisentido se produzca de forma que

35 resulte el efecto deseado, por ejemplo, la modulación de la expresión. Dentro del contexto de la presente divulgación, el término "región" se define como una porción del ácido nucleico diana que tiene al menos una estructura, función o característica identificable. Dentro de las regiones de ácidos nucleicos diana están segmentos. Los "segmentos" se definen como porciones más pequeñas o sub-porciones de regiones dentro de un ácido nucleico

40 diana. "Sitios", como se usa en la presente divulgación, se definen como posiciones dentro de un ácido nucleico diana.

En un aspecto, los oligonucleótidos antisentido se unen a las secuencias antisentido naturales de un Gen del Síndrome de Down y modulan la expresión y/o función de un Gen del Síndrome de Down (SEQ ID NO: 1 a 3). Los

45 ejemplos de secuencias antisentido incluyen SEQ ID NOS: 4 a 30.

En otro aspecto, los oligonucleótidos antisentido se unen a uno o más segmentos de polinucleótidos de un Gen del Síndrome de Down, y modulan la expresión y/o función de un Gen del Síndrome de Down. Los segmentos comprenden al menos cinco nucleótidos consecutivos de polinucleótidos sentido o antisentido de un Gen del

50 Síndrome de Down.

En otro aspecto, los oligonucleótidos antisentido son específicos para una secuencia antisentido natural de un Gen del Síndrome de Down donde la unión de los oligonucleótidos a las secuencias antisentido naturales de un Gen del Síndrome de Down modula la expresión y/o función de un Gen del Síndrome de Down.

55

En otro aspecto, los compuestos de oligonucleótido comprenden secuencias expuestas como SEQ ID NO: 7 a 24, secuencias antisentido que se identifican y expanden usando, por ejemplo, PCR, hibridación etc. Estos oligonucleótidos pueden comprender uno o más nucleótidos modificados, fragmentos más cortos o más largos, enlaces modificados y similares. Los ejemplos de enlaces modificados o enlaces internucleotídicos comprenden

fosforotioato, fosforaditioato o similares. En otro aspecto, los nucleótidos comprenden un derivado de fósforo. El derivado de fósforo (o grupo fosfato modificado) que puede unirse al resto de azúcar o de análogo de azúcar en los oligonucleótidos modificados de la presente divulgación puede ser un monofosfato, difosfato, trifosfato, alquilfosfato, alcanofosfato, fosforotioato y similares. La preparación de los análogos de fosfato que se han indicado anteriormente, y su incorporación en nucleótidos, nucleótidos modificados y oligonucleótidos, también se conoce *per se* y no necesita describirse aquí.

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

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

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

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

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

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

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

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

10

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

15 intrónica como exónica.

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

20

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

30

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

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

40

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

45

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

50

55

Una vez se han identificado una o más regiones diana, segmentos o sitios, se eligen compuestos antisentido que

son suficientemente complementarios a la diana, es decir, hibridan suficientemente bien y con suficiente especificidad, para dar el efecto deseado.

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

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

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

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

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

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

Según la presente divulgación, los compuestos antisentido incluyen oligonucleótidos antisentido, ribozimas, oligonucleótidos de secuencia de guía externa (EGS), compuestos de siRNA, compuestos de interferencia (iARN) de ARN mono- o bicatenario tales como compuestos de siRNA, y otros compuestos oligoméricos que hibridan con al menos una porción del ácido nucleico diana y modulan su función. Como tales, pueden ser ADN, ARN, similares a

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

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

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

Los dsARN también pueden activar la expresión génica, un mecanismo que se ha llamado "activación génica inducida por ARN pequeño" o aARN. Los promotores génicos que se dirigen a dsARN inducen la potente activación transcripcional de genes asociados. El aARN se demostró en células humanas usando dsARN sintéticos, llamados "ARN activantes pequeños" (ARNap).

Se ha descubierto que el ARN bicatenario pequeño (dsARN), tal como ARN interferente pequeño (siRNA) y microARN (miARN), es el desencadenante de un mecanismo evolutivamente conservado conocido como interferencia de ARN (iARN). La iARN conduce invariablemente al silenciamiento génico. Sin embargo, en los aspectos descritos en detalle en la sección de ejemplos a continuación, se muestra que los oligonucleótidos aumentan la expresión y/o función de los polinucleótidos de un Gen del Síndrome de Down y productos codificados de los mismos. Los dsARN también pueden actuar como ARN activantes pequeños (ARNap). Sin desear quedar ligado por la teoría, direccionando secuencias a promotores génicos, los ARNap inducirán la expresión de genes diana en un fenómeno denominado activación transcripcional inducida por dsARN (aARN).

En un aspecto adicional, los "segmentos diana" identificados en el presente documento pueden emplearse en un cribado para compuestos adicionales que modulan la expresión de polinucleótidos de un Gen del Síndrome de Down. "Moduladores" son aquellos compuestos que disminuyen o aumentan la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica un Gen del Síndrome de Down y que comprenden al menos una porción de 5 nucleótidos que es complementaria a un segmento diana. El método de cribado comprende las etapas de poner en contacto un

- segmento diana de una molécula de ácido nucleico que codifica polinucleótidos sentido o antisentido naturales de un Gen del Síndrome de Down con uno o más moduladores candidatos, y seleccionar uno o más moduladores candidatos que disminuyen o aumentan la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica un polinucleótidos de un Gen del Síndrome de Down, por ejemplo, SEQ ID NO: 7 a 24. Una vez se muestra que el
- 5 modulador o moduladores candidatos son capaces de modular (por ejemplo, disminuir o aumentar) la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica un polinucleótido de un Gen del Síndrome de Down, el modulador puede entonces emplearse en estudios de investigación adicionales de la función de un polinucleótido de un Gen del Síndrome de Down, o para su uso como un agente de investigación, diagnóstico o terapéutico según la presente divulgación.
- 10 El direccionamiento de la secuencia antisentido natural modula preferiblemente la función del gen diana. Por ejemplo, el Gen del Síndrome de Down (por ejemplo, números de acceso NM_101395 y NM_004414). En un aspecto, la diana es un polinucleótido antisentido del Gen del Síndrome de Down. En un aspecto, un oligonucleótido antisentido se dirige a secuencias sentido y/o antisentido naturales de un polinucleótido de un Gen del Síndrome de
- 15 Down (por ejemplo, números de acceso NM_101395 y NM_004414), variantes, alelos, isoformas, homólogos, mutantes, derivados, fragmentos y secuencias complementarias a los mismos. Preferiblemente, el oligonucleótido es una molécula antisentido y las dianas incluyen regiones codificantes y no codificantes de polinucleótidos antisentido y/o sentido de un Gen del Síndrome de Down.
- 20 Los segmentos diana de la presente divulgación también pueden combinarse con sus compuestos antisentido complementarios respectivos de la presente divulgación para formar oligonucleótidos (duplexados) bicatenarios estabilizados.
- Se ha mostrado en la técnica que dichos restos de oligonucleótido bicatenario modulan la expresión de diana y
- 25 regulan la traducción, así como el procesamiento de ARN mediante un mecanismo antisentido. Además, los restos bicatenarios pueden someterse a modificaciones químicas. Por ejemplo, se ha mostrado que tales restos bicatenarios inhiben la diana por la hibridación clásica de la hebra antisentido del dúplex con la diana, activando de este modo la degradación enzimática de la diana.
- 30 En un aspecto, un oligonucleótido antisentido se dirige a polinucleótidos de un Gen del Síndrome de Down (por ejemplo, números de acceso NM_101395 y NM_004414), variantes, alelos, isoformas, homólogos, mutantes, derivados, fragmentos y secuencias complementarias a los mismos. Preferiblemente, el oligonucleótido es una molécula antisentido.
- 35 Según aspectos de la divulgación, la molécula de ácido nucleico diana no se limita al Gen del Síndrome de Down en solitario, sino que se extiende a cualquiera de las isoformas, receptores, homólogos y similares de las moléculas de un Gen del Síndrome de Down.
- En otro aspecto, un oligonucleótido se dirige a una secuencia antisentido natural de un polinucleótido de un Gen del
- 40 Síndrome de Down, por ejemplo, polinucleótidos expuestos como SEQ ID NO: 3 a 6, y cualquier variante, alelo, homólogo, mutante, derivado, fragmento y secuencia complementaria a los mismos. Los ejemplos de oligonucleótidos antisentido se exponen como las SEQ ID NO: 7 a 24.
- En un aspecto, los oligonucleótidos son complementarios a o se unen a secuencias de ácidos nucleicos de
- 45 antisentido de un Gen del Síndrome de Down, incluyendo, sin limitación, secuencias sentido y/o antisentido no codificantes asociadas a un polinucleótido de un Gen del Síndrome de Down, y modulan la expresión y/o función de una molécula de un Gen del Síndrome de Down.
- En otro aspecto, los oligonucleótidos son complementarios a o se unen a secuencias de ácidos nucleicos de
- 50 antisentido natural de un Gen del Síndrome de Down, expuestas como SEQ ID NO: 3 a 6, y modulan la expresión y/o función de una molécula de un Gen del Síndrome de Down.
- En un aspecto, los oligonucleótidos comprenden secuencias de al menos 5 nucleótidos consecutivos de las SEQ ID NO: 7 a 24, y modulan la expresión y/o función de una molécula de un Gen del Síndrome de Down.
- 55 Las dianas de polinucleótido comprenden un Gen del Síndrome de Down, incluyendo miembros de la familia del mismo, variantes de un Gen del Síndrome de Down; mutantes de un Gen del Síndrome de Down, que incluyen SNP; secuencias no codificantes de un Gen del Síndrome de Down; alelos de un Gen del Síndrome de Down; variantes de especies, fragmentos y similares. Preferiblemente, el oligonucleótido es una molécula antisentido.

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

En otro aspecto, el direccionamiento de un polinucleótido de un Gen del Síndrome de Down, por ejemplo, SEQ ID NO: 3 a 6, modula la expresión o función de estas dianas. En un aspecto, la expresión o función está regulada por aumento en comparación con un control. En otro aspecto, la expresión o función se regula por disminución en comparación con un control.

En otro aspecto, los compuestos antisentido comprenden secuencias expuestas como SEQ ID NO: 7 a 24. Estos oligonucleótidos pueden comprender uno o más nucleótidos modificados, fragmentos más cortos o más largos, enlaces modificados y similares.

En otro aspecto, las SEQ ID NO: 7 a 24 comprenden uno o más nucleótidos de LNA.

La modulación de un ácido nucleico diana deseado puede realizarse de varias formas conocidas en la técnica. Por ejemplo, oligonucleótidos antisentido, siRNA, etc. Las moléculas de ácidos nucleicos enzimáticos (por ejemplo, ribozimas) son moléculas de ácidos nucleicos capaces de catalizar una o más de una diversidad de reacciones, incluyendo la capacidad de escindir repetidamente otras moléculas de ácidos nucleicos separadas de una manera específica de secuencia de bases de nucleótidos. Tales moléculas de ácidos nucleicos enzimáticos pueden usarse, por ejemplo, para dirigirse prácticamente a cualquier transcripción de ARN.

Debido a su especificidad de secuencia, las moléculas de ácidos nucleicos enzimáticos que se escinden en trans se muestran prometedores como agentes terapéuticos para una enfermedad humana. Las moléculas de ácidos nucleicos enzimáticos pueden diseñarse para escindir dianas de ARN específicas dentro del fondo del ARN celular. Tal acontecimiento de escisión convierte el ARNm en no funcional y anula la expresión de proteínas de ese ARN. De este modo puede inhibirse selectivamente la síntesis de una proteína asociada a una patología.

En general, los ácidos nucleicos enzimáticos con actividad de escisión de ARN actúan uniéndose primero a un ARN diana. Tal unión se produce mediante la porción de unión de diana de un ácido nucleico enzimático que se mantiene en estrecha proximidad a una porción enzimática de la molécula que actúa para escindir el ARN diana. Por lo tanto, el ácido nucleico enzimático se reconoce primero y después se une a un ARN diana mediante apareamiento de bases complementario, y una vez se une al sitio correcto, actúa enzimáticamente para cortar el ARN diana. La escisión estratégica de un ARN diana tal destruirá su capacidad para dirigir la síntesis de una proteína codificada. Después de unirse un ácido nucleico enzimático y escindir su ARN diana, se libera de ese ARN para buscar otra diana y puede unirse repetidamente y escindir nuevas dianas.

Se han usado varios enfoques, tales como estrategias de selección *in vitro* (evolución) para desarrollar nuevos catalizadores de ácido nucleico capaces de catalizar una diversidad de reacciones, tales como escisión y ligación de enlaces fosfodiéster y enlaces amida.

El desarrollo de ribozimas que son óptimas para la actividad catalítica contribuirá significativamente a cualquier estrategia que emplea ribozimas que escinden ARN con el fin de regular la expresión génica. La ribozima de cabeza de martillo, por ejemplo, funciona con una velocidad catalítica (kcat) de aproximadamente 1 min⁻¹ en presencia de concentraciones de saturación (10 mM) de cofactor de Mg²⁺. Se ha mostrado que una ribozima de "ARN ligasa" artificial cataliza la reacción de auto-modificación correspondiente con una velocidad de aproximadamente 100 min⁻¹. Además, se sabe que ciertas ribozimas de cabeza de martillo modificadas que tienen brazos de unión al sustrato hechos de ADN catalizan la escisión de ARN con múltiples velocidades de recuperación que se aproximan a 100 min⁻¹. Finalmente, la sustitución de un residuo específico dentro del núcleo catalítico de la cabeza de martillo con ciertos análogos de nucleótido da ribozimas modificadas que muestran una mejora de tanto como 10 veces en la velocidad catalítica. Estos hallazgos demuestran que las ribozimas pueden promover transformaciones químicas con velocidades catalíticas que son significativamente superiores a las mostradas *in vitro* por la mayoría de las ribozimas que se auto-escinden naturales. Después, es posible que las estructuras de ciertas ribozimas de auto-escisión puedan optimizarse para dar la máxima actividad catalítica, o que puedan prepararse motivos de ARN completamente nuevos que muestran velocidades significativamente más rápidas para la escisión de fosfodiéster de ARN.

La escisión intermolecular de un sustrato de ARN por un catalizador de ARN que se ajusta al modelo de "cabeza de martillo" se mostró por primera vez en 1987. Se recuperó el catalizador de ARN y se hizo reaccionar con múltiples moléculas de ARN, demostrando que era verdaderamente catalítico.

- 5 Se han usado ARN catalíticos diseñados basados en el motivo de "cabeza de martillo" para escindir secuencias diana específicas haciendo cambios de base apropiados en el ARN catalítico para mantener apareamiento de bases necesarios con las secuencias diana. Esto ha permitido el uso del ARN catalítico para escindir secuencias diana específicas e indica que los ARN catalíticos diseñados según el modelo de "cabeza de martillo" pueden escindir posiblemente ARN de sustrato específico *in vivo*.

10

La interferencia de ARN (iARN) se ha convertido en una poderosa herramienta para modular la expresión génica en mamíferos y células de mamífero. Este enfoque requiere la administración de ARN interferente pequeño (siRNA) como el propio ARN o como ADN, usando un plásmido de expresión o virus y la secuencia codificante para ARN de horquilla pequeño que se procesa a siRNA. Este sistema permite un transporte eficaz de los pre-siRNA al citoplasma

- 15 donde son activos y permite el uso de promotores regulados y específicos de tejido para la expresión génica.

En un aspecto preferido, un oligonucleótido o compuesto antisentido comprende un oligómero o polímero de ácido ribonucleico (ARN) y/o ácido desoxirribonucleico (ADN), o un mimético, quimera, análogo u homólogo de los mismos. Este término incluye oligonucleótidos compuestos de nucleótidos de origen natural, azúcares y enlaces internucleósido covalentes (estructura), así como oligonucleótidos que tienen porciones que no existen de forma natural que funcionan de forma similar. Tales oligonucleótidos modificados o sustituidos son frecuentemente

20

deseados con respecto a formas nativas debido a propiedades deseables tales como, por ejemplo, captación celular mejorada, afinidad potenciada para un ácido nucleico diana y aumento de la estabilidad en presencia de nucleasas.

