

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 694 592**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/713 (2006.01)

A61K 31/712 (2006.01)

A61K 31/7125 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.03.2013 PCT/US2013/030589**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.09.2013 WO13138374**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.03.2013 E 13712635 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.09.2018 EP 2825648**

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

30 Prioridad:

15.03.2012 US 201261611225 P
23.03.2012 US 201261614664 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.12.2018

73 Titular/es:

CURNA, INC. (50.0%)
4400 Biscayne Boulevard
Miami, FL 33137, US y
THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE (50.0%)

72 Inventor/es:

FAGHIHI, MOHAMMAD, ALI y
COITO, CARLOS

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 694 592 T3

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

DESCRIPCIÓN

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

5

CAMPO DE LA INVENCION

Aspectos de la descripción comprenden oligonucleótidos que modulan la expresión y/o función del BDNF y moléculas asociadas.

10

ANTECEDENTES

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

El documento WO 2010/093904 y su contrapartida de EE. UU. US/2011/0319475 divulgan a BDNF como diana para modulación usando los oligonucleótidos mencionados en los mismos. Existe la necesidad de un desarrollo continuado con respecto a dianas antisentido naturales y oligonucleótidos recién desarrollados que complementen tales dianas y modulen la expresión de proteína BDNF para tratar potencialmente o usarse en investigación asociada al tratamiento de enfermedades y afecciones relacionadas con BDNF.

RESUMEN

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

Este resumen se proporciona para presentar un resumen de la descripción para indicar brevemente la naturaleza y sustancia de la descripción. Se presenta con el entendimiento de que no se usará para interpretar ni limitar el alcance o significado de las reivindicaciones.

En un aspecto, la descripción proporciona procedimientos de inhibición de la acción de un transcrito antisentido natural usando uno o más oligonucleótidos antisentido orientados a cualquier región del transcrito antisentido natural, dando como resultado la regulación positiva del gen con sentido de BDNF correspondiente en organismos mamíferos. También está contemplado en la presente memoria que la inhibición del transcrito antisentido natural mencionado en la presente memoria pueda conseguirse mediante siARN, ribozimas y moléculas pequeñas, que se considera que están dentro del alcance de la presente descripción.

45

Un aspecto proporciona un procedimiento de modulación de la función y/o la expresión de un polinucleótido de BDNF en sistemas biológicos incluyendo, pero sin limitación, células o tejidos del paciente *in vivo* o *in vitro* que comprende poner en contacto dicho sistema biológico o dichas células o tejidos con un oligonucleótido antisentido de aproximadamente 5 a aproximadamente 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 1279 de la SEQ ID NO: 3 o 1 a 1478 de la SEQ ID NO: 4 o 1 a 1437 de la SEQ ID NO: 5 o 1 a 2322 de la SEQ ID NO: 6 o 1 a 2036 de la SEQ ID NO: 7 o 1 a 2364 de la SEQ ID NO: 8 o 1 a 3136 de la SEQ ID NO: 9 o 1 a 906 de la SEQ ID NO: 10 o 1 a 992 de la SEQ ID NO: 11, modulando así la función y/o expresión del polinucleótido de BDNF en dicho sistema biológico que incluye dichas células o tejidos de paciente *in vivo* o *in vitro*, con la condición de excluir los oligonucleótidos que tengan las SEQ ID NO: 50-55.

55

En un aspecto, un oligonucleótido mencionado anteriormente se orienta a una secuencia antisentido natural de polinucleótidos de BDNF presente en un sistema biológico, por ejemplo, los nucleótidos expuestos en las SEQ ID NO: 3 a 11, y cualquier variante, alelo, homólogo, mutante, derivado, fragmento y secuencia complementaria

60

de los mismos. Se exponen ejemplos de tales oligonucleótidos antisentido como las SEQ ID NO: 12 a 49.

5 En otro aspecto, la descripción comprende un procedimiento de modulación de la función o expresión de un polinucleótido de BDNF en un sistema biológico, que comprende poner en contacto dicho sistema biológico con al menos un oligonucleótido antisentido orientado a un transcrito antisentido natural del polinucleótido de BDNF que comprende de 5 a 30 nucleótidos consecutivos dentro de los nucleótidos 1 a 1279 de la SEQ ID NO: 3 o 1 a 1478 de la SEQ ID NO: 4 o 1 a 1437 de la SEQ ID NO: 5 o 1 a 2322 de la SEQ ID NO: 6 o 1 a 2036 de la SEQ ID NO: 7 o 1 a 2364 de la SEQ ID NO: 8 o 1 a 3136 de la SEQ ID NO: 9 o 1 a 906 de la SEQ ID NO: 10 o 1 a 992 de la SEQ ID NO: 11, modulando así la función y/o expresión del polinucleótido de BDNF en dicho sistema biológico.

10 En otro aspecto, la descripción comprende un procedimiento de modulación de la función o expresión de un polinucleótido de BDNF en un sistema biológico, que comprende poner en contacto dicho sistema biológico con al menos un oligonucleótido antisentido orientado a una región de un transcrito antisentido natural del polinucleótido de BDNF que comprende de 5 a 30 nucleótidos consecutivos dentro de los nucleótidos 1 a 1279 de la SEQ ID NO: 3 o 1 a 1478 de la SEQ ID NO: 4 o 1 a 1437 de la SEQ ID NO: 5 o 1 a 2322 de la SEQ ID NO: 6 o 1 a 2036 de la SEQ ID NO: 7 o 1 a 2364 de la SEQ ID NO: 8 o 1 a 3136 de la SEQ ID NO: 9 o 1 a 906 de la SEQ ID NO: 10 o 1 a 992 de la SEQ ID NO: 11, modulando así la función y/o expresión del polinucleótido de BDNF en dicho sistema biológico.

20 En un aspecto, la descripción comprende un procedimiento de aumento de la función y/o expresión de un polinucleótido de BDNF que tiene la SEQ ID NO: 1 y 2 en un sistema biológico, que comprende poner en contacto dicho sistema biológico con al menos un oligonucleótido antisentido orientado a un transcrito antisentido natural de dicho polinucleótido de BDNF que comprende de 5 a 30 nucleótidos consecutivos dentro de los nucleótidos 1 a 1279 de la SEQ ID NO: 3 o 1 a 1478 de la SEQ ID NO: 4 o 1 a 1437 de la SEQ ID NO: 5 o 1 a 2322 de la SEQ ID NO: 6 o 1 a 2036 de la SEQ ID NO: 7 o 1 a 2364 de la SEQ ID NO: 8 o 1 a 3136 de la SEQ ID NO: 9 o 1 a 906 de la SEQ ID NO: 10 o 1 a 992 de la SEQ ID NO: 11, aumentando así la función y/o expresión de dicho polinucleótido de BDNF o producto de expresión del mismo.

30 En otro aspecto, la descripción comprende un procedimiento de aumento de la función y/o expresión de un polinucleótido de BDNF que tiene la SEQ ID NO: 1 y 2 en un sistema biológico, que comprende poner en contacto dicho sistema biológico con al menos un oligonucleótido antisentido orientado a un transcrito antisentido natural de dicho polinucleótido de BDNF, aumentando así la función y/o expresión de dicho polinucleótido de BDNF o producto de expresión del mismo, donde los transcritos antisentido naturales se seleccionan de entre las SEQ ID NO: 3 a 11.

35 En otro aspecto, la descripción comprende un procedimiento de aumento de la función y/o expresión de un polinucleótido de BDNF que tiene la SEQ ID NO: 1 y 2 en un sistema biológico, que comprende poner en contacto dicho sistema biológico con al menos un oligonucleótido antisentido orientado a un transcrito antisentido natural de dicho polinucleótido de BDNF, aumentando así la función y/o expresión de dicho polinucleótido de BDNF o producto de expresión del mismo, donde los transcritos antisentido naturales se seleccionan de entre las SEQ ID NO: 3 a 11 y 40 donde los oligonucleótidos antisentido se seleccionan de entre al menos una de las SEQ ID NO: 12 a 49.

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

45 En un aspecto, los oligonucleótidos comprenden uno o más nucleótidos modificados o sustituidos.

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

50 En aún otro aspecto más, los nucleótidos modificados comprenden bases modificadas que comprenden fosforotioato, metilfosfonato, ácidos peptidonucleicos, 2'-O-metilo, fluoro o carbono, metileno u otras moléculas de ácido nucleico bloqueado (ANB). Preferentemente, los nucleótidos modificados son moléculas de ácido nucleico bloqueado, incluyendo α -L-ANB.

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

60 En un aspecto, los oligonucleótidos se administran en una composición farmacéutica. Un régimen 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 de otros tipos de terapias.

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

- 5 En un aspecto, la presente descripción comprende el uso de las SEQ ID NO: 50-55 como oligonucleótidos orientados a transcritos antisentido naturales (NAT) para modular la expresión de un polinucleótido de BDNF, donde dichos NAT se seleccionan de entre el grupo consistente en las SEQ ID NO: 3 a 11. En otro aspecto, la presente descripción comprende el uso de las SEQ ID NO: 50-55 como oligonucleótidos orientados a transcritos antisentido naturales (NAT) para modular la expresión de un polinucleótido de BDNF, donde dichos NAT se seleccionan de
10 entre el grupo consistente en las SEQ ID NO: 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10 y 11.

Otros aspectos se describen más adelante.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- 15 Las Figuras 1a-e muestran la regulación mediada por antisentido de ARNm con sentido y proteína. La Figura 1a muestra que, después de la transfección de varias líneas celulares humanas y de ratón con tres oligonucleótidos de siARN orientados a regiones no solapantes del transcrito de BDNF-AS, ocurría desactivación génica y regulación positiva del transcrito de BDNF. La Figura 1b muestra los datos del estudio de curso temporal después de la
20 administración de siARN orientado a BDNF-AS en la expresión endógena tanto de transcritos de BDNF como de BDNF-AS. Los datos muestran que, durante el curso temporal, el BDNF-AS se regula negativamente y entonces la expresión de BDNF se regula positivamente y es reversible. La Figura 1c muestra que la proteína BDNF, medida por ELISA, aumentaba significativamente con dos siARN orientados al transcrito de BDNF-AS, pero no con siARN reordenados o un siARN de control no orientado. La Figura 1d muestra los niveles de proteína BDNF después de la
25 administración de diversos siARN usando ELISA y/o Western blotting. La Figura 1e muestra el porcentaje de cambio en veces de BDNF en comparación con control ficticio frente a concentraciones crecientes de oligonucleótido (10^{-12} a 10^{-6} M).

La Figura 2 muestra que la regulación positiva de BDNF aumenta el crecimiento neuronal.

- 30 La Figura 3 muestra que el BDNF-AS regula ARNm de BDNF y su proteína *in vivo*.
La Figura 4 muestra que el bloqueo de BDNF-AS, *in vivo*, causa un aumento de la supervivencia y proliferación neuronales.
La Figura 5 muestra que la desactivación génica de BDNF-AS conduce a la regulación positiva de ARNm de BDNF.
La Figura 6 muestra la regulación postranscripcional de la expresión de BDNF.
35 La Figura 7 muestra la inhibición del transcrito de BDNF-AS humano por hBDNF-AntagoNAT.
La Figura 8 muestra la inhibición del transcrito de BDNF-AS de ratón en células N2a por AntagoNAT.
La Figura 9 muestra que la desactivación génica de BDNF-AS ni cambia el nivel de TrkB ni de genes vecinos de BDNF (Let7C y KIF18A) en ambas direcciones: LIN7C y KIF18A son genes localizados en dirección 3' y en dirección
40 5' de BDNF, respectivamente.

- 40 Descripción del listado de secuencias: SEQ ID NO: 1: Factor neurotrófico derivado de cerebro de Homo sapiens (BDNF), variante de transcrito 3, ARNm. (N.º de acceso del NCBI: NM_170735); SEQ ID NO: 2: Factor neurotrófico derivado de cerebro de Mus musculus (BDNF) variante de transcrito 1, ARNm (N.º de acceso del NCBI: NM_007540); SEQ ID NO: 3: Secuencia antisentido natural de BDNF (variante de transcrito BT1A; NR_033313.1);
45 SEQ ID NO: 4: Secuencia antisentido natural de BDNF (variante de transcrito BT2A; NR_033314.1); SEQ ID NO: 5: Secuencia antisentido natural de BDNF (variante de transcrito BT1B; NR_033315.1); SEQ ID NO: 6: Secuencia antisentido natural de BDNF (variante de transcrito BT2B; NR_002832.2); SEQ ID NO: 7: Secuencia antisentido natural de BDNF (variante de transcrito BT1C; NR_033312.1); SEQ ID NO: 8: Secuencia antisentido natural de BDNF (variante BDNF-AS); SEQ ID NO: 9: Secuencia antisentido natural de BDNF; SEQ ID NO: 10: Secuencia
50 antisentido natural de ratón de BDNF (variante de BDNF-AS de ratón 1); SEQ ID NO: 11: Secuencia antisentido natural de ratón de BDNF (variante de BDNF-AS de ratón 2); SEQ ID NO: 12 a 55: Oligonucleótidos antisentido; SEQ ID NO: 56 a 59: Complemento inverso de los oligonucleótidos antisentido 12 a 15 respectivamente; SEQ ID NO: 60 a 64: Complemento inverso de los oligonucleótidos antisentido 42 a 46 respectivamente; SEQ ID NO: 65 y 66: Secuencias de ensayo. ANB (ácido nucleico bloqueado con 2'-O,4'-C metileno): +A* o +T* o
55 +C* o +G*; 2'OM (2'-O-metilo): mU* o mA* o mC* o mg*; PS (fosfotioato): T* o A* o G* o c*; ARN: rU o rA o rG o rC.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

- A continuación, se describen varios aspectos de la descripción con referencia a aplicaciones de ejemplos para
60 ilustración. Debe entenderse que los numerosos detalles, relaciones y procedimientos específicos se exponen para

proporcionar un entendimiento completo de la descripción. Un experto en la materia relevante, sin embargo, reconocerá fácilmente que la descripción puede ponerse en práctica sin uno o más de los detalles específicos o con otros procedimientos. La presente descripción no está limitada por el orden de acciones o acontecimientos, ya que algunas acciones pueden ocurrir en diferentes órdenes y/o simultáneamente con otras acciones o acontecimientos.

5 Además, no todas las acciones o acontecimientos ilustrados son requeridos para implementar una metodología de acuerdo con la presente descripción.

Todos los genes, nombres de genes, y productos génicos divulgados en la presente memoria pretenden corresponderse a homólogos de cualquier especie para la cual las composiciones y procedimientos divulgados en la presente memoria sean aplicables. Por tanto, los términos incluyen, pero sin limitación, genes y productos génicos de seres humanos y ratones. Se entiende que, cuando se divulga un gen o producto génico de una especie particular, esta descripción pretende ser ejemplar solamente, y no se ha de interpretar como una limitación, a menos que el contexto donde aparece lo indique claramente. Por tanto, por ejemplo, para los genes divulgados en la presente memoria, que en algunos aspectos se refieren a secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos de mamífero, se pretenden englobar genes homólogos y/u ortólogos y productos génicos de otros animales incluyendo, pero sin limitación, otros mamíferos, peces, anfibios, reptiles y aves. En un aspecto, los genes o secuencias de ácidos nucleicos son humanos.

Definiciones

20 La terminología usada en la presente memoria es con el fin de describir aspectos particulares solamente y no pretende ser limitante de la descripción. Como se usan en la presente memoria, se pretende que las formas en singular «un», «una», «el» y «la» incluyan también las formas plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Además, en la medida que se usen las expresiones «que incluye», «incluye», «que tiene», «tiene», «con», o variantes de las mismas en la descripción detallada y/o las reivindicaciones, tales expresiones pretenden ser inclusivas de una manera similar a la expresión «que comprende».

Las expresiones «aproximadamente» o «alrededor de» significan dentro de un intervalo de error aceptable para el valor particular determinado por un experto en la materia, lo que dependerá parcialmente de cómo se mida o determine el valor, es decir, de las limitaciones del sistema de medida. Por ejemplo, «aproximadamente» puede significar dentro de 1 o más de 1 desviaciones estándares, conforme a la práctica de la técnica. Como alternativa, «aproximadamente» puede significar un intervalo de hasta el 20 %, preferentemente hasta el 10 %, más preferentemente hasta el 5 %, y más preferentemente aún 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, preferentemente dentro de 5 veces, y más preferentemente dentro de 2 veces, de un valor. Cuando se describen valores particulares en la solicitud y las reivindicaciones, a menos que se afirme lo contrario, el término «aproximadamente» significa que debe asumirse dentro de un intervalo de error aceptable para el valor particular.

Como se usa en la presente memoria, el término «ARNm» significa el uno o más transcritos de ARNm actualmente conocidos de un gen elegido como diana, y cualquier transcrito adicional que pueda ser dilucidado.

Se entiende por «oligonucleótidos antisentido» o «compuesto antisentido» una molécula de ARN o de ADN que se une a otro ARN o ADN (ARN, ADN diana). Por ejemplo, si éste 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 positivamente o regular negativamente la expresión y/o función de un polinucleótido particular. La definición pretende incluir cualquier molécula de ARN o ADN extraña que sea útil desde un punto de vista terapéutico, de diagnóstico u otro. Tales moléculas incluyen, por ejemplo, moléculas de ADN o ADN antisentido, ARN de interferencia (ARNi), microARN, moléculas de ARN señuelo, siARN, 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 corte y empalme alternativos, cebadores, sondas y otros compuestos oligoméricos que hibridan con al menos una parte del ácido nucleico diana. Como tales, estos compuestos pueden introducirse en forma de compuestos oligoméricos monocatenarios, bicatenarios, parcialmente monocatenarios o circulares.

55 En el contexto de esta descripción, el término «oligonucleótido» hace referencia 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 grupos de enlace naturales y/o modificados, que incluyen desoxirribonucleósidos, ribonucleósidos, formas sustituidas y alfa-anómeras de los mismos, ácidos peptidonucleicos (APN), ácidos nucleicos bloqueados (ANB), fosforotioato, metilfosfonato y similares. Los oligonucleótidos son capaces de unirse específicamente a un polinucleótido diana por medio de un patrón regular de

interacciones de monómero a monómero, tales como el tipo de apareamiento de bases de Watson-Crick, los tipos de apareamiento de bases de Hoögsteeen o Hoögsteen inverso, o similares.

El oligonucleótido puede ser «quimérico», es decir, estar compuesto por diferentes regiones. En el contexto de esta descripción, 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 ANB, etc. Cada región química está compuesta por al menos una unidad monomérica, es decir, un nucleótido en el caso de un compuesto de oligonucleótidos. Estos oligonucleótidos comprenden típicamente al menos una región donde el oligonucleótido se modifica con el fin de exhibir una o más propiedades deseadas. Las propiedades deseadas del oligonucleótido incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, resistencia aumentada a la degradación por nucleasas, captación celular aumentada y/o afinidad de unión aumentada por el ácido nucleico diana. Las diferentes regiones del oligonucleótido pueden, por lo tanto, tener diferentes propiedades. Los oligonucleótidos quiméricos de la presente descripción pueden formarse como estructuras mixtas de dos o más oligonucleótidos, oligonucleótidos modificados, oligonucleósidos y/o análogos de oligonucleótido, como se ha descrito anteriormente.

El oligonucleótido puede estar compuesto por regiones que pueden ligarse en «registro», es decir, cuando los monómeros se ligan consecutivamente, como en ADN nativo, o se ligan mediante espaciadores. Se pretende que los espaciadores constituyan un «puente» covalente entre las regiones y tengan, en casos preferidos, una longitud que no supere aproximadamente los 100 átomos de carbono. Los espaciadores pueden portar diferentes funcionalidades, por ejemplo, tener carga positiva o negativa, portar propiedades de unión a ácido nucleico especiales (intercalantes, ligantes de surcos, toxinas, fluoróforos, etc.), ser lipófilos o inducir estructuras secundarias especiales como, por ejemplo, péptidos que contienen alanina que inducen hélices alfa.

Como se usa en la presente memoria, «BDNF» y «factor neurotrófico derivado del cerebro» incluyen todos los miembros de la familia, mutantes, alelos, fragmentos, especies, secuencias codificantes y no codificantes, hebras de polinucleótidos con sentido y antisentido, etc.

Como se usan en la presente memoria, las palabras «factor neurotrófico derivado del cerebro», «factor neurotrófico derivado de cerebro» y BDNF son consideradas iguales en la bibliografía y se usan indistintamente en la presente solicitud.

Como se usa en la presente memoria, la expresión «oligonucleótido específico de» u «oligonucleótido orientado a» hace referencia a un oligonucleótido que tiene una secuencia (i) capaz de formar un complejo estable con una parte del gen elegido como diana, o (ii) capaz de formar un dúplex estable con una parte de un transcrito de ARNm del gen elegido como diana. La estabilidad de los complejos y los dúplex puede determinarse mediante cálculos teóricos y/o ensayos *in vitro*. Los ensayos ejemplares para determinar la estabilidad de complejos y dúplex de hibridación se describen en los ejemplos más adelante.

Como se usa en la presente memoria, la expresión «ácido nucleico diana» engloba ADN, ARN (que comprende preARNm y ARNm) transcrito a partir de dicho ADN y también ADNc derivado de dicho ARN, secuencias codificantes, no codificantes, polinucleótidos con sentido o antisentido. La hibridación específica de un compuesto oligomérico con su ácido nucleico diana interfiere con la función normal del ácido nucleico. Se hace referencia a esta modulación de la función de un ácido nucleico diana por compuestos que hibridan específicamente con él generalmente como «antisentido». Las funciones de ADN con las que interferirán incluyen, por ejemplo, la replicación y transcripción. Las funciones de ARN con las que interferirán incluyen todas las funciones vitales tales como, por ejemplo, translocalización del ARN al sitio de traducción de proteína, traducción de proteína desde ARN, corte y empalme del ARN para dar una o más especies de ARNm, y actividad catalítica que puede estar acoplada con o facilitarse por el ARN. El efecto global de dicha interferencia con las funciones del ácido nucleico diana es la modulación de la expresión de un producto codificado u oligonucleótidos.

La interferencia de ARN «ARNi» está mediada por moléculas de ARN bicatenario (dsARN) que tienen homología específica de secuencia con sus secuencias de ácido nucleico «diana». En ciertos aspectos de la presente descripción, los mediadores son dúplex de ARN «interferentes pequeños» (siARN) de 5-25 nucleótidos. Los siARN derivan del procesamiento de dsARN por una enzima ARNasa conocida como Dicer. Los productos dúplex de siARN se agrupan en un complejo de siARN multiproteico llamado RISC (o en español: Complejo Silenciador Inducido por ARN). Sin desear ceñirse a ninguna teoría particular, se cree entonces que un RISC es guiado a un ácido nucleico diana (adecuadamente ARNm), donde el dúplex de siARN interactúa de 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 descripción pueden sintetizarse y usarse de acuerdo con procedimientos que son bien conocidos en la materia y que serán familiares para el experto en la materia. Los ARN interferentes pequeños para su uso en los

procedimientos de la presente descripción comprenden adecuadamente entre aproximadamente 1 y aproximadamente 50 nucleótidos (nt). En los ejemplos de aspectos no limitantes, los siARN pueden comprender de aproximadamente 5 a aproximadamente 40 nt, de aproximadamente 5 a aproximadamente 30 nt, de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 nt, de aproximadamente 15 a aproximadamente 25 nt, o 5 aproximadamente 20-25 nucleótidos.

La selección de los 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 exhiben un grado de identidad apropiado entre especies. En el caso de genes que no han sido secuenciados, se realizan Southern blots para permitir una determinación del grado de identidad entre genes en especies diana y otras especies. Realizando Southern blots a grados de astringencia variables, como es bien conocido en la materia, es posible obtener una medida aproximada de la identidad. Estos procedimientos permiten la selección de oligonucleótidos que exhiben un alto grado de complementariedad con secuencias de ácido nucleico diana en un sujeto a controlar y un menor grado de complementariedad con secuencias de ácido nucleico correspondientes en otras especies. Un experto en la materia se dará cuenta de que hay libertad considerable en la selección de regiones apropiadas de genes para su uso en la presente descripción.