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

Una vez introducido a un sistema, los compuestos de la divulgación pueden provocar la acción de una o más enzimas o proteínas estructurales para efectuar la escisión u otra modificación del ácido nucleico diana o pueden trabajar mediante mecanismos basados en la ocupación. En general, los ácidos nucleicos (incluyendo

55

oligonucleótidos) pueden describirse como "similares a ADN" (es decir, que generalmente tienen uno o más 2'-desoxiazúcares y, generalmente, bases T en vez de U) o "similares a ARN" (es decir, que generalmente tienen uno o más 2'-hidroxilazúcares o azúcares modificados en 2' y, generalmente bases U en vez de T). Las hélices de ácido nucleico pueden adoptar más de un tipo de estructura, más comúnmente las formas A y B. Se cree que, en general, los oligonucleótidos que tienen estructura similar a la forma B son "similares a ADN" y aquellos que tienen estructura

similar a la forma A son "similares a ARN". En algunos aspectos (quiméricos), un compuesto antisentido puede contener tanto regiones en forma A como B.

- Los compuestos antisentido de acuerdo con esta divulgación pueden comprender una porción antisentido de aproximadamente 5 a aproximadamente 80 nucleótidos (es decir, de aproximadamente 5 a aproximadamente 80 nucleósidos enlazados) de longitud. Esto se refiere a la longitud de la hebra antisentido o porción del compuesto antisentido. En otras palabras, un compuesto antisentido monocatenario de la divulgación comprende de 5 a aproximadamente 80 nucleótidos, y un compuesto antisentido bicatenario de la divulgación (tal como un dsARN, por ejemplo) comprende una hebra sentido y antisentido o porción de 5 a aproximadamente 80 nucleótidos de longitud.
- Un experto en la técnica apreciará que esto comprenda porciones antisentido de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 u 80 nucleótidos de longitud, o cualquier intervalo entre los mismos.
- En un aspecto, los compuestos antisentido de la divulgación tienen porciones antisentido de 10 a 50 nucleótidos de longitud. Un experto en la técnica apreciará que éstos incorporan oligonucleótidos que tienen porciones antisentido de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 nucleótidos de longitud, o cualquier intervalo entre los mismos. En algunos aspectos, los oligonucleótidos tienen 15 nucleótidos de longitud.
- En un aspecto, los compuestos antisentido o de oligonucleótido de la divulgación tienen porciones antisentido de 12 o 13 a 30 nucleótidos de longitud. Un experto en la técnica apreciará que éstos incorporan compuestos antisentido que tienen porciones antisentido de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos de longitud, o cualquier intervalo entre los mismos.
- En otro aspecto, los compuestos oligoméricos de la presente divulgación también incluyen variantes en las que una base diferente está presente en una o más de las posiciones de nucleótido en el compuesto. Por ejemplo, si el primer nucleótido es una adenosina, pueden producirse variantes que contienen timidina, guanosina o citidina en esa posición. Esto puede hacerse en cualquiera de las posiciones de los compuestos antisentido o de dsARN. Estos compuestos se prueban entonces usando los métodos descritos en el presente documento para determinar su capacidad para inhibir la expresión de un ácido nucleico diana.
- En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencia o complementariedad, entre el compuesto antisentido y diana, es de aproximadamente el 40 % a aproximadamente el 60 %. En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencia o complementariedad es de aproximadamente el 60 % a aproximadamente el 70 %. En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencia o complementariedad es de aproximadamente el 70 % a aproximadamente el 80 %. En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencias o complementariedad es de aproximadamente el 80 % a aproximadamente el 90 %. En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencia o complementariedad es de aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 % o aproximadamente el 100 %.
- En otro aspecto, los oligonucleótidos antisentido, tales como, por ejemplo, las moléculas de ácidos nucleicos expuestas en las SEQ ID NO: 4 a 30, comprenden una o más sustituciones o modificaciones. En un aspecto, los nucleótidos están sustituidos con ácidos nucleicos bloqueados (LNA).
- En otro aspecto, los oligonucleótidos se dirigen a una o más regiones de las moléculas de ácidos nucleicos sentido y/o antisentido de secuencias codificantes y/o no codificantes asociadas a un Gen del Síndrome de Down y las secuencias expuestas como SEQ ID NO: 1 a 6. Los oligonucleótidos también se dirigen a regiones solapantes de las SEQ ID NO: 1 a 6.

Ciertos oligonucleótidos de esta divulgación son oligonucleótidos quiméricos. "Oligonucleótidos quiméricos" o "quimeras", en el contexto de esta divulgación, son oligonucleótidos que contienen dos o más regiones químicamente distintas, cada una constituida por al menos un nucleótido. Estos oligonucleótidos contienen normalmente al menos una región de nucleótidos modificados que confiere una o más propiedades beneficiosas (tales como, por ejemplo, elevada resistencia a nucleasas, elevada captación en células, elevada afinidad de unión por la diana) y una región que es un sustrato para enzimas capaces de escindir híbridos de ARN:ADN o ARN:ARN. A modo de ejemplo, la RNasa H es una endonucleasa celular que escinde la hebra de ARN de un dúplex de ARN:ADN. Por lo tanto, la activación de RNasa H da como resultado la escisión del ARN diana, mejorando

enormemente de esta manera la eficiencia de la modulación antisentido de la expresión génica. En consecuencia, frecuentemente pueden obtenerse resultados comparables con oligonucleótidos más cortos cuando se usan oligonucleótidos quiméricos, en comparación con desoxioligonucleótidos de fosforotioato que hibridan con la misma región diana. La escisión del ARN diana puede detectarse rutinariamente por electroforesis en gel y, si fuera necesario, técnicas de hibridación de ácidos nucleicos asociadas conocidas en la técnica. En un aspecto, un oligonucleótido quimérico comprende al menos una región modificada para aumentar la afinidad de unión de la diana, y, normalmente, una región que actúa de sustrato para RNasa H. La afinidad de un oligonucleótido por su diana (en este caso, un ácido nucleico que codifica ras) se determina rutinariamente midiendo la T_m de un par de oligonucleótido/diana, que es la temperatura a la que se disocian el oligonucleótido y la diana; la disociación se detecta espectrofotométricamente. Cuanto mayor sea la T_m , mayor será la afinidad del oligonucleótido por la diana.

Los compuestos antisentido quiméricos de la divulgación pueden formarse como estructuras compuestas de dos o más oligonucleótidos, oligonucleótidos modificados, miméticos de oligonucleósidos y/o de oligonucleótidos, como se han descrito anteriormente. Tales compuestos también se han denominado en la técnica híbridos o gámperos. Las Patentes de Estados Unidos representativas que indican la preparación de tales estructuras híbridas comprenden, pero sin limitación, las patentes de Estados Unidos n.º 5.013.830; 5.149.797; 5.220.007; 5.256.775; 5.366.878; 5.403.711; 5.491.133; 5.565.350; 5.623.065; 5.652.355; 5.652.356; y 5.700.922.

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

Los ejemplos específicos de algunos oligonucleótidos previstos para esta divulgación incluyen aquellos que comprenden estructuras modificadas, por ejemplo, fosforotioatos, fosfotriésteres, metilfosfonatos, enlaces entre azúcares de alquilo o cicloalquilo de cadena corta o enlaces entre azúcares heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta. La mayor parte son oligonucleótidos con estructuras de fosforotioato y aquellos con estructuras de heteroátomo, particularmente estructuras de $\text{CH}_2\text{--NHO--CH}_2$, $\text{CH}_2\text{--N(CH}_3\text{)--O--CH}_2$ [conocido como una estructura de metileno(metilimino) o MMI], $\text{CH}_2\text{--O--N(CH}_3\text{)--CH}_2$, $\text{CH}_2\text{--N(CH}_3\text{)--N(CH}_3\text{)--CH}_2$ y $\text{O--N(CH}_3\text{)--CH}_2\text{--CH}_2$, en los que la estructura de fosfodiéster nativa se representa O--P--O--CH_2 . También se prefieren estructuras amida desveladas por De Mesmaeker y col. (1995) Acc. Chem. Res. 28: 366-374. También se prefieren oligonucleótidos que tienen estructuras principales de morfolino (Summerton y Weller, Pat. de Estados Unidos n.º 5.034.506). En otros aspectos, tales como la estructura de ácido nucleico peptídico (PNA), la estructura de fosfodiéster del oligonucleótido se sustituye por una estructura de poliamida, estando los nucleótidos unidos directa o indirectamente a los átomos de nitrógeno azo de la estructura poliamida. Los oligonucleótidos también pueden comprender uno o más restos de azúcar sustituidos. Los oligonucleótidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': OH, SH, SCH_3 , F, OCN, OCH_3 , OCH_3 , $\text{O(CH}_2\text{)}_n\text{CH}_3$, $\text{O(CH}_2\text{)}_n\text{NH}_2$ u $\text{O(CH}_2\text{)}_n\text{CH}_3$, donde n es de 1 a aproximadamente 10; alquilo C1 a C10 inferior, alcoialcoxi, alquilo, alcarilo o aralquilo inferior sustituido; Cl; Br; CN; CF_3 ; OCF_3 ; O-, S-, o N-alquilo; O-, S-, o N-alqueno; SOCH_3 ; SO_2CH_3 ; ONO_2 ; NO_2 ; N_3 ; NH_2 ; heterocicloalquilo; heterocicloalcarilo; aminoalquilamino; polialquilamino; sililo sustituido; un grupo de escisión de

- ARN; un grupo indicador; un intercalador; un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido; o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un oligonucleótido y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. Una modificación preferida incluye 2'-metoxietoxi [2'-O-CH₂ CH₂ OCH₃, también conocido como 2'-O-(2-metoxietilo)]. Otras modificaciones preferidas incluyen 2'-metoxi (2'-O-CH₃), 2'-propoxi (2'-OCH₂ CH₂CH₃) y 2'-fluoro (2'-F). También pueden hacerse modificaciones similares en otras posiciones sobre el oligonucleótido, particularmente la posición 3' del azúcar en el nucleótido del extremo 3' y la posición 5' del nucleótido del extremo 5'. Los oligonucleótidos también pueden tener miméticos de azúcar tales como ciclobutilos en lugar del grupo pentofuranosilo.
- 10 Los oligonucleótidos también pueden incluir, adicionalmente o como alternativa, modificaciones o sustituciones de nucleobases (frecuentemente denominadas en la técnica simplemente "base"). Como se usa en el presente documento, nucleótidos "no modificados" o "naturales" incluyen adenina (A), guanina (G), timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Los nucleótidos modificados incluyen nucleótidos encontrados únicamente poco frecuentemente o transitoriamente en ácidos nucleicos naturales, por ejemplo, hipoxantina, 6-metiladenina, 5-Me-pirimidinas, particularmente 5-metilcitosina (también denominada 5-metil-2'-desoxicitosina y frecuentemente denominada en la técnica 5-Mc-C), 5-hidroximetilcitosina (HMC), glicosil HMC y gentobiosil HMC, así como nucleótidos sintéticos, por ejemplo, 2-aminoadenina, 2-(metilamino)adenina, 2-(imidazolilalquil)adenina, 2-(aminoalquilamino)adenina u otras alquiladeninas heterosustituidas, 2-tiouracilo, 2-tiotimina, 5-bromouracilo, 5-hidroximetiluracilo, 8-azaguanina, 7-deazaguanina, N⁶(6-aminoxetil)adenina y 2,6-diaminopurina. Puede incluirse una base "universal" conocida en la técnica, por ejemplo, inosina. Se ha mostrado que las sustituciones de 5-Me-C aumentan la estabilidad del dúplex de ácido nucleico 0,6-1,2 °C (Sanghvi, Y. S., en Crooke, S. T. y Lebleu, B., eds., *Antisense Research and Applications*, CRC Press, Boca Raton, 1993, págs. 276-278) y son en el presente las sustituciones de base.
- 15 Otra modificación de los oligonucleótidos de la divulgación implica enlazar químicamente al oligonucleótido uno o más restos o conjugados que potencian la actividad o captación celular del oligonucleótido. Tales restos incluyen, pero sin limitación, restos de lípido tales como un resto de colesterol, un resto colesteroilo, un tioéter, por ejemplo, hexil-S-tritilol, un tiocolesterol, una cadena alifática, por ejemplo, residuos de dodecanodiol o de undecilo, un fosfolípido, por ejemplo, di-hexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato de trietilamonio, una poliamina o una cadena de polietilenglicol, o ácido adamantanoacético. Los oligonucleótidos que comprenden restos lipófilos, y métodos para preparar tales oligonucleótidos, se conocen en la técnica, por ejemplo, las Pat. de Estados Unidos n.º 5.138.045, 5.218.105 y 5.459.255.
- 20 No es necesario que todas las posiciones en un oligonucleótido dado estén uniformemente modificadas, y de hecho más de una de las modificaciones anteriormente mencionadas puede incorporarse en un único oligonucleótido o incluso dentro de un único nucleósido dentro de un oligonucleótido. La presente divulgación también incluye oligonucleótidos que son oligonucleótidos quiméricos como se ha definido anteriormente en el presente documento.
- 25 En otro aspecto, la molécula de ácido nucleico de la presente divulgación está conjugada con otro resto que incluye, pero sin limitación, nucleótidos abásicos, poliéter, poliamina, poliamidas, péptidos, hidratos de carbono, lípido, o compuestos de polihidrocarburo. Los expertos en la técnica reconocerán que estas moléculas pueden enlazarse a uno o más de cualquiera de los nucleótidos que comprenden la molécula de ácido nucleico en varias posiciones en el azúcar, base o grupo fosfato.
- 30 Los oligonucleótidos usados según la presente divulgación pueden prepararse convenientemente y rutinariamente mediante la técnica ya conocida de síntesis en fase sólida. El equipo para tales síntesis se vende por varios proveedores, incluyendo Applied Biosystems. También puede emplearse cualquier otro medio para tal síntesis: la síntesis real de los oligonucleótidos está perfectamente dentro de las aptitudes de un experto en la técnica. También se conocen bien usar técnicas similares para preparar otros oligonucleótidos tales como los fosforotioatos y derivados alquilados. También se conoce bien usar técnicas similares y amiditos modificados disponibles en el mercado y productos de vidrio de poro controlado (CPG) tales como biotina, fluoresceína, acridina o amiditos modificados con psoraleno y/o CPG (disponible en Glen Research, Sterling VA) para sintetizar oligonucleótidos fluorescentemente marcados, biotinilados u otros oligonucleótidos modificados, tales como oligonucleótidos modificados con colesterol.
- 35 Según la divulgación, el uso de modificaciones tales como el uso de monómeros de LNA para potenciar la potencia, especificidad y duración de la acción y ampliar las vías de administración de oligonucleótidos comprende químicas actuales tales como MOE, ANA, FANA, PS, etc. Esto puede lograrse sustituyendo algunos de los monómeros en los oligonucleótidos actuales por monómeros de LNA. El oligonucleótido modificado con LNA puede tener un tamaño similar al compuesto precursor o puede ser más largo o preferiblemente más pequeño. Se prefiere que tales

oligonucleótidos modificados con LNA contengan menos de aproximadamente el 70 %, más preferiblemente menos de aproximadamente el 60 %, más preferiblemente menos de aproximadamente el 50 % de monómeros de LNA y que sus tamaños estén entre aproximadamente 5 y 25 nucleótidos, más preferiblemente entre aproximadamente 12 y 20 nucleótidos.

5 Las estructuras de oligonucleótidos modificados comprenden, pero sin limitación, fosforotioatos, fosforotioatos quirales, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, metilo y otros alquil fosfonatos que comprenden 3'-alquilfosfonatos y fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidatos que comprenden 3'-amino fosforamidato y aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionalquilfosfonatos, tionalquilfosfotriésteres y boranofosfatos que
10 tienen enlaces 3'-5' normales, análogos enlazados en 2'-5' de estos, y aquellos que tienen polaridad invertida donde los pares adyacentes de unidades de nucleósidos están enlazados 3'-5' a 5'-3' o 2'-5' a 5'-2'. También se incluyen diversas sales, sales mixtas y formas de ácido libre.

Las patentes de Estados Unidos representativas que muestran la preparación de los enlaces que contienen fósforo
15 anteriores comprenden, pero sin limitación, las patentes de Estados Unidos n.º 3.687.808; 4.469.863; 4.476.301; 5.023.243; 5.177.196; 5.188.897; 5.264.423; 5.276.019; 5.278.302; 5.286.717; 5.321.131; 5.399.676; 5.405.939; 5.453.496; 5.455.233; 5.466.677; 5.476.925; 5.519.126; 5.536.821; 5.541.306; 5.550.111; 5.563.253; 5.571.799; 5.587.361; y 5.625.050.

20 Las estructuras de oligonucleótido modificadas que no incluyen un átomo de fósforo en las mismas tienen estructuras que se forman por enlaces internucleósido de alquilo o cicloalquilo de cadena corta, enlaces internucleósidos de heteroátomo y alquilo o cicloalquilo mixtos, o uno o más enlaces internucleósidos heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta. Estos comprenden aquellos que tienen enlaces morfolino (formados en parte a partir de la porción de azúcar de un nucleósido); estructuras de siloxano; estructuras de sulfuro,
25 sulfóxido y sulfona; estructuras de formacetilo y tioformacetilo; estructuras de metilenformacetilo y tioformacetilo; estructuras que contienen alqueno; estructuras de sulfamato; estructuras de metilenimino y metilenhidrazino; estructuras de sulfonato y sulfonamida; estructuras de amida; y otras que tienen partes de componentes de N, O, S y CH₂ mixtos.

30 Las patentes de Estados Unidos representativas que muestran la preparación de los oligonucleósidos anteriores comprenden, pero sin limitación, las patentes de Estados Unidos n.º 5.034.506; 5.166.315; 5.185.444; 5.214.134; 5.216.141; 5.235.033; 5.264.562; 5.264.564; 5.405.938; 5.434.257; 5.466.677; 5.470.967; 5.489.677; 5.541.307; 5.561.225; 5.596.086; 5.602.240; 5.610.289; 5.602.240; 5.608.046; 5.610.289; 5.618.704; 5.623.070; 5.663.312; 5.633.360; 5.677.437; y 5.677.439.

35 En otros miméticos de oligonucleótidos, tanto el azúcar como el enlace internucleósido, es decir, la estructura, de las unidades de nucleótido se sustituyen por grupos novedosos. Las unidades de base se mantienen para la hibridación con un compuesto de ácido nucleico diana apropiado. Tal compuesto oligomérico, un oligonucleótido mimético que se ha mostrado que tiene excelente propiedades de hibridación, se denomina un ácido nucleico peptídico (PNA). En
40 compuestos de PNA, la estructura de azúcar de un oligonucleótido se reemplaza por una estructura que contiene amida, en particular una estructura de aminoetilglicina. Las nucleobases son retenidas y se unen directa o indirectamente a átomos de nitrógeno azo de la porción de amida de la estructura. La patentes de Estados Unidos representativas que muestran la preparación de compuestos de PNA comprenden, pero sin limitación, las patentes de Estados Unidos n.º 5.539.082; 5.714.331; y 5.719.262. Pueden encontrarse enseñanzas adicionales de
45 compuestos de PNA en Nielsen, y col. (1991) Science 254, 1497-1500.

En otro aspecto de la divulgación, los oligonucleótidos con estructuras de fosforotioato y oligonucleósidos con estructuras de heteroátomo, y en particular CH₂-NH-O-CH₂-, -CH₂-N (CH₃)-O-CH₂-, se conocen como una estructura de metileno (metilimino) o MMI, -CH₂-O-N (CH₃)-CH₂-, -CH₂N(CH₃)-N(CH₃) CH₂-y -ON(CH₃)-CH₂-CH₂-,
50 donde la estructura de fosfodiéster nativo se representa como -O-P-O-CH₂- de la patente de Estados Unidos n.º 5.489.677 que se ha citado anteriormente, y las estructuras de amida de la patente de Estados Unidos n.º 5.602.240 que se ha citado anteriormente. También hay oligonucleótidos que tienen estructuras principales de morfolino de la patente de Estados Unidos n.º 5.034.506 que se ha citado anteriormente.

55 Los oligonucleótidos modificados también pueden contener uno o más restos de azúcar sustituidos. Los oligonucleótidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': OH; F; O-, S- o N-alquilo; O-, S-, o N-alqueno; O-, S- o N-alquinilo; o O-alquil-O-alquilo, donde el alquilo, alqueno y alquinilo pueden ser alquilo C a CO sustituido o sin sustituir o alqueno y alquinilo C2 a CO. Particularmente se prefieren O(CH₂)_nOmCH₃, O(CH₂)_n, OCH₃, O(CH₂)_nNH₂, O(CH₂)_nCH₃, O(CH₂)_nONH₂ y O(CH₂)_nON(CH₂)_nCH₃)₂ donde n y m pueden ser de 1 a

aproximadamente 10. Otros oligonucleótidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': C a CO (alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, alcarilo, aralquilo, O-alcarilo o O-aralquilo, SH, SCH3, OCN, Cl, Br, CN, CF3, OCF3, SOCH3, SO2CH3, ONO2, NO2, N3, NH2, heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, polialquilamino, sililo sustituido, un grupo de escisión de ARN, un grupo indicador, un intercalador, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido, o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un oligonucleótido, y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. Una modificación comprende 2'-metoxietoxi (2'-O-CH2CH2OCH3, también conocido como 2'-O-(2-metoxietilo) o 2'-MOE), es decir, un grupo alcóxialcoxi. Una modificación adicional comprende 2'-dimetilaminooxietoxi, es decir, un grupo O(CH2)2ON(CH3)2, también conocido como 2'-DMAOE, como se describe en los ejemplos en el presente documento a continuación, y 2'-dimetilaminoetoxietoxi (también conocido en la técnica como 2'-O-dimetilaminoetoxietilo o 2'-DMAEOE), es decir, 2'-O-CH2-O-CH2-N(CH2)2.

Otras modificaciones comprenden 2'-metoxi (2'-OCH3), 2'-aminopropoxi (2'-OCH2CH2CH2NH2) y 2'-flúor (2'-F). También pueden hacerse modificaciones similares en otras posiciones en el oligonucleótido, particularmente la posición 3' del azúcar en el nucleótido del extremo 3' o en oligonucleótidos enlazados 2'-5' y la posición 5' del nucleótido del extremo 5'. Los oligonucleótidos también pueden tener miméticos de azúcar tales como restos ciclobutilo en lugar del pentofuranosil azúcar. Las patentes de Estados Unidos representativas que muestran la preparación de tales estructuras de azúcar modificadas comprenden, pero sin limitación, las patentes de Estados Unidos n.º 4.981.957; 5.118.800; 5.319.080; 5.359.044; 5.393.878; 5.446.137; 5.466.786; 5.514.785; 5.519.134; 5.567.811; 5.576.427; 5.591.722; 5.597.909; 5.610.300; 5.627.053; 5.639.873; 5.646.265; 5.658.873; 5.670.633; y 5.700.920.

Los oligonucleótidos también pueden comprender modificaciones o sustituciones de nucleobases (frecuentemente denominadas en la técnica simplemente "base"). Como se usa en el presente documento, nucleótidos "no modificados" o "naturales" comprenden las bases de purina adenina (A) y guanina (G), y las bases de pirimidina timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Los nucleótidos modificados comprenden otros nucleótidos sintéticos y naturales tales como 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroxietilcitosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, derivados de 6-metilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, derivados de 2-propilo y otros de alquilo de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracilo y citosina, 5-propiniluracilo y citosina, 6-azouracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudo-uracilo), 4-tiouracilo, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo y otras adeninas y guaninas sustituidas en 8, 5-halo, particularmente 5-bromo, 5-trifluorometilo y otros uracilos y citosinas sustituidos en 5, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-deazaguanina y 7-deazaadenina y 3-deazaguanina y 3-deazaadenina.

Además, los nucleótidos comprenden los desvelados en la patente de Estados Unidos n.º 3.687.808, los desvelados en "The Concise Encyclopedia of Polymer Science And Engineering", páginas 858-859, Kroschwitz, J.I., ed. John Wiley & Sons, 1990, los desvelados por English y col., "Angewandte Chemie, International Edition", 1991, 30, página 613, y los desvelados por Sanghvi, Y.S., Capítulo 15, "Antisense Research and Applications", páginas 289-302, Crooke, S.T. y Lebleu, B. ca., CRC Press, 1993. Algunos de estos nucleótidos son particularmente útiles para aumentar la afinidad de unión de los compuestos oligoméricos de la divulgación. Estos comprenden pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y purinas sustituidas en N-2, N-6 y O-6, que comprenden 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. Se ha mostrado que las sustituciones de 5-meetilcitosina aumentan la estabilidad del dúplex de ácido nucleico 0,6-1,2 °C (Sanghvi, Y.S., Crooke, S.T. y Lebleu, B., eds, "Antisense Research and Applications", CRC Press, Boca Raton, 1993, págs. 276-278) y son en el presente sustituciones de base, incluso más particularmente cuando se combinan con modificaciones de 2'-O-metoxietil azúcar.

Las patentes de Estados Unidos representativas que muestran la preparación de los nucleótidos modificados que se han indicado anteriormente, así como otros nucleótidos modificados, comprenden, pero sin limitación, las patentes de Estados Unidos n.º 3.687.808, así como 4.845.205; 5.130.302; 5.134.066; 5.175.273; 5.367.066; 5.432.272; 5.457.187; 5.459.255; 5.484.908; 5.502.177; 5.525.711; 5.552.540; 5.587.469; 5.596.091; 5.614.617; 5.750.692, y 5.681.941.

Otra modificación de los oligonucleótidos de la divulgación implica enlazar químicamente al oligonucleótido uno o más restos o conjugados, que potencian la actividad, distribución celular o captación celular del oligonucleótido.

Tales restos comprenden, pero sin limitación, restos de lípido tales como un resto colesterol, ácido cólico, un tioéter, por ejemplo, hexil-S-tritilol, un tiocolesterol, una cadena alifática, por ejemplo, residuos de dodecanodiol o de undecilo, un fosfolípido, por ejemplo, di-hexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato de trietilamonio, una poliamina o una cadena de polietilenglicol, o ácido adamantanoacético, un resto palmitilo, o un

resto octadecilamina o hexilamino-carbonil-oxicolesterol.

Las patentes de Estados Unidos representativas que muestran la preparación de dichos conjugados oligonucleótidos comprenden, pero sin limitación, las patentes de Estados Unidos n.º 4.828.979; 4.948.882; 5.218.105; 5.525.465; 5.541.313; 5.545.730; 5.552.538; 5.578.717; 5.580.731; 5.580.731; 5.591.584; 5.109.124; 5.118.802; 5.138.045; 5.414.077; 5.486.603; 5.512.439; 5.578.718; 5.608.046; 4.587.044; 4.605.735; 4.667.025; 4.762.779; 4.789.737; 4.824.941; 4.835.263; 4.876.335; 4.904.582; 4.958.013; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.245.022; 5.254.469; 5.258.506; 5.262.536; 5.272.250; 5.292.873; 5.317.098; 5.371.241; 5.391.723; 5.416.203; 5.451.463; 5.510.475; 5.512.667; 5.514.785; 5.565.552; 5.567.810; 5.574.142; 5.585.481; 5.587.371; 5.595.726; 5.597.696; 5.599.923; 5.599.928 y 5.688.941.

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

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

La transferencia de un ácido nucleico exógeno en una célula huésped u organismo puede evaluarse detectando directamente la presencia del ácido nucleico en la célula u organismo. Tal detección puede lograrse por varios métodos muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, la presencia del ácido nucleico exógeno puede detectarse por Southern blot o por una técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando cebadores que amplifican específicamente secuencias de nucleótidos asociadas al ácido nucleico. La expresión de los ácidos nucleicos exógenos también puede medirse usando métodos convencionales que incluyen análisis de expresión génica. Por ejemplo, el ARNm producido a partir de un ácido nucleico exógeno puede detectarse y cuantificarse usando una Northern blot y PCR con transcripción inversa (RT-PCR).

La expresión de ARN del ácido nucleico exógeno también puede detectarse midiendo una actividad enzimática o una actividad de proteína indicadora. Por ejemplo, puede medirse la actividad moduladora antisentido indirectamente como una disminución o aumento en la expresión de ácido nucleico diana como una indicación de que el ácido nucleico exógeno está produciendo el ARN efector. Basándose en la conservación de secuencias, pueden diseñarse cebadores y usarse para amplificar regiones codificantes de los genes diana. Inicialmente, la región codificante más altamente expresada de cada gen puede usarse para construir un gen de control modelo, aunque puede usarse cualquier región codificante o no codificante. Cada gen de control se ensambla insertando cada región codificante entre una región codificante indicadora y su señal de poli (A). Estos plásmidos producirán un ARNm con un gen indicador en la porción aguas arriba del gen y una posible diana de ARN en la región no codificante 3'. La eficacia de los oligonucleótidos antisentido individuales se ensayará por modulación del gen indicador. Los genes indicadores útiles en los métodos de la presente divulgación incluyen acetohidroxiácido sintasa (AHAS), fosfatasa alcalina (AP), beta-galactosidasa (LacZ), beta-glucuronidasa (GUS), cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), proteína verde fluorescente (GFP), proteína roja fluorescente (RFP), proteína amarilla fluorescente (YFP), proteína cian fluorescente (CFP), peroxidasa de rábano picante (HRP), luciferasa (Luc), nopalina sintasa (NOS), octopina sintasa (OCS), y derivados de los mismos. Están disponibles múltiples marcadores de selección que confieren resistencia a ampicilina, bleomicina, cloranfenicol, gentamicina, higromicina, kanamicina, lincomicina, metotrexato, fosfinotricina, puromicina y tetraciclina. Los métodos de determinación de la modulación de un gen indicador se conocen bien en la técnica, e incluyen, pero sin limitación, métodos fluorimétricos (por ejemplo, espectroscopia de fluorescencia, citometría de flujo activada por fluorescencia (FACS), microscopía de fluorescencia), determinación de la resistencia a antibióticos.

La expresión de las proteínas DYRK1, DSCR1 y de ARNm puede ensayarse usando métodos conocidos por los expertos en la técnica y descritos en cualquier parte en el presente documento. Por ejemplo, pueden usarse

inmunoensayos tales como ELISA para medir niveles de proteína. Los anticuerpos de un Gen del Síndrome de Down para ELISA están disponibles en el mercado, por ejemplo, en R&D Systems (Mineápolis, MN). Abcam, Cambridge, MA.

- 5 En aspectos, la expresión de DYRK1, DSCRI (por ejemplo, ARNm o proteína) en una muestra (por ejemplo, células o tejidos *in vivo* o *in vitro*) tratada usando un oligonucleótido antisentido de la divulgación se evalúa comparando con la expresión de un Gen del Síndrome de Down en una muestra de control. Por ejemplo, la expresión de la proteína o ácido nucleico puede compararse usando métodos conocidos por los expertos en la técnica con aquella en una muestra tratada con vector vacío o sin tratar. Como alternativa, la comparación con una muestra tratada con un
- 10 oligonucleótido antisentido de control (por ejemplo, una que tiene una secuencia alterada o diferente) puede hacerse dependiendo de la información deseada. En otro aspecto, una diferencia en la expresión de la proteína o ácido nucleico de un Gen del Síndrome de Down en una muestra tratada frente a una muestra sin tratar puede compararse con la diferencia en la expresión de un ácido nucleico diferente (incluyendo cualquier estándar considerado apropiado por el investigador, por ejemplo, un gen de mantenimiento) en una muestra tratada frente a una muestra
- 15 sin tratar.