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

Se entiende por «ARN señuelo» una molécula de ARN que imita el dominio de unión natural para un ligando. El ARN señuelo compite, por lo tanto, con la diana de unión natural por la unión de un ligando específico. Por ejemplo, se ha mostrado que la sobreexpresión de ARN de respuesta transactivadora (RTA) de VIH puede actuar como un «señuelo» y se une de forma eficiente a la proteína tat de VIH, impidiendo así que se una a secuencias de RTA codificadas por el ARN de VIH. Este pretende ser un ejemplo específico. Los expertos en la materia reconocerán que este es solo un ejemplo, y fácilmente pueden generarse otros aspectos usando técnicas generalmente conocidas en la materia.

Como se usa en la presente memoria, el término «monómeros» indica típicamente monómeros ligados por enlaces fosfodiéster o análogos de los mismos para formar oligonucleótidos que varían en tamaño entre unas pocas unidades monoméricas, p. ej., de aproximadamente 3-4 a aproximadamente varios cientos de unidades monoméricas. Los análogos de grupos de enlace fosfodiéster incluyen: fosforotioato, fosforoditioato, metilfosfonatos, fosforoselenoato, fosforamidoato y similares, como se describe con mayor detalle más adelante.

El término «nucleótido» cubre nucleótidos de origen natural, así como nucleótidos de origen no natural. Debe ser evidente para el experto en la materia que diversos nucleótidos que se consideraron anteriormente «de origen no natural» se han encontrado posteriormente en la naturaleza. De este modo, «nucleótidos» incluye no solamente las moléculas que contienen heterociclos de purina y pirimidina conocidas, sino también análogos heterocíclicos y tautómeros de las mismas. Son ejemplos ilustrativos de otros tipos de nucleótidos 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-alquinil (C3-C6)-citosina, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, pseudoisocitosina, 2-hidroxi-5-metil-4-triazolopiridina, isocitosina, isoguanina, inosina y los nucleótidos «de origen no natural» descritos en Benner y col., pat. de EE. UU. n.º 5.432.272. El término «nucleótido» pretende cubrir todos y cada uno de estos ejemplos, además de análogos y tautómeros de los mismos. Son nucleótidos especialmente interesantes aquellos que contienen adenina, guanina, timina, citosina y uracilo, que se consideran como los nucleótidos de origen natural en relación con la aplicación terapéutica y diagnóstica en seres humanos. Los nucleótidos incluyen los 2'-desoxi- y 2'-hidroxilazúcares naturales, p. ej., como se describe en Kornberg y Baker, DNA Replication, 2ª Ed. (Freeman, San Francisco, 1992) así como sus análogos.

«Análogos» con referencia a nucleótidos, incluye nucleótidos sintéticos que tienen restos de base modificados y/o restos de azúcar modificados (véase, p. ej., descrito generalmente por Scheit, Nucleotide Analogs, John Wiley, Nueva York, 1980; Freier & Altmann, (1997) Nucl. Acid. Res., 25(22), 4429-4443; Toulmé, J.J., (2001) Nature Biotechnology 19: 17-18; Manoharan M., (1999) Biochemica et Biophysica Acta 1489: 117-139; Freier S. M., (1997)

Nucleic Acid Research, 25: 4429-4443, Uhlman, E., (2000) Drug Discovery & Development, 3: 203-213, Herdewin P., (2000) Antisense & Nucleic Acid Drug Dev., 10: 297-310); [3.2.0]bicicloarabinonucleósidos ligados por 2'-O, 3'-C. Tales análogos incluyen nucleótidos sintéticos diseñados para potenciar propiedades de unión, p. ej., la estabilidad o especificidad del dúplex o el tríplex, o similares.

5

Como se usa en la presente memoria, «hibridación» significa el apareamiento de hebras sustancialmente complementarias de compuestos oligoméricos. Un mecanismo de apareamiento implica la formación de puentes de hidrógeno, que pueden ser puentes de hidrógeno de Watson-Crick, de Hoögsteeen o de Hoögsteeen inverso, entre bases de nucleósidos o de nucleótidos (nucleótidos) complementarias de las hebras de compuestos oligoméricos.

10 Por ejemplo, la adenina y la timina son nucleótidos complementarios que se aparean mediante la formación de puentes de hidrógeno. La hibridación puede ocurrir en circunstancias variables.

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

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

«Complementario», como se usa en la presente memoria, hace referencia a la capacidad de apareamiento preciso
 35 entre dos nucleótidos en una o dos hebras oligoméricas. Por ejemplo, si una nucleobase en cierta posición de un compuesto antisentido es capaz de formar puentes de hidrógeno con una nucleobase en cierta posición de un ácido nucleico diana, siendo dicho ácido nucleico diana un ADN, ARN, o molécula de oligonucleótido, entonces la posición de la formación de puentes de 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
 40 complementarios entre sí cuando un número suficiente de posiciones complementarias en cada molécula están ocupadas por nucleótidos que pueden formar puentes de hidrógeno entre sí. Por tanto, «específicamente hibridable» y «complementario» son expresiones que se usan para indicar un grado suficiente de apareamiento preciso o complementariedad sobre un número suficiente de nucleótidos de tal modo que ocurra unión estable y específica entre el compuesto oligomérico y un ácido nucleico diana.

45

Se entiende en la materia que no es necesario que la secuencia de un compuesto oligomérico sea un 100 % complementaria a la de su ácido nucleico diana para ser específicamente hibridable. Además, un oligonucleótido puede hibridarse sobre uno o más segmentos, de tal modo que segmentos intermedios o adyacentes no estén implicados en el acontecimiento de hibridación (p. ej., una estructura en bucle, desapareamiento o estructura de
 50 horquilla). Los compuestos oligoméricos de la presente descripción 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 orientan. Por ejemplo, un compuesto antisentido donde 18 de los 20 nucleótidos del compuesto antisentido
 55 son complementarios de una región diana y, por lo 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 de 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
 60 ácido nucleico diana tendría el 77,8 % de complementariedad global con el ácido nucleico diana, y por tanto estaría

dentro del alcance de la presente descripción. 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 materia. El porcentaje de homología, identidad de secuencia o complementariedad pueden determinarse, por ejemplo, por el programa Gap (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison Wis.), usando parámetros por defecto, que usa el algoritmo de Smith y Waterman (Adv. Appl. Math., (1981) 2, 482-489).

Como se usa en la presente memoria, la expresión «punto de fusión térmica (T_m)» hace referencia a la temperatura, bajo fuerza iónica, pH y concentración de ácido nucleico definidas, a la que el 50 % de los oligonucleótidos complementarios de la secuencia diana hibridan con la secuencia diana en equilibrio. Típicamente, serán condiciones astringentes aquellas donde la concentración de sales es de al menos aproximadamente 0,01 a 1,0 M de concentración de ion Na (u otras sales) a pH de 7,0 a 8,3 y la temperatura es de al menos aproximadamente 30 °C para oligonucleótidos cortos (por ejemplo, de 10 a 50 nucleótidos). Las condiciones astringentes también pueden lograrse con la adición de agentes desestabilizantes, tales como formamida.

Como se usa en la presente memoria, «modulación» significa un aumento (estimulación) o una disminución (inhibición) de la expresión de un gen.

El término «variante», cuando se usa en el contexto de una secuencia de polinucleótidos, puede englobar una secuencia de polinucleótidos relacionada con un gen de tipo silvestre. Esta definición también puede incluir, por ejemplo, variantes «alélicas», de «corte y empalme», de «especie» o «polimórficas». Una variante de corte y empalme puede tener identidad significativa con una molécula de referencia, pero generalmente tendrá un mayor o menor número de polinucleótidos debido al corte y empalme 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 polinucleotídicas que varían de una especie a otra. Son de particular utilidad en la descripción de variantes de productos génicos de tipo silvestre. Las variantes pueden ser el resultado de al menos una mutación en la secuencia de ácidos nucleicos y pueden dar como resultado ARNm alterados o polipéptidos cuya estructura o función puede alterarse o no. 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 deleciones, adiciones o sustituciones naturales de nucleótidos. Cada uno de estos tipos de cambios puede ocurrir solo, o en combinación con los otros, una o más veces en una secuencia dada.

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

Los polinucleótidos derivados incluyen ácidos nucleicos sometidos a modificación química, por ejemplo, reemplazo de hidrógeno por un grupo alquilo, acilo o amino. Los derivados, p. ej., oligonucleótidos derivados, pueden comprender partes de origen no natural, tales como restos de azúcar o grupos de enlace entre azúcares alterados. Son ejemplares entre éstos fosforotioato y otras especies que contienen azufre que se conocen en la materia. Los ácidos nucleicos derivados también pueden contener marcajes, incluyendo radionucleótidos, enzimas, agentes fluorescentes, agentes quimioluminiscentes, agentes cromógenos, sustratos, cofactores, inhibidores, partículas magnéticas y similares.

Un polipéptido o péptido «derivado» es aquel que se modifica, por ejemplo, por glucosilación, pegilación, fosforilación, sulfatación, reducción/alquilación, acilación, acoplamiento químico o tratamiento suave con formalina. Un derivado también puede modificarse para contener un marcaje detectable, tanto directa como indirectamente, incluyendo, pero sin limitación, un radioisótopo, marcaje fluorescente y enzimático.

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

«Mamífero» cubre mamíferos de sangre caliente que típicamente están bajo atención médica (p. ej., seres humanos y animales domesticados). Los ejemplos incluyen felinos, caninos, equinos, bovinos y seres humanos, además de solo seres humanos.

«Tratar» o «tratamiento» cubre el tratamiento de una patología en un mamífero, e incluye: (a) prevenir que ocurra 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, p. ej., 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 (p. ej., rebajar el dolor o molestia), donde dicha mejora puede afectar o no directamente a la enfermedad (p. ej., causa, transmisión, expresión, etc.).

Como se usa en la presente memoria, «cáncer» hace referencia a todos los tipos de cáncer o neoplasia o tumores malignos encontrados 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, leiomioma, rhabdomioma, carcinoma de colon, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer ovárico, cáncer de próstata, carcinoma escamoso, carcinoma basocelular, adenocarcinoma, carcinoma de glándula sudorípara, carcinoma de glándula sebácea, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de conductos biliares, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, cáncer de cuello uterino, tumor testicular, carcinoma pulmonar, carcinoma pulmonar microcítico, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, endimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma y retinoblastoma. Otros cánceres que pueden tratarse con la composición divulgada de acuerdo con la descripción incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, enfermedad de Hodgkin, linfoma de no Hodgkin, mieloma múltiple, neuroblastoma, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, rhabdomioma, trombocitosis primaria, macroglobulinemia primaria, tumores de pulmón microcíticos, tumores primarios del cerebro, cáncer de estómago, cáncer de colon, insulanoma pancreático maligno, carcinoide maligno, cáncer de vejiga urinaria, cáncer gástrico, lesiones cutáneas premalignas, cáncer testicular, linfomas, cáncer de tiroides, neuroblastoma, cáncer de esófago, cáncer del tracto genitourinario, hipercalcemia maligna, cáncer de cuello uterino, cáncer endometrial, cáncer de corteza suprarrenal y cáncer de próstata.

Como se usa en la presente memoria, «enfermedad o trastorno neurológico» hace referencia a cualquier enfermedad o trastorno del sistema nervioso y/o del sistema visual. «enfermedad o trastorno neurológico» incluye enfermedades o trastornos que implican al sistema nervioso central (cerebro, tronco del encéfalo y cerebelo), el sistema nervioso periférico (incluyendo los nervios craneales) y el sistema nervioso autónomo (partes del cual están localizadas tanto en el sistema nervioso central como periférico). Una enfermedad o trastorno neurológico incluye, pero sin limitación, afasia epileptiforme adquirida; encefalomiелitis aguda diseminada; adrenoleucodistrofia; degeneración macular relacionada con la edad; agenesia del cuerpo calloso; agnosia; síndrome de Aicardi; enfermedad de Alexander; enfermedad de Alpers; hemiplejia alternante; enfermedad de Alzheimer; demencia vascular; esclerosis lateral amiotrófica; anencefalia; síndrome de Angelman; angiomatosis; anoxia; afasia; apraxia; quistes aracnoides; aracnoiditis; malformación de Anronl-Chiari; malformación arteriovenosa; síndrome de Asperger; ataxia-telangiectasia; trastorno por déficit de atención con hiperactividad; autismo; disfunción autónoma; dolor de espalda; enfermedad de Batten; enfermedad de Behcet; parálisis de Bell; blefaroespasmo esencial benigno; amiotrofia focal benigna; hipertensión intracraneal benigna; enfermedad de Binswanger; blefaroespasmo; síndrome de Bloch Sulzberger; lesión del plexo braquial; absceso cerebral; lesión cerebral; tumores cerebrales (incluyendo glioblastoma multiforme); tumor espinal; síndrome de Brown-Sequard; enfermedad de Canavan; síndrome del túnel carpiano; causalgia; síndrome de dolor central; mielínolisis pontina central; trastorno cefálico; aneurisma cerebral; arteriosclerosis cerebral; atrofia cerebral; gigantismo cerebral; parálisis cerebral; enfermedad de Charcot-Marie-Tooth; neuropatía inducida por quimioterapia y dolor neuropático; malformación de Chiari; corea; polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica; dolor crónico; síndrome de dolor regional crónico; síndrome de Coffin Lowry ; coma, incluyendo estado vegetativo persistente; diplejía facial congénita; degeneración corticobasal; arteritis craneal; craneosinostosis; enfermedad de Creutzfeldt-Jakob; trastornos traumáticos acumulativos; síndrome de Cushing; enfermedad de cuerpos de inclusión citomegálicos; infección por citomegalovirus; síndrome de los ojos y pies danzantes; síndrome de Dandy Walker; enfermedad de Dawson; síndrome de De Morsier; parálisis de Dejerine-Klumke; demencia; dermatomiositis; neuropatía diabética; esclerosis difusa; disautonomía; disgrafía dislexia; distonias; encefalopatía epiléptica infantil temprana; síndrome de la silla vacía; encefalitis; encefalocelos; angiomatosis 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 frontotemporal y otras «tauropatías»; enfermedad de Gaucher; síndrome de Gerstmann; arteritis de células gigantes; enfermedad de inclusión celular gigante; leucodistrofia de células globoides; síndrome de Guillain-Barré; mielopatía asociada al HTLV-1; enfermedad de Hallervorden-Spatz; lesión craneal; dolor de cabeza; espasmo

hemifacial; paraplejía espástica hereditaria; heredopatía atáctica polineurítica; herpes Zoster ótico; infección por herpes; síndrome de Hirayama; demencia y neuropatía asociada al VIH (también manifestaciones neurológicas del SIDA); holoprosencefalia; enfermedad de Huntington y otras enfermedades de repetición de poliglutamina; hidranencefalia; hidrocefalia; hipercortisolismo; hipoxia; encefalomielitis mediada por inmunidad; miositis con cuerpos
5 de inclusión; incontinencia pigmentaria; enfermedad de 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; kuru; enfermedad de Lafora; síndrome miasténico de Lambert-Eaton; síndrome de Landau-Kleffner; síndrome medular lateral (Wallenberg); dificultades de aprendizaje;
10 enfermedad 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 las neuronas motoras o esclerosis lateral amiotrófica); enfermedad del disco lumbar; enfermedad de Lyme - secuelas neurológicas; enfermedad de Machado-Joseph; macrocefalia; megalencefalia; síndrome de Melkersson-Rosenthal; enfermedad de Meniere; meningitis; enfermedad de Menkes; leucodistrofia metacromática; microcefalia; migraña;
15 síndrome de Miller Fisher; miopoplejías; miopatías mitocondriales; síndrome de Mobius; amiotrofia monomérica; enfermedad de las neuronas motoras; enfermedad de Moyamoya; mucopolisacaridosis; demencia multiinfarto; neuropatía motora multifocal; esclerosis múltiple y otros trastornos desmielinizantes; atrofia sistémica múltiple con hipotensión postural; distrofia muscular; miastenia grave; esclerosis mielinoclastica difusa; encefalopatía mioclónica de lactantes; mioclono; miopatía; miotonía congénita; narcolepsia; neurofibromatosis; síndrome neuroléptico
20 maligno; manifestaciones neurológicas del SIDA; secuelas neurológicas del lupus; neuromiotonía; lipofuscinosis ceroides neuronal; trastornos de migración neuronal; enfermedad de Niemann-Pick; síndrome de O'Sullivan-McLeod; neuralgia occipital; secuelas de disrafismo espinal oculto; síndrome de Ohtahara; atrofia olivopontocerebelosa; opsoclonos mioclono; neuritis óptica; hipotensión ortostática; síndrome de sobreuso; parestesias; enfermedad o trastorno neurodegenerativo (enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, enfermedad de Alzheimer,
25 esclerosis lateral amiotrófica (ELA), demencia, esclerosis múltiple y otras enfermedades y trastornos asociados con la muerte celular neuronal); 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 profundos del desarrollo; reflejo de estornudo fótico; enfermedad de almacenamiento de ácido fitánico; enfermedad de Pick; nervio pinzado; tumores pituitarios;
30 polimiositis; porencefalia; síndrome postpolio; neuralgia postherpética; encefalomielitis postinfecciosa; hipotensión postural; síndrome de Prader-Willi; esclerosis lateral primaria; enfermedades priónicas; atrofia hemifacial progresiva; leucoencefalopatía multifocal progresiva; poliosteoartritis esclerosante progresiva; parálisis supranuclear progresiva; pseudotumor cerebral; síndrome de Ramsay-Hunt (tipos I y II); encefalitis de Rasmussen; síndrome de distrofia simpática refleja; enfermedad de Refsum; trastornos del movimiento repetitivo; lesiones por estrés repetitivo;
35 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; herpes; 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 en la columna; síndrome de Stiff-Person; apoplejía; síndrome de Sturge-Weber; panencefalitis esclerosante subaguda; encefalopatía
40 arteriosclerótica subcortical; corea de Sydenham; síncope; siringomielia; discinesia tardía; enfermedad de Tay-Sachs; arteritis temporal; síndrome de la médula espinal atada; enfermedad de Thomsen; síndrome de la salida torácica; tic doloroso; parálisis de Todd; síndrome de Tourette; ataque isquémico transitorio; encefalopatías espongiiformes transmisibles; mielitis transversa; lesión cerebral traumática; temblor; neuralgia trigeminal; paraparesia espástica tropical; esclerosis tuberosa; demencia vascular (demencia multiinfarto); vasculitis incluyendo
45 arteritis temporal; enfermedad de Von Hippel-Lindau; síndrome de Wallenberg; enfermedad de Werdnig-Hoffman; síndrome de West; latigazo; síndrome de Williams; enfermedad de Wildon y síndrome de Zellweger.

Una «enfermedad o trastorno proliferativo» incluye, pero sin limitación, trastornos neoplásicos hematopoyéticos que implican células hiperplásicas/neoplásicas de origen hematopoyético surgidas de estirpes mieloides, linfoides o
50 eritroides, o células precursoras de las mismas. Estas incluyen, pero sin limitación, leucemia eritroblástica, leucemia promielocítica aguda (LPMA), leucemia mielógena crónica (LMC), malignidades linfoides incluyendo, pero sin limitación, leucemia linfoblástica aguda (LLA), la cual incluye TODAS las estirpes B y TODAS las estirpes T, leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia prolinfocítica (LPL), tricoleucemia (TLC) y macroglobulinemia de Waldenstrom (MW). Las formas adicionales de linfomas malignos incluyen, pero sin limitación, linfoma de no
55 Hodgkin y variantes del mismo, linfomas de linfocitos T periféricos, leucemia/linfoma de linfocitos T adultos (LTA), linfoma cutáneo de linfocitos T (LCLT), leucemia linfocítica granulosa de células grandes (LFG), enfermedad de Hodgkin y enfermedad de Reed-Sternberg.

Una «inflamación» hace referencia a las afecciones inflamatorias sistémicas y afecciones asociadas con la migración
60 a nivel local y la atracción de monocitos, leucocitos y/o neutrófilos. Los ejemplos de inflamación incluyen, pero sin

limitación, inflamación resultante de la infección con microorganismos patógenos (incluyendo bacterias grampositivas y gramnegativas, virus, hongos y parásitos tales como protozoos y helmintos), rechazo de trasplante (incluido el rechazo de órganos sólidos como riñón, hígado, corazón, pulmón o córnea, así como rechazo de los trasplantes de médula ósea incluyendo enfermedad de injerto contra hospedador (EICH)), o por reacciones autoinmunitarias o alérgicas localizadas agudas o crónicas. Las enfermedades autoinmunitarias incluyen glomerulonefritis aguda; artritis reumatoide o reactiva; glomerulonefritis crónica; enfermedad inflamatoria intestinal, tal como enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y enterocolitis necrotizante; hepatitis; sepsis; enfermedad hepática alcohólica, esteatosis hepática no alcohólica; síndromes asociados a transfusiones de granulocitos; dermatosis inflamatorias tales como dermatitis de contacto, dermatitis atópica, psoriasis, lupus eritematoso sistémico (LES), tiroiditis autoinmunitaria, esclerosis múltiple, y algunas formas de diabetes, o cualquier otro estado autoinmunitario donde el ataque del propio sistema inmunitario del sujeto da como resultado la destrucción patológica de tejido. Las reacciones alérgicas incluyen asma alérgico, bronquitis crónica, hipersensibilidad aguda y retardada. Las patologías inflamatorias sistémicas incluyen inflamación asociada con traumatismo, quemaduras, reperfusión tras eventos isquémicos (p. ej., eventos tromboticos en el corazón, el cerebro, el intestino o los vasos periféricos, incluyendo infarto de miocardio y apoplejía), sepsis, síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA) o síndrome de disfunción orgánica múltiple. El agrupamiento de células inflamatorias también ocurre en placas ateroscleróticas. La inflamación incluye, pero sin limitación, linfoma de no Hodgkin, granulomatosis de Wegener, tiroiditis de Hashimoto, carcinoma hepatocelular, atrofia del timo, pancreatitis crónica, artritis reumatoide, hiperplasia linfoide reactiva, osteoartritis, colitis ulcerosa, carcinoma papilar, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, colecistitis aguda, colecistitis crónica, cirrosis, sialoadenitis crónica, peritonitis, pancreatitis aguda, pancreatitis crónica, gastritis crónica, adenomiosis, endometriosis, cervicitis aguda, cervicitis crónica, hiperplasia linfoide, esclerosis múltiple, hipertrofia derivada de púrpura trombocitopénica idiopática, nefropatía por IgA primaria, lupus sistémico eritematoso, psoriasis, enfisema pulmonar, pielonefritis crónica y cistitis crónica.

25 **Composiciones y moléculas de polinucleótidos y oligonucleótidos**

Dianas: en un aspecto, las dianas incluyen secuencias de ácido nucleico del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) incluyendo, sin limitación, secuencias codificantes y/o no codificantes con sentido y/o antisentido asociadas con BDNF. La Pub. PCT n.º WO 2010/093904 y la pub. de sol. de pat. de EE. UU. n.º 2011/0319475, tituladas ambas «treatment of Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Related Diseases by Inhibition of Natural Antisense Transcript to BDNF», divulgan a BDNF como una diana para modulación usando oligonucleótidos como se menciona en las mismas.

Las neurotrofinas son una clase de factores de crecimiento relacionados estructuralmente que promueven la supervivencia y diferenciación neurales. Estimulan el crecimiento de neuritas, sugiriendo que pueden promover la regeneración de neuronas lesionadas, y actúan como factores neurotróficos derivados de diana estimulando el brote colateral en tejidos diana que producen neutrófilos. El factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) se caracterizó inicialmente como una proteína básica presente en extractos cerebrales y capaz de aumentar la supervivencia de ganglios de raíz dorsal. Cuando la comunicación axonal con el cuerpo celular se interrumpe por lesión, las células de Schwann producen factores neurotróficos tales como factor de crecimiento nervioso (NGF) y BDNF. Las neurotrofinas se liberan de las células de Schwann y se dispersan difusamente en forma de gradiente alrededor de axones en regeneración, que se extienden entonces distalmente a lo largo del gradiente de densidad de neurotrofinas. Se ha mostrado que la aplicación local de BDNF a nervios transectados en ratas neonatales previene la muerte masiva de neuronas motoras que sigue a la axotomía. El título de ARNm de BDNF aumenta a varias veces el nivel normal 4 días después de la axotomía y alcanza su máximo a las 4 semanas. Además, se ha reseñado que el BDNF potencia la supervivencia de neuronas colinérgicas en cultivo.