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

Kits, reactivos de investigación, productos diagnósticos y terapéuticos

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

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

- Como se usa en el presente documento, la expresión "sistema biológico" o "sistema" se define como cualquier organismo, célula, cultivo celular o tejido que expresa, o se ha hecho competente para expresar productos de Genes del Síndrome de Down. Estos incluyen, pero sin limitación, seres humanos, animales transgénicos, células, cultivos
- 45 celulares, tejidos, xenoinjertos, trasplantes y combinaciones de los mismos.

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

- Los ejemplos de métodos de análisis de la expresión génica conocidos en la técnica incluyen matrices o micromatrices de ADN (Brazma y Vilo, (2000) FEBS Lett., 480, 17-24; Celis, y col., (2000) FEBS Lett., 480, 2-16), SAGE (análisis en serie de la expresión génica) (Madden, y col., (2000) Drug Discov. Today, 5, 415-425), READS (amplificación por enzima de restricción de ADNc digeridos) (Prashar y Weissman, (1999) Methods Enzymol., 303,
- 55

258-72), TOGA (análisis de la expresión génica total) (Sutcliffe, y col., (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 97, 1976-81), matrices de proteínas y proteómica (Celis, y col., (2000) FEBS Lett., 480, 2-16; Jungblut, y col., Electrophoresis, 1999, 20, 2100-10), secuenciación de etiquetas de secuencia expresada (EST) (Celis, y col., FEBS Lett., 2000, 480, 2-16; Larsson, y col., J. Biotechnol., 2000, 80, 143-57), huellas genómicas de ARN sustractivas (SuRF) (Fuchs, y col., (2000) Anal. Biochem. 286, 91-98; Larson, y col., (2000) Cytometry 41, 203-208), clonación sustractiva, expresión diferencial (DD) (Jurecic y Belmont, (2000) Curr. Opin. Microbiol. 3, 316-21), hibridación genómica comparativa (Carulli, y col., (1998) J. Cell Biochem. Suppl., 31, 286-96), técnicas de FISH (hibridación *in situ* fluorescente) (Going y Gusterson, (1999) Eur. J. Cancer, 35, 1895-904) y métodos de espectrometría de masas (To, Comb. (2000) Chem. High Throughput Screen, 3, 235-41).

10

Los compuestos de la divulgación son útiles para investigación y diagnóstico, debido a que estos compuestos hibridan con ácidos nucleicos que codifican un Gen del Síndrome de Down. Por ejemplo, los oligonucleótidos que hibridan con tal eficiencia y bajo tales condiciones que se han desvelado en el presente documento por ser eficaces. Los moduladores de un Gen del Síndrome de Down son cebadores o sondas eficaces en condiciones que favorecen la amplificación génica o detección, respectivamente. Estos cebadores y sondas son útiles en métodos que requieren la detección específica de moléculas de ácidos nucleicos que codifican un Gen del Síndrome de Down y en la amplificación de dichas moléculas de ácidos nucleicos para la detección o para su uso en estudios adicionales de un Gen del Síndrome de Down. La hibridación de los oligonucleótidos antisentido, particularmente los cebadores y sondas, de la divulgación con un ácido nucleico que codifica un Gen del Síndrome de Down puede detectarse por medios conocidos en la técnica. Tales medios pueden incluir conjugación de una enzima con el oligonucleótido, radiomarcado del oligonucleótido, o cualquier otro medio de detección adecuado. También pueden prepararse kits que usan tales medios de detección para detectar el nivel de un Gen del Síndrome de Down en una muestra.

La especificidad y sensibilidad de antisentido también se emplea por los expertos en la técnica para usos terapéuticos. Se han empleado oligonucleótidos antisentido como restos terapéuticos en el tratamiento de patologías en animales, incluyendo seres humanos. Los fármacos de oligonucleótido antisentido se han administrado con seguridad y eficazmente a seres humanos y numerosos ensayos clínicos están actualmente en marcha. Por lo tanto, se establece que los compuestos antisentido pueden ser modalidades terapéuticas útiles que pueden configurarse para ser útiles en pautas de tratamiento para el tratamiento de células, tejidos y animales, especialmente seres humanos.

Para productos terapéuticos, un animal, preferiblemente un ser humano, que se sospecha que tiene una enfermedad o trastorno que puede tratarse modulando la expresión de un polinucleótido de un Gen del Síndrome de Down se trata administrando compuestos antisentido de acuerdo con esta divulgación. Por ejemplo, en un aspecto no limitante, los métodos comprenden la etapa de administrar al animal en necesidad de tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz del modulador de un Gen del Síndrome de Down. Los moduladores de un Gen del Síndrome de Down de la presente divulgación modulan eficazmente la actividad de un Gen del Síndrome de Down o modulan la expresión de una proteína de un Gen del Síndrome de Down. En un aspecto, la actividad o expresión de un Gen del Síndrome de Down en un animal se inhibe aproximadamente el 10 % en comparación con un control. Preferiblemente, la actividad o expresión de un Gen del Síndrome de Down en un animal se inhibe aproximadamente el 30 %. Más preferiblemente, la actividad o expresión de un Gen del Síndrome de Down en un animal se inhibe el 50 % o más. Por lo tanto, los compuestos oligoméricos modulan la expresión del ARNm de un Gen del Síndrome de Down al menos el 10 %, al menos el 50 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o el 100 % en comparación con un control.

En un aspecto, la actividad o expresión de un Gen del Síndrome de Down y/o en un animal se eleva aproximadamente en un 10 % en comparación con un control. Preferiblemente, la actividad o expresión de un Gen del Síndrome de Down en un animal se eleva aproximadamente el 30 %. Más preferiblemente, la actividad o expresión de un Gen del Síndrome de Down en un animal se eleva el 50 % o más. Así, los compuestos oligoméricos modulan la expresión del ARNm de un Gen del Síndrome de Down al menos el 10 %, al menos el 50 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o el 100 % en comparación con un control.

55

Por ejemplo, la reducción de la expresión de un Gen del Síndrome de Down puede medirse en suero, sangre, tejido adiposo, hígado o cualquier otro fluido corporal, tejido u órgano del animal. Preferiblemente, las células contenidas dentro de dichos fluidos, tejidos u órganos que se analizan contienen una molécula de ácido nucleico que codifica péptidos de un Gen del Síndrome de Down y/o la propia proteína de un Gen del Síndrome de Down.

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

5

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

10 intercaladores, moléculas indicadoras, poliaminas, poliamidas, polietilenglicoles, poliéteres, grupos que potencian las propiedades farmacodinámicas de oligómeros, y grupos que potencian las propiedades farmacocinéticas de oligómeros. Los grupos conjugados típicos incluyen colesterol, lípidos, fosfolípidos, biotina, fenazina, folato, fenantridina, antraquinona, acridina, fluoresceínas, rodaminas, cumarinas y colorantes. Los grupos que potencian las propiedades farmacodinámicas, en el contexto de la presente divulgación, incluyen grupos que mejoran la captación,

15 potencian la resistencia a la degradación y/o fortalecen la hibridación específica de secuencia con el ácido nucleico diana. Los grupos que potencian las propiedades farmacocinéticas, en el contexto de la presente divulgación, incluyen grupos que mejoran la captación, distribución, metabolismo o eliminación de los compuestos de la presente divulgación. Los grupos de conjugados representativos se desvelan en la solicitud de patente internacional n.º PCT/US92/09196, presentada el 23 de octubre de 1992, y la patente de Estados Unidos n.º 6.287.860. Los restos de

20 conjugados incluyen, pero sin limitación, restos de lípidos tales como un resto colesterol, ácido cólico, un tioéter, por ejemplo, hexil-5-tritilitiol, un tiocolésterol, una cadena alifática, por ejemplo, residuos de dodecanodiol o undecilo, un fosfolípido, por ejemplo, di-hexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicerol-3-H-fosfonato de trietilamonio, una poliamina o una cadena de polietilenglicol, o ácido adamantanoacético, un resto palmitilo, o un resto octadecilamina o hexilamino-carbonil-oxicolesterol. Los oligonucleótidos de la divulgación también pueden conjugarse con principios

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

30 Las patentes de Estados Unidos representativas que muestran la preparación de tales conjugados de oligonucleótidos incluyen, pero sin limitación, las patentes de Estados Unidos n.º 4.828.979; 4.948.882; 5.218.105; 5.525.465; 5.541.313; 5.545.730; 5.552.538; 5.578.717; 5.580.731; 5.580.731; 5.591.584; 5.109.124; 5.118.802; 5.138.045; 5.414.077; 5.486.603; 5.512.439; 5.578.718; 5.608.0146; 4.587.044; 4.605.735; 4.667.025; 4.762.779; 4.789.737; 4.824.941; 4.835.263; 4.876.335; 4.904.582; 4.958.013; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.082.830;

35 5.112.963; 5.214.136; 5.245.022; 5.254.469; 5.258.506; 5.262.536; 5.272.250; 5.292.873; 5.317.098; 5.371.241; 5.391.723; 5.416.203; 5.451.463; 5.510.475; 5.512.667; 5.514.785; 5.565.552; 5.567.810; 5.574.142; 5.585.481; 5.587.371; 5.595.726; 5.597.696; 5.599.923; 5.599.928 y 5.688.941.

Formulaciones: Los compuestos de la divulgación también pueden mezclarse, encapsularse, conjugarse o asociarse

40 de otro modo a otras moléculas, estructuras de molécula o mezclas de compuestos, como, por ejemplo, liposomas, moléculas dirigidas a receptor, formulaciones orales, rectales, tópica u otras, para ayudar en la captación, distribución y/o absorción. Las patentes de Estados Unidos representativas que muestran la preparación de tales formulaciones que facilitan la captación, distribución y/o absorción incluyen, pero sin limitación, las patentes de Estados Unidos n.º 5.108.921; 5.354.844; 5.416.016; 5.459.127; 5.521.291; 5.543.165; 5.547.932; 5.583.020;

45 5.591.721; 4.426.330; 4.534.899; 5.013.556; 5.108.921; 5.213.804; 5.227.170; 5.264.221; 5.356.633; 5.395.619; 5.416.016; 5.417.978; 5.462.854; 5.469.854; 5.512.295; 5.527.528; 5.534.259; 5.543.152; 5.556.948; 5.580.575; y 5.595.756.

Aunque los oligonucleótidos antisentido no necesitan administrarse en el contexto de un vector con el fin de modular

50 una expresión y/o función de diana, los aspectos de la divulgación se refieren a construcciones de vector de expresión para la expresión de oligonucleótidos antisentido, que comprende promotores, secuencias de genes promotores híbridos y poseen una fuerte actividad constitutiva promotora, o una actividad de promotor que puede inducirse en el caso deseado.

55 En un aspecto, la práctica de la divulgación implica administrar al menos uno de los oligonucleótidos antisentido anteriores con un sistema de administración de ácidos nucleicos adecuado. En un aspecto, ese sistema incluye un vector no viral operativamente ligado al polinucleótido. Los ejemplos de tales vectores no virales incluyen el oligonucleótido en solitario (por ejemplo, una cualquiera o más de SEQ ID NO: 7 a 24) o en combinación con una formulación de proteína, polisacárido o lípido adecuada.

Los sistemas de administración de ácidos nucleicos adecuados adicionales incluyen vector viral, normalmente una secuencia de al menos uno de un adenovirus, virus asociado a adenovirus (AAV), adenovirus dependiente de cooperador, retrovirus, o complejo de virus hemaglutinante de liposoma de Japón (HVJ). Preferiblemente, el vector viral comprende un promotor de eucariota fuerte operativamente enlazado al polinucleótido, por ejemplo, un promotor de citomegalovirus (CMV).

Los vectores preferidos adicionales incluyen vectores virales, proteínas de fusión y conjugados químicos. Los vectores retrovirales incluyen virus de la leucemia murina de Moloney y virus basados en el VIH. Un vector viral basado en el VIH preferido comprende al menos dos vectores donde los genes gag y pol son de un genoma del VIH y el gen env es de otro virus. Se prefieren vectores virales de ADN. Estos vectores incluyen vectores de pox tales como vectores de ortopox o avipox, vectores del virus del herpes tales como un vector del virus del herpes simple I (HSV), vectores de adenovirus y vectores de virus adeno-asociados.

Los compuestos antisentido de la divulgación incluyen cualquier sal farmacéuticamente aceptable, éster o sal de tales ésteres, o cualquier otro compuesto que, tras la administración a un animal, incluyendo un ser humano, es capaz de proporcionar (directa o indirectamente) el metabolito biológicamente activo o residuo del mismo.

La expresión "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales fisiológica y farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la divulgación: es decir, sales que conservan la actividad biológica deseada del compuesto precursor y no confieren efectos toxicológicos no deseados al mismo. Para los oligonucleótidos, los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables y sus usos se describen adicionalmente en la patente de Estados Unidos n.º 6.287.860.

La presente divulgación también incluye composiciones farmacéuticas y formulaciones que incluyen los compuestos antisentido de la divulgación. Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación pueden administrarse en varias formas que dependen de si se desea tratamiento local o sistémico y del área que va a tratarse. La administración puede ser tópica (incluyendo oftálmica y a membranas mucosas que incluyen administración vaginal y rectal), pulmonar, por ejemplo, por inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, incluyendo por nebulizador; intratraqueal, intranasal, epidérmica y transdérmica), oral o parenteral. La administración parenteral incluye inyección o infusión intravenosa, intrarterial, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular; o administración intracraneal, por ejemplo, intratecal o intraventricular.

Para tratar tejidos en el sistema nervioso central, la administración puede hacerse por, por ejemplo, inyección o infusión en el líquido cefalorraquídeo. La administración de ARN antisentido en líquido cefalorraquídeo se describe, por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2007/0117772, "Methods for slowing familial ALS disease progression".

Si se pretende que el oligonucleótido antisentido de la presente divulgación se administre a células en el sistema nervioso central, la administración puede ser con uno o más agentes capaces de promover la penetración del oligonucleótido antisentido objeto a través de la barrera hematoencefálica. La inyección puede hacerse, por ejemplo, en la corteza entorrinal o el hipocampo. La administración de factores neurotróficos por administración de un vector de adenovirus a neuronas motoras en tejido muscular se describe es, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 6.632.427, "Adenoviral-vector-mediated gene transfer into medullary motor neurons". La administración de vectores directamente al cerebro, por ejemplo, el estriado, el tálamo, el hipocampo, o la sustancia negra, se conoce en la técnica y se describe, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos n.º 6.756.523, "Adenovirus vectors for the transfer of foreign genes into cells of the central nervous system particularly in brain". La administración puede ser rápida como mediante inyección o hacerse durante un periodo de tiempo como por infusión o administración lenta de formulaciones de liberación lenta.

Los oligonucleótidos antisentido objeto también puede enlazarse o conjugarse con agentes que proporcionan propiedades farmacéuticas o farmacodinámicas deseables. Por ejemplo, el oligonucleótido antisentido puede acoplarse a cualquier sustancia, conocida en la técnica para promover la penetración o transporte a través de la barrera hematoencefálica, tal como un anticuerpo para el receptor de transferrina, y administrarse mediante inyección intravenosa. El compuesto antisentido puede enlazarse con un vector viral, por ejemplo, que hace al compuesto antisentido más eficaz y/o aumenta el transporte del compuesto antisentido a través de la barrera hematoencefálica. La rotura osmótica de la barrera hematoencefálica también puede realizarse, por ejemplo, por infusión de azúcares incluyendo, pero sin limitación, mesoeritritol, xilitol, D(+) galactosa, D(+) lactosa, D(+) xilosa, dulcitol, mio-inositol, L(-) fructosa, D(-) manitol, D(+) glucosa, D(+) arabinosa, D(-) arabinosa, celobiosa, D(+)

maltosa, D(+) rafinosa, L(+) ramnosa, D(+) melibiosa, D(-) ribosa, adonitol, D(+) arabitol, L(-) arabitol, D(+) fucosa, L(-) fucosa, D(-) lixosa, L(+) lixosa y L(-) lixosa, o aminoácidos que incluyen, pero sin limitación, glutamina, lisina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glicina, histidina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, tirosina, valina y taurina. Los métodos y materiales para potenciar la penetración de la barrera hematoencefálica se describen, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos n.º 4.866.042, "Method for the delivery of genetic material across the blood brain barrier", 6.294.520, "Material for passage through the blood-brain barrier", y 6.936.589, "Parenteral delivery system".