En un aspecto, se usan oligonucleótidos antisentido para prevenir o tratar enfermedades o trastornos asociados con miembros de la familia de BDNF. Las enfermedades y trastornos mediados por factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) ejemplares que pueden tratarse con los oligonucleótidos antisentido de la descripción y/o con células/tejidos regenerados a partir de células madre obtenidas usando y/o que tienen los compuestos antisentido comprenden: una enfermedad o trastorno asociado con una función y/o expresión anormal de BDNF, una enfermedad o trastorno neurológico, una enfermedad o trastorno asociado con neurogénesis defectiva; una enfermedad o trastorno neurodegenerativo (p. ej., enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, etc.); un trastorno neuropsiquiátrico (depresión, esquizofrenia, trastorno esquizofreniforme, trastorno esquizoafectivo y trastorno delirante; trastornos de ansiedad tales como trastorno de pánico, fobias (incluyendo agorafobia), un trastorno obsesivo-compulsivo, un trastorno de estrés postraumático, un trastorno bipolar, anorexia nerviosa, bulimia nerviosa), un trastorno autoinmunitario (p. ej., esclerosis múltiple) del sistema nervioso central, pérdida de memoria, un trastorno de memoria a largo plazo o corto plazo, olvido benigno, un trastorno de aprendizaje infantil, lesión craneal cerrada, un trastorno de déficit de atención, reacción neuronal a

infección vírica, daño cerebral, narcolepsia, un trastorno del sueño (p. ej., trastornos del ritmo circadiano, insomnio y narcolepsia); corte de nervios o daño nervioso, corte de médula nerviosa cerebroespinal (SNC) y daño en células cerebrales o nerviosas, un déficit neurológico asociado con SIDA, un trastorno motor de tic caracterizado por tics motores y/o vocales (p. ej., trastorno de Tourette, trastorno de tic motor o vocal crónico, trastorno de tic transitorio y trastorno de movimiento estereotípico), un trastorno por abuso de sustancia (p. ej., dependencia de sustancia, abuso de sustancia y secuelas de abuso/dependencia de sustancia, tal como trastorno psicológico inducido por sustancia, abstinencia de sustancia y demencia o trastorno amnésico inducido por sustancia), lesión cerebral traumática, acúfenos, neuralgia (p. ej., neuralgia del trigémino), dolor (p. ej., dolor crónico, dolor inflamatorio crónico, dolor asociado con artritis, fibromialgia, dolor de espalda, dolor asociado con cáncer, dolor asociado con enfermedad digestiva, dolor asociado con enfermedad de Crohn, dolor asociado con enfermedad autoinmunitaria, dolor asociado con enfermedad endocrina, dolor asociado con neuropatía diabética, dolor del miembro fantasma, dolor espontáneo, dolor posquirúrgico crónico, dolor temporomandibular crónico, causalgia, neuralgia posherpética, dolor relacionado con SIDA, síndromes de dolor regional complejo de tipo I y II, neuralgia del trigémino, dolor de espalda crónico, dolor asociado con lesión de médula espinal, dolor asociado con toma de fármacos y dolor agudo recurrente, dolor neuropático), actividad neuronal inapropiada resultante en neurodistesias en una enfermedad tal como diabetes, una EM y una enfermedad de neuronas motoras, ataxias, rigidez muscular (espasticidad), disfunción de la articulación temporomandibular, síndrome de deficiencia de la recompensa (SDR), neurotoxicidad causada por abuso de alcohol o sustancia (p. ej., éxtasis, metanfetamina, etc.), retraso mental o deterioro cognitivo (p. ej., retraso mental ligado a X no síndrómico, síndrome de X frágil, síndrome de Down, autismo), afasia, parálisis de Bell, enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, encefalitis, degeneración macular relacionada con la edad, síndrome de ondina, síndrome de WAGR, pérdida de audición, síndrome de Rett, epilepsia, lesión de médula espinal, apoplejía, hipoxia, isquemia, lesión cerebral, neuropatía diabética, neuropatía periférica, complicaciones de trasplante de nervio, enfermedad de neuronas motoras, lesión de nervios periféricos, obesidad, un síndrome metabólico, cáncer, asma, una enfermedad atópica, inflamación, alergia, eccema, una enfermedad o trastorno neurootológico y una enfermedad o trastorno asociado con el envejecimiento y la senescencia.

La presente descripción proporciona un mecanismo mediante el cual NAT endógenos suprimen la transcripción de sus contrapartidas génicas con sentido. La descripción proporciona que esa expresión génica endógena pueda estar regulada positivamente, de manera específica de locus, por la retirada o inhibición de los NAT, que se transcriben a partir de la mayoría de unidades transcripcionales.

Un aspecto de la presente descripción proporciona ejemplos de ARNnc funcionales que regulan la entrada de proteína, siendo el fenómeno aplicable a muchos otros loci genómicos.

El factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) es un miembro de la familia de factores de crecimiento «neurotrofinas» esencial para el crecimiento, maduración, diferenciación y mantenimiento neuronales. El BDNF es también esencial para la plasticidad neuronal y se ha mostrado que está implicado en procesos de aprendizaje y memoria. El locus de BDNF está en el cromosoma 11 y muestra transcripción activa de ambas hebras, lo que conduce a la transcripción de un NAT no codificante.

La presente descripción caracteriza el papel regulador de esta molécula de ARN antisentido, BDNF-AS, que ejerce una regulación recíproca y dinámica potente sobre la expresión de ARNm de BDNF con sentido y su proteína, tanto *in vitro* como *in vivo*.

Un aspecto de la presente descripción proporciona una estrategia de regulación positiva de la expresión de ARNm usando moléculas inhibitoras de transcrito de ARN antisentido, que se denominan AntagoNAT. Los AntagoNAT se describen, p. ej. en la Pub. PCT n.º 2012/068340.

Se ha mostrado que el número de ARNnc en genomas eucarióticos aumenta en función de la complejidad de desarrollo y hay, por ejemplo, una gran cantidad de diversidad en los ARNnc expresados en el sistema nervioso. Durante los últimos años, ha habido informes sobre NAT funcionales y se ha mostrado su implicación potencial en trastornos humanos, incluyendo enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y síndrome de X frágil. Además, se ha reseñado que puede alcanzarse la regulación positiva del gen con sentido CD97 mediante desactivación génica de su transcrito de ARN antisentido. Se ha reseñado regulación positiva del receptor de progesterona (PR) y otros transcritos endógenos después de orientar ARN no codificantes derivados de promotor. Se ha reseñado la activación transcripcional del gen p21 y el promotor Oct4 después del agotamiento de NAT. La remodelación de cromatina inducida por ARN antisentido parece ser un modo de acción factible y dinámico para muchos NAT de bajo número de copias. Si es así, el ARN antisentido podría ejercer predominantemente efectos locales para mantener o modificar la estructura de cromatina, activando o suprimiendo en última instancia la expresión del gen con sentido.

PCR2 es un complejo proteico que consiste en cuatro subunidades de núcleo: Eed, Suz12, RbAp48 y la catalítica Ezh2, que cataliza la trimetilación de la histona H3-lisina. (H3K27met3). Estudios recientes proporcionan evidencias de la interacción directa ARN-proteína entre Ezh2 y muchos transcritos de ARNnc. Otros estudios de inactivación de X y la agrupación génica HOX muestran que los transcritos de ARN están implicados en la inducción mediada por PRC2 de H3K27met3, marcas de cromatina represivas. La elaboración del perfil del transcriptoma PRC2 ha identificado a más de 9.000 ARN de interacción con PRC2 en células madre embrionarias, muchos de ellos clasificados como transcritos de ARN antisentido. Se ha reseñado que el silenciamiento epigenético de los genes p15 y DM1 implica la formación de heterocromatina por su ARN antisentido. La división binaria tradicional de cromatina en heterocromatina o eucromatina podría no ser completa, ya que trabajos recientes han mostrado que hay cinco tipos principales de cromatina que son más dinámicos y flexibles de lo creído originalmente. Igualmente aplicables a un gran número de loci génicos, los NAT pueden manipularse para obtener una alteración específica de locus en la modificación de cromatina. Como ejemplos, se ha mostrado que la escisión (por siARN) o inhibición (por AntagoNAT) de los transcritos antisentido de los genes de BDNF conduce a la regulación positiva de los ARNm correspondientes.

Las neurotrofinas pertenecen a una clase de factores de crecimiento secretados que potencian la supervivencia, desarrollo, diferenciación y función de neuronas y el BDNF es un mediador molecular importante de la plasticidad sináptica. Se sugiere que el BDNF sincroniza la maduración neuronal y glial, participa en la diferenciación axonal y dendrítica y protege y potencia la supervivencia de células neuronales. Los niveles de expresión de neurotrofina son deficientes en trastornos neurodegenerativos, psiquiátricos y de neurodesarrollo. Se cree que la regulación positiva de las neurotrofinas tiene efectos beneficiosos sobre varios trastornos neurológicos. Pueden usarse AntagoNAT como estrategia terapéutica para inhibir BDNF-AS y, en consecuencia, potenciar la proliferación y supervivencia neuronal en una variedad de patologías. No puede excluirse que el enfoque descrito en la presente memoria para regular positivamente la síntesis de moléculas de BDNF endógenas, que se supone que contienen modificaciones naturales y representan todas las formas de corte y ajuste conocidas, pruebe ser distinto, y quizá superior, a administrar las moléculas de BDNF sintéticas.

En un aspecto, la modulación de BDNF por uno o varios oligonucleótidos antisentido se administra a un paciente necesitado de ello para prevenir o tratar cualquier enfermedad o trastorno relacionado con la expresión, función o actividad anormales de BDNF en comparación con un control normal.

En un aspecto, los oligonucleótidos son específicos de los transcritos antisentido naturales de BDNF mencionados en la presente memoria, lo que incluye, sin limitación, regiones no codificantes. Las dianas de BDNF comprenden variantes de BDNF; mutantes de BDNF, incluyendo SNP; secuencias no codificantes de BDNF; alelos, fragmentos y similares. Preferentemente, el oligonucleótido es una molécula de ARN antisentido.

De acuerdo con aspectos de la descripción, la molécula de ácido nucleico diana no está limitada a polinucleótidos de BDNF solos, sino que se extiende a cualquiera de las isoformas, receptores, homólogos, regiones no codificantes y similares de BDNF.

En un aspecto, un oligonucleótido está orientado a una secuencia antisentido natural (antisentido natural a las regiones codificantes y no codificantes) de dianas de BDNF, incluyendo, sin limitación, variantes, alelos, homólogos, mutantes, derivados, fragmentos y secuencias complementarias de estos. Preferentemente, el oligonucleótido es una molécula de ARN o ADN antisentido.

En un aspecto, los compuestos oligoméricos de la presente descripción también incluyen variantes donde 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. Estos compuestos se ensayan entonces usando los procedimientos descritos en la presente memoria para determinar su capacidad de inhibir la expresión de un ácido nucleico diana.

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 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 %.

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

10 Un compuesto antisentido, ya sea 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 produciendo una pérdida de utilidad, y hay un grado de complementariedad suficiente para evitar la unión inespecífica del compuesto antisentido a secuencias no diana en condiciones donde 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 las condiciones donde se realizan los ensayos.

20 En un aspecto, la orientación a BDNF incluyendo, sin limitación, secuencias antisentido que se identifican y se expanden, usando, por ejemplo, PCR, hibridación etc., una o más de las secuencias expuestas como las SEQ ID NO: 3 a 11, y similares, modula la expresión o función de BDNF. En un aspecto, la expresión o función está regulada positivamente en comparación con un control. En un aspecto, la expresión o función está regulada negativamente en comparación con un control.

25 En un aspecto, los oligonucleótidos comprenden secuencias de ácidos nucleicos expuestas como las SEQ ID NO: 12 a 49, incluyendo 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 o grupos de enlace internucleotídicos modificados comprenden fosforotioato, fosforoditioato o similares. En un aspecto, los nucleótidos comprenden un derivado de fósforo. El derivado de fósforo (o grupo fosfato modificado) que puede enlazarse con el resto de azúcar o de análogo de azúcar en los oligonucleótidos modificados de la presente descripción puede ser un monofosfato, difosfato, trifosfato, alquilfosfato, alcanofosfato, fosforotioato y similares. La preparación de los análogos de fosfato indicados anteriormente, y su incorporación en nucleótidos, nucleótidos modificados y oligonucleótidos, también es en sí conocida y no es necesario describirla aquí.

35 La especificidad y sensibilidad de los antisentido también son aprovechadas por los expertos en la materia 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 de manera efectiva a seres humanos y numerosos ensayos clínicos están actualmente en marcha. Está por tanto establecido que los oligonucleótidos pueden ser modalidades terapéuticas útiles que pueden configurarse para ser útiles en regímenes de tratamiento para el tratamiento de células, tejidos y animales, especialmente seres humanos.

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

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

55 La orientación de un compuesto antisentido a una molécula de ácido nucleico particular, en el contexto de esta descripción, puede ser un proceso multietapa. El proceso normalmente empieza con la identificación de un ácido nucleico diana cuya función va a modularse. Este ácido nucleico diana puede ser, por ejemplo, un gen celular (o ARNm transcrito del gen) cuya expresión está asociada a un trastorno o patología particular, o una molécula de 60 ácido nucleico de un agente infeccioso. En la presente descripción, el ácido nucleico diana codifica el factor

neurotrófico derivado del cerebro (BDNF).

El proceso de orientación normalmente incluye también la determinación de al menos una región diana, segmento, o sitio dentro del ácido nucleico diana para que ocurra la interacción antisentido de tal forma que resulte el efecto deseado, p. ej., la modulación de la expresión. Dentro del contexto de la presente descripción, el término «región» se define como una parte del ácido nucleico diana que tiene al menos una estructura, función o característica identificable. Dentro de las regiones de ácidos nucleicos diana están los segmentos. Los «segmentos» se definen como partes más pequeñas o subpartes de regiones dentro de un ácido nucleico diana. «Sitios», como se usa en la presente descripción, se define como posiciones dentro de un ácido nucleico diana.

10 En un aspecto, los oligonucleótidos antisentido se unen a las secuencias antisentido naturales de factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y modulan la expresión y/o función de BDNF (SEQ ID NO: 1 y 2). Los ejemplos de secuencias antisentido incluyen las SEQ ID NO: 3 a 55.

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

En un aspecto, los oligonucleótidos antisentido son específicos de secuencias antisentido naturales de BDNF, donde la unión de los oligonucleótidos a las secuencias antisentido naturales de BDNF modula la expresión y/o función de BDNF.

En un aspecto, los compuestos de oligonucleótido comprenden secuencias expuestas como las SEQ ID NO: 12 a 49, 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 o grupos de enlace internucleotídicos modificados comprenden fosforotioato, fosforoditioato o similares. En un aspecto, los nucleótidos comprenden un derivado de fósforo. El derivado de fósforo (o grupo fosfato modificado) que puede enlazarse con el resto de azúcar o de análogo de azúcar en los oligonucleótidos modificados de la presente descripción puede ser un monofosfato, difosfato, trifosfato, alquilfosfato, alcanofosfato, fosforotioato y similares. La preparación de los análogos de fosfato indicados anteriormente, y su incorporación en nucleótidos, nucleótidos modificados y oligonucleótidos, también es en sí conocida y no es necesario describirla aquí.

Ya que, como se conoce en la materia, el codón de iniciación de la traducción es típicamente 5'-AUG (en moléculas de ARNm transcrito; 5'-ATG en la molécula de ADN correspondiente), se hace referencia también al codón de iniciación de la traducción como el «codón AUG», el «codón de iniciación» o el «codón de iniciación AUG». Una minoría de genes tiene un codón de iniciación de la traducción que tiene la secuencia de ARN 5'-GUG, 5'-UUG o 5'-CUG; y se ha demostrado que 5'-AUA, 5'-ACG y 5'-CUG funcionan *in vivo*. Por tanto, las expresiones «codón de iniciación de la traducción» y «codón de iniciación» pueden englobar muchas secuencias de codón, aun cuando el aminoácido iniciador en cada aspecto sea típicamente metionina (en eucariotas) o formilmetionina (en procariotas). Los genes eucariotas y procariotas pueden tener dos o más codones de iniciación alternativos, uno cualquiera de los cuales puede utilizarse preferentemente para la iniciación de la traducción en un tipo particular de célula o tejido, o en un conjunto particular de condiciones. En el contexto de la descripción, «codón de iniciación» y «codón de iniciación de la traducción» hacen referencia al codón o codones que se usan *in vivo* para iniciar la traducción de un ARNm transcrito de un gen que codifica el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), independientemente de la una o más 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).

50 Las expresiones «región de codón de iniciación» y «región de codón de iniciación de la traducción» hacen referencia a una parte de dicho ARNm o gen que engloba de aproximadamente 25 a aproximadamente 50 nucleótidos contiguos en cualquier dirección (es decir, 5' o 3') desde un codón de iniciación de la traducción. De forma similar, las expresiones «región de codón de terminación» y «región de codón de terminación de la traducción» hacen referencia a una parte de dicho ARNm o gen que engloba de aproximadamente 25 a aproximadamente 50 nucleótidos contiguos en cualquier dirección (es decir, 5' o 3') desde un codón de terminación de la traducción. En consecuencia, la «región de codón de iniciación» (o «región de codón de iniciación de la traducción») y la «región de codón de terminación» (o «región de codón de terminación de la traducción») son todas regiones que pueden ser efectivamente elegidas como diana con los compuestos antisentido de la presente descripción.

60 El marco de lectura abierto (ORF) o «región codificante», que se conoce en la materia por hacer referencia a la

región entre el codón de iniciación de la traducción y el codón de terminación de la traducción, también es una región que puede ser efectivamente elegida como diana. Dentro del contexto de la presente descripción, una región elegida como diana es la región intragénica que engloba el codón de iniciación o de terminación de la traducción del marco de lectura abierto (ORF) de un gen.

5

Otra región diana incluye la región no traducida 5' (5'UTR), conocida en la materia por hacer referencia a la parte de un ARNm en la dirección 5' desde el codón de iniciación de la traducción, y que incluye, por tanto, nucleótidos entre el sitio caperuza 5' (5' cap) y el codón de iniciación de la traducción de un ARNm (o nucleótidos correspondientes en el gen). Otra región diana más incluye la región no traducida 3' (3'UTR), conocida en la materia por hacer referencia a la parte de un ARNm en la dirección 3' desde el codón de terminación de la traducción, y que incluye, por 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 caperuza 5' de un ARNm comprende un residuo de guanosina N7-metilado unido al residuo más 5' del ARNm mediante un grupo de enlace trifosfato 5'-5'. La región caperuza 5' de un ARNm se considera que incluye la propia estructura de caperuza 5', además de los primeros 50 nucleótidos adyacentes al sitio de caperuza. Otra región diana para esta descripción es la región caperuza 5'.

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

En un 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.

30

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

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

35

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

40

Tras la escisión de una o más regiones de exón o intrón, o partes de las mismas durante el corte y empalme, 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 corte y empalme. Estas variantes de ARNm también se conocen como «variantes de corte y empalme alternativas». Si no se produce corte y empalme de la variante de pre-ARNm, entonces la variante de pre-ARNm es idéntica a la variante de ARNm.

45

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

50

55

60

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

5 Aunque se exponen las secuencias específicas de ciertos segmentos diana a modo de ejemplo en el presente documento, un experto en la materia reconocerá que estas sirven para ilustrar y describir aspectos particulares dentro del alcance de la presente descripción. Los segmentos diana adicionales son fácilmente identificables por un experto en la materia en vista de esta descripción.

10 Se considera que los segmentos diana de 5-100 nucleótidos de longitud que comprenden un tramo de al menos cinco (5) nucleótidos consecutivos seleccionados de entre los segmentos diana preferidos ilustrativos también son adecuados para orientación.

Los segmentos diana pueden comprender secuencias de ADN o ARN que comprenden al menos los 5 nucleótidos consecutivos desde el extremo 5' de uno de los segmentos diana preferidos ilustrativos (siendo los restantes nucleótidos un tramo consecutivo del mismo ADN o ARN que empieza inmediatamente en dirección 5' del extremo 5' del segmento diana y que continúa hasta que el ADN o ARN contenga de aproximadamente 5 a aproximadamente 100 nucleótidos). Se representan segmentos diana preferidos de forma similar por secuencias de ADN o ARN que comprenden al menos los 5 nucleótidos consecutivos desde el extremo 3' de uno de los segmentos diana preferidos ilustrativos (siendo los restantes nucleótidos un tramo consecutivo del mismo ADN o ARN que empieza inmediatamente en dirección 3' del extremo 3' del segmento diana y que continúa hasta que el ADN o ARN contenga de aproximadamente 5 a aproximadamente 100 nucleótidos). Un experto en la materia dotado de los segmentos diana ilustrados en la presente memoria será capaz, sin experimentación indebida, de identificar segmentos diana preferidos adicionales.

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

30 En aspectos de la descripción, 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 oriente a secuencias solapantes de tal forma que los oligonucleótidos se sinteticen para cubrir toda la longitud del polinucleótido diana. Las dianas también incluyen regiones codificantes, además de no codificantes.

35 En un aspecto, se prefiere orientarse a ácidos nucleicos específicos por oligonucleótidos antisentido. La orientación 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. Esta 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, transcritos antisentido y otras unidades transcripcionales (UT) que contienen una alta densidad de codones de terminación y que carecen de cualquier amplio «marco de lectura abierto». Muchos ARNnc parecen empezar a partir de sitios de iniciación en regiones no traducidas 3' (3'UTR) de loci codificantes de proteínas. 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 ha mostrado que el conjunto de ARN nucleares no poliadenilados puede ser muy grande, y que muchos de tales transcritos 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 cadena opuesta a los ARN donde actúan y, por lo tanto, exhiben complementariedad perfecta con su diana, y (2) ARN codificados en trans que están codificados en una localización cromosómica distinta de los ARN donde actúan, y generalmente no exhiben potencial de apareamiento de bases perfecto con sus dianas.

60 Sin desear ceñirse a ninguna teoría, la perturbación de un polinucleótido antisentido por los oligonucleótidos antisentido descritos en la presente memoria puede alterar la expresión de los ARN mensajeros con sentido correspondientes. Sin embargo, esta regulación puede tanto ser discordante (la desactivación génica antisentido da

como resultado elevación del ARN mensajero) como concordante (la desactivación génica antisentido da como resultado reducción concomitante del ARN mensajero). En estos casos, los oligonucleótidos antisentido pueden orientarse a partes solapantes o no solapantes del transcrito antisentido, dando como resultado su desactivación génica o secuestro. Los antisentido codificantes, así como no codificantes, pueden orientarse de una manera idéntica y cualquier categoría es capaz de regular los transcritos con sentido correspondientes, tanto de manera concordante como discordante. Las estrategias que se emplean en identificar nuevos oligonucleótidos para su uso contra una diana pueden basarse en la desactivación génica de transcritos de ARN antisentido por oligonucleótidos antisentido o cualquier otro medio de modulación de la diana deseada.

10 *Estrategia 1:* en el caso de regulación discordante, la desactivación génica del transcrito antisentido eleva la expresión del gen convencional (con sentido). Si este último gen codifica un fármaco diana conocido o supuesto, entonces la desactivación génica de su contrapartida antisentido podría imitar posiblemente la acción de un agonista receptor o un estimulante enzimático.

Estrategia 2: en el caso de regulación concordante, podrían desactivarse génicamente de forma concomitante tanto los transcritos antisentido como con sentido y así lograr una reducción sinérgica de la expresión génica (con sentido) convencional. Si, por ejemplo, se usa un oligonucleótido antisentido para lograr la desactivación génica, entonces esta estrategia puede usarse para aplicar un oligonucleótido antisentido orientado al transcrito con sentido y otro oligonucleótido antisentido al transcrito antisentido correspondiente, o un único oligonucleótido antisentido energéticamente simétrico que se orienta simultáneamente a transcritos con sentido y antisentido solapantes.

20 De acuerdo con la presente descripción, los compuestos antisentido incluyen oligonucleótidos antisentido, ribozimas, oligonucleótidos de secuencia de guía externa (EGS), compuestos de siARN, compuestos de interferencia (ARNi) de ARN mono- o bicatenario tales como compuestos de siARN, y otros compuestos oligoméricos que hibridan con al menos una parte 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 de forma rutinaria linealmente, pero pueden unirse o prepararse de otro modo para ser circulares y/o ramificados. Los compuestos antisentido pueden incluir constructos tales como, por ejemplo, dos hebras hibridadas para formar un compuesto completa o parcialmente bicatenario o una única hebra con autocomplementariedad suficiente para permitir la hibridación y formación de un compuesto completa o parcialmente bicatenario. Las dos hebras pueden ligarse internamente, dejando los extremos 3' o 5' libres, o pueden ligarse 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', produciendo una extensión del carácter monocatenario. Los compuestos bicatenarios opcionalmente pueden incluir nucleótidos protuberantes en los extremos. Modificaciones adicionales pueden incluir grupos conjugados enlazados con uno de los extremos, posiciones de nucleótido seleccionadas, posiciones de azúcar o uno de los grupos de enlace internucleosídicos. Como alternativa, las dos hebras pueden ligarse mediante un resto no de ácido nucleico o grupo ligador. Cuando se forma a partir de solo una hebra, el dsARN puede tomar la forma de una molécula tipo horquilla autocomplementaria que se dobla sobre sí misma formando un dúplex. Por tanto, el dsARN puede ser completa o parcialmente bicatenario. Puede lograrse la modulación específica de la expresión génica por expresión estable de horquillas de dsARN en líneas celulares transgénicas, sin embargo, en algunos aspectos, la expresión o función génica está regulada positivamente. Cuando se forma a partir de dos hebras, o una única hebra que adopta la forma de una molécula de tipo horquilla autocomplementaria 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 introducidos en un sistema, los compuestos de la descripción 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 funcionar mediante mecanismos basados en la ocupación. En general, los ácidos nucleicos (incluyendo oligonucleótidos) pueden describirse como «similares a ADN» (es decir, que generalmente tienen uno o más 2'-desoxiazúcares y, generalmente, bases T en vez de U) o «similares a ARN» (es decir, que generalmente tienen uno o más 2'-hidroxilazúcares o azúcares modificados en 2' y, generalmente bases U en vez de T). Las hélices de ácido nucleico pueden adoptar más de un tipo de estructura, más comúnmente las formas A y B. Se cree que, en general, los oligonucleótidos que tienen estructura similar a la forma B son «similares a ADN» y aquellos que tienen estructura similar a la forma A son «similares a ARN». En algunos aspectos (químicos), un compuesto antisentido puede contener tanto regiones en forma A como B.

En un aspecto, los oligonucleótidos o compuestos antisentido deseados comprenden al menos un: ARN antisentido, ADN antisentido, oligonucleótidos antisentido quiméricos, oligonucleótidos antisentido que comprenden grupos de enlace modificados, ARN de interferencia (ARNi), ARN interferente pequeño (siARN); un microARN de interferencia

(miARN); un ARN temporal pequeño (stARN); o un ARN de horquilla corta (shARN); activación génica inducida por ARN pequeño (ARNa); ARN activantes pequeños (saARN), o combinaciones de los mismos.

5 Los dsARN también pueden activar la expresión génica, un mecanismo que se ha llamado «activación génica inducida por ARN pequeño» o ARNa. Los promotores génicos que se orientan a dsARN inducen la potente activación transcripcional de genes asociados. El ARNa se demostró en células humanas usando dsARN sintéticos, llamados «ARN activantes pequeños» (saARN). No se sabe actualmente si la ARNa se conserva en otros organismos.

10 Se ha descubierto que el ARN bicatenario (dsARN) pequeño, tal como ARN interferente pequeño (siARN) y microARN (miARN), es el desencadenante de un mecanismo evolutivamente conservado conocido como interferencia de ARN (ARNi). La ARNi conduce invariablemente al silenciamiento génico mediante la remodelación de cromatina para suprimir así la transcripción, degradando el ARNm complementario o bloqueando la traducción de proteínas. Sin embargo, en los aspectos descritos en detalle en la sección de ejemplos a continuación, se muestra
15 que los oligonucleótidos aumentan la expresión y/o función de los polinucleótidos del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y productos codificados por los mismos. Los dsARN también pueden actuar como ARN activantes pequeños (saARN). Sin desear quedar ceñido a ninguna teoría, al orientar secuencias a promotores génicos, los saARN inducirán la expresión de genes diana en un fenómeno al que se hace referencia como activación transcripcional inducida por dsARN (ARNa).

20 En un aspecto adicional, los «segmentos diana preferidos» identificados en la presente memoria pueden emplearse en un cribado para compuestos adicionales que modulan la expresión de polinucleótidos del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF). Los «moduladores» son aquellos compuestos que disminuyen o aumentan la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica BDNF y que comprenden al menos una parte de 5 nucleótidos que es complementaria de un segmento diana preferido. El procedimiento de cribado comprende las etapas de poner en contacto un segmento diana preferido de una molécula de ácido nucleico que codifica polinucleótidos con sentido o antisentido naturales de BDNF con uno o más moduladores candidatos, y seleccionar uno o más moduladores candidatos que disminuyan o aumenten la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica polinucleótidos de BDNF, p. ej., las SEQ ID NO: 12 a 49. Una vez que se muestra que el modulador o
25 moduladores candidatos son capaces de modular (p. ej., tanto disminuir como aumentar) la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica polinucleótidos de BDNF, el modulador puede entonces emplearse en estudios de investigación adicionales de la función de polinucleótidos de BDNF, o para su uso como un agente de investigación, diagnóstico o terapéutico de acuerdo con la presente descripción.

35 Orientar la secuencia antisentido natural preferentemente modula la función del gen diana. Por ejemplo, el gen de BDNF (p. ej., números de acceso NM_170735 y NM_007540). En un aspecto, la diana es un polinucleótido antisentido del gen de BDNF. En un aspecto, un oligonucleótido antisentido se orienta a secuencias con sentido y/o antisentido naturales de polinucleótidos de BDNF (p. ej., números de acceso NM_170735 y NM_007540), variantes, alelos, isoformas, homólogos, mutantes, derivados, fragmentos y secuencias complementarias de los mismos.
40 Preferentemente, el oligonucleótido es una molécula antisentido y las dianas incluyen regiones codificantes y no codificantes de polinucleótidos antisentido y/o con sentido de BDNF.

Los segmentos diana preferidos de la presente descripción también pueden combinarse con sus compuestos antisentido complementarios respectivos de la presente descripción, formando oligonucleótidos bicatenarios
45 (duplexados) estabilizados.

Se ha mostrado en la materia que tales restos de oligonucleótido bicatenario modulan la expresión de la diana y regulan la traducción, así como el procesamiento de ARN mediante un mecanismo antisentido. Además, los restos bicatenarios pueden estar sujetos a modificaciones químicas. Por ejemplo, se ha mostrado que tales restos
50 bicatenarios inhiben la diana por la hibridación clásica de la hebra antisentido del dúplex con la diana, desencadenando así la degradación enzimática de la diana.

En un aspecto, un oligonucleótido antisentido se orienta a polinucleótidos de factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (p. ej., números de acceso: NM_170735 y NM_007540), variantes, alelos, homólogos, mutantes, derivados, fragmentos y secuencias complementarias de los mismos. Preferentemente, el oligonucleótido es una molécula antisentido.

De acuerdo con aspectos de la descripción, la molécula de ácido nucleico diana no está limitada solo a BDNF, sino que se extiende a cualquier polinucleótido variante del mismo y a cualquier polinucleótido que produzca, afecte,
60 influya o dé como resultado o se refiera a un producto de expresión de BDNF y/o cualquier isoforma del mismo.

En un aspecto, un oligonucleótido se orienta a una secuencia antisentido natural de polinucleótidos de BDNF, por ejemplo, los polinucleótidos expuestos como SEQ ID NO: 3 a 11, y cualquier variante, alelo, homólogo, mutante, derivado, fragmento y secuencia complementaria de los mismos. Se exponen ejemplos de oligonucleótidos antisentido como las SEQ ID NO: 12 a 49.

En un aspecto, los oligonucleótidos son complementarios de, o se unen a, secuencias de ácido nucleico de BDNF antisentido incluyendo, sin limitación secuencias con sentido y/o antisentido no codificantes asociadas con polinucleótidos de BDNF, y modulan la expresión y/o función de moléculas de BDNF.

En un aspecto, los oligonucleótidos son complementarios de, o se unen a, secuencias de ácido nucleico del antisentido natural de BDNF, expuesto como SEQ ID NO: 3 a 11 y modulan la expresión y/o la función de moléculas de BDNF.

En un aspecto, los oligonucleótidos comprenden secuencias de al menos 5 nucleótidos consecutivos de las SEQ ID NO: 12 a 49 y modulan la expresión y/o la función de moléculas de BDNF.

La dianas polinucleotídicas comprenden BDNF; incluyendo miembros de la familia del mismo, variantes de BDNF, mutantes de BDNF, incluidos SNP; secuencias no codificantes de BDNF; alelos de BDNF, variantes de especie, fragmentos y similares. Preferentemente, el oligonucleótido es una molécula antisentido.

En un aspecto, el oligonucleótido que se orienta a polinucleótidos de BDNF comprende: ARN antisentido, ARN de interferencia (ARNi), ARN de interferencia pequeño (siARN); microARN de interferencia (miARN); un ARN temporal pequeño (stARN); o un ARN de horquilla corta (shARN); activación génica inducida por ARN pequeño (ARNa) o ARN activante pequeño (saARN).

En un aspecto, orientar a los polinucleótidos de factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), por ejemplo, las SEQ ID NO: 3 a 55, modula la expresión o función de estas dianas. En un aspecto, la expresión o función está regulada positivamente en comparación con un control. En un aspecto, la expresión o función está regulada negativamente en comparación con un control.

En un aspecto, los compuestos antisentido comprenden secuencias expuestas como las SEQ ID NO: 12 a 49. Estos oligonucleótidos pueden comprender uno o más nucleótidos modificados, fragmentos más cortos o más largos, enlaces modificados y similares.

En un aspecto, las SEQ ID NO: 12 a 49 comprenden uno o más nucleótidos de ANB. La Tabla 1 muestra oligonucleótidos antisentido ejemplares útiles en los procedimientos de la descripción.

Tabla 1:

ID de secuencia	Nombre de la secuencia antisentido	Secuencia
SEQ ID NO: 12	CUR-2046 (Antisentido)	ArArCrArArArCrArArCrUrGrGrUrGrArGrCrCrUrGrG
SEQ ID NO: 13	CUR-2047 (Antisentido)	rUrGrArGrCrCrUrArArGrArUrArCrArUrUrGrCrUrCrU
SEQ ID NO: 14	CUR-2048 (Antisentido)	rGrUrGrCrUrGrUrUrGrUrArArGrArUrUrArGrCrCrArC
SEQ ID NO: 15	CUR-2049 (Antisentido)	rArArUrGrArCrArUrGrUrUrUrGrUrArGrGrGrArGrCrC
SEQ ID NO: 16	CUR-2050	+C*mC*mA*+G*mG*mU*+G*mU*mG*mC*+G*mG*mA*+C
SEQ ID NO:	CUR-2051	

ES 2 694 592 T3

17		+C*mC*mA*+U*mG*mG*+G*mA*mC*mU*+C*mU*mG* *+G
SEQ ID NO: 18	CUR-2052	+A*mG*mA*+G*mC*mG*+U*mG*mA*mA*+U*mG*mG* *+G
SEQ ID NO: 19	CUR-2053	+C*mC*mC*+A*mA*mG*+G*mC*mA*mG*+G*mU*mU* *+C
SEQ ID NO: 20	CUR-2054	+A*mA*mG*+A*mU*mG*+C*mU*mU*mG*+A*mC*mA* *+U
SEQ ID NO: 21	CUR-2055	+C*mA*mU*+U*mG*mG*+C*mU*mG*mA*+C*mA*mC* *+U
SEQ ID NO: 22	CUR-2056	+U*mU*mC*+G*mA*mA*+C*mA*mC*mG*+U*mG*mA* *+U
SEQ ID NO: 23	CUR-2057	+A*mG*mA*+A*mG*mA*+G*mC*mU*mG*+U*mU*mG* *+G
SEQ ID NO: 24	CUR-2058	+A*mU*mG*+A*mG*mG*+A*mC*mC*mA*+G*mA*mA* *+A
SEQ ID NO: 25	CUR-2059	+G*mU*mU*+C*mG*mG*+C*mC*mC*mA*+A*mU*mG* *+A
SEQ ID NO: 26	CUR-2060	+A*mG*mA*+A*mA*mA*+C*mA*mA*mU*+A*mA*mG* *+G
SEQ ID NO: 27	CUR-2061	+A*mC*mG*+C*mA*mG*+A*mC*mU*mU*+G*mU*mA* *+C
SEQ ID NO: 28	CUR-2062	+A*mC*mG*+U*mC*mC*+A*mG*mG*mG*+U*mG*mA* *+U
SEQ ID NO: 29	CUR-2063	+G*mC*mU*+C*mA*mG*+U*mA*mG*mU*+C*mA*mA* *+G
SEQ ID NO: 30	CUR-2064	+U*mG*mC*+C*mU*mU*+U*mG*mG*mA*+G*mC*mC* *+U
SEQ ID NO: 31	CUR-2065	+C*mC*mU*+C*mU*mU*+C*mU*mC*mU*+U*mU*mC* *+U
SEQ ID NO: 32	CUR-2066	+C*+C*+C*G*G*T*A*T*C*C*A*A*A*+G*+G*+C
SEQ ID NO: 33	CUR-2067	+G*+T*+A*T*A*G*C*G*A*G*T*G*+G*+G*+T
SEQ ID NO: 34	CUR-2068	+G*+T*+C*T*A*T*G*A*G*G*G*T*T*+C*+G*+G
SEQ ID NO: 35	CUR-2069	+C*+C*+T*C*C*T*C*T*A*C*T*C*T*+T*+T*+C

SEQ ID NO: 36	CUR-2070	+G*+G*+C*A*G*G*T*T*C*G*A*G*A*+G*+G*+T
SEQ ID NO: 37	CUR-2071	+T*+T*+C*C*T*T*C*C*C*A*C*A*G*+T*+T*+C
SEQ ID NO: 38	CUR-2072	+C*+G*+G*T*T*G*C*A*T*G*A*A*G*+G*+C*+G
SEQ ID NO: 39	CUR-2073	+T*+G*+G*C*T*G*G*C*G*A*T*T*C*+A*+T*+A
SEQ ID NO: 40	CUR-2074	+C*+A*+A*C*A*T*A*T*C*A*G*G*A*+G*+C*+C
SEQ ID NO: 41	CUR-2075	+T*+G*+T*A*T*T*C*C*C*A*G*A*A*+C*+T*+T
SEQ ID NO: 42	CUR-2076 (Antisentido)	rUrArUrGrGrUrUrArUrUrUrCrArUrArCrUrUrC rGrGrUrUrGrCrArUrG
SEQ ID NO: 43	CUR-2077 (Antisentido)	rArGrArArGrUrArArArCrGrUrCrCrArCrGrGrA rCrArArGrGrCrArArC
SEQ ID NO: 44	CUR-2078 (Antisentido)	rArUrUrUrCrUrArCrGrArGrArCrCrArArGrUrG rUrArArUrCrCrCrArU
SEQ ID NO: 45	CUR-2079 (Antisentido)	rUrArArGrGrArCrGrCrGrGrArCrUrUrGrUrArC rArCrUrUrCrCrGrGrG
SEQ ID NO: 46	CUR-2080 (Antisentido)	rArGrArArArGrArArArGrUrUrCrUrArArCrCrU rGrUrUrCrUrGrUrGrU
SEQ ID NO: 47	CUR-2081	+G*+A*+T*T*T*C*A*G*A*G*C*C*G*+C*+A*+G
SEQ ID NO: 48	CUR-2082	+G*+A*+C*A*C*A*T*T*C*A*T*T*C*+C*+A*+G
SEQ ID NO: 49	CUR-2083	+C*+C*+T*C*G*T*T*C*A*T*G*T*T*+G*+T*+G
SEQ ID NO: 50	CUR-0071	C*+T*+T*G*A*A*T*T*G*T*T*+G*+T*+A
SEQ ID NO: 51	CUR-0072	A*+G*+T*T*G*C*A*A*G*A*G*T*+T*+G*+G
SEQ ID NO: 52	CUR-0073	A*+T*+C*T*G*T*T*C*T*G*C*T*+G*+T*+C
SEQ ID NO: 53	CUR-0074	C*+A*+T*A*T*T*C*T*T*G*G*A*+C*+G*+A
SEQ ID NO: 54	CUR-0075	T*+G*+T*G*C*T*G*T*T*G*T*A*+A*+G*+A
SEQ ID NO: 55	CUR-0076	T*+G*+A*C*A*G*A*G*G*A*G*T*+A*+T*+T

La modulación de un ácido nucleico diana deseado puede llevarse a cabo de varias formas conocidas en la materia. Por ejemplo, oligonucleótidos antisentido, siARN, etc. Las moléculas de ácidos nucleicos enzimáticos (p. ej., ribozimas) son moléculas de ácidos nucleicos capaces de catalizar una o más de diversas reacciones, incluyendo la capacidad de escindir repetidamente otras moléculas de ácidos nucleicos separadas de manera específica de secuencia de bases de nucleótidos. Tales moléculas de ácidos nucleicos enzimáticos pueden usarse, por ejemplo, para orientarse prácticamente a cualquier transcrito 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 enfermedades humanas. 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 al ARNm en no funcional y anula la expresión de proteínas de ese ARN. De esta manera, 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 ocurre a través de la parte de unión a diana de un ácido nucleico enzimático, que se mantiene en estrecha proximidad con una parte enzimática de la molécula que actúa para escindir el ARN diana. Por tanto, el
- 5 ácido nucleico enzimático se reconoce primero y a continuación se une a un ARN diana mediante apareamiento de bases complementarias, y una vez se une al sitio correcto, actúa enzimáticamente para cortar el ARN diana. La escisión estratégica de tal ARN diana 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.
- 10 Se han usado varios enfoques tales como estrategias de selección *in vitro* (evolución) (Orgel, (1979) Proc. R. Soc. London, B 205, 435) para desarrollar nuevos catalizadores de ácido nucleico capaces de catalizar diversas reacciones, tales como escisión y ligamiento de grupos de enlace fosfodiéster y grupos de enlace amida.
- 15 El desarrollo de ribozimas que sean óptimas para la actividad catalítica contribuiría significativamente a cualquier estrategia que empleara ribozimas que escinden ARN con el fin de regular la expresión génica. La ribozima de cabeza de martillo, por ejemplo, funciona con una velocidad catalítica (k_{cat}) de aproximadamente 1 min⁻¹ en presencia de concentraciones saturantes (10 mM) de cofactor Mg²⁺. Se ha mostrado que una ribozima de «ligasa de ARN» artificial cataliza la reacción de automodificación correspondiente con una velocidad de aproximadamente
- 20 100 min⁻¹. Además, se sabe que ciertas ribozimas de cabeza de martillo modificadas que tienen brazos de unión al sustrato compuestos de ADN catalizan la escisión de ARN con múltiples velocidades de recambio que se aproximan a 100 min⁻¹. Finalmente, el reemplazo de un residuo específico dentro del núcleo catalítico de la cabeza de martillo por ciertos análogos de nucleótido da ribozimas modificadas que muestran una mejora de hasta 10 veces en la velocidad catalítica. Estos descubrimientos demuestran que las ribozimas pueden promover transformaciones
- 25 químicas con velocidades catalíticas que son significativamente superiores a aquellas exhibidas *in vitro* por la mayoría de las ribozimas naturales que se autoescinden. Es entonces posible que las estructuras de ciertas ribozimas que se autoescinden puedan optimizarse para dar la máxima actividad catalítica, o que puedan prepararse motivos de ARN completamente nuevos que exhiben velocidades significativamente más rápidas para la escisión de fosfodiéster de ARN.
- 30 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 (Uhlenbeck, O. C. (1987) Nature, 328: 596-600). Se recuperó el catalizador de ARN y se hizo reaccionar con múltiples moléculas de ARN, demostrando que era verdaderamente catalítico.
- 35 Se han usado ARN catalíticos diseñados basándose en el motivo de «cabeza de martillo» para escindir secuencias diana específicas haciendo cambios de base apropiados en el ARN catalítico para mantener el apareamiento de bases necesario con las secuencias diana. Esto ha permitido el uso del ARN catalítico para escindir secuencias diana específicas e indica que los ARN catalíticos diseñados de acuerdo con el modelo de «cabeza de martillo»
- 40 pueden escindir posiblemente ARN de sustrato específicos *in vivo*.
- La interferencia de ARN (ARNi) se ha convertido en una poderosa herramienta para modular la expresión génica en mamíferos y células de mamífero. Este enfoque requiere el suministro de ARN interferente pequeño (siARN) bien como el propio ARN o bien como ADN, usando un plásmido de expresión o virus y la secuencia codificante para
- 45 ARN de horquilla pequeños que se procesan hasta siARN. Este sistema permite el transporte eficiente de los pre-siARN al citoplasma, donde son activos y permiten el uso de promotores regulados y específicos de tejido para la expresión génica.
- En un aspecto, un oligonucleótido o compuesto antisentido comprende un oligómero o polímero de ácido
- 50 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 grupos de enlace internucleosídicos covalentes (esqueleto), así como oligonucleótidos que tienen partes de origen no natural que funcionan de forma similar. Tales oligonucleótidos modificados o sustituidos son frecuentemente deseados con respecto a formas nativas debido a propiedades deseables tales como, por ejemplo, captación celular potenciada,
- 55 afinidad potenciada por un ácido nucleico diana y estabilidad elevada en presencia de nucleasas.
- De acuerdo con la presente descripción, 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 siARN, compuestos de interferencia (ARNi) de
- 60 ARN mono- o bicatenario tales como compuestos de siARN, saARN, ARNa, y otros compuestos oligoméricos que

hibridan con al menos una parte 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 de forma rutinaria linealmente, pero pueden unirse o prepararse de otro modo para ser circulares y/o ramificados. Los compuestos antisentido pueden incluir constructos tales como, por ejemplo, dos hebras hibridadas para formar un compuesto completa o parcialmente bicatenario o una única hebra con autocomplementariedad suficiente para permitir la hibridación y formación de un compuesto completa o parcialmente bicatenario. Las dos hebras pueden ligarse internamente, dejando los extremos 3' o 5' libres, o pueden ligarse 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', produciendo una extensión del carácter monocatenario. Los compuestos bicatenarios opcionalmente pueden incluir nucleótidos protuberantes en los extremos. Modificaciones adicionales pueden incluir grupos conjugados enlazados con uno de los extremos, posiciones de nucleótido seleccionadas, posiciones de azúcar o uno de los grupos de enlace internucleosídicos. Como alternativa, las dos hebras pueden ligarse mediante un resto no de ácido nucleico o grupo ligador. Cuando se forma a partir de solo una hebra, el dsARN puede tomar la forma de una molécula tipo horquilla autocomplementaria que se dobla sobre sí misma formando un dúplex. Por tanto, el dsARN puede ser completa o parcialmente bicatenario. Puede lograrse la 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 autocomplementaria 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 introducidos en un sistema, los compuestos de la descripción 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 funcionar mediante mecanismos basados en la ocupación. En general, los ácidos nucleicos (incluyendo oligonucleótidos) pueden describirse como «similares a ADN» (es decir, que generalmente tienen uno o más 2'-desoxiazúcares y, generalmente, bases T en vez de U) o «similares a ARN» (es decir, que generalmente tienen uno o más 2'-hidroxilazúcares o azúcares modificados en 2' y, generalmente bases U en vez de T). Las hélices de ácido nucleico pueden adoptar más de un tipo de estructura, más comúnmente las formas A y B. Se cree que, en general, los oligonucleótidos que tienen estructura similar a la forma B son «similares a ADN» y aquellos que tienen estructura similar a la forma A son «similares a ARN». En algunos aspectos (químicos), un compuesto antisentido puede contener tanto regiones en forma A como B.

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

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

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

En un aspecto, los compuestos oligoméricos de la presente descripción también incluyen variantes donde 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 esta posición. Esto puede hacerse en cualquiera de las posiciones de los compuestos antisentido o de dsARN. Estos

compuestos se ensayan entonces usando los procedimientos descritos en la presente memoria para determinar su capacidad de inhibir la expresión de un ácido nucleico diana.