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

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

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

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

Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación incluyen, pero sin limitación, soluciones, emulsiones, espumas y formulaciones que contienen liposomas. Las composiciones farmacéuticas y formulaciones de la presente divulgación pueden comprender uno o más potenciadores de la penetración, vehículos, excipientes u otros principios activos o inactivos.

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

Las formulaciones de la presente divulgación incluyen formulaciones liposomales. Como se usa en la presente divulgación, el término "liposoma" significa una vesícula compuesta de lípidos anfílicos dispuestos en una bicapa o bicapas esféricas. Los liposomas son vesículas unilaminares o multilaminares que tienen una membrana formada de un material lipófilo y un interior acuoso que contiene la composición que va a administrarse. Los liposomas catiónicos son liposomas positivamente cargados que se cree que interactúan con moléculas de ADN negativamente cargadas para formar un complejo estable. Se cree que los liposomas que son sensibles al pH o están cargados negativamente atrapan el ADN en vez de complejarse con él. Se han usado tanto liposomas catiónicos como no catiónicos para administrar ADN a células.

Los liposomas también incluyen liposomas "estéricamente estabilizados", una expresión que, como se usa en el presente documento, se refiere a liposomas que comprenden uno o más lípidos especializados. Cuando se incorporan en liposomas, estos lípidos especializados producen liposomas con vidas mejoradas con respecto a los

liposomas que carecen de tales lípidos especializados. Los ejemplos de liposomas estéricamente estabilizados son aquellos en los que parte de la porción de lípido que forma la vesícula del liposoma comprende uno o más glicolípidos o se derivatiza con uno o más polímeros hidrófilos, tales como un resto de polietilenglicol (PEG). Los liposomas y sus usos se describen adicionalmente en la patente de Estados Unidos n.º 6.287.860.

5

Las formulaciones farmacéuticas y composiciones de la presente divulgación también pueden incluir tensioactivos. El uso de tensioactivos en medicamentos, formulaciones y en emulsiones es muy conocido en la técnica. Los tensioactivos y sus usos se describen adicionalmente en la patente de Estados Unidos n.º 6.287.860.

- 10 En un aspecto, la presente divulgación emplea diversos potenciadores de la penetración para efectuar la eficaz administración de ácidos nucleicos, particularmente oligonucleótidos. Además de ayudar en la difusión de fármacos no lipófilos a través de membranas celulares, los potenciadores de la penetración también potencian la permeabilidad de fármacos lipófilos. Los potenciadores de la penetración pueden clasificarse como pertenecientes a una de cinco amplias categorías, es decir, tensioactivos, ácidos grasos, sales biliares, agentes quelantes y no
- 15 tensioactivos no quelantes. Los potenciadores de la penetración y sus usos se describen adicionalmente en la patente de Estados Unidos n.º 6.287.860.

Un experto en la técnica reconocerá que las formulaciones se diseñan rutinariamente según su uso previsto, es decir, vía de administración.

20

Las formulaciones para administración tópica incluyen aquellas en las que los oligonucleótidos de la divulgación están en mezcla con un agente de administración tópica tal como lípidos, liposomas, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, esteroides, agentes quelantes y tensioactivos. Los lípidos y liposomas incluyen neutros (por ejemplo, dioleoil-fosfatidiletanolamina DOPE, dimiristoilfosfatidilcolina DMPC, diestearoilfosfatidilcolina) negativos (por

25 ejemplo, dimiristoilfosfatidilglicerol DMPG) y catiónicos (por ejemplo, dioleoil-tetrametilaminopropilo DOTAP y dioleoil-fosfatidiletanolamina DOTMA).

- Para administración tópica u otra, los oligonucleótidos de la divulgación pueden encapsularse dentro de liposomas o pueden formar complejos con los mismos, en particular con liposomas catiónicos. Como alternativa, los
- 30 oligonucleótidos pueden estar complejados con lípidos, en particular con lípidos catiónicos. Ácidos grasos y ésteres preferidos, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, y sus usos se describen adicionalmente en la patente de Estados Unidos n.º 6.287.860.

- Las composiciones y formulaciones para administración por vía oral incluyen polvos o gránulos, micropartículas,
- 35 nanopartículas, suspensiones o soluciones en agua o medios no acuosos, cápsulas, cápsulas de gel, sobres, comprimidos o minicompimidos. Pueden ser deseables espesantes, aromatizantes, diluyentes, emulsionantes, adyuvantes de dispersión o aglutinantes. Las formulaciones orales son aquellas en las que los oligonucleótidos de la divulgación se administran conjuntamente con uno o más potenciadores de la penetración, tensioactivos y quelantes. Los tensioactivos incluyen ácidos grasos y/o ésteres o sales de los mismos, ácidos biliares y/o sales de los mismos.
- 40 Los ácidos biliares/sales y ácidos grasos y sus usos se describen adicionalmente en la patente de Estados Unidos n.º 6.287.860. También son combinaciones de potenciadores de la penetración, por ejemplo, ácidos grasos/sales en combinación con ácidos biliares/sales. Una combinación particular es la sal de sodio de ácido láurico, ácido cáprico y UDCA. Los potenciadores de la penetración adicionales incluyen éter polioxietilen-9-laurílico, éter polioxietilen-20-cetílico. Los oligonucleótidos de la divulgación pueden administrarse por vía oral, en forma granulada que incluye
- 45 partículas secadas por pulverización, o complejados para formar micro o nanopartículas. Los agentes de complejantes de oligonucleótidos y sus usos se describen adicionalmente en la patente de Estados Unidos n.º 6.287.860.

- Las composiciones y formulaciones para administración parenteral, intratecal o intraventricular pueden incluir
- 50 soluciones acuosas estériles que también pueden contener tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados tales como, pero sin limitación, potenciadores de la penetración, compuestos portadores y otros vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables.

- Ciertos aspectos de la divulgación proporcionan composiciones farmacéuticas que contienen uno o más compuestos
- 55 oligoméricos y uno o más agentes quimioterapéuticos diferentes que funcionan por un mecanismo no antisentido. Los ejemplos de tales agentes quimioterapéuticos incluyen, pero sin limitación, fármacos quimioterapéuticos para el cáncer tales como daunorrubicina, daunomicina, dactinomicina, doxorubicina, epirubicina, idarrubicina, esorubicina, bleomicina, mafosfamida, ifosfamida, citosina arabinósido, biscloroetil-nitrosurea, busulfano, mitomicina C, actinomicina D, mitramicina, prednisona, hidroxiprogesterona, testosterona, tamoxifeno, dacarbazina,

procarbazina, hexametilmelamina, pentametilmelamina, mitoxantrona, amsacrina, clorambucilo, metilciclohexilnitrosurea, mostazas de nitrógeno, melfalan, ciclofosfamida, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-azacitidina, hidroxiurea, desoxicoformicina, 4-hidroxiperoxíciclo-fosforamida, 5-fluorouracilo (5-FU), 5-fluorodesoxiuridina (5-FUdR), metotrexato (MTX), colchicina, taxol, vincristina, vinblastina, etopósido (VP-16), trimetrexato, irinotecán, topotecán, gemcitabina, tenipósido, cisplatino y dietilestilbestrol (DES). Cuando se usan con los compuestos de la divulgación, tales agentes quimioterapéuticos pueden usarse individualmente (por ejemplo, 5-FU y oligonucleótido), secuencialmente (por ejemplo, 5-FU y oligonucleótido durante un periodo de tiempo seguido de MTX y oligonucleótido), o en combinación con uno o varios de otros de tales agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, 5-FU, MTX y oligonucleótido, o 5-FU, radioterapia y oligonucleótido). Los fármacos antiinflamatorios, que incluyen, pero sin limitación, fármacos antiinflamatorios no esteroideos y corticosteroides, y fármacos antivirales, que incluyen, pero sin limitación, ribivirina, vidarabina, aciclovir y ganciclovir, también pueden combinarse en composiciones de la divulgación. Las combinaciones de compuestos antisentido y otros fármacos no antisentido también están dentro del alcance de la presente divulgación. Pueden usarse dos o más compuestos combinados juntos o secuencialmente.

En otro aspecto relacionado, las composiciones de la divulgación pueden contener uno o más compuestos antisentido, particularmente oligonucleótidos, dirigidos a un primer ácido nucleico y uno o más compuestos antisentido adicionales dirigidos a un segundo ácido nucleico diana. Por ejemplo, la primera diana puede ser una secuencia antisentido particular de un Gen del Síndrome de Down, y la segunda diana puede ser una región de otra secuencia de nucleótidos. Como alternativa, las composiciones de la divulgación pueden contener dos o más compuestos antisentido dirigidos a diferentes regiones de la misma diana de ácido nucleico de un Gen del Síndrome de Down. Se ilustran numerosos ejemplos de compuestos antisentido en el presente documento y otros pueden seleccionarse de entre compuestos adecuados conocidos en la técnica. Pueden usarse dos o más compuestos combinados juntos o secuencialmente.

Dosificación:

Se cree que la formulación de composiciones terapéuticas y su posterior administración (dosificación) están dentro de la experiencia de los expertos en la técnica. La dosificación depende de la gravedad y sensibilidad de la patología que va a tratarse, durando el ciclo de tratamiento de varios días a varios meses, o hasta que se efectúe una cura o se logre una disminución de la patología. Pueden calcularse programas de dosificación óptimos a partir de mediciones de acumulación de fármaco en el cuerpo del paciente. Los expertos pueden determinar fácilmente dosificaciones óptimas, metodologías de dosificación y tasas de repetición. Las dosificaciones óptimas pueden variar dependiendo de la potencia relativa de oligonucleótidos individuales, y generalmente pueden estimarse basándose en las CE50 que se encuentra que son eficaces en modelos animales *in vitro* e *in vivo*. En general, la dosificación es de 0,01 µg a 100 g por kg de peso corporal, y puede administrarse una vez o más diariamente, semanalmente, mensualmente o anualmente, o incluso una vez cada 2 a 20 años. Los expertos en la técnica pueden estimar fácilmente tasas de repetición para la dosificación basándose en tiempos de residencia medidos y concentraciones del fármaco en los fluidos o tejidos corporales. Tras el tratamiento satisfactorio, puede desearse que el paciente reciba terapia de mantenimiento para prevenir la reaparición de la patología, donde el oligonucleótido se administra en dosis de mantenimiento, que oscilan de 0,01 µg a 100 g por kg de peso corporal, una vez o más diariamente, a una vez cada 20 años.

En aspectos, un paciente se trata con una dosificación de fármaco que es al menos aproximadamente 1, al menos aproximadamente 2, al menos aproximadamente 3, al menos aproximadamente 4, al menos aproximadamente 5, al menos aproximadamente 6, al menos aproximadamente 7, al menos aproximadamente 8, al menos aproximadamente 9, al menos aproximadamente 10, al menos aproximadamente 15, al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 25, al menos aproximadamente 30, al menos aproximadamente 35, al menos aproximadamente 40, al menos aproximadamente 45, al menos aproximadamente 50, al menos aproximadamente 60, al menos aproximadamente 70, al menos aproximadamente 80, al menos aproximadamente 90, o al menos aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal. Ciertas dosificaciones inyectadas de oligonucleótidos antisentido se describen, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos n.º 7.563.884, "Antisense modulation of PTP1B expression".

Aunque se han descrito anteriormente diversos aspectos de la presente divulgación, debe entenderse que se han presentado únicamente a modo de ejemplo, y no de limitación. Pueden hacerse numerosos cambios a los aspectos descritos de acuerdo con la divulgación en el presente documento sin apartarse del espíritu o alcance de la divulgación. Por lo tanto, la anchura y alcance de la presente divulgación no debe limitarse por ninguno de los aspectos que se han descrito anteriormente.

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

5

Ejemplos

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

10

Ejemplo 1: Diseño de oligonucleótidos antisentido específicos para una molécula de ácido nucleico antisentido a un Gen del Síndrome de Down y/o una hebra sentido de un polinucleótido de un Gen del Síndrome de Down

15 Como se ha indicado anteriormente la expresión "oligonucleótido específico para" u "dianas de oligonucleótido" se refiere a un oligonucleótido que tiene una secuencia (i) capaz de formar un complejo estable con una porción del gen elegido como diana, o (ii) capaz de formar un dúplex estable con una porción de una transcripción de ARNm del gen elegido como diana.

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

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

40

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

45

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

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

Puede realizarse un ensayo de la curva de fusión usando una copia de ADNc de la molécula de ARN antisentido natural real o un nucleótido de ADN o ARN sintético correspondiente al sitio de unión de la molécula. Están disponibles múltiples kits que contienen todos los reactivos necesarios para realizar este ensayo (por ejemplo, kit MeltDoctor de Applied Biosystems Inc.). Estos kits incluyen una solución de tampón adecuada que contiene uno de los colorantes de unión a ADN bicatenario (dsADN) (tales como los colorantes ABI HRM, SYBR Green, SYTO, etc.). Las propiedades de los colorantes de dsADN son tales que casi no emiten fluorescencia en forma libre, pero son

55

altamente fluorescentes cuando se unen a dsADN.

Para realizar el ensayo, el ADNc o un oligonucleótido correspondiente se mezclan con la molécula en concentraciones definidas por los protocolos del fabricante particulares. La mezcla se calienta a 95 °C para disociar todos los complejos de dsADN previamente formados, luego se enfría lentamente a temperatura ambiente u otra temperatura menor definida por el fabricante del kit para permitir que se hibriden las moléculas de ADN. Después, los complejos recientemente formados se calientan lentamente a 95 °C con recogida de datos continua simultánea sobre la cantidad de fluorescencia que se produce por la reacción. La intensidad de fluorescencia es inversamente proporcional a las cantidades de dsADN presentes en la reacción. Los datos pueden recogerse usando un instrumento de PCR en tiempo real compatible con el kit (por ejemplo, sistema de PCR en tiempo real StepOne Plus de ABI o el instrumento LightTyper, Roche Diagnostics, Lewes, Reino Unido).

Los picos de fusión se construyen representando la derivada negativa de la fluorescencia con respecto a la temperatura ($-d(\text{Fluorescencia})/dT$) sobre el eje y) contra la temperatura (eje x) usando software apropiado (por ejemplo, LightTyper (Roche) o SDS Dissociation Curve, ABI). Los datos se analizan para identificar la temperatura de la rápida transición del complejo de dsADN a moléculas monocatenarias. Esta temperatura se llama T_m y es directamente proporcional a la intensidad de la interacción entre las dos moléculas. Normalmente, la T_m se excederá de 40 °C.