En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencia o complementariedad, entre el compuesto antisentido y la 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 secuencia 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 un aspecto, los oligonucleótidos antisentido, tales como por ejemplo, las moléculas de ácidos nucleicos expuestas en las SEQ ID NO: 12 a 49, comprenden una o más sustituciones o modificaciones. En un aspecto, los nucleótidos están sustituidos por ácidos nucleicos bloqueados (ANB).

En un aspecto, los oligonucleótidos se orientan a una o más regiones de las moléculas de ácidos nucleicos con sentido y/o antisentido de secuencias codificantes y/o no codificantes asociadas a BDNF y las secuencias expuestas como SEQ ID NO: 1 a 11. Los oligonucleótidos también se orientan a regiones solapantes de las SEQ ID NO: 1 a 11.

Ciertos oligonucleótidos preferidos de esta descripción son oligonucleótidos quiméricos. «Oligonucleótidos quiméricos» o «quimeras», en el contexto de esta descripción, son oligonucleótidos que contienen dos o más regiones químicamente distintas, cada una constituida por al menos un nucleótido. Estos oligonucleótidos contienen típicamente al menos una región de nucleótidos modificados que confiere una o más propiedades beneficiosas (tales como, por ejemplo, resistencia a nucleasas aumentada, captación en células aumentada, afinidad de unión por la diana aumentada) y una región que es un sustrato para enzimas capaces de escindir híbridos de ARN:ADN o ARN:ARN. A modo de ejemplo, la ARNasa H es una endonucleasa celular que escinde la hebra de ARN de un dúplex de ARN:ADN. La activación de ARNasa H, por lo tanto, da como resultado la escisión de la diana de ARN, potenciando así enormemente 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 desoxi oligonucleótidos 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 materia. 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 ARNasa 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.

Se pueden formar compuestos antisentido quiméricos de la descripción como estructuras compuestas de dos o más oligonucleótidos, oligonucleótidos modificados, oligonucleósidos y/o miméticos de oligonucleótidos, como se ha descrito anteriormente. Se ha hecho referencia a tales compuestos también en la materia como híbridos o gámperos. Las patentes representativas de los Estados Unidos que enseñan la preparación de tales estructuras híbridas comprenden, pero sin limitación, las patentes de EE. UU. 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 un aspecto, la región del oligonucleótido que se modifica comprende al menos un nucleótido modificado en la posición 2' del azúcar, lo más preferentemente un nucleótido modificado con 2'-O-alquilo, 2'-O-alquil-O-alquilo o 2'-flúor. En otro aspecto, 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'-desoxi oligonucleótidos frente a una diana dada. El efecto de tal afinidad aumentada es potenciar enormemente la inhibición por oligonucleótidos de ARNi de la expresión génica. La ARNasa H es una endonucleasa celular que escinde la hebra de ARN de los dúplex de ARN:ADN: por lo tanto, la activación de esta enzima da como resultado la escisión del ARN diana, y por tanto puede potenciar enormemente la eficiencia de inhibición de ARNi. La escisión del ARN diana puede demostrarse rutinariamente por electroforesis en gel. En un aspecto, el oligonucleótido quimérico también se modifica para potenciar la resistencia a nucleasas. Las células contienen diversas exo- y endonucleasas que pueden degradar ácidos nucleicos. Se ha mostrado que una

serie de modificaciones de nucleótidos y nucleósidos hacen que el oligonucleótido donde 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 diversas modificaciones de oligonucleótidos potencian o confieren resistencia a nucleasas. Los oligonucleótidos que contienen al menos una modificación de fosforotioato son actualmente más preferidos. En algunos casos, las modificaciones de oligonucleótidos que potencian la afinidad de unión a diana son, también, independientemente, capaces de potenciar la resistencia a nucleasas.

Los ejemplos específicos de algunos oligonucleótidos preferidos concebidos para esta descripción incluyen aquellos que comprenden esqueletos modificados, por ejemplo, fosforotioatos, fosfotriésteres, metilfosfonatos, grupos de enlace entre azúcares de alquilo o cicloalquilo de cadena corta o grupos de enlace entre azúcares heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta. Los más preferidos son oligonucleótidos con esqueletos de fosforotioato y aquellos con esqueletos heteroatómicos, particularmente esqueletos de CH₂-NH-O-CH₂, CH, -N(CH₃)-O-CH₂ [conocido como esqueleto de metileno(metilimino) o mMI], CH₂-O-N(CH₃)-CH₂, CH₂-N(CH₃)-N(CH₃)-CH₂ y O-N(CH₃)-CH₂-CH₂, donde el esqueleto de fosfodiéster nativo se representa como O-P-O-CH). Los esqueletos de amida divulgados por De Mesmaeker y col., (1995) Acc. Chem. Res. 28: 366-374 también son preferidos. También son preferidos oligonucleótidos que tienen esqueletos de morfolino (Summerton y Weller, pat. de EE. UU. n.º 5.034.506). En otro aspecto, tal como el esqueleto de ácido peptidonucleico (APN), el esqueleto de fosfodiéster del oligonucleótido se reemplaza por un esqueleto de poliamida, estando los nucleótidos unidos directa o indirectamente a los átomos de nitrógeno azoicos del esqueleto de poliamida. Los oligonucleótidos también pueden comprender uno o más restos de azúcar sustituidos. Los oligonucleótidos preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': OH, SH, SCH₃, F, OCN, OCH₃, O(CH₂)_nCH₃, O(CH₂)_nNH₂ u O(CH₂)_nCH₃, donde n es de 1 a aproximadamente 10; alquilo inferior C1 a C10, alcoxilalcoxi, alquilo, alcarilo o aralquilo inferior sustituido; Cl; Br; CN; CF₃; OCF₃; O-, S-, o N-alquilo; O-, S-, o N-alquenoilo; SOCH₃; SO₂CH₃; ONO₂; NO₂; N₃; NH₂; heterocicloalquilo; heterocicloalcarilo; aminoalquilamino; polialquilamino; sililo sustituido; un grupo de escisión de ARN; un grupo reportero; un intercalante; 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-CH₂CH₂OCH₃, también conocido como 2'-O-(2-metoxietilo)]. Otras modificaciones preferidas incluyen 2'-metoxi (2'-O-CH₃), 2'-propoxi (2'-OCH₂CH₂CH₃) y 2'-flúor (2'-F). También pueden hacerse modificaciones similares en otras posiciones sobre el oligonucleótido, particularmente la posición 3' del azúcar en el nucleótido del extremo 3' y la posición 5' del nucleótido del extremo 5'. Los oligonucleótidos también pueden tener miméticos de azúcar tales como ciclobutilos en lugar del grupo pentofuranosilo.

Los oligonucleótidos también pueden incluir, adicionalmente o como alternativa, modificaciones o sustituciones de nucleobase (a la que se hace referencia frecuentemente en la materia simplemente como «base»). Como se usa en la presente memoria, los nucleótidos «no modificados» o «naturales» incluyen adenina (A), guanina (G), timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Los nucleótidos modificados incluyen nucleótidos encontrados solo poco frecuentemente o transitoriamente en ácidos nucleicos naturales, p. ej., hipoxantina, 6-metiladenina, 5-Me-pirimidinas, particularmente 5-metilcitosina (a la que también se hace referencia como 5-metil-2'-desoxicitosina y a la que frecuentemente se hace referencia en la materia como 5-Me-C), 5-hidroximetilcitosina (HMC), glicosil-HMC y gentobiosil-HMC, así como nucleótidos sintéticos, p. ej., 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-aminohexil)adenina y 2,6-diaminopurina. Puede incluirse una base «universal» conocida en la materia, p. ej., inosina. Se ha mostrado que las sustituciones 5-Me-C aumentan la estabilidad de los dúplex de ácidos nucleicos en 0,6-1,2 °C, y actualmente son las sustituciones de base preferidas.

Otra modificación de los oligonucleótidos de la descripción implica ligar 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 lipídicos tales como restos de colesterol, un resto de colesterilo, una cadena alifática, p. ej. residuos de dodecanodiol o undecilo, una poliamina o una cadena de polietilenglicol, o ácido adamantanoacético. Los oligonucleótidos que comprenden restos lipófilos, y procedimientos para preparar dichos oligonucleótidos, son conocidos en la materia, por ejemplo, en las pat. de EE. UU. n.º 5.138.045, 5.218.105 y 5.459.255.

No es necesario que todas las posiciones en un oligonucleótido dado estén uniformemente modificadas, y, de hecho, más de una de las modificaciones mencionadas anteriormente puede incorporarse en un único

oligonucleótido o incluso dentro de un único nucleósido dentro de un oligonucleótido. La presente descripción también incluye oligonucleótidos que son oligonucleótidos quiméricos, tal como se ha definido anteriormente en la presente memoria.

5 En otro aspecto, la molécula de ácido nucleico de la presente descripción 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 materia reconocerán que estas moléculas pueden ligarse con 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.

10

Los oligonucleótidos usados de acuerdo con esta descripción pueden prepararse conveniente y rutinariamente mediante la técnica muy conocida de síntesis en fase sólida. Los equipos para dicha síntesis son comercializados 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 materia. También es muy conocido usar técnicas similares para preparar otros oligonucleótidos tales como fosforotioatos y derivados alquilados. También es muy conocido usar técnicas similares y amiditas modificadas disponibles comercialmente y productos de vidrio de poro controlado (CPG) tales como biotina, fluoresceína, acridina o amiditas modificadas con psoraleno y/o CPG (disponible en Glen Research, Sterling VA) para sintetizar oligonucleótidos marcados de forma fluorescente, biotinilados u otros oligonucleótidos modificados tales como

20

De acuerdo con la descripción, el uso de modificaciones tales como el uso de monómeros de ANB 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

25

monómeros en los oligonucleótidos actuales por monómeros de ANB. El oligonucleótido modificado con ANB puede tener un tamaño similar al compuesto parental o puede ser más grande o preferentemente más pequeño. Se prefiere que tales oligonucleótidos modificados con ANB contengan menos de aproximadamente el 70 %, más preferentemente menos de aproximadamente el 60 %, lo más preferentemente menos de aproximadamente el 50 % de monómeros de ANB y que sus tamaños estén entre aproximadamente 5 y 25 nucleótidos, más preferentemente

30

Los esqueletos de oligonucleótidos modificados preferidos comprenden, aunque sin limitación, fosforotioatos, fosforotioatos quirales, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, metilfosfonatos y otros alquilfosfonatos que comprenden 3'-alquilenfosfonatos y fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidatos que

35

comprenden 3'-aminofosforamidato y aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionoalquilfosfonatos, tionoalquilfosfotriésteres y boranofosfonatos que tienen grupos de enlace 3'-5' normales, análogos ligados en 2'-5' de estos, y aquellos que tienen polaridad invertida, donde los pares adyacentes de unidades de nucleósidos están ligados 3'-5' a 5'-3' o 2'-5' a 5'-2'. También se incluyen diversas sales, sales mixtas y formas de ácido libre.

40

Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de los grupos de enlace anteriores que contienen fósforo 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.

45

Los esqueletos de oligonucleótidos modificados preferidos que no incluyen un átomo de fósforo en los mismos tienen esqueletos que están formados por grupos de enlace internucleosídicos de alquilo o cicloalquilo de cadena corta, grupos de enlace internucleosídicos heteroatómicos y de alquilo o cicloalquilo mixtos, o uno o más grupos de enlace internucleosídicos heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta. Estos comprenden aquellos que tienen

50

grupos de enlace morfolino (formados en parte a partir de la parte de azúcar de un nucleósido); esqueletos de siloxano; esqueletos de sulfuro, sulfóxido y sulfona; esqueletos de formacetilo y tioformacetilo; esqueletos de metilformacetilo y tioformacetilo; esqueletos que contienen alqueno; esqueletos de sulfamato; esqueletos de metilnimino y metilhidrazino; esqueletos de sulfonato y sulfonamida; esqueletos de amida; y otros que tienen partes de componentes de N, O, S y CH₂ mixtos.

55

Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de los oligonucleósidos anteriores comprenden, pero sin limitación, las patentes de EE. UU. 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.

60

En otros miméticos de oligonucleótidos preferidos, tanto el azúcar como el grupo de enlace internucleosídico, es decir, el esqueleto, de las unidades de nucleótido se reemplazan por grupos novedosos. Las unidades de base se mantienen para la hibridación con un compuesto de ácido nucleico diana apropiado. Se hace referencia a uno de tales compuestos oligoméricos, un mimético de oligonucleótido que se ha mostrado que tiene excelentes propiedades de hibridación, como ácido peptidonucleico (APN). En compuestos de APN, el esqueleto de azúcar de un oligonucleótido se reemplaza por un esqueleto que contiene amida, en particular un esqueleto de aminoetilglicina. Las nucleobases son retenidas y se unen directamente o indirectamente a átomos de nitrógeno azoicos de la parte de amida del esqueleto. Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de compuestos de APN comprenden, pero sin limitación, las patentes de los EE. UU. n.º 5.539.082; 5.714.331; y 5.719.262. Pueden encontrarse enseñanzas adicionales de compuestos de APN en Nielsen, y col. (1991) Science 254, 1497-1500.

En un aspecto de la descripción, los oligonucleótidos con esqueletos de fosforotioato y oligonucleósidos con esqueletos de heteroátomo, y en particular $-\text{CH}_2\text{-NH-O-CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{-N(CH}_3\text{)-O-CH}_2-$, conocidos como un esqueleto de metileno (metilimino) o esqueleto de mMl, $-\text{CH}_2\text{-O-N(CH}_3\text{)-CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{N(CH}_3\text{)-N(CH}_3\text{)CH}_2-$ y $-\text{O-N(CH}_3\text{)-CH}_2\text{-CH}_2-$, donde el esqueleto de fosfodiéster nativo se representa como $-\text{O-P-O-CH}_2-$ de la patente de EE. UU. n.º 5.489.677, citada anteriormente, y los esqueletos de amida de la patente de EE. UU. n.º 5.602.240, citada anteriormente. También se prefieren oligonucleótidos que tienen estructuras de esqueletos de morfolino de la patente de EE. UU. n.º 5.034.506, citada anteriormente.

Los oligonucleótidos modificados también pueden contener uno o más restos de azúcar sustituidos. Los oligonucleótidos preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': OH; F; O-, S- o N-alquilo; O-, S-, o N-alqueno; O-, S- o N-alquinilo; o O-alquil-O-alquilo, donde alquilo, alqueno y alquinilo pueden ser alquilo C a CO sustituido o sin sustituir o alqueno y alquinilo C_{2a} a C_{10} . Se prefieren particularmente $\text{O(CH}_2\text{)}_n\text{O}^m\text{CH}_3$, $\text{O(CH}_2\text{)}_n$, OCH_3 , $\text{O(CH}_2\text{)}_n\text{NH}_2$, $\text{O(CH}_2\text{)}_n\text{CH}_3$, $\text{O(CH}_2\text{)}_n\text{ONH}_2$ y $\text{O(CH}_2\text{)}_n\text{ON(CH}_3\text{)}_2$, donde n y m pueden ser de 1 a aproximadamente 10. Otros oligonucleótidos preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': C a CO, (alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, alcarilo, aralquilo, O-alcarilo o O-aralquilo, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, polialquilamino, sililo sustituido, un grupo de escisión de ARN, un grupo reportero, un intercalante, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido, o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un oligonucleótido, y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. Una modificación preferida comprende 2'-metoxietoxi (2'-O-CH₂CH₂OCH₃, también conocido como 2'-O-(2-metoxietilo) o 2'-MOE), es decir, un grupo alcoxialcoxi. Otra modificación preferida comprende 2'-dimetilaminoxietoxi, es decir, un grupo $\text{O(CH}_2\text{)}_2\text{ON(CH}_3\text{)}_2$, también conocido como 2'-DMAOE, como se describe en los ejemplos en la presente memoria más adelante, y 2'-dimetilaminoetoxietoxi (también conocido en la materia como 2'-O-dimetilaminoetoxietilo o 2'-DMAEOE), es decir, 2'-O-CH₂-O-CH₂-N(CH₂)₂.

Otras modificaciones preferidas comprenden 2'-metoxi (2'-OCH₃), 2'-aminopropoxi (2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂) y 2'-fluoro (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 ligados 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 azúcar pentofuranosilo. Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de tales estructuras de azúcar modificadas comprenden, pero sin limitación, las patentes de EE. UU. 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 nucleobase (a la que se hace referencia frecuentemente en la materia simplemente como «base»). Como se usa en la presente memoria, los nucleótidos «no modificados» o «naturales» comprenden las bases de purina adenina (A) y guanina (G), y las bases de pirimidina timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Los nucleótidos modificados comprenden otros nucleótidos sintéticos y naturales tales como 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetilcitosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, derivados de 6-metilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, derivados de 2-propilo y otros derivados 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 (pseudouracilo), 4-tiouracilo, adeninas y guaninas sustituidas con 8-halógeno, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo y otras sustituidas en 8, 5-halógeno, 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.

60

Además, los nucleótidos comprenden aquellos divulgados en la patente de Estados Unidos n.º 3.687.808, aquellos divulgados en "The Concise Encyclopedia of Polymer Science And Engineering", páginas 858-859, Kroschwitz, J.I., ed. John Wiley & Sons, 1990, aquellos divulgados por Englisch y col., «Angewandte Chemie, International Edition», 1991, 30, página 613, y aquellos divulgados por Sanghvi, Y.S., Capítulo 15, «Antisense Research and Applications», páginas 289-302, Croke, S.T. y Lebleu, B. ea., CRC Press, 1993. Algunos de estos nucleótidos son particularmente útiles para aumentar la afinidad de unión de los compuestos oligoméricos de la descripción. 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-metilcitosina aumentan la estabilidad del dúplex de ácido nucleico en 0,6-1,2 °C (Sanghvi, Y. S., en Croke, S. T. y Lebleu, B., eds., Antisense Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, páginas 276-278) y actualmente son las sustituciones de base preferidas, aún más particularmente cuando se combinan con modificaciones de azúcar de 2'-O-metoxietilo.

Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de los nucleótidos modificados citados anteriormente, así como otros nucleótidos modificados, comprenden, pero sin limitación, las patentes de los EE. UU. 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 descripción implica ligar 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 de colesterol, ácido cólico, un tioéter, p. ej., hexil-5-tritilol, un tiocolesterol, una cadena alifática, p. ej., residuos de dodecanodiol o undecilo, un fosfolípido, p. ej., dihexadecil-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 de palmitilo, o un resto de octadecilamina o hexilaminocarboniloxicolesterol.

Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de estos conjugados de 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 descripción también pueden aplicarse en las áreas del descubrimiento de fármacos y validación de dianas. La presente descripción comprende el uso de los compuestos y segmentos diana preferidos e identificados en la presente memoria en un esfuerzo por descubrir fármacos para esclarecer las relaciones que existen entre polinucleótidos del factor neurotrófico derivado del cerebro (GDNF) y una patología, fenotipo o afección. Estos procedimientos incluyen detectar o modular los polinucleótidos de BDNF, que comprenden poner en contacto una muestra, tejido, célula u organismo con los compuestos de la presente descripción, medir el nivel de ácido nucleico o de proteína de los polinucleótidos de BDNF y/o un criterio de valoración fenotípico o químico relacionado en algún momento después del tratamiento, y opcionalmente comparar el valor medido con una muestra no tratada o muestra tratada con otro compuesto de la descripción. Estos procedimientos 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.

50 **Valoración de la regulación positiva o inhibición de la expresión génica:**

La transferencia de un ácido nucleico exógeno a una célula u organismo hospedador puede valorarse detectando directamente la presencia del ácido nucleico en la célula u organismo. Tal detección puede lograrse mediante varios procedimientos bien conocidos en la materia. 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 procedimientos 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).

60

La expresión de ARN del ácido nucleico exógeno también puede detectarse midiendo una actividad enzimática o una actividad de proteína reportera. Por ejemplo, puede medirse la actividad moduladora antisentido indirectamente como una disminución o aumento en la expresión de ácido nucleico diana, como una indicación de que el ácido nucleico exógeno está produciendo el ARN efector. Basándose en 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 reportera y su señal de poli(A). Estos plásmidos producirían un ARNm con un gen reportero en la parte en dirección 5' del gen y una diana de ARNi potencial en la región no codificante 3'. La efectividad de oligonucleótidos antisentido individuales se ensayaría por la modulación del gen reportero. Los genes reporteros útiles en los procedimientos de la presente descripción 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 procedimientos de determinación de la modulación de un gen reportero son muy conocidos en la materia e incluyen, pero sin limitación, procedimientos fluorimétricos [p. ej., espectroscopia de fluorescencia, clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), microscopía de fluorescencia] y determinación de la resistencia a antibióticos.

La expresión de la proteína BDNF y su ARNm puede ensayarse usando procedimientos conocidos por los expertos en la materia y descritos en otro lugar de la presente memoria. Por ejemplo, pueden usarse inmunoensayos como ELISA para medir los niveles de proteína. Los kits de ensayo ELISA para BDNF están disponibles comercialmente, p. ej., en R&D Systems (Minneapolis, MN).

En unos aspectos, la expresión de BDNF (p. ej. ARNm o proteína) en una muestra (p. ej. células o tejidos *in vivo* o *in vitro*) tratada con un oligonucleótido antisentido de la descripción se evalúa por comparación con la expresión de BDNF en una muestra de control. Por ejemplo, la expresión de la proteína o del ácido nucleico puede compararse usando procedimientos conocidos por los expertos en la materia con una muestra tratada ficticiamente o sin tratar. De forma alternativa, puede hacerse una comparación con una muestra tratada con un oligonucleótido antisentido de control (p. ej., uno que tenga una secuencia alterada o diferente) dependiendo de la información deseada. En otro aspecto, una diferencia en la expresión de la proteína BDNF o su ácido nucleico 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 que el investigador considere apropiado, p. ej. un gen constitutivo) en una muestra tratada frente a una muestra sin tratar.

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

Kits, reactivos de investigación, de diagnóstico y terapéuticos

Los compuestos de la presente descripción pueden utilizarse para diagnóstico, terapia y profilaxis, y como reactivos de investigación y componentes de kits. Además, los oligonucleótidos antisentido, que son capaces de inhibir la expresión génica con exquisita especificidad, son usados frecuentemente por los expertos en la materia para dilucidar la función de genes particulares o para distinguir entre funciones de diversos miembros de una ruta biológica.

Para su uso en kits y diagnósticos y en diversos sistemas biológicos, los compuestos de la presente descripción, tanto solos como en combinación con otros compuestos o productos terapéuticos, son útiles como herramientas en análisis diferenciales y/o combinatorios para dilucidar patrones de expresión de una parte o de todo el complemento de genes expresados dentro de células y tejidos.

Como se usa en la presente memoria, 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 factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF). Estos incluyen, pero sin limitación, seres humanos, animales transgénicos, células, cultivos celulares, tejidos, xenoinjertos, trasplantes y combinaciones de los mismos.

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

Los ejemplos de procedimientos de análisis de expresión génica conocidos en la materia incluyen matrices o micromatrices de ADN, técnicas SAGE (análisis en serie de expresión génica), READS (amplificación de ADN digerido con enzimas de restricción), TOGA (análisis de expresión génica total), matrices de proteínas y proteómica, secuenciación de marcaje de secuencia expresada (EST), huella genética de ARN sustractivo (SuRF), clonación sustractiva, exhibición diferencial (DD), hibridación genómica comparativa, FISH (hibridación fluorescente *in situ*) y procedimientos de espectrometría de masas.

Los compuestos de la descripción son útiles para investigación y diagnóstico, debido a que estos compuestos hibridan con ácidos nucleicos que codifican el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF). Por ejemplo, los oligonucleótidos que hibridan con tal eficiencia y en tales condiciones como se han divulgado en la presente memoria como moduladores efectivos de BDNF son cebadores o sondas efectivos en condiciones que favorecen la amplificación o detección génica, respectivamente. Estos cebadores y sondas son útiles en procedimientos que requieren la detección específica de moléculas de ácidos nucleicos que codifican BDNF y en la amplificación de dichas moléculas de ácidos nucleicos para la detección o para su uso en estudios adicionales de BDNF. La hibridación de los oligonucleótidos antisentido, particularmente los cebadores y sondas de la descripción, con un ácido nucleico que codifica BDNF puede detectarse por medios conocidos en la materia. Tales medios pueden incluir conjugación de una enzima con el oligonucleótido, radiomarcaje del oligonucleótido, o cualquier otro medio de detección adecuado. También pueden prepararse kits que usan tales medios de detección para detectar el nivel de BDNF en una muestra.

La especificidad y sensibilidad de los antisentido también son aprovechadas por los expertos en la materia para usos terapéuticos. Se han empleado compuestos 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 efectivamente a seres humanos y numerosos ensayos clínicos están actualmente en marcha. Está por tanto establecido que los compuestos antisentido pueden ser modalidades terapéuticas útiles que pueden configurarse para ser útiles en regímenes de tratamiento para el tratamiento de células, tejidos y animales, especialmente seres humanos.

Para productos terapéuticos, se trata un animal, preferentemente un ser humano, que se sospecha o tiene una enfermedad o trastorno que puede tratarse modulando la expresión de BDNF, administrando compuestos antisentido de acuerdo con esta descripción. Por ejemplo, en un aspecto no limitante, los procedimientos comprenden la etapa de administrar al animal que necesita tratamiento una cantidad terapéuticamente efectiva del modulador de BDNF. Los moduladores de BDNF de la presente descripción modulan de manera efectiva la actividad de BDNF o modulan la expresión de la proteína BDNF. En un aspecto, la actividad o expresión del BDNF en un animal se inhibe aproximadamente el 10 % en comparación con un control. Preferentemente, la actividad o expresión del BDNF en un animal se inhibe aproximadamente el 30 %. Más preferentemente, la actividad o expresión del BDNF en un animal se inhibe el 50 % o más. Por tanto, los compuestos oligoméricos modulan la expresión de ARNm del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) al menos el 10 %, al menos el 50 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o el 100 % en comparación con un control.

En un aspecto, la actividad o expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en un animal aumenta aproximadamente el 10 % en comparación con un control. Preferentemente, la actividad o expresión de BDNF en un animal aumenta aproximadamente el 30 %. Más preferentemente, la actividad o expresión de BDNF en un animal aumenta el 50 % o más. Por tanto, los compuestos oligoméricos modulan la expresión de ARNm de BDNF al menos el 10 %, al menos el 50 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el

60 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o el 100 % en comparación con un control

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

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

Conjugados

15 Otra modificación de los oligonucleótidos de la descripción implica ligar 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 unidos de manera covalente a grupos funcionales, tales como grupos hidroxilo primarios o secundarios. Los grupos conjugados de la descripción incluyen intercalantes, moléculas reporteras, 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 tintes. Los grupos que potencian las propiedades farmacodinámicas, en el contexto de esta descripción, incluyen grupos que mejoran la captación, potencian la resistencia a la degradación y/o fortalecen la hibridación específica de secuencia con el ácido nucleico diana. Los grupos que potencian las propiedades farmacocinéticas, en el contexto de esta descripción, incluyen grupos que mejoran la captación, distribución, metabolismo o excreción de los compuestos de la presente descripción. Se divulgan grupos conjugados representativos en la solicitud de patente internacional n.º PCT/US92/09196, presentada el 23 de octubre de 1992, y en la patente de EE. UU. n.º 6.287.860. Los restos conjugados incluyen, pero sin limitación, restos de lípido tales como un resto colesterol, ácido cólico, un tioéter, p. ej., hexil-5-tritilol, un tiocolesterol, una cadena alifática, p. ej., residuos de dodecanodiol o undecilo, un fosfolípido, p. ej., dihexadecil-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 hexilaminocarboniloxicoesterol. Los oligonucleótidos de la descripción también pueden conjugarse con principios activos farmacológicos, 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, una sulfamida, un antidiabético, un antibacteriano o un antibiótico.

Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de tales conjugados de oligonucleótidos incluyen, pero sin limitación, las patentes de EE. UU. 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.

Formulaciones

50 Los compuestos de la descripción también pueden mezclarse, encapsularse, conjugarse o asociarse de otro modo a otras moléculas, estructuras de molécula o mezclas de compuestos, como, por ejemplo, liposomas, moléculas orientadas a receptor, formulaciones orales, rectales, tópicas u otras, para ayudar a la captación, distribución y/o absorción. Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de estas formulaciones de ayuda a la captación, distribución y/o absorción incluyen, pero sin limitación, las patentes de EE. UU. 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; 5.591.721; 4.426.330; 4.534.899; 5.013.556; 5.108.921; 5.227.170; 5.264.221; 5.356.633; 5.395.619; 5.416.016; 5.416.016; 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 la expresión y/o función de una diana, aspectos de la descripción se refieren a constructos de vector de expresión

para la expresión de oligonucleótidos antisentido que comprenden promotores, secuencias de genes promotores híbridos y que poseen una fuerte actividad promotora constitutiva, o una actividad promotora que puede inducirse en el caso deseado.

5 En un aspecto, la práctica de la descripción implica administrar al menos uno de los oligonucleótidos antisentido anteriores con un sistema de suministro de ácidos nucleicos adecuado. En un aspecto, ese sistema incluye un vector no vírico ligado operativamente con el polinucleótido. Los ejemplos de tales vectores no víricos incluyen el oligonucleótido solo (p.ej., una cualquiera o más de las SEQ ID NO: 12 a 49) o en combinación con una formulación de proteína, polisacárido o lípido adecuada.

10

Los sistemas de suministro de ácidos nucleicos adecuados incluyen adicionalmente un vector vírico, típicamente una secuencia de al menos uno de un adenovirus, virus asociado a adenovirus (AAV), adenovirus dependiente de auxiliar, retrovirus, o complejo de virus hemaglutinante de Japón-liposoma (HVJ). Preferentemente, el vector vírico comprende un promotor de eucariota fuerte ligado operativamente con el polinucleótido, p.ej., un promotor del citomegalovirus (CMV).

15

Los vectores preferidos incluyen adicionalmente vectores víricos, proteínas de fusión y conjugados químicos. Los vectores retrovíricos incluyen virus de la leucemia murina de Moloney y virus basados en el VIH. Un vector vírico basado en 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 víricos de ADN. Estos vectores incluyen vectores de viruela 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 asociados a adenovirus.

20

Los compuestos antisentido de la descripción engloban cualquier sal, éster o sal de tales ésteres farmacéuticamente aceptables, o cualquier otro compuesto que, tras la administración a un animal, que incluye un ser humano, sea capaz de proporcionar (directa o indirectamente) el metabolito biológicamente activo o residuo del mismo.

25

La expresión «sales farmacéuticamente aceptables» hace referencia a sales fisiológica y farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la descripción: es decir, sales que retienen la actividad biológica deseada del compuesto parental y no confieren efectos toxicológicos no deseados al mismo. Para los oligonucleótidos, los ejemplos preferidos de sales farmacéuticamente aceptables y sus usos se describen adicionalmente en la pat. de EE. UU. n.º 6.287.860.

30

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

35

40

Para el tratamiento de los tejidos en el sistema nervioso central, la administración puede realizarse, p. ej. por inyección o infusión en el líquido cefalorraquídeo. La administración de ARN antisentido en el líquido cefalorraquídeo se describe, p. ej., en la pub. de sol. de pat. de EE. UU. n.º 2007/0117772, "Methods for slowing familial ALS disease progression".

45

Cuando lo que se pretende es que los oligonucleótidos antisentido de la presente descripción puedan administrarse a células del sistema nervioso central, la administración puede ser con uno o más agentes capaces de promover la penetración de los oligonucleótidos antisentido a través de la barrera hematoencefálica del sujeto. La inyección puede realizarse, p.ej., en la corteza entorrinal o en el hipocampo. El suministro de factores neurotróficos mediante la administración de un vector adenovírico en las neuronas motoras del tejido muscular se describe en, p. ej., la pat. de EE. UU. n.º 6.632.427, "Adenoviral-vector-mediated gene transfer into medullary motor neurons". El suministro de vectores directamente al cerebro, p. ej., el cuerpo estriado, el tálamo, el hipocampo o la sustancia negra, es conocida en la materia y se describe, p. ej. en la pat. de EE. UU. n.º 6.756.523, "Adenovirus vectors for the transfer of foreign genes into cells of the central nervous system particularly in brain".

50

55

La administración puede ser rápida como por inyección o realizarse a lo largo de un período de tiempo, ya sea por infusión lenta o mediante la administración de formulaciones de liberación lenta.

60 Los oligonucleótidos antisentido en cuestión también pueden ligarse o conjugarse con agentes que proporcionen

unas propiedades farmacéuticas o farmacodinámicas deseables. Por ejemplo, el oligonucleótido antisentido puede acoplarse a cualquier sustancia conocida en la materia por promover la penetración o el transporte a través de la barrera hematoencefálica, tal como un anticuerpo contra el receptor de la transferrina, y administrarse por inyección intravenosa. El compuesto antisentido puede ligarse con un vector vírico, por ejemplo, que hace que el compuesto antisentido sea más efectivo y/o aumente el transporte del compuesto antisentido a través de la barrera hematoencefálica. La desestabilización de la barrera hematoencefálica osmótica también puede llevarse a cabo mediante infusión, p. ej. de azúcares incluyendo, pero sin limitación, mesoeritritol, xilitol, D(+)-galactosa, D(+)-lactosa, D(+)-xilosa, dulcitol, mioinositol, L(-)-fructosa, D(-)-manitol, D(+)-glucosa, D(+)-arabinosa, D(-)-arabinosa, celobiosa, D(+)-maltosa, D(+)-rafinosa, L(+)-ramnosa, D(+)-melibiosa, D(-)-ribosa, adonitol, D(+)-arabitol, L(-)-arabitol, D(+)-fucosa, L(-)-fucosa, D(-)-lixosa, L(+)-lixosa y L(-)-lixosa o aminoácidos, incluyendo, 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 procedimientos y materiales para potenciar la penetración en la barrera hematoencefálica se describen, p. ej., en las patentes de EE. UU. 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 systems".

Los compuestos antisentido en cuestión también 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, tópicas u otras, para ayudar en la captación, distribución y/o absorción. Por ejemplo, pueden incluirse lípidos catiónicos en la formulación para facilitar la captación de oligonucleótidos. Una de tales composiciones que se ha mostrado que facilita la captación es LIPOFECTIN (disponible en GIBCO BRL, Bethesda, MD).

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

Las formulaciones farmacéuticas de la presente descripción, que pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria, pueden prepararse de acuerdo con técnicas convencionales muy conocidas en la industria farmacéutica. Tales técnicas incluyen la etapa de poner en asociación los principios activos con el uno o más vehículos farmacéuticos o 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 a continuación, si fuera necesario, moldeando el producto.

Las composiciones de la presente descripción 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 descripción 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 estabilizantes.

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

Las emulsiones son típicamente sistemas heterogéneos de un líquido dispersado en otro en forma de gotas 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 solución o bien en la fase acuosa, fase oleosa o bien él mismo como una fase independiente. Las microemulsiones están incluidas como un aspecto de la presente descripción. Las emulsiones y sus usos son muy conocidos en la materia y se describen adicionalmente en la pat. de EE. UU. n.º 6.287.860.

Las formulaciones de la presente descripción incluyen formulaciones liposomales. Como se usa en la presente descripción, el término «liposoma» significa una vesícula compuesta por lípidos anfífilicos dispuestos en una bicapa o bicapas esféricas. Los liposomas son vesículas unilamelares o multilamelares que tienen una membrana formada por un material lipófilo y un interior acuoso que contiene la composición que va a suministrarse. Los liposomas catiónicos son liposomas cargados positivamente que se cree que interactúan con moléculas de ADN cargadas

negativamente 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 suministrar ADN a células.

- 5 Los liposomas también incluyen liposomas «estabilizados estéricamente», una expresión que, como se usa en la presente memoria, hace referencia a liposomas que comprenden uno o más lípidos especializados. Cuando se incorporan en liposomas, estos lípidos especializados dan como resultado liposomas con vidas en circulación potenciadas con respecto a los liposomas que carecen de tales lípidos especializados. Son ejemplos de liposomas estabilizados estéricamente aquellos donde parte de la parte del lípido formador de vesícula del liposoma
10 comprende uno o más glucolípidos 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 pat. de EE. UU. n.º 6.287.860.

Las formulaciones y composiciones farmacéuticas de la presente descripción también pueden incluir tensioactivos. El uso de tensioactivos en medicamentos, formulaciones y en emulsiones es muy conocido en la materia. Los
15 agentes tensioactivos y sus usos se describen adicionalmente en la pat. de EE. UU. n.º 6.287.860.

En un aspecto, la presente descripción emplea diversos potenciadores de la penetración para efectuar el suministro eficiente 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
20 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 tensioactivos no quelantes. Los potenciadores de la penetración y sus usos se describen adicionalmente en la pat. de EE. UU. n.º 6.287.860.

25 Un experto en la materia reconocerá que las formulaciones se diseñan rutinariamente de acuerdo con su uso previsto, es decir, su vía de administración.

Las formulaciones preferidas para administración tópica incluyen aquellas donde los oligonucleótidos de la descripción están en mezcla con un agente de suministro tópico tal como lípidos, liposomas, ácidos grasos, ésteres
30 de ácidos grasos, esteroides, agentes quelantes y tensioactivos. Los lípidos y liposomas preferidos incluyen neutros (por ejemplo, dioleoilfosfatidiletanolamina DOPE, dimiristoilfosfatidilcolina DMPC, diestearoilfosfatidilcolina), negativos (por ejemplo, dimiristoilfosfatidilglicerol DMPG) y catiónicos (por ejemplo, dioleoiltetrametilaminopropilo DOTAP y dioleoilfosfatidiletanolamina DOTMA).

35 Para administración tópica u otra, los oligonucleótidos de la descripción pueden encapsularse dentro de liposomas o pueden formar complejos con los mismos, en particular con liposomas catiónicos. Como alternativa, los oligonucleótidos pueden estar complejados con lípidos, en particular con lípidos catiónicos. Los ácidos grasos y ésteres preferidos, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, y sus usos se describen adicionalmente en
40 la pat. de EE. UU. n.º 6.287.860.

Las composiciones y formulaciones para administración por vía oral incluyen polvos o gránulos, micropartículas, nanopartículas, suspensiones o soluciones en agua o medios no acuosos, cápsulas, cápsulas de gel, sobres, comprimidos o minicomprimidos. Pueden ser deseables espesantes, aromatizantes, diluyentes, emulsionantes, adyuvantes de dispersión o aglutinantes. Las formulaciones orales preferidas son aquellas donde los
45 oligonucleótidos de la descripción se administran conjuntamente con uno o más potenciadores de la penetración, tensioactivos y quelantes. Los tensioactivos preferidos incluyen ácidos grasos y/o ésteres o sales de los mismos, ácidos biliares y/o sales de los mismos. Los ácidos/sales biliares y ácidos grasos preferidos y sus usos se describen adicionalmente en la pat. de EE. UU. n.º 6.287.860.

También se prefieren combinaciones de potenciadores de la penetración, por ejemplo, ácidos grasos/sales en
50 combinación con ácidos biliares/sales. Una combinación particularmente preferida es la sal de sodio de ácido láurico, ácido cáprico y UDCA. Los potenciadores de la penetración adicionales incluyen éter polioxiétilen-9-laurílico y éter polioxiétilen-20-cetílico. Los oligonucleótidos de la descripción pueden suministrarse por vía oral, en forma granulada que incluye partículas secadas por pulverización, o complejados para formar micro- o nanopartículas. Los agentes complejantes de oligonucleótidos y sus usos se describen adicionalmente en la pat. de EE. UU. n.º
55 6.287.860.

Las composiciones y formulaciones para administración parenteral, intratecal o intraventricular pueden incluir 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
60 farmacéuticamente aceptables.

Ciertos aspectos de la descripción proporcionan composiciones farmacéuticas que contienen uno o más compuestos oligoméricos y uno o más de otros agentes quimioterapéuticos 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, esorrubicina, bleomicina, mafosfamida, ifosfamida, citosina arabinósido, biscloroetilnitrosurea, busulfano, mitomicina C, actinomicina D, mitramicina, prednisona, hidroxiprogesterona, testosterona, tamoxifeno, dacarbazina, procarbazona, hexametilmelamina, pentametilmelamina, mitoxantrona, amsacrina, clorambucilo, metilciclohexilnitrosurea, mostazas de nitrógeno, melfalán, ciclofosfamida, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-azacitidina, hidroxiaurea, desoxicoformicina, 4-hidroxiperoxiciclofosforamida, 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 descripción, 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 más de otros de tales agentes quimioterapéuticos (p.ej., 5-FU, MTX y oligonucleótido, o 5-FU, radioterapia y oligonucleótido). Los fármacos antiinflamatorios incluyendo, pero sin limitación, fármacos antiinflamatorios no esteroideos y corticosteroides, y fármacos antivíricos incluyendo, pero sin limitación, ribivirina, vidarabina, aciclovir y ganciclovir, también pueden combinarse en composiciones de la descripción. Las combinaciones de compuestos antisentido y otros fármacos no antisentido también están dentro del alcance de esta descripción. Pueden usarse dos o más compuestos combinados juntos o secuencialmente.

En otro aspecto relacionado, las composiciones de la descripción pueden contener uno o más compuestos antisentido, particularmente oligonucleótidos, orientados a un primer ácido nucleico y uno o más compuestos antisentido adicionales orientados a un segundo ácido nucleico diana. Por ejemplo, la primera diana puede ser una secuencia antisentido particular del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), y la segunda diana puede ser una región de otra secuencia de nucleótidos. Como alternativa, las composiciones de la descripción pueden contener dos o más compuestos antisentido orientados a diferentes regiones del mismo ácido nucleico diana del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF). Se ilustran numerosos ejemplos de compuestos antisentido en la presente memoria y otros pueden seleccionarse de entre compuestos adecuados conocidos en la materia. 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 materia. La dosificación depende de la gravedad y sensibilidad de la patología que vaya 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 medidas 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 ha encontrado que son efectivas en modelos animales *in vitro* e *in vivo*. En general, la dosificación es de 0,01 µg a 10 mg 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 materia pueden estimar fácilmente tasas de repetición para la dosificación basándose en tiempos de residencia medidos y concentraciones del fármaco en fluidos corporales o tejidos. Tras el tratamiento satisfactorio, puede desearse que el paciente reciba terapia de mantenimiento para prevenir la reaparición de la patología, donde el oligonucleótido se administra en dosis de mantenimiento que oscilan de 0,01 µg a 10 mg por kg de peso corporal, de una vez o más diariamente, a una vez cada 2-20 años.

En aspectos, un paciente se trata con una dosificación de fármaco que es de 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 10 mg/kg de peso corporal. Ciertas dosificaciones inyectadas de oligonucleótidos antisentido se describen, p. ej., en la pat. de EE. UU. n.º 7.563.884, "Antisense modulation of PTP1B expression".

Aunque se han descrito anteriormente diversos aspectos de la presente descripción, debe entenderse que se han

presentado a modo de ejemplo solamente, y no de limitación. Pueden realizarse numerosos cambios a los aspectos divulgados de acuerdo con la descripción en la presente memoria sin alejarse del espíritu o alcance de la descripción. Por tanto, la amplitud y el alcance de la presente descripción no deben estar limitados por ninguno de los aspectos descritos anteriormente.

5

Por su citación de diversas referencias en este documento, los solicitantes no admiten que ninguna referencia particular sea «técnica anterior» a su invención. En los siguientes ejemplos se ilustran realizaciones de composiciones y procedimientos inventivos.

10 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 materia y están dentro del alcance de aspectos de la presente descripción.

15

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

20 Como se ha indicado anteriormente, la expresión «oligonucleótido específico de» o «dianas de oligonucleótido» hace referencia a un oligonucleótido que tiene una secuencia (i) capaz de formar un complejo estable con una parte del gen elegido como diana, o (ii) capaz de formar un dúplex estable con una parte de un transcrito de ARNm del gen elegido como diana.

25 La selección de los oligonucleótidos apropiados se ve facilitada por el uso de programas informáticos (p. ej. IDT AntiSense Design, IDT OligoAnalyzer) que identifican automáticamente en cada secuencia dada subsecuencias de 19-25 nucleótidos que formarán híbridos con una secuencia de polinucleótidos diana con una temperatura de fusión deseada (normalmente 50-60 °C) y no formarán autodímeros u otras estructuras secundarias complejas.

30 La selección de los oligonucleótidos apropiados se facilita aún más usando programas informáticos que alinean automáticamente secuencias de ácido nucleico 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 genes y regiones intragénicas de un genoma dado permite la selección de secuencias de ácidos nucleicos que exhiben un grado de especificidad apropiado respecto al gen de interés. Estos procedimientos permiten la selección de oligonucleótidos que exhiben un alto grado de complementariedad con secuencias de ácido nucleico diana y un menor grado de complementariedad con otras secuencias de ácido nucleico en un genoma dado. Un experto en la materia se dará cuenta de que hay libertad considerable en la selección de regiones apropiadas de genes para su uso en la presente invención.

40

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 causar una modulación de la función y/o la actividad, y existe un grado de complementariedad suficiente para evitar unión inespecífica del compuesto antisentido a secuencias de ácido nucleico no diana en condiciones donde se desea unión específica, es decir, en condiciones fisiológicas en el caso de ensayos *in vivo* o tratamiento terapéutico, y en las condiciones donde se realizan ensayos en el caso de ensayos *in vitro*.

45

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

50

La fuerza de unión entre el antisentido natural diana y una molécula de fármaco potencial (Molécula) puede estimarse usando cualquiera de los procedimientos establecidos de medida de la fuerza de interacciones intermoleculares, por ejemplo, un ensayo de la curva de fusión.

55

El ensayo de la curva de fusión determina la temperatura a la que ocurre 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 fuerza de interacción entre las dos moléculas.

60

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 (p. ej., kit MeltDoctor de Applied Biosystems Inc.). Estos kits incluyen una solución tampón adecuada que contiene uno de los tintes de unión a ADN bicatenario (dsADN) (tales como los tintes ABI HRM, SYBR Green, SYTO, etc.). Las propiedades de los tintes de dsADN son tales que casi no emiten fluorescencia en forma libre, pero son 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 específicos del fabricante. La mezcla se calienta a 95 °C para disociar todos los complejos de dsADN previamente formados y se enfría entonces lentamente a temperatura ambiente u otra temperatura menor definida por el fabricante del kit para permitir que se reasocien las moléculas de ADN. Entonces, 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 (p. ej., 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) frente a 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 transición rápida del complejo de dsADN a moléculas monocatenarias. Esta temperatura se llama T_m y es directamente proporcional a la fuerza de la interacción entre las dos moléculas. Típicamente, la T_m superará los 40 °C.

Diseño de moléculas de AntagoNAT modificadas:

Se diseñaron y ensayaron una serie de oligonucleótidos antisentido basados en ADN, llamados AntagoNAT, orientados a BDNF-AS no codificante y otros transcritos antisentido. Se diseñaron diversos AntagoNAT en el intervalo de 12 a 20 nucleótidos de longitud con o sin modificación de fosforotioato completa más/menos 2-O'-metil-ARN o nucleótidos modificados de ANB. Se observó la eficiencia máxima sobre el nivel de ARNm de BDNF con el gámpero de fosforotioato de 16 nucleótidos con tres nucleótidos modificados con ANB en cada extremo (XXXnnnnnnnnnnXXX). Para bloquear las interacciones entre transcritos antisentido de BDNF humano, se usaron mixmeros de 14 nucleótidos que contienen tanto moléculas de ANB como 2-O'-metil-ARN. Aunque se sugiere que estos oligonucleótidos modificados con 2-O'-metil-ARN bloquean solo el ARN, se observó regulación negativa marginal de ARN elegidos como diana en este experimento (Figura 11). Se enumeran en la Tabla 1 secuencias de diversos AntagoNAT, así como otros siARN, cebadores y sondas usados para estos estudios.