20 **Ejemplo 2: Modulación de un polinucleótido de un Gen del Síndrome de Down**

Tratamiento de células HepG2 con oligonucleótidos antisentido

Se cultivaron células HepG2 de ATCC (cat. n.º HB-8065) en medio de crecimiento (MEM/EBSS (Hyclone, cat. n.º SH30024 o Mediatech, cat. n.º MT-10-010-CV) + FBS al 10 % (Mediatech, cat. n.º MT35-011-CV) + penicilina/estreptomicina (Mediatech, cat. n.º MT30-002-CI)) a 37 °C y CO₂ al 5 %. Un día antes del experimento, las células volvieron a sembrarse a la densidad de $1,5 \times 10^5/\text{ml}$ en placas de 6 pocillos y se incubaron a 37 °C y CO₂ al 5 %. El día del experimento, el medio en las placas de 6 pocillos se cambió a medio de crecimiento nuevo. Todos los oligonucleótidos antisentido se diluyeron a la concentración de 20 μM . Se incubaron dos μl de esta solución con 400 μl de medio Opti-MEM (Gibco, cat. n.º 31985-070) y 4 μl de Lipofectamine 2000 (Invitrogen, cat. n.º 11668019) a temperatura ambiente durante 20 min y se aplicó a cada pocillo de las placas de 6 pocillos con células HepG2. Se usó una mezcla similar que incluía 2 μl de agua en lugar de la solución de oligonucleótido para los controles transfectados con vector vacío. Después de 3-18 h de incubación a 37 °C y CO₂ al 5 %, el medio se cambió a medio de crecimiento nuevo. 48 h después de la adición de oligonucleótidos antisentido, el medio se eliminó y se extrajo ARN de las células usando el sistema de aislamiento de ARN total SV de Promega (cat. n.º Z3105) o el kit de aislamiento de ARN total RNeasy de Qiagen (cat. n.º 74181) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se añadieron 600 ng de ARN a la reacción de transcripción inversa realizada usando el kit de ADNc Verso de Thermo Scientific (cat. n.º AB1453B) o el kit High Capacity ADNc Reverse Transcription (cat. n.º 4368813) como se describe en el protocolo del fabricante. El ADNc de esta reacción de transcripción inversa se usó para monitorizar la expresión génica por PCR en tiempo real usando mezcla de expresión génica Taqman de ABI (cat. n.º 4369510) y cebadores/sondas diseñados por ABI (ensayo de expresión génica Taqman de Applied Biosystems: Hs00176369_ml y Hs00176369_ml, por Applied Biosystems Inc., Foster City CA). Se usó el siguiente ciclo de PCR: 50 °C durante 2 min, 95 °C durante 10 min, 40 ciclos de (95 °C durante 15 segundos, 60 °C durante 1 min) usando el ciclador térmico Mx4000 (Stratagene).

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

50 **Resultados**

Los resultados de PCR en tiempo real muestran que los niveles de DYRK1a ARNm en las células HepG2 se aumentan significativamente 48 h después de tratamiento con uno de los oligos diseñados para DYRK1a antisentido Hs. 713879 (CUR-0885-CUR-0890). (Figura 1).

Los resultados de PCR en tiempo real muestran que los niveles de DSCR1 ARNm en las células HepG2 se aumentan significativamente 48 h después de tratamiento con uno de los oligos diseñados para DSCR1 antisentido DA403464 (Figura 2).

Tratamiento de células Vero 76 con oligonucleótidos antisentido

Las células Vero 76 de ATCC (cat. n.º CRL-1587) se cultivaron en medio de cultivo (MEM/EBSS (Hyclone cat. n.º SH30024, o Mediatech cat. n.º MT-10-010-CV) + FBS al 10 % (Mediatech cat. n.º MT35- 011-CV) + penicilina/estreptomicina (Mediatech cat. n.º MT30-002-CI)) a 37 °C y CO₂ al 5 %. Un día antes del experimento las células se volvieron a poner en placas a la densidad de 1,5 x 10⁵/ml en placas de 6 pocillos y se incubaron a 37 °C y CO₂ al 5 %. El día del experimento, el medio en las placas de 6 pocillos se cambió a medio de crecimiento nuevo. Todos los oligonucleótidos antisentido se diluyeron a la concentración de 20 µM. Dos µl de esta solución se incubaron con 400 µl de medio Opti-MEM (Gibco cat. n.º 31985-070) y 4 µl de Lipofectamine 2000 (Invitrogen cat. n.º 11668019) a temperatura ambiente durante 20 min y se aplicó a cada pocillo de las placas de 6 pocillos con células Vero 76. Se usó una mezcla similar que incluía 2 µl de agua en lugar de la solución de oligonucleótido para los controles transfectados con vector vacío. Después de 3-18 h de incubación a 37 °C y CO₂ al 5 %, el medio se cambió a medio de crecimiento nuevo. 48 h después de la adición de oligonucleótidos antisentido, el medio se eliminó y el ARN se extrajo de las células usando el sistema de aislamiento de ARN total SV de Promega (cat. n.º Z3105) o el kit de aislamiento de ARN total RNeasy de Qiagen (cat. n.º 74181) siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Se añadieron 600 ng de ARN a la reacción de transcripción inversa realizada usando el kit de ADNc Verso de Thermo Scientific (cat. n.º AB1453B) o el kit High Capacity ADNc Reverse Transcription (cat. n.º 4368813) como se describe en el protocolo del fabricante. El ADNc de esta reacción de transcripción inversa se usó para controlar la expresión génica por PCR en tiempo real usando mezcla de expresión génica Taqman de ABI (cat. n.º 4369510) y cebadores/sondas diseñados por ABI (ensayo de expresión génica Taqman de Applied Biosystems: Hs00176369_ml y Hs00176369_ml, de Applied Biosystems Inc., Foster City CA). Se usó el siguiente ciclo de PCR: 50 °C durante 2 min, 95 °C durante 10 min, 40 ciclos de (95 °C durante 15 segundos, 60 °C durante 1 min) usando el ciclador térmico Mx4000 (Stratagene) o la máquina de PCR en tiempo real StepOne Plus (Applied Biosystems).

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

Los resultados de PCR en tiempo real muestran que los niveles de ARNm de DYRK1a en las células Vero se aumentan significativamente 48 h después de tratamiento con 1 de los oligos diseñados para DYRK1a antisentido Hs, 713879. (Figura 3).

Los resultados de PCR en tiempo real muestran que los niveles de ARNm de DSCR1 en las células Vero se aumentan significativamente 48 h después de tratamiento con uno de los oligos diseñados para DSCR1 antisentido DA403464. (Figura 4).

Además, aunque puede haberse desvelado una característica particular de la invención con respecto únicamente a una de varias implementaciones, dicha característica puede combinarse con una o más características diferentes de otras implementaciones según pueda desearse y sea ventajoso para cualquier aplicación determinada o particular.

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

LISTA DE SECUENCIAS

<110> CuRNA, Inc.

<120> TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES RELACIONADAS CON UN GEN DEL SÍNDROME DE DOWN MEDIANTE LA INHIBICIÓN DE UNA TRANSCRIPCIÓN ANTISENTIDO NATURAL A UN GEN DEL SÍNDROME DE DOWN

<130> DS Gene

<150> 61/220.747
<151> 26-06-2009

<150> 61/235.752
<151> 21-08-2009

<160> 24

<170> PatentIn versión 3.5

5

<210> 1

<211> 5517

<212> ADN

<213> Homo sapiens

10

<300>

<308> NM_101395

<309> 20-06-2010

<313> (1)..(5517)

15

<400> 1

gggagcgcg	cgcgggagcc	cgaggctgag	actcaccgga	ggaagcggcg	cgagcgcccc	60
gccatcgtcc	cggtgaagt	gcagtggcac	gatcataggt	ggtcactaca	gtctcagatt	120
cctgggctta	agcagttctc	ccacctcagc	ctccccagta	gctgggatta	cagtgttata	180
gttttgccgc	tggactcttc	cctcccttcc	cccaccccat	caggatgata	tgagacttga	240
aagaagacga	tgcatacagg	aggagagact	tcagcatgca	aaccttcac	tggtcggctt	300
gcaccgtcat	tttcattcca	tgtctgtggc	cttcagatgg	ctggacagat	gccccattca	360
catcagtaca	gtgaccgtcg	ccagccaaac	ataagtgaac	aacaggtttc	tgcccttatca	420
tattctgacc	agattcagca	acctctaact	aaccagggtga	tgctgatata	tgatcatgta	480
cagaggcgga	tgccccaac	cttcctgtgac	ccagcaactg	ctccctgag	aaaactttct	540
gttgacttga	tcaaaacata	caagcatatt	aatgagggtt	actatgcaaa	aaagaagcga	600
agacaccaac	agggccagg	agacgattct	agtcataaga	aggaacggaa	ggttttacaat	660
gatggttatg	atgatgataa	ctatgattat	attgtaaaaa	acggagaaaa	gtggatggat	720
cgttacgaaa	ttgactcctt	gataggcaaa	ggttccctttg	gacaggttgt	aaaggcatat	780
gatcgtgtgg	agcaagaatg	ggttgccatt	aaaataataa	agaacaagaa	ggcttttctg	840
aatcaagcac	agatagaagt	gcgacttctt	gagctcatga	acaaacatga	cactgaaatg	900
aaatactaca	tagtgcat	gaaacgccac	tttatgtttc	gaaacctct	ctgttttagtt	960
tttgaaatgc	tgctctacaa	cctctatgac	ttgctgagaa	acaccaat	ccgaggggtc	1020
tctttgaacc	taacacgaaa	gtttgcgcaa	cagatgtgca	ctgcactgct	tttccttgcg	1080

```

actccagaac ttagtatcat tcactgtgat ctaaaacctg aaaatatcct tctttgtaac 1140
cccaaacgca gtgcaatcaa gatagttgac tttggcagtt cttgtcagtt ggggcagagg 1200
atataccagt atattcagag tcgcttttat cggctctccag aggtgctact gggaatgcct 1260
tatgaccttg ccattgatat gtggtccctc ggggtgtattt tggttgaaat gcacactgga 1320
gaacctctgt tcagtgggtgc caatgaggta gatcagatga ataaaatagt ggaagttctg 1380
gggtattccac ctgctcatat tcttgacca gacacaaaag caagaaagtt ctttgagaag 1440
ttgccagatg gcacttgga cttaaagaag accaaagatg gaaaacggga gtacaaacca 1500
ccaggaaccc gtaaaactta taacattctt ggagtggaaa caggaggacc tgggtggcga 1560
cgtgctgggg agtcaggta tacggtcgct gactacttga agttcaaaga cctcatttta 1620
aggatgcttg attatgaccc caaaactcga attcaacctt attatgctct gcagcacagt 1680
ttcttcaaga aaacagctga tgaaggta aatacaagta atagtgtatc tacaagcccc 1740
gccatggagc agtctcagtc ttcgggcacc acctccagta catcgtcaag ctcagggtggc 1800
tcatcgggga caagcaacag tgggagagcc cggtcggatc cgacgcacca gcacggcac 1860
agtgggtggc acttcacagc tgccgtgcag gccatggact gcgagacaca cagtccccag 1920
gtgagctcgc acgtggttca tttgcttgtg tcacctgcca ttctcagggt gagcagcact 1980
ggatgccagg tgcctttaga atgaccgtat catttaccct agaggttcat gacgttcttg 2040
tctaaggaaa tgtgcgtcag caatttcctg ctctctcttg ttggtcaggc actgaagctc 2100
ctacacaggt cactgttgaa actcatcctg ttcaagaaac aacctttcat gtagcccctc 2160
aacagaatgc attgcatcat caccatggta acagttccca tcaccatcac caccaccacc 2220
accatcacca ccaccatgga caacaagcct tgggtaaccg gaccaggcca aggggtctaca 2280
attctccaac gaatagctcc tctacccaag attctatgga ggttgggcac agtcaccact 2340
ccatgacatc cctgtcttcc tcaacgactt ctctctcgac atcttctctc tctactggta 2400
accaaggcaa tcaggcctac cagaatcgcc cagtgggtgc taataccttg gactttggac 2460
agaatggagc tatggacgtt aatttgaccg tctactccaa tccccgcaa gagactggca 2520
tagctggaca tccaacatac caattttctg ctaatacagg tcttgacatc tacatgactg 2580
aaggacatct gacaatgagg caaggggctg atagagaaga gtcccccag acaggagttt 2640
gtgtgcaaca gagtcctgta gctagctcgt gactacattg aaacttgagt ttgtttcttg 2700
tgtgttttta tagaagtggg gttttttttc caaaaacaaa gtgcaaagct gcttgaatca 2760
ggaggagatt aacacactga accgctacaa gagggcaag ctgatttttt ttttaacttg 2820
aaaagattgc aaaggacat tgaagtgtt aaaagagcca tgtccaaacc catcttcatg 2880
gatagctcag aggtatcctc tttttgctcc cccattttta cttgccacat ccagtcaca 2940
gtgggggttt tttgtctttc tattcagcaa aagttaatat tcagatgttg gtcttggtca 3000

```

tttgccaact aatttttaaag taaaaggcac tgcacataat ttgcataaag ggcccatga	3060
gggtgttttt tttttttctt tttgtccccc ccatcccctt ttttttttgt tttgttctgt	3120
tttgtttttg gtgggagggt gggaaatttg ggtttttaag tcctctaaac acacttgggc	3180
acggaaatgc agtactgtaa ggaagaggga cctccagctt ccacaaacac catcttcagc	3240
tgtatgaaag ggacggttgt ggtgaagttt gtcaggcaca gtaagcatgc tgagtggcgg	3300
ggatcagaac tctcctatct gaacctactg aggagcaaag cagcaattac atgggatcct	3360
gtggctctcc cgttgcagag gccacaggaa gataggatgg aacgtgactg gtctcctaac	3420
caagggtcac tgagaagcaa tcaacgggtc ggtcgtggcc agtcctgggg aggtctgagt	3480
ggtggtcttt gggataacct ttggccttat ggatttggac tcgaaattag aagagcctac	3540
catttcagat gcaatcactt ttggacatgc ttttgcagac agtccttaat gctgaaaaca	3600
cagagaatgg gtaattcaag aggcctttct tttaaaatag acttttgtga cccactaatt	3660
gtaagggtatt gcaaggtcac tttgcgtgtg tcataaagtt gacttcctta ttggttgaag	3720
gtcacagaag tagtggtttg ctttgcagga aatagctaca gctgtgtccc ttctgtcttt	3780
ttactttttc ttttgccttt tctcggcacg tggtatctcc accatttctt ctgcacaaag	3840
atgtcttctg ttcatcctga acatttttaa aaaatgcaga attttatgtg actgcttttt	3900
tgcttcacaa ttatgctgtg aattttacaa aaatttattt tcttttttga taatttattg	3960
taccaaagct gtttttatag cacatagatg tctgtaacca ataatgtagc agttctgcac	4020
tttgacacaa ggtgtaacta gaccattttt aaatgtcagt tgaaaattat ggctgtacta	4080
ttgcttaaac aaaactggaa ctggtgttga atccatagcc aatacattta cagcaatctg	4140
tgtactgaac atagtagatt gacatctaat tcaagattac aacatctgtt acattctaag	4200
tgtgttcagg cttctgaagg taaagggaca ctggatccag aagctatgga accagcagtt	4260
gattcttgta ttctgatta acctacttgt aaacttgaaa gcaagacctt gattgcacca	4320
acagggtccag agtatgagtg caagcaaagc agaactctca tgcgtgacct gagcagacag	4380
gctggtattt aacagggtgc tcgtgttgag attacgtgc cttaatgtaa cacagtctgg	4440
cagttgctaa atttgtgttc ccatttttaa ttgaccaatt ttgggggtgtg acacttttga	4500
gcggttgaat tgggagaatg aagataagta atttacctgt ccaggatcaa aagaagccta	4560
gaaaagaagc agtaatctac ctctgccgat aacctgttta agatgactca gcagaacacc	4620
gcgtttcatt ctattggtca attccatgtg gctgactagg tcaatttttt ttctgaacaa	4680
aagcaggttt ttatatgtaa acagtgagaa aagaaaggct aaacactatg taaatgtgaa	4740
tggaaacttg gaaatactcg tttttataaa ctacaaaaac tttttgttgt ttatcaggaa	4800
atccatattt attttgtaat taactgtcaa gcctgtggat gatttttttg aacttggtag	4860
ttcataaagg ttacagtga ataaaaggat atcatcttga gtatagcaat atcaaaagga	4920
attcagtagt tactgctgtt taggaatata aggttaagat atcatatggg tcaggtcatt	4980

ttttttttct gtgctggttg ccacatctta gcaagcacca aaaaactaaa gcagttttta	5040
aaccgatatt tacgtaaaga aaatcataaa atccaatgct tctgcatact gtgttatggt	5100
acagtcaggt tttgtgtgct ttactacaca gtttggttac aggacttctg tgcattgtaa	5160
acataaacag catggaaaag gttaaatacc tgtgttcaga ttgtaagatc tagtccggac	5220
ttgctgtgta tattgtaacg ttaaataaaa aaagaacccc cttttgtatt atagtcatgc	5280
ggctcttatgt atgataaaca gttgaataat ttgtctcag actctttact atgctttttt	5340
aaaaattaat ttaagaaaaa tgtaaacata gtaaaaatct tcctatgcaa ttaaactggt	5400
ccaggtctgg taggtatagt atcaaagttg agttaaatgt gtaaaaagga aactatttga	5460
gatacattga cataggcatc agcaatctct gaaagtaaaa attggagggt taacaga	5517