Ejemplo 2: modulación de polinucleótidos de BDNF

Todos los oligonucleótidos antisentido usados en el Ejemplo 2 se diseñaron como se describe en el Ejemplo 1. Se encargó al fabricante (IDT Inc. de Coralville, IA) que fabricara los oligonucleótidos con el enlace fosfotioato diseñados y se proporcionaron los análogos de fosfotioato diseñados mostrados en la Tabla 1. La denominación asterisco entre nucleótidos indica la presencia de enlace fosfotioato. Los oligonucleótidos requeridos para el experimento del ejemplo 2 pueden sintetizarse utilizando cualquier procedimiento apropiado del estado de la técnica, por ejemplo el procedimiento utilizado por IDT: sobre soporte sólido, tal como microperlas de vidrio de poro controlado (CPG) de 5 micrómetros, usando monómeros de fosforamidita (nucleótidos normales con todos los grupos activos protegidos con grupos de protección, p.ej., grupo tritilo en el azúcar, benzoilo en A y C, y N-2-isobutirilo en G). Los grupos de protección impiden las reacciones no deseadas durante la síntesis de oligonucleótidos. Los grupos de protección se retiran al final del proceso de síntesis. El nucleótido inicial está ligado a un soporte sólido a través del carbono 3' y la síntesis continúa en dirección 3'-5'. La adición de una nueva base a una cadena de oligonucleótidos en elongación tiene lugar en cuatro etapas: 1) el grupo de protección se retira del oxígeno 5' del nucleótido inmovilizado con ácido tricloroacético; 2) el nucleótido inmovilizado y el siguiente en la secuencia se acoplan usando tetrazol; la reacción continúa a través de un intermedio tetrazoilfosforamidita; 3) los nucleótidos libres que no hayan reaccionado y otros subproductos de reacción se lavan, y los oligonucleótidos inmovilizados que no hayan reaccionado se cubren con caperuza para prevenir su participación en la próxima ronda de síntesis; la cobertura con caperuza se logra acetilando el hidroxilo 5' libre utilizando anhídrido acético y N-metilimidazol; 4) para estabilizar el enlace entre los nucleótidos, el fósforo se oxida con yodo y agua, si se va a producir un enlace fosfodiéster, o reactivo Beaucage (1,1-dióxido de 3H-1,2-benzoditiol-3-ona), si se desea un enlace fosfotioato. Alternando los dos agentes oxidantes, se puede construir un esqueleto quimérico. Se repite el

ciclo de cuatro etapas descrito anteriormente para cada nucleótido de la secuencia. Cuando la secuencia completa esté sintetizada, se escinde el oligonucleótido del soporte sólido y se desprotege usando hidróxido de amonio a alta temperatura. Los grupos de protección se lavan mediante desalinización y se liofilizan el resto de los oligonucleótidos.

5

Tratamiento de células Hek293 con diferentes siARN para cuantificar la cantidad de ARNm de BDNF

1. Se hicieron crecer células Hek293 de ATCC (n.º de cat CRL-1573) en MEM/EBSS (Hyclone n.º de cat SH30024) + 10 % de FBS + penicilina + estreptomina a 37 °C y 5 % de CO₂. Un día antes del experimento, las células volvieron a sembrarse a la densidad de 5x10⁵/pocillo en placas de 6 pocillos y se incubaron a 37 °C y 5 % de CO₂.
2. El día del experimento, el medio en las placas de 6 pocillos se cambió a MEM/EBSS reciente + 10 % de FBS.
3. Se diluyeron todos los BDNF-AntagoNAT (oligonucleótido antisentido de BDNF-AS) a la concentración de 20 uM y el siARN de BDNF-AS (siARN complementario de BDNF-AS) a 10 uM; ambos compuestos oligonucleotídicos se fabrican por IDT. Para dosificar un pocillo, se incubaron 2 µl de esta solución con 400 µl de medio Opti-MEM (Gibco, n.º de cat. 31985-070) y 4 µl de Lipofectamine 2000 (Invitrogen, n.º de cat. 11668019) a temperatura ambiente durante 20 min y se aplicaron gota a gota a un pocillo de las placas de 6 pocillos con células HepG2. Se usó una mezcla similar que incluye 2 µl de agua en lugar de la solución de oligonucleótido para los controles transfectados ficticiamente.
4. Después de 3-18 horas de incubación a 37 °C y 5 % de CO₂, el medio se cambió a medio MEM/EBSS reciente + 10 % de FBS + penicilina + estreptomina.
5. 48 h después de realizar la adición de oligonucleótidos antisentido, se retiró entonces el medio y se extrajo ARN de las células usando el sistema de aislamiento de ARN SV Total de Promega (n.º de cat Z3105) o el kit de aislamiento de ARN RNeasy Total de Qiagen (n.º de cat 74181) siguiendo las instrucciones del fabricante.
6. Se añadieron 200-400 ng del ARN extraído a la reacción de transcripción inversa realizada usando hexámeros aleatorios, mezcla 2,5 mM de dNTP, mgCl₂ y tampón apropiado. Se usó el ADNc (20-40 ng) de esta reacción de transcripción inversa para monitorizar la expresión génica mediante PCR en tiempo real usando la mezcla de expresión génica ABI Taqman (n.º de cat. 4369510) y 300 nM de cebadores directo e inverso y 200 nM de sonda en un volumen de reacción final de 15 µl. Se diseñaron los cebadores/sondas usando el software FileBuilder (Applied Biosystem). Los cebadores eran específicos de hebra para los pares con sentido-antisentido, y las sondas cubrían los límites de exón para eliminar la opción de amplificación de ADN genómico. El ensayo de ABI para BDNF humano era el ensayo de expresión génica Applied Biosystems Taqman: Hs00542425_s1 (NANOG) 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 la máquina GeneAmp 7900 (Applied Biosystems). Se calculó el cambio en veces en la expresión génica después del tratamiento con oligonucleótidos antisentido basándose en la diferencia de valores de dCt normalizados frente a 18S entre las muestras tratadas y las transfectadas ficticiamente.
7. Detección de oligos para BDNF-AS:
Ensayo ABI de ID Hs00417345_m1 secuencia de contexto GCACACCTGGAGATACTCTATTATA (SEQ ID No.: 65).
8. Detección de oligos para BDNF:
Ensayo ABI de ID Hs00542425_s1 CCTGCAGAATGGCCTGGAATTACAA (SEQ ID No.: 66).
Detección de oligos para BDNF-AS: Ensayo ABI de ID Hs00417345_m1 secuencia de contexto GCACACCTGGAGATACTCTATTATA (SEQ ID No.: 65).
Detección de oligos para BDNF: Ensayo ABI de ID Hs00542425_s1 CCTGCAGAATGGCCTGGAATTACAA (SEQ ID No.: 66).
9. Los resultados están basados en los valores de umbral de ciclo (Ct). Se dan las diferencias calculadas entre los valores de Ct para genes experimental y de referencia (ARN de 18S) como ddCt y se representan como porcentaje de cada ARN a la muestra calibradora.

50

Resultados: la transfección de varias líneas celulares humanas y de ratón, incluyendo células HEK293T, con diferentes siARN que se orientan a regiones no solapantes del transcrito de BDNF-AS muestra una regulación positiva de 2-6 veces del transcrito de BDNF (Figura 1a y Figura 6) a las 48 h. La regulación positiva de BDNF no estaba relacionada con la elección de los controles endógenos (Figura 5a-b). La regulación positiva no afectaba a la regulación de otros genes vecinos de BDNF (Figura 9).

55

La Figura 5 muestra que la desactivación génica de BDNF-AS conduce a la regulación positiva de ARNm de BDNF. La desactivación génica de BDNF-AS usando siARN-1 (10 nM) orientado a la región no solapante del transcrito de BDNF-AS causaba una regulación positiva de 6 veces de ARNm de BDNF (con sentido) (****= P<0,0001). Los resultados representados aquí se obtuvieron a partir de experimentos con células HEK293T, usando beta-actina

60

(panel izquierdo) o ARNr de 18S (panel derecho) como controles endógenos y transfección ficticia como muestra de referencia. Este experimento pretende mostrar que la elección de controles endógenos o muestra calibradora de referencia no cambia la regulación positiva observada del ARNm de BDNF.

- 5 La Figura 6 muestra la regulación postranscripcional de la expresión de BDNF. Se transfectaron células N2a con una combinación de mBDNF-AntagoNAT9 orientado a transcrito de BDNF-AS de ratón y siARN de Drosha orientado a proteína Drosha, que está implicada en el procesamiento de microARN (miARN). Se observó la regulación positiva de ARNm de BDNF después del tratamiento de células con mBDNF-AntagoNAT9 (***)= valor de $p < 0,0001$). La adición de siARN de Drosha aumentaba marginalmente la transcripción de BDNF frente al tratamiento con mBDNF-
10 AntagoNAT9 (*= valor de $p < 0,05$). Este experimento puede sugerir la implicación de otros mecanismos postraduccionales, tales como miARN, en la regulación del transcrito de BDNF.

La Figura 9 muestra que la desactivación génica de BDNF-AS ni cambia el nivel de TrkB ni de genes vecinos de BDNF (Let7C y KIF18A) en ambas direcciones: LIN7C y KIF18A son genes localizados en dirección 3' y en dirección
15 5' de BDNF, respectivamente. El receptor tirosina cinasa neurotrófico de tipo 2 (TrkB) codifica un receptor unido a membrana para BDNF y está localizado en un cromosoma diferente (Chr-9) que BDNF. Se determinó que estos genes se alteraban tras el agotamiento del transcrito de BDNF-AS. Se transfectaron células HEK293T con siARN de control o siARN de BDNF-AS y se midieron varios niveles de transcrito. Se observó que el transcrito de BDNF-AS se regulaba negativamente y que el ARNm de BDNF se regulaba positivamente como se indica en otro lugar de este
20 manuscrito. Se encontró que la desactivación génica de BDNF-AS no tiene efecto sobre la expresión de TrkB ni sobre los genes vecinos Let7C y KIF18A. Estos datos sugieren que, tras el agotamiento de BDNF-AS, hay una alteración específica de locus de la expresión de BDNF.

Tratamiento de células HEK293 con un siARN en un curso temporal de 0-96 h para cuantificar la cantidad de BDNF y BDNF-AS

La metodología seguida era la misma que en el tratamiento de células Hek293 con siARN, pero esta vez las células se recolectan a las 0 a 96 h después de la adición de los oligos.

Resultados: el curso temporal de la expresión de BDNF y BDNF-AS muestra una regulación positiva óptima de
30 BDNF debido al siARN a las 48 h simultáneamente a una regulación negativa óptima del BDNF-AS (Figura 1b).

Tratamiento de células Hek293 con diferentes hBDNF-AntagoNAT para cuantificar la cantidad de BDNF y BDNF-AS

35 La metodología seguida era la misma que en el tratamiento de células Hek293 con siARN, pero esta vez las células se tratan con AntagoNAT.

Resultados: el transcrito de BDNF-AS contiene una región solapante de 225 nucleótidos que tiene complementariedad completa con el ARNm de BDNF. Las interacciones de ARN-ARN pueden ser responsables de la regulación discordante del BDNF por su transcrito antisentido. Para determinar el papel regulador de BDNF-AS sobre el ARNm de BDNF, se utilizaron los gápmers (AntagoNAT) que contienen tanto LNA como modificaciones de 2'OMe-ARN para bloquear la interacción entre transcritos con sentido y antisentido. La región solapante estaba cubierta por teselado de hBDNF-AntagoNAT. Se encontró que el uso de hBDNF-AntagoNAT regula positivamente el ARNm de BDNF. Se observó una regulación negativa marginal del transcrito de BDNF-AS, que no se esperaba para oligos bloqueantes que contienen 2'OMe-ARN. Se ensayaron los 16 hBDNF-AntagoNAT y se encontró que bloquear
45 la primera mitad de la región solapante de BDNF-AS tiene un mayor efecto sobre la regulación positiva de ARNm de BDNF. Específicamente, hBDNF-AntagoNAT1 y hBDNF-AntagoNAT4 causaban una regulación positiva significativa de ARNm de BDNF. Al contrario que los siARN, los oligonucleótidos antisentido son monocatenarios y pueden ser de longitud más corta; reduciendo por lo tanto los efectos de unión no específica (fuera de diana). Los oligonucleótidos modificados con ácido nucleico bloqueado (ANB) monocatenarios son generalmente más efectivos,
50 *in vivo*, en comparación con los siARN no modificados (Figura 7)

Tratamiento de células N2a de ratón con diferentes mBDNF-AntagoNAT para cuantificar la cantidad de BDNF y BDNF-AS

55 La metodología seguida era la misma que en el tratamiento de células Hek293 con diferentes hBDNF-AntagoNAT para cuantificar la cantidad de BDNF y BDNF-AS, pero esta vez las células son células N2a. Además, se usó el siguiente ciclo de PCR: 50 °C durante 2 min, 95 °C durante 10 min, 50 ciclos de (95 °C durante 15 segundos, 60 °C durante 1 min) usando la máquina GeneAmp 7900 (Applied Biosystems).

60 Resultados. La Figura 8 muestra la inhibición del transcrito de BDNF-AS de ratón en células N2a por AntagoNAT:

ese bloqueo de la región solapante entre transcritos con sentido y antisentido de BDNF regula positivamente los niveles de ARNm de BDNF. Se determinó entonces si existe un mecanismo similar en una línea celular de ratón y se ensayaron 11 mBDNF-AntagoNAT que se orientan al transcrito BDNF-AS de ratón. Los mBDNF-AntagoNAT contienen un esqueleto de fosforotioato y tres nucleótidos modificados con ANB en ambos extremos 3' y 5'. Los oligonucleótidos de control tienen un esqueleto y modificaciones similares, pero no se orientan a ninguna secuencia en los genomas de mamífero. Dos mBDNF-AntagoNAT (mBDNF-AntagoNA3 y mBDNF-AntagoNAT9) eran capaces de aumentar los niveles de ARNm de BDNF en células N2a. En suma, bloquear el transcrito de BDNF-AS de ratón con AntagoNAT monocatenarios (de 16 unidades) causaba una regulación positiva de los niveles de ARNm de BDNF en células N2a de ratón. Estos datos sugieren que el transcrito antisentido de BDNF ejerce un efecto supresor sobre ARNm de BDNF.

Tratamiento de células Hek293 con diferentes siARN para cuantificar la proteína BDNF

La metodología seguida era la misma que en el tratamiento de células Hek293 con diferentes siARN para cuantificar la cantidad de ARNm de BDNF, excepto en la etapa 5 donde, 48 h después de realizar la adición de siARN, se retiró entonces el medio, se desestabilizaron las células y se cuantificaron sus niveles de proteínas BDNF por ELISA (Figura 1c) y Western blot (Figura 1d).

Western blot: se transfectaron células HEK293T con 10 nM de BDNF-AS, o siARN de control. Se desestabilizaron las células, 48 h después de la transfección, con 200 μ l de tampón de muestra Laemmli (Biorad) que contiene DTT 350 nM. Se separaron 20 μ l del lisado en una PAGE-SDS al 10 % y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa durante una noche. Se incubó entonces la membrana con anticuerpo primario de Mecp2 (Abcam), BDNF (Promega, número de catálogo G164B) y anticuerpo secundario conjugado con HRP. Después de la adición de sustrato de HRP, se detectó la señal quimioluminiscente con película de rayos X. Se quitó la misma membrana y se reutilizó para la detección de β -actina como control de carga.

ELISA: se transfectaron células con 20 nM de siARN de BDNF-AS o siARN de control. Se recogió el sobrenadante celular para experimentos ELISA. Como alternativa, se extrajo la proteína total de tejidos de cerebro de ratón embebidos en tampón de extracción de proteína más inhibidores de proteasa (kit BCA, Fisher) y se homogeneizaron con Bioruptor y perlas metálicas. Se midió la proteína total usando el kit de ensayo de proteína BCA (número de catálogo Pierce 23227) y se normalizaron las cargas de muestra a las concentraciones de proteína total, los kits de ELISA se adquirieron para BDNF humano en Promega (número de catálogo G7611) o BDNF de ratón en Millipore (número de catálogo CYT306) y se realizó el ELISA siguiendo el protocolo del suministrador. Se restó de la absorbancia media de tres repeticiones a 450 nm el fondo y se normalizó a la muestra de control.

Tratamiento de células Hek293 (no seguro) con diferentes concentraciones de mBDNF-AntagoNAT9 para cuantificar el ARNm de BDNF

La metodología seguida era la misma que en el tratamiento de células Hek293 con diferentes siARN para cuantificar la cantidad de ARNm de BDNF excepto en la etapa 3, donde se diluyó todo el mBDNF-AntagoNAT9 a diferente concentración de tal modo que al final se aplicaron 11 concentraciones diferentes a las células (diluciones en serie 1:3 que oscilan de 300 nM a 5 pM) usando las mismas cantidades proporcionales de Lipofectamine 2000 (n.º de cat. Invitrogen 11668019) que en el tratamiento de células Hek293 con diferentes siARN para cuantificar la cantidad de ARNm de BDNF, usando el mismo volumen de medio Opti-MEM (n.º de cat. Gibco 31985-070). Se realizó esto a temperatura ambiente durante 20 min y se aplicó gota a gota a un pocillo de la placa de 6 pocillos con células HepG2. Se usó una mezcla similar, que incluye agua en lugar de la solución de oligonucleótido, para los controles transfectados ficticiamente.

Resultados: como se muestra aquí en la Figura 1e, hay una regulación positiva dependiente de la dosis de BDNF cuando BDNF-AS se elige como diana de mBDNF-AntagoNAT9.

La Figura 1 muestra la regulación mediada por antisentido de ARNm con sentido y proteína. (A) La desactivación génica de transcrito antisentido natural de factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (BDNF-AS) en células HEK293T (n= 12 por tratamiento) con cada uno de tres siARN únicos (10 nM) orientados a la región no solapante del transcrito de BDNF-AS causaba una regulación positiva de 2-6 veces del ARNm de BDNF (con sentido) (n=6 para cada punto de datos/tratamiento, ***= P<0,001, **= P<0,01). Se obtuvieron resultados similares de experimentos que usan neurona cortical humana (HCN), células de glioblastoma (MK059), células N2a de ratón y neuroesferas (datos no mostrados). Se usaron como controles secuencias reordenadas, transfección ficticia y siARN de control. El siARN de control para este y otros experimentos es un siARN inerte (CCUCUCCACGCGCAGUACATT) que no se orienta a ninguna secuencia conocida en el genoma de mamífero. Se normalizaron todas las medidas a ARNr de 18S y se representaron como porcentaje de cada ARNm de la muestra de control de siARN negativo.

- (B) Se valoraron los cambios de los transcritos de BDNF y BDNF-AS durante un periodo de tiempo después de la desactivación génica de BDNF-AS (n=6 para cada punto de datos/tratamiento). La desactivación génica por siARN de BDNF-AS humano daba como resultado una regulación negativa eficiente y consistente de BDNF-AS, partiendo de las 6 h y siguiendo hasta las 72 h. Los niveles de ARNm de BDNF se elevaron a las 18 h, permaneciendo altos durante más de 72 h, revirtiendo a los niveles pretratamiento a las 96 h. Obsérvese que el pico a las 48 h es consistente y reproducible. Aunque la desactivación génica de BDNF-AS empieza después de las 6 h, la regulación positiva de BDNF empezaba 18 h después del tratamiento. Este retardo temporal entre el agotamiento de BDNF-AS y el aumento de ARNm de BDNF muestra el orden secuencial de eventos, que indica que las células requieren tiempo para adaptarse a la retirada del transcrito antisentido antes de la regulación positiva de BDNF.
- (C) La desactivación génica por siARN del transcrito de BDNF-AS causaba un aumento en los niveles de proteína BDNF medido por ELISA. Se transfectaron las células con 10 nM de dos siARN activos para BDNF-AS, siARN reordenados o un siARN de control durante 48 horas. Se concentraron los sobrenadantes de estas células y se analizó la proteína BDNF por ELISA usando un kit comercialmente disponible. La proteína BDNF aumentaba significativamente (n= 6 por tratamiento, ***=P <0,0001, **=P <0,001) con siARN orientado al transcrito de BDNF-AS.
- (D) Las Western blots confirmaban que la desactivación génica del BDNF-AS no codificante de proteína con siARN1 de BDNF-AS, pero no con transcrito de siARN no orientado de control, aumentaba los niveles de proteína BDNF sin cambiar los niveles de beta-actina. Colectivamente, estos datos sugieren que hay una relación discordante entre los transcritos de BDNF con sentido y antisentido en que el BDNF-AS suprime la expresión de ARNm de BDNF y su proteína. La retirada de este efecto regulatorio negativo, por desactivación génica de BDNF-AS, causa la regulación positiva de los niveles de ARNm de BDNF y su proteína.
- (E) Aumentos de BDNF dependientes de la dosis después del agotamiento de BDNF-AS: se realizaron experimentos de respuesta a la dosis usando 11 concentraciones diferentes (diluciones en serie 1:3 que oscilan de 300 nM a 5 pM) de mBDNF-AntagoNAT9 (n= 6 por punto de datos/tratamiento) y se observó un aumento dependiente de la dosis de los niveles de ARNm de BDNF a la concentración 1-300 nM con una CE50 de 6,6 nM.

Tratamiento de neuroesferas de hipocampo con siARN

- Diseción de células madre neurales de hipocampo de ratón en neuroesferas:* se separaron células madre neuronales del hipocampo de crías de ratón, P0-P1. Se separaron mecánicamente los hipocampos en células individuales, se recogieron por centrifugaciones cortas y se hicieron crecer en una mezcla de DMEM y F12 que contiene glutamina, antibióticos, solución de B27 y concentración 0,001 mM tanto de EGF como de FGF. Después de 3-4 días, se formaron neuroesferas flotantes. Se sembraron 100.000 células en placas de 24 pocillos recubiertas con poli-L-lisina (PLL). La siembra de células de neuroesfera sobre PLL iniciará el proceso de diferenciación. El tercer día después de la siembra, se retiraron los factores de crecimiento del medio y se dejaron crecer las células durante 4 días más (7 días después de la siembra). En este momento, el cultivo celular tenía una mezcla de estirpes de célula neural consistentes en astrocitos, neuronas, oligodendrocitos y sus progenitores, haciéndolo más similar al tejido cerebral maduro. Se midió la expresión de BDNF y BDNF-AS en neuroesferas flotantes así como en cultivos de 3 y 7 días después de la siembra. Se realizaron experimentos de desactivación génica usando siARN 50 nM u oligonucleótidos antisentido 20 nM orientados al transcrito de BDNF-AS, a los 3 o 7 días después de la siembra. Se sembraron también células madre neuronales en cámaras de inmunocitoquímica (18.000 células por pocillo) en un volumen total de 80 µl. Se transfirieron entonces las neuroesferas, usando el mismo protocolo, para valorar los efectos funcionales de la desactivación génica de BDNF-AS sobre células primarias de murino. Después de 48-72 h, se fijaron las células con paraformaldehído (al 4 %) durante 20 min y se lavaron con 1x PBS varias veces. Después de bloquear con FBS, se incubaron las neuroesferas con anticuerpo primario (β -tubulina III de conejo monoclonal, TUJ1) a una concentración de 1:2000 durante una noche. Se incubaron las células fijadas con anticuerpo secundario, se marcaron con Alexafluor 568 (IgG de cabra anti-conejo, 2 mg/ml, a una concentración de 1:5000). Se tiñeron los núcleos con tinción Hoechst. Se obtuvieron imágenes por microscopía de detección de antígeno por inmunofluorescencia.

Orientación a BDNF-AS por AntagoNAT:

- El término AntagoNAT se usa aquí para describir moléculas oligonucleotídicas monocatenarias que inhiben las interacciones con sentido-antisentido (con diferentes modificaciones, véanse los procedimientos suplementarios). Se diseñaron gámperos monocatenarios, oligonucleótidos de 14 nucleótidos de longitud con modificaciones de 2'O-metil-ARN y/o ácido nucleico bloqueado (ANB). Usando esta estrategia, se teseló toda la región solapante entre los transcritos de BDNF-AS y BDNF humanos y se identificaron varios AntagoNAT eficaces capaces de regular positivamente ARNm de BDNF. Los hBDNF-AntagoNAT1 y hBDNF-AntagoNAT4, orientados a la primera parte de la región solapante, producían la mayor respuesta. El dato sugiere que el bloqueo del ARN antisentido de BDNF por AntagoNAT monocatenarios es suficiente para causar un aumento del ARNm de BDNF.

Se diseñaron entonces gámpmeros monocatenarios, 15 oligonucleótidos de ADN modificados con ANB (AntagoNAT) de 16 nucleótidos de longitud con esqueleto de fosforotioato, complementarios de BDNF-AS de ratón. Dos AntagoNAT (mBDNF-AntagoNAT3 y mBDNF-AntagoNAT9) mostraban consistentemente un aumento estadísticamente significativo de los niveles de ARNm de BDNF en células N2a de ratón (Fig. 7).