<210> 2

<211> 2457

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<300>

<308> NM_004414

10 <309> 19-04-2010

<313> (1)..(2457)

<400> 2

ggagcgcggtg	aggctccggc	gcgcaagccc	ggagcagccc	gctggggcgc	acagggtcgc	60
gcgggcgcgg	ggatggagga	cggcgtggcc	ggtccccagc	tcggggccgc	ggcggaggcg	120
gcggaggcgg	ccgaggcgcg	agcgcgccc	ggggtgacgc	tcgggccctt	cgcgccctc	180
tcgggggcgg	ccgaggcgga	cgagggcggc	ggcgactgga	gcttcattga	ctgcgagatg	240
gaggaggtgg	acctgcagga	cctgccagc	gccaccatcg	cctgtcacct	ggacccgcgc	300
gtgttcgtgg	acggcctgtg	ccgggccaaa	tttgagtccc	tctttaggac	gtatgacaag	360
gacatcacct	ttcagtattt	taagagcttc	aaacgagtca	gaataaactt	cagcaacccc	420
ttctccgcag	cagatgccag	gctccagctg	cataagactg	agtttctggg	aaaggaaatg	480
aagttatatt	ttgctcagac	cttacacata	ggaagctcac	acctggctcc	gccaaatcca	540
gacaagcagt	ttctgatctc	ccctcccgcc	tctccgccag	tgggatggaa	acaagtggaa	600
gatgcgaccc	cagtcataaa	ctatgatctc	ttatatgcca	tctccaagct	ggggccaggg	660
gaaaagtatg	aattgcacgc	agcgactgac	accactccca	gcgtggtggt	ccatgtatgt	720
gagagtgatc	aagagaagga	ggaagaagag	gaaatggaaa	gaatgaggag	acctaagcca	780
aaaattatcc	agaccaggag	gccggagtac	acgccgatcc	acctcagctg	aactggcacg	840
cgacgaggac	gcattccaaa	tcataactcac	gggaggaatc	ttttactgtg	gaggtggctg	900
gtcacgactt	cttcggaggt	ggcagccgag	atcgggggtg	cagaaatccc	agttcatggt	960
gctcagaaga	gaatcaaggc	cgtgtccctt	tgttctaattg	ctgcacacca	gttactgttc	1020

atggcaccog	ggaatgactt	gggccaatca	ctgagtttgt	ggtgatcgca	caaggacatt	1080
tgggactgtc	ttgagaaaac	agataatgat	agtgttttgt	acttgtttctt	ttctggtagg	1140
ttctgtctgt	gccaaagggca	ggttgatcag	tgagctcagg	agagagcttc	ctgtttctaa	1200
gtggcctgca	ggggccactc	tctactggta	ggaagaggta	ccacaggaag	ccgcctagtg	1260
cagagagggt	gtgaaaacag	cagcaatgca	atgtggaaat	tgtagcgttt	cctttcttcc	1320
ctcatgttct	catgtttgtg	catgtatatt	actgatttac	aagactaacc	tttggttcgta	1380
tataaagtta	caccgttggt	gttttacatc	ttttgggaag	ccaggaaagc	gtttggaaaa	1440
cgtatcacct	ttcccagatt	ctcggattct	cgactctttg	caacagcact	tgcttgcgga	1500
actcttcctg	gaatgcattc	actcagcatc	cccaaccgtg	caacgtgtaa	cttgtgcttt	1560
tgcaaaagaa	gttgatctga	aattcctctg	tagaatttag	cttatacaat	tcagagaata	1620
gcagtttcac	tgccaacttt	tagtggggtga	gaaatttttag	tttaggtgtt	tgggatcgga	1680
cctcagtttc	tgttgtttct	tttatgtggt	ggtttctata	catgaatcat	agccaaaaaac	1740
ttttttggaa	actgtttggt	gagatagttg	gttcttttac	cccacgaaga	catcaagata	1800
cacttgtaaa	taaagctgat	agcatatatt	catacctggt	gtacacttgg	gtgaaaagta	1860
tggcagtggt	agactaagat	gtattaacct	acctgtgaat	catatgttgt	aggaaaagct	1920
gttcccatgt	ctaacaggac	ttgaattcaa	agcatgtcaa	gtggatagta	gatctgtggc	1980
gatatgagag	ggatgcagtg	cctttcccca	ttcattcctg	atggaattgt	tatactaggt	2040
taacatttgt	aatttttttc	tagttgtaat	gtgtatgtct	ggtaaatagg	tattatatatt	2100
tggccttaca	ataccgtaac	aatgtttgtc	attttgaaat	acttaatgcc	aagtaacaat	2160
gcatgctttg	gaaatttgga	agatgggttt	attctttgag	aagcaaatat	gtttgcatta	2220
aatgctttga	ttgttcatat	caagaaattg	attgaacggt	ctcaaaccct	gtttacggta	2280
cttggttaaga	gggagccggt	ttgggagaga	ccattgcac	gctgtccaag	tgtttcttgt	2340
taagtgcttt	taaactggag	aggctaacct	caaaatat	tttttaactg	cattctataa	2400
taaatgggca	cagtatgctc	cttacagaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaa	2457

<210> 3

<211> 3814

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 3

atctgttaaa cctccaattt ttactttcag agattgctga tgctatgtc aatgtatctc	60
aaatagtttc ctttttacac atttaactca actttgatac tatacctacc agacctggac	120
cagtttaatt gcataggaag atttttacta tgtttacatt tttcttaaata taatttttaa	180
aaaagcatag taaagagtct gaggacaaat tattcaactg tttatcatac ataagaccgc	240
atgactataa taaaagggg gggtcttttt tcatttaacg ttacaatata cacagcaagt	300

ccggactaga tcttacaatc tgaacacagg tattttaacct tttccatgct gtttatgttt	360
acaatgcaca gaagtcctgt aaccaaactg tgtagtaaag cacacaaaac tggactgtaa	420
cataacacag tatgcagaag cattggattt tatgattttc tttacgtaaa tatcggttta	480
aaaactgctt tagtTTTTTg gtgcttgcta agatgtggca accagcacag aaaaaaaaaa	540
tgacctgacc catatgatat cttaacctta tattcctaaa cagcagtaac tactgaattc	600
cttttgatat tgctatactc aagatgatat ccttttattc actgtaaaac tttatgaact	660
accaagtcca aaaaaatcat ccacaggctt gacagttaat tacaaaataa atatggattt	720
cctgataaac aacaaaaagt ttttgtagtt tataaaaaac agtatttcca agtttccatt	780
cacatttaca tagtgtttag cctttctttt ctactgttt acatataaaa acctgctttt	840
gttcagaaaa aaaattgacc tagtcagcca catggaattg accaatagaa tgaaacgcgg	900
tgttctgctg agtcatctta aacaggttat cggcagagg agattactgc ttcttttcta	960
ggcttctttt gatcctggac aggtaaatta cttatcttca ttctccaat tcaaccgctc	1020
aaaagtgtca caccctaaaa ttggtcaatt taaaatggga acacaaattt agcaactgcc	1080
agactgtgtt acattaaggc agcgtaatct caacacgagg cacctgttaa ataccagcct	1140
gtctgctcag gtcacgcatg agagtctgc tttgcttgca ctcatactct ggacctgttg	1200
gtgcaatcaa ggtcttgctt tcaagtttac aagtaggtta atcaggaata caagaatcaa	1260
ctgctggttc catagcttct ggatccagtg tccctttacc ttcagaagcc tgaacacact	1320
tagaatgtaa cagatgttgt aatcttgaat tagatgtcaa tctactatgt tcagtacaca	1380
gattgctgta aatgtattgg ctatggattc aacaacagtt ccagttttgt ttaagcaata	1440
gtacagccat aattttcaac tgacatttaa aaatggctta gttacacctt gtgtcaaagt	1500
gcagaactgc tacattattg gttacagaca tctatgtgct ataaaaacag ctttgggtaca	1560
ataaattatc aaaaaagaaa ataaattttt gtaaaattca cagcataatt gtgaggcaaa	1620
aaagcagtca cataaaattc tgcatttttt aaaaatgttc aggatgaaca gaagacatct	1680
ttgtgcagaa gaaatggtgg agataccacg tgccgagaaa aagcaaaaga aaaagtaaaa	1740
agcaggaagg gacacagctg tagctatttc catcaaagca aaccactact tctgtgacct	1800
tcaaccaata aggaagtcaa ctttatgaca cgcgcaaagt gacctgcaa taccttacia	1860
ttagtggttc acaaaagtct attttaaaag aaaggcctct tgaattaccc attctctgtg	1920
ttttcagcat taaggactgt ctgcaaaagc atgtccaaaa gtgattgcat ctgaaatggt	1980
aggctcttct aatttcgagt ccaaaccat aaggccaaag gttatcccaa agaccaccac	2040
tcagacctcc ccaggactgg ccacgaccga cccgttgatt gcttctcagt gcaccttgg	2100
taggagacca gtcacgttcc atcctatctt cctgtggcct ctgcaacggg agagccacag	2160
gatcccatgt aattgctgct ttgctcctca gtagggtcag ataggagagt tctgatcccc	2220
gccactcagc atgcttactg tgcctgacaa acttcaccac aaccgtccct ttcatacagc	2280

tgaagatggt gtttgtggaa gctggaggtc cctcttcctt acagtactgc atttcogtgc	2340
ccaagtgtgt ttagaggact taaaaacca aatttccac cctcccaccc aaaacaaaac	2400
agaacaaaac aaaaaaaaaag ggggatgggg gggacaaaaa gaaaaaaaaa aaacaccctc	2460
atggggccct ttatgcaaat tatgtgcagt gccttttact ttaaaattag ttggcaaatg	2520
accaagacca acatctgaat attaactttt gctgaataga aagacaaaaa aaccccactg	2580
tgactgggat gtggcaagtt aaaatggggg agcaaaaaga ggatacctct gagctatcca	2640
tgaagatggg tttggacatg gctcttttaa acacttcaat gtccctttgc aatcttttca	2700
agttaaaaaa aaaatcagct ttgccctctt gtagcggttc agtgtgttaa tctcctcctg	2760
attcaagcag ctttgcactt tgttttttga aaaaaaacac cacttctata aaaacacaca	2820
agaaacaaac tcaagtttca atgtagtcac gagctagcta caggactctg ttgcacacaa	2880
actcctgtca tgggggactc ttctctatca gcccttgcc tcattgtcag atgtccttca	2940
gtcatgtaat gtgcaggacc tgtattagca gaaaattggt atgttggatg tccagctatg	3000
ccagtctctt ggcggggatt ggagtagacg gtcaaattaa cgtccatagc tccattctgt	3060
ccaaagtcca aggtattagc agccactggg cgattctggt aggcctgatt gccttggtta	3120
ccagtagagg aggaagatgt cgaggaagaa gtcggtgagg aagacaggga tgtcatggag	3180
tggtgactgt ggccaacctc catagaatct tgggtagagg agctattcgt tggagaattg	3240
tagacccttg gcctgggtccg gttaccaag gcttgttgtc catggtggtg gtgatggtgg	3300
tggtggtggt gatggtgatg ggaactgtta ccatggtgat gatgcaatgc attctgttga	3360
ggggctacat gaaaggttgt ttcttgaaca ggatgagttt caacagtgac ctgtgtagga	3420
gagcccgaaac cgcccgcccc cgagtccccg cacagacaga cagacactcg cacacacccg	3480
cacactcgcg cgcacaatcg ccctcgaca cgctccctcg cacacacact cgcactcaca	3540
cgggtccgc ctgctcgcg gcgggggcag cggcaccaac agcagcagca ggaacagcag	3600
cagcagaagc ggcgggcgcg ggcggcgac ccccgctcg ggggtgtccg tctctgagge	3660
cgacctgggc cgcgatcagc agcagcgaca gcagcagtc ccccggtac ccccgccgcg	3720
gttgccgcg ccacccccgc ctcaactcaa tggggctttt tattattatt cgggcgggaa	3780
gcgaaagggt taaaaaaaa accaaccaac aaaa	3814

<210> 4

<211> 633

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 4

atggcgacgg accgacccgg tcgctatagc aactgtcaat caaaacgcaa aaccccggt	60
gacgtgctga cgtcctctc cggcccccca gcccagagcc ggcgggcggg gcctgttgct	120
caggtaacgg cagattccgt tccctccttt ccgtctcccc ctctgtcccc agccaaccac	180
ccaaccccct caggtcacgt gaaggataaa ttcgagagctc gggtcgcta cgaccccgcc	240
cgcgcggggg ggagggggcg gctgccccgg gcgggggagg gggaggagga ggggcgccgc	300
ggccttcggg cggggaccgg ggaagcccac cccgcgcgcc cgggcctgga gggctctcac	360
cgcgggtcgg gcgcgcgct cgcctctctc cccgggaagc gcggcgggcg cgaccgtccg	420
cgcgtggagc cggttcttcg aagggtggc gggcctccta gccggaaaat gccggcgag	480
gcctgggtgg gggcggggag gagccaccgc cgcgccccag acatcgagc aattccggac	540
gctgcgcggg gcccgggggc cctgaggctg gcacctggct ccggtcgggc cgcccagggt	600
ttgtggcgcc cgagaccagc gttgggaaat tag	633

5

<210> 5

<211> 497

<212> ADN

10 <213> Homo sapiens

<400> 5

tttttttttt ttttcttgaa gactaagctt acagaatcat gtgactatat ataaagaagt	60
ttgatccagt cttttttcct cacaccatca ctctccagat ccaacagact ggctaaggag	120
gggacggcca gaccccagc gacttttgtc agcattgcag ttaatgatct gtttacacaa	180
ggggagatac caccaacctt aagtagattt acatttacat tacatcatcc aaaggtgaca	240
ccccagtctt aacagtaaga ctgccacatt gaaaccgcag aaactacata ttcccaccta	300
gaaggatggg ttgagctaaa tgagaaatgg tccacttgct gcaaggctta ccaaggaccc	360
gctgtgactt tagctctcag gttgccact gcatagagct atttgcctc agagactggg	420
actcccttag cccacctggg ttttgggttt tcaactgattg ctgtatatct cacaggaccc	480
tagaattgga catcagt	497

15

<210> 6

<211> 545

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 6

aaaaaaacca cttcacagat gaacgtgtcc tgaaaggggg cttatatacc ttggatatat	60
gatccgccct cctgacaagc cacagcagca cttaaaaagg cttgtgaagg gatgatgcca	120
gtggaagaaa acaggaactt tgacctccca gagcctatgg ataccaagaa gggatcagat	180
gactgatttt ttcaaaagct tcctgggtgga ataaatgcat ttcacaggac tcacatgaat	240
gaacgtctct ggacacctaa tcaccattta tcaatctcac ttctatgaga aaaacacatt	300
tcaagtacct acctccagc ttgtcaacaa attcattaaa aaagaaggga acatcagtta	360
tataaagcca tgggtgtttt gccttactat caagcttttg gatgaaatgg aaaagttaaa	420
tccgcccggg aggcatttct aactctccac atttagccac ggaatagtta gactaatacc	480
tgaaattctcc atttacattt tcagcttgca ttcacagatc tggagtcata gagaaattac	540
tggtg	545

5

<210> 7
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10

<220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

<400> 7

15

gaatctgccg ttacctgagc 20

<210> 8
 <211> 20

20

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

25

<400> 8

gaattcctgc gatgtctggg 20

30

<210> 9
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

35

<220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

<400> 9

gctccgaatt tatccttcac 20

5 <210> 10

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

10 <220>

<223> Oligonucleótido antisentido

<400> 10

15 tcccatcacc atcaccacca c 21

<210> 11

<211> 20

<212> ADN

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido antisentido

25 <400> 11

gccacatctt agcaagcacc 20

<210> 12

30 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

35 <223> Oligonucleótido antisentido

<400> 12

gccacatccc agtcacagt 20

40

<210> 13

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

45

<220>

<223> Oligonucleótido antisentido

<400> 13

50

gccacatccc agtcacagt 19

<210> 14

<211> 19

55 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido antisentido

<400> 14

5 gctgtgtccc ttctgtctt 19

<210> 15
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

<400> 15

15 ggtctggttag gtatagtatc a 21

<210> 16
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

25 <400> 16

gggtccttgg taagccttgc 20

30 <210> 17
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

<400> 17

40 ctgatgtcca attctagggt c 21

<210> 18
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

50 <400> 18

ggagagtgat ggtgtgagga 20

<210> 19
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido antisentido

<400> 19

5 ccctccttag ccagtctgtt 20

<210> 20
<211> 20
<212> ADN

10 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido

15 <400> 20

gtcatctgat cccttcttgg 20

<210> 21
20 <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
25 <223> Oligonucleótido antisentido

<400> 21

gctggagggt aggtactga 20

30 <210> 22
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

35 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido

<400> 22

40 ctgtgcagga gggcggatca 20

<210> 23
<211> 19

45 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido

50 <400> 23

ttctctatga ctccagatc 19

55 <210> 24
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido antisentido

<400> 24

5

gcatcatccc ttcacaagcc t 21

REIVINDICACIONES

1. Un oligonucleótido que se dirige a una transcripción antisentido natural de un Gen del Síndrome de Down para su uso como un compuesto terapéutico, donde el oligonucleótido modula la expresión del Gen del Síndrome de Down y donde la transcripción antisentido natural tiene la secuencia de ácido nucleico como se expone en una de las SEQ ID NO: 3-6.
2. Un oligonucleótido que se dirige a una transcripción antisentido natural de un Gen del Síndrome de Down para su uso en la prevención o tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado a un Gen del Síndrome de Down, donde el oligonucleótido modula la expresión del Gen del Síndrome de Down y donde la transcripción antisentido natural tiene la secuencia de ácido nucleico como se expone en una de las SEQ ID NO: 3-6.
3. Uso de un oligonucleótido que se dirige a una transcripción antisentido natural de un Gen del Síndrome de Down para la preparación de un medicamento para su uso en la prevención o tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado a un Gen del Síndrome de Down, donde el oligonucleótido modula la expresión del Gen del Síndrome de Down y donde la transcripción antisentido natural tiene la secuencia de ácido nucleico como se expone en una de las SEQ ID NO: 3-6.
4. Uso de acuerdo con la reivindicación 3, o un oligonucleótido para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, donde la enfermedad o trastorno del Gen del Síndrome de Down se selecciona entre el grupo que consiste en expresión o función aberrante mutante de DSCR1 o DYRK1a; cáncer, una enfermedad o trastorno angiogénico, una enfermedad o trastorno apoptótico, una enfermedad o trastorno proliferativo celular, inflamación, una enfermedad o trastorno cardiovascular, una enfermedad o trastorno neurológico, síndrome de Down, enfermedad de Alzheimer, retraso mental, trastorno de la memoria, trisomía, neuropatología, una enfermedad o trastorno neurodegenerativo, hipertrofia de los cardiomiocitos, una anomalía vascular (por ejemplo, hemangioma infantil, un tumor vascular dependiente de la angiogénesis, malformación vascular, etc.), hiperhomocisteinemia, diferenciación osteoblástica alterada, osteoclastogénesis, función mitocondrial alterada, estrés oxidativo, una enfermedad o trastorno asociado a la ruta de señalización mediada por calcineurina alterada, una enfermedad o trastorno asociado a una regulación alterada de la angiogénesis, estrés mediado por calcio y una enfermedad o trastorno asociado a una función de APC y/o Axina defectuosa o alterada.
5. Un método *in vitro* para modular la expresión de un Gen del Síndrome de Down en células o tejidos de pacientes que comprende: poner en contacto dichas células o tejido con un oligonucleótido que se dirige a una transcripción antisentido natural de un Gen del Síndrome de Down; modulando de este modo la expresión del Gen del Síndrome de Down, donde la transcripción antisentido natural tiene la secuencia de ácido nucleico como se expone en una de las SEQ ID NO: 3-6.
6. Un oligonucleótido que se dirige a una transcripción antisentido natural de un Gen del Síndrome de Down, donde el oligonucleótido modula la expresión del Gen del Síndrome de Down, donde la transcripción antisentido natural tiene la secuencia de ácido nucleico como se expone en una de las SEQ ID NO: 3-6, y donde el oligonucleótido comprende adicionalmente una o más modificaciones que comprenden
 - a. al menos un enlace internucleósido modificado seleccionado de entre: un fosforotioato, 2'-Ometoxietilo (MOE), 2'-fluoro, alquifosfonato, fosforoditioato, alquifosfonotioato, fosforamidato, carbamato, carbonato, fosfato triéster, acetamidato, carboximetil éster, y combinaciones de los mismos;
 - b. al menos un nucleótido modificado seleccionado de entre: un ácido nucleico peptídico (PNA), un ácido nucleico bloqueado (LNA), un ácido arabino-nucleico (FANA), un análogo, un derivado, y combinaciones de los mismos; o
 - c. al menos un resto de azúcar modificado seleccionado de entre: un resto de azúcar modificado con 2'-O-metoxietilo, un resto de azúcar modificado con 2'-metoxi, un resto de azúcar modificado con 2'-O-alquilo, un resto de azúcar bicíclico, y combinaciones de los mismos.
7. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 o 4, o un oligonucleótido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 4, o un método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 5, o un oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 6, donde el oligonucleótido tiene entre 10 a 30 nucleótidos de longitud.
8. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3, 4 o 7, o un oligonucleótido para su uso

de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4 o 7, o un método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 5 o la reivindicación 7, o un oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 6 o la reivindicación 7, donde el oligonucleótido tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con respecto a un complemento de una transcripción antisentido natural de un Gen del Síndrome de Down.

- 5 9. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3, 4, 7 u 8, o un oligonucleótido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4, 7 u 8, o un método *in vitro* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5, 7 u 8, o un oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, donde el oligonucleótido es monocatenario.
- 10 10. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3, 4, 7 u 8, o un oligonucleótido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4, 7 u 8, o un método *in vitro* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5, 7 u 8, o un oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, donde el oligonucleótido es un compuesto siRNA.
- 15 11. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3, 4 o 7 a 10, o un oligonucleótido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4 o 7 a 10, o un método *in vitro* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 o 7 a 10, o un oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, donde el oligonucleótido comprende una de las SEQ ID NO: 7-24.
- 20 12. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3, 4 o 7 a 11, o un oligonucleótido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4 o 7 a 11, o un método *in vitro* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 o 7 a 11, o un oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11, donde el oligonucleótido disminuye la expresión del Gen del Síndrome de Down.
- 25 13. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3, 4 o 7 a 11, o un oligonucleótido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4 o 7 a 11, o un método *in vitro* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 o 7 a 11, o un oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11, donde el oligonucleótido aumenta la expresión del Gen del Síndrome de Down.
- 30 14. Uso de acuerdo con la reivindicación 12, o un oligonucleótido para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, o un método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 12, o un oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 12, donde la expresión del Gen del Síndrome de Down se reduce en al menos un 10 %.
- 35 15. Uso de acuerdo con la reivindicación 13, o un oligonucleótido para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, o un método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 13, o un oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 13, donde la expresión del Gen del Síndrome de Down se aumenta en al menos un 10 %.
- 40 16. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3, 4 o 7 a 15, o un oligonucleótido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4 o 7 a 15, o un método *in vitro* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 o 7 a 15, donde el oligonucleótido comprende adicionalmente una o más modificaciones que comprenden
 - a. al menos un enlace internucleósido modificado seleccionado de entre: un fosforotioato, 2'-Ometoxietilo (MOE), 2'-fluoro, alquifosfonato, fosforoditioato, alquifosfonotioato, fosforamidato, carbamato, carbonato, fosfato triéster, acetamidato, carboximetil éster, y combinaciones de los mismos;
 - b. al menos un nucleótido modificado seleccionado de entre: un ácido nucleico peptídico (PNA), un ácido nucleico bloqueado (LNA), un ácido arabino-nucleico (FANA), un análogo, un derivado, y combinaciones de los mismos; o
 - c. al menos un resto de azúcar modificado seleccionado de entre: un resto de azúcar modificado con 2'-O-metoxietilo, un resto de azúcar modificado con 2'-metoxi, un resto de azúcar modificado con 2'-O-alquilo, un resto de azúcar bicíclico, y combinaciones de los mismos.
- 55 17. Una composición farmacéutica que comprende al menos un oligonucleótido que tiene las características de un oligonucleótido definido en cualquiera de las reivindicaciones 6 a 16 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Figura 1

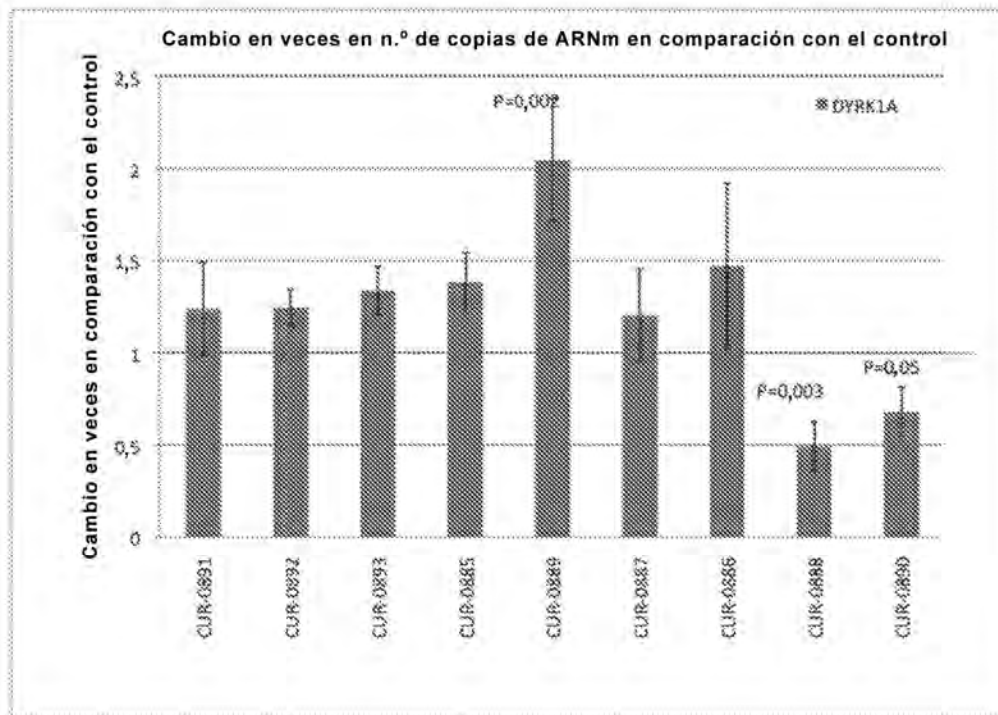


Figura 2

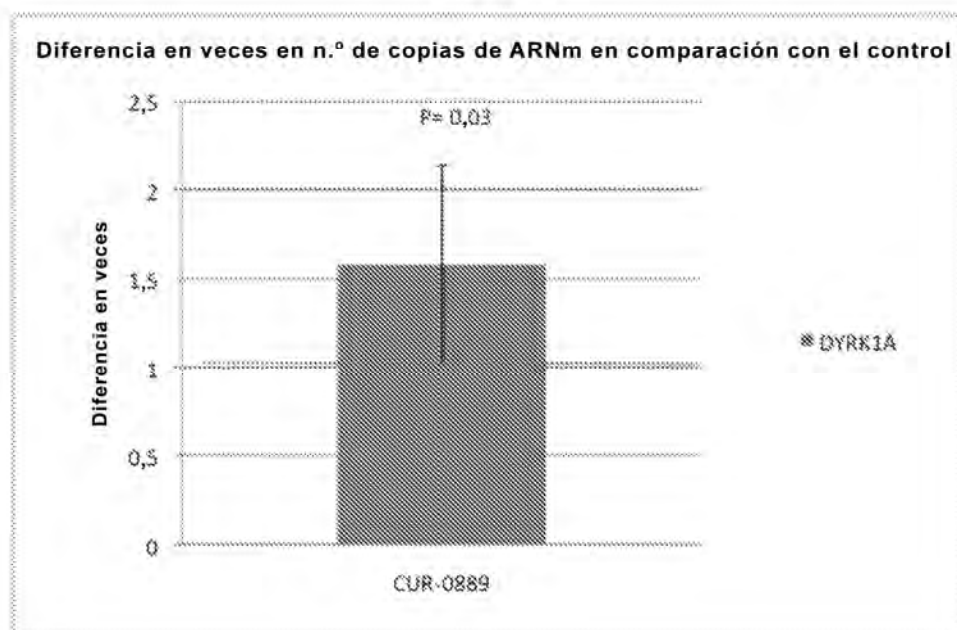


Figura 3

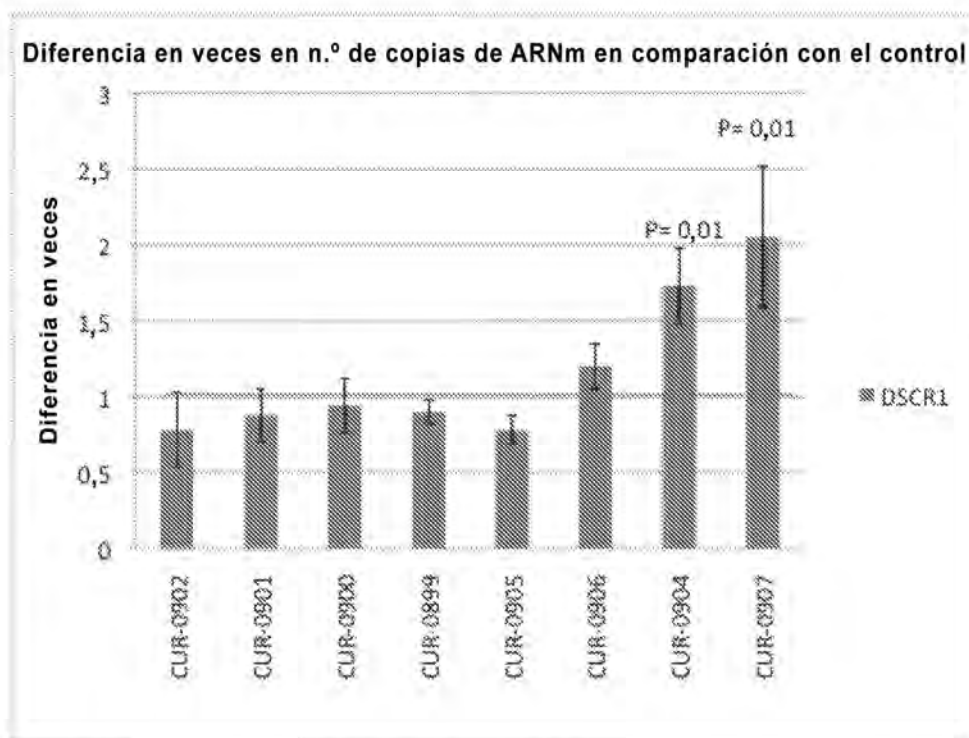


Figura 4