La Figura 7 muestra la inhibición del transcrito de BDNF-AS humano por hBDNF-AntagoNAT: El transcrito de BDNF-AS contiene una región solapante de 225 nucleótidos que tiene complementariedad completa con el ARNm de BDNF. Las interacciones de ARN-ARN pueden ser responsables de la regulación discordante del BDNF por su transcrito antisentido. Para determinar el papel regulatorio de BDNF-AS sobre el ARNm de BDNF, se utilizaron gámpmeros (AntagoNAT) que contienen tanto LNA como modificaciones de 2'OMe-ARN para bloquear la interacción entre transcritos con sentido y antisentido. La región solapante se cubría teselando hBDNF-AntagoNAT. Se encontró que el uso de hBDNF-AntagoNAT regula positivamente el ARNm de BDNF. Se observó una regulación negativa marginal del transcrito de BDNF-AS, que no se esperaba para oligos bloqueantes que contienen 2'OMe-ARN. Se ensayaron los 16 hBDNF-AntagoNAT (de 14 unidades cada uno con las secuencias proporcionadas a continuación) y se encontró que bloquear la primera mitad de la región solapante de BDNF-AS tiene un mayor efecto sobre la regulación positiva de ARNm de BDNF. Específicamente, hBDNF-AntagoNAT1 y hBDNF-AntagoNAT4 causaban una regulación positiva significativa de ARNm de BDNF. Al contrario que los siARN, los oligonucleótidos antisentido son monocatenarios y pueden ser de longitud más corta; reduciendo por lo tanto los efectos de unión no específica (fuera de diana). Los oligonucleótidos modificados con ácido nucleico bloqueado (ANB) monocatenario son generalmente más efectivos, *in vivo*, en comparación con siARN no modificados. La regulación positiva de BDNF aumenta el crecimiento neuronal.

La regulación positiva de BDNF aumenta el crecimiento neuronal:

Consistentemente con muchos informes previos que indican los efectos estimulantes de BDNF sobre el crecimiento neuronal y la neurogénesis en adultos¹⁶⁻¹⁷, se encontró que un aumento en el nivel de BDNF endógeno debido a la desactivación génica del transcrito de BDNF-AS daba como resultado un número de células neuronales aumentado y crecimiento y maduración de neuritas a los 3 y 7 días después de la siembra en neuroesferas (Fig. 5a-d). Estos datos sugieren que la regulación positiva de BDNF endógeno debido a la inhibición de ARN antisentido induce la diferenciación neuronal en células progenitoras neuronales y podría causar un fenotipo maduro en neuronas nacientes.

Resultados: la Figura 2 muestra que la regulación positiva de BDNF aumenta el crecimiento neuronal (A-B). Imágenes de inmunocitoquímica de neuroesferas de hipocampo tratadas con siARN de control (A) o siARN de BDNF-AS (B) 3 días después de la siembra. (C-D) Imágenes de inmunocitoquímica de la maduración neuronal y el crecimiento de neuritas en neuroesferas de hipocampo tratadas con siARN de control (C) o siARN de BDNF-AS (D) 7 días después de la siembra. El tratamiento de células con siARN orientados al transcrito de BDNF-AS daba como resultado un número de células neuronales aumentado así como un aumento del crecimiento y maduración de neuritas, en neuroesferas tanto 3 días como 7 días después de la siembra. La B-tubulina III teñía de rojo, la GFAP teñía de verde y el DAPI teñía de azul.

El suministro intracerebroventricular (ICV) de mBDNF-AntagoNAT9 usando minibombas osmóticas desactiva génicamente BDNF-AS y regula positivamente BDNF

Estudios en ratón: se usaron 10 ratones C57BL/6 macho de 8 semanas de edad para experimentos *in vivo*. Se prepararon los ratones con cánulas permanentes crónicas en el tercer ventrículo dorsal implantadas por vía subcutánea con minibombas osmóticas que suministraban una infusión continua (0,11 microlitros/h) de oligonucleótido antisentido dirigido contra *BDNF-AS* (mBDNF-AntagoNAT9) u oligonucleótido de control (secuencia inerte que no existe en ser humano o ratón) a una dosis de 1,5 mg/kg/d durante 4 semanas. Se conectaron los tubos al puerto de salida de la minibomba osmótica y se perforó por vía subcutánea hasta la cánula permanente, de tal modo que los tratamientos se suministraran directamente al cerebro. A los 5 días después de la implantación, todos los animales recibieron una inyección intraperitoneal (IP) de BrdU (80 mg/kg) durante 5 días consecutivos. El día 28 después de la cirugía, se sacrificaron los animales y se extirparon tres tejidos (hipocampo, corteza frontal y cerebelo) de cada cerebro de ratón para medidas cuantitativas de ARN.

La desactivación génica de BDNF-AS aumenta el BDNF *in vivo*:

Se utilizaron minibombas osmóticas para el suministro intracerebroventricular (ICV) de mBDNF-AntagoNAT9 a ratones C57BL/6. Se seleccionó entonces mBDNF-AntagoNAT9, que se orienta a una región no solapante de

- BDNF-AS de ratón, frente a otros AntagoNAT activos basándose en su alta eficacia para aumentar el ARNm de BDNF *in vitro*. Después de 28 días de infusión continua de AntagoNAT, los niveles de ARNm de BDNF aumentaron por las regiones del prosencéfalo adyacentes al tercer ventrículo en ratones tratados con AntagoNAT9, en comparación con los niveles inalterados por un oligonucleótido de control inerte (Fig. 3a, b). Los transcritos de BDNF y BDNF-AS estaban inalterados en el hipotálamo, una estructura que no está inmediatamente adyacente al tercer ventrículo (Fig. 3c). Además, se encontró que el bloqueo mediado por AntagoNAT de BDNF-AS da como resultado niveles de proteína BDNF aumentados (Fig. 3d, e). Estos hallazgos corresponden a los datos *in vitro* descritos anteriormente e indican que el bloqueo de BDNF-AS da como resultado un aumento de la expresión de ARNm de BDNF y su proteína *in vivo*.
- 10 **Extracción de ARN y RT-PCR de muestras de cerebro de ratón:** se sacrificaron los ratones después de 28 días y se extirparon los cerebros. Se fijó un hemiserebro de cada ratón en formaldehído al 4 % durante una noche para estudios histológicos. Se extirpó otro hemiserebro para medida cuantitativa de ARN de hipocampo, corteza frontal y cerebelo. Se extrajo ARN después de homogeneización en reactivo Trizol (Invitrogen, 15596-026) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se separó la fase acuosa y se añadió un volumen igual de etanol al 70 % antes de pasar las
- 15 muestras a través de columnas RNeasy de Qiagen (QIAGEN, 74106) y se sometieron esas muestras de ARN a tratamiento con ADNasa en columna para la retirada de la contaminación de ADN. Se usaron 400 ng de cada muestra para la síntesis de la primera hebra de ADNc y se llevaron a cabo medidas de RT-PCR. Se representaron los cambios porcentuales en los niveles de ARN para tejidos individuales, en comparación con ratones de control, en cada gráfico.
- 20 **Resultados:** la Figura 3 muestra que el BDNF-AS regula el ARNm de BDNF y su proteína *in vivo*; (A-C) Usando minibombas osmóticas, se infundieron constantemente mBDNF-AntagoNAT9 (CAACATATCAGGAGCC) u oligonucleótido de control (CCACGCGCAGTACATG) durante un periodo de 28 días en el tercer ventrículo de cerebro de ratón (n= 5 por grupo de tratamiento, *=P<0,05, **= P<0,01, ***= P<0,001). El mBDNF-AntagoNAT9
- 25 dirigido contra BDNF-AS, pero no el oligonucleótido de control, daba como resultado un aumento de los niveles de BDNF en el hipocampo (A) y corteza frontal (B). En el hipotálamo (C), ambos transcritos estaban intactos, como se esperaba para un tejido que no está directamente conectado con el tercer ventrículo del cerebro. (D-E) Los niveles de proteína BDNF fueron valorados por ELISA y se encontró que el tratamiento con mBDNF-AntagoNAT9 da como resultado un aumento de la proteína BDNF, tanto en el hipocampo (D) como la corteza frontal (E), en comparación
- 30 con los ratones tratados con oligonucleótido de control.

El suministro intracerebroventricular (ICV) de mBDNF-AntagoNAT9 usando minibombas osmóticas desactiva génicamente BDNF-AS y regula positivamente BDNF

- 35 Se inyectó BrdU en los ratones tratados con mBDNF-AntagoNAT9 en la primera semana del estudio durante 5 días. Después de 28 días de infusión continua de AntagoNAT, se realizó el examen histológico de tejidos cerebrales y se cuantificó la proliferación neuronal y supervivencia usando los marcadores Ki67 y BrdU, respectivamente. En ratones tratados con mBDNF-AntagoNAT9, se observó un aumento de las células positivas de Ki67 (proliferantes) en comparación con ratones tratados con control (Fig. 4a, b). Se cuantificó el número de células positivas de Ki67 y se
- 40 encontró un aumento significativo de la proliferación celular en ratones tratados con mBDNF-AntagoNAT9 en comparación con oligonucleótido de control (Fig. 4c). En ratones tratados con mBDNF-AntagoNAT9, había un aumento significativo de la incorporación de BrdU (células supervivientes) en comparación con los ratones tratados con oligonucleótido de control (Fig. 4d). No había diferencias en el volumen de hipocampo entre los ratones tratados con control y mBDNF-AntagoNAT9 (Fig. 4e). Estos hallazgos demuestran que el BDNF-AS regula los niveles de
- 45 BDNF *in vivo*.

- Resultados:** la Figura 4 muestra que el bloqueo de BDNF-AS, *in vivo*, causa un aumento de la supervivencia y proliferación neuronal; (A-B) se trataron los ratones con mBDNF-AntagoNAT9 u oligos de control. Después de 28 días de infusión continua de mBDNF-AntagoNAT9, se realizó el examen histológico de tejidos cerebrales usando
- 50 Ki67. Ki67 es el marcador de células proliferantes en el hipocampo y se observó un aumento del número de células proliferantes en ratones que recibieron BDNF-AntagoNAT en comparación con ratones que recibieron oligos de control. En ratones tratados con mBDNF-AntagoNAT9 (B), había un aumento de células positivas de Ki67 (células proliferantes) en comparación con los ratones tratados con control (A). (C) Los ratones tratados con mBDNF-AntagoNAT9 tenían un aumento significativo del número de células positivas de Ki67 en comparación con los ratones tratados con control. (D) En ratones tratados con mBDNF-AntagoNAT9, había un aumento significativo del
- 55 número de células supervivientes (positivas de BrdU) en comparación con ratones tratados con oligonucleótido de control. (E) No había diferencias en el volumen de hipocampo entre los ratones tratados con control y mBDNF-AntagoNAT9. Conjuntamente, estos datos (n= 5 por grupo de tratamiento, *= P<0,05, ***= P<0,001) demuestran que el BDNF-AS regula los niveles de BDNF *in vivo* y que bloquear las interacciones con sentido-antisentido de BDNF da
- 60 como resultado un aumento de la estirpe, proliferación y supervivencia neuronales.

Además, aunque se ha descrito un rasgo particular de la descripción con respecto a solo una de varias implementaciones, tal rasgo puede combinarse con uno o más de otros rasgos de las otras implementaciones, como puede desearse y ser ventajoso para cualquier aplicación dada o particular.

5

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

10 **LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> CURNA, INC.

<110> THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE

15 <120> TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES RELACIONADAS CON EL FACTOR NEUROTRÓFICO DERIVADO DEL CEREBRO (BDNF) POR INHIBICIÓN DEL TRANSCRITO ANTISENTIDO NATURAL DE BDNF

<130> US61/614.664

20 <150> US61/614.664

<151> 23-03-2012

<160> 66

25 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 4755

<212> ADN

30 <213> Homo sapiens

<400> 1

ES 2 694 592 T3

cacacacaca cacacacaca gagagaacat ctctagtaaa aagaaaagtt gagctttctt	60
agctagatgt gtgtattagc cagaaaaagc caaggagtga agggttttag agaactggag	120
gagataaagt ggagtctgca tatgggaggc atttgaaatg gacttaaattg tctttttaat	180
gctgactttt tcagttttct ccttaccaga cacattgttt tcatgacatt agccccaggc	240
atagacacat cattaanaatg aacatgtcaa aaaatgattt ctgtttagaa ataagcaaaa	300
cattttcagt tgtgaccacc caggtgtaga ataaagaaca gtggaattgg gagccctgag	360
ttctaacata aactttcttc atgacataag gcaagtcttc tatggccttt ggtttcctta	420
cctgtaaaac aggatggctc aatgaaatta tctttcttct ttgctataat agagtatctc	480
tgtgggaaga ggaaaaaaaa agtcaattta aaggctcctt atagttcccc aactgctgtt	540
ttattgtgct attcatgcct agacatcaca tagctagaaa ggcccatcag acccctcagg	600
ccactgctgt tctgtcaca cattcctgca aaggaccatg ttgctaactt gaaaaaaaaatt	660
actattaatt acacttgcag ttgttgctta gtaacattta tgattttgtg tttctcgtga	720
cagcatgagc agagatcatt aaaaattaaa cttacaaagc tgctaaagtg ggaagaagga	780
gaacttgaag ccacaatttt tgcaottgct tagaagccat ctaatctcag gttatatgct	840
agatcttggg ggcaaacact gcatgtctct ggtttatatt aaaccacata cagcacta	900
ctgacactga tttgtgtctg gtgcagctgg agtttatcac caagacataa aaaaaccttg	960
accctgcaga atggcctgga attacaatca gatgggccac atggcatccc ggtgaaagaa	1020
agccctaacc agttttctgt cttgtttctg ctttctccct acagttccac caggtgagaa	1080
gagtgatgac catccttttc cttactatgg ttatttcata ctttggttgc atgaaggctg	1140
ccccatgaa agaagcaaac atccgaggac aaggtggctt ggctacca ggtgtgcgga	1200

ES 2 694 592 T3

cccatgggac tctggagagc gtgaatgggc ccaaggcagg ttcaagaggc ttgacatcat 1260
 tggctgacac tttcgaacac gtgatagaag agctggttga tgaggaccag aaagttcggc 1320
 ccaatgaaga aaacaataag gacgcagact tgtacacgtc caggggtgatg ctcagtagtc 1380
 aagtgccttt ggagcctcct cttctctttc tgctggagga atacaaaaat tacctagatg 1440
 ctgcaaacat gtccatgagg gtccggcgcc actctgaccc tgcccgccga ggggagctga 1500
 gcgtgtgtga cagtattagt gagtgggtaa cggcggcaga caaaaagact gcagtggaca 1560
 tgtcgggagg gacggtcaca gtccttgaaa aggtccctgt atcaaaaggc caactgaagc 1620
 aataacttcta cgagaccaag tgcaatccca tgggttacac aaaagaaggc tgcaggggca 1680
 tagacaaaag gcattggaac tcccagtgcc gaactaccca gtcgtacgtg cgggccctta 1740
 ccatggatag caaaaagaga attggctggc gattcataag gatagacact tcttgtgtat 1800
 gtacattgac cattaaaagg ggaagatagt ggatttatgt tgtatagatt agattatatt 1860
 gagacaaaaa ttatctatct gtatatatac ataacagggt aaattattca gttaagaaaa 1920
 aaataatctt atgaactgca tgtataaatg aagtttatac agtacagtgg ttctacaatc 1980
 tatttattgg acatgtccat gaccagaagg gaaacagtca tttgcgcaca acttaaaaag 2040
 tctgcattac attccttgat aatgttgtgg tttgttgccg ttgccaagaa ctgaaaacat 2100
 aaaaagttaa aaaaaataat aaattgcatg ctgctttaat tgtgaattga taataaactg 2160
 tcctotctta gaaaacagaa aaaaacacac acacacacaa caaaaatttg aaccaaaaca 2220
 ttccgtttac attttagaca gtaagtatct tcgttcttgt tagtactata tctgttttac 2280
 tgcttttaac ttctgatagc gttggaatta aaacaatgtc aagggtgctgt tgcattgct 2340
 ttactggcctt aggggatggg ggatgggggg tatatctttg tttgttttgt gttttttttt 2400
 cgtttgtttg ttttgttttt tagttcccac agggagtaga gatggggaaa gaattcctac 2460
 aatatatatt ctggctgata aaagatacat ttgtatggtg tgaagatggt tgcaatatcg 2520
 atcagatgac tagaaagtga ataaaaatta aggcaactga acaaaaaaat gctcacactc 2580
 cacatcccgt gatgcacctc ccaggccccg ctcattcttt gggcgttggt cagagtaagc 2640
 tgcttttgac ggaaggacct atgtttgctc agaacacatt ctttcccccc ctccccctct 2700
 ggtctcctct ttgttttggt ttaaggaaga aaaatcagtt gcgcttctg aaatatttta 2760
 ccaactgctgt gaacaagtga acacattgtg tcacatcatg acaactcgtat aagcatggag 2820
 aacagtgatt tttttttaga acagaaaaca acaaaaaata accccaaaat gaagattatt 2880
 ttttatgagg agtgaacatt tgggtaaate atggctaage ttaaaaaaaa ctcatggtga 2940
 ggcttaacaa tgtcttgtaa gcaaaaggta gagccctgta tcaaccaga aacacctaga 3000
 tcagaacagg aatccacatt gccagtgaca tgagactgaa cagccaaatg gaggctatgt 3060

ES 2 694 592 T3

ggagttggca ttgcatttac cggcagtgcg ggaggaatth ctgagtggcc atcccaaggt 3120
 ctaggtggag gtggggcatg gtatttgaga cattccaaaa cgaaggcctc tgaaggaccc 3180
 ttcagaggtg gctctggaat gacatgtgtc aagctgcttg gacctcgtgc ttttaagtgcc 3240
 tacattatct aactgtgctc aagaggttct cgactggagg accacactca agccgactta 3300
 tgcccacat cccacctctg gataatthtg cataaaattg gattagcctg gagcaggttg 3360
 ggagccaaat gtggcatttg tgatcatgag attgatgcaa tgagatagaa gatgthtgct 3420
 acctgaacac ttattgctth gaaactagac ttgaggaaac cagggtthtat cthttgagaa 3480
 cthttggtaa gggaaaaggg aacaggaaaa gaaaccccaa actcaggccg aatgatcaag 3540
 gggaccata ggaaatcttg tccagagaca agacttgggg aaggtgtctg gacattcaga 3600
 acaccaagac ttgaaggtgc cttgctcaat ggaagaggcc aggacagagc tgacaaaatt 3660
 ttgctcccca gtgaaggcca cagcaacctt ctgcccattc tgtctgttca tggagaggtg 3720
 ccctgcctca cctctgcat tttgggttag gagaagtcaa gttgggagcc tgaaatagtg 3780
 gttcttgaa aatggatcc ccagtgaaaa ctgagactct aagccattc agccatttc 3840
 acacctgaaa atgttagtga tcaccacttg gaccagcatt ctttaagtatt agaaagcccc 3900
 aagcaattgc tgcatttag tagggtgagg gataagcaaa agaggatgth caccataacc 3960
 caggaatgaa gataccatca gcaaagaatt tcaatthgtt cagtctthca thtagagcta 4020
 gtctthcaca gtaccattctg aatacctctt tgaaagaagg aagactthac gtagtgtaga 4080
 thtgthttgt gthgtthgaa aatattatct thgttaattat ththtaattg taaggatgc 4140
 thggaatatt tgctattgt caactthatt cagcttcctt thgagggaca aaththaaac 4200
 aaacaacccc ccatcacaaa cthaaaggat tgcaagggcc agatctgtta agtggthtca 4260
 taggagacac atccagcaat tgtgtggtca gtggctctth taccataaa gatacattc 4320
 agtcacattg thgatgthtt atgttgacct aagattthatt thgtthaaat ctctctctgt 4380
 tgtgttcgtt cthgttctgt thtgthttgt thththaaagt cthgtctgtg thctctthgtg 4440
 gcagaaggtt thcatgcatg gcagcaggcc tgttgctthtt thattggcgat thccattgaa 4500
 aatgtaagta aatgtctgtg gccttgthct ctctattggt aagattthatt thcaccattg 4560
 aaacaaaaaa caatthttat tgtattthtag tatattthata taattattgt attgaaaaaa 4620
 attggcatta aaactthacc gcatcagaac ctattgthaa tacaagthct attthaaagt 4680
 actaattaac atataatata tgtththaaat atagaattth taatgththtt aatattthtt 4740
 tcaaagtaca taaaa 4755

<210> 2
<211> 4302
<212> ADN

5 <213> Mus musculus

<400> 2

ES 2 694 592 T3

taaagcagta gccggctggt gcagaaaagc aacaagttcc ccagcggctct tcccgccta 60
 gcttgacaag gcgaagggtt tcttacctgg cgacagggaa atctcctgag ccgagctcat 120
 ctttgccaga gcccagggtg tgacctgagc agtgggcaaa ggatcggcgt gcaaatgga 180
 ttatTTTTat gggggtactc tgaaactccc tcactttctc tgggaacttt ttgtgctagg 240
 gctcagtgac aggcggtgag aaagctgctt caggaaacgc ccgctatata gcagggcaat 300
 tggacagtca ttggtaacct cgctcattca ttagaatcac gtaagaactc aaagggaaac 360
 gtgtctctca gaatgagggc gtttgcgtaa atctataggt ttttcaacat cgatgccagt 420
 tgctttgtct tctgtagtgc ccaaggtgga tgagagttga agctttgcgg atattgcgaa 480
 gggttattag attcataagt cacaccaagt ggtgggcgat ccactgagca aagccgaact 540
 tctcacatga tgacttcaaa caagacacat taccttctct catctgttgg ggagacaaga 600
 ttttaagaca ctgagtctcc aggacagcaa agccacaatg ttccaccagg tgagaagagt 660
 gatgaccatc cttttcctta ctatggttat ttcatacttc ggttgcataa aggcggcgcc 720
 catgaaagaa gtaaactgct acggacaagg caacttggcc taccaggtg tgcggaccca 780
 tgggactctg gagagcgtga atgggcccag ggcaggttcg agaggtctga cgacgacatc 840
 actggctgac acttttgagc acgtcatcga agagctgctg gatgaggacc agaaggttcg 900
 gcccacgaa gaaaaccata aggacgcgga cttgtacact tcccgggtga tgctcagcag 960
 tcaagtgcct ttggagcctc ctctactcct tctgctggag gaatacaaaa attacctgga 1020
 tgccgcaaac atgtctatga gggttcggcg ccactccgac cctgcccgcc gtggggagct 1080
 gagogtgtgt gacagtatta gcgagtgggt cacagcggca gataaaaaga ctgcagtgga 1140
 catgtctggc gggacggtca cagtcctaga gaaagtcccg gtatccaaag gccaaactgaa 1200
 gcagtatttc tacgagacca agtgtaatcc catgggttac accaaggaag gctgcagggg 1260
 catagacaaa aggcactgga actcgcaatg ccgaactacc caatcgtatg ttcgggccct 1320
 tactatggat agcaaaaaga gaattggctg gcgattcata aggatagaca cttcctgtgt 1380
 atgtacactg accattaaaa ggggaagata gtggatttat gttgtataga ttatattgag 1440
 acaaaattat ctatttgtat atatacataa cagggtaaat tattcagtta agaaaaata 1500
 attttatgaa ctgcatgtat aaatgaagtt tatacagtac agtggttcta caatctattt 1560
 attggacata tccatgacct gaaaggaaac agtcatttgc gcacaacttt aaaagtctgc 1620
 attacattcc tcgataatgt tgtggtttgt tgccgttgcc aagaattgaa aacaaaaagt 1680
 ttaaaaaaaaa taataataaa ttgcatgctg ctttaattgt gaattgataa taaactgtcc 1740
 ctctttcaga aaacagatta aaaaaacaaa aaacaaaaaa aaaaaacaa aaaacaaaa 1800
 caaaaattgg aacaaaaaca ttccgtttac attttagaca ctaagtatct tcgttcttgt 1860

ES 2 694 592 T3

tagtactctg ttttactgct ttogacttct gatagcgttg gaattaaaac aatgtcaagg 1920
tgctgttgct attgctttac tggcgtaagg gacggggaat gggaggggta gatttctggt 1980
tgttttgtgt tttattttgt ttgtttgttt gttttgtttt ttagttccac ccggagtagg 2040
gatggagaaa atttcttcac tatccattct ggttgataaa gcgttacatt tgtatgttgt 2100
aaagatgttt gcaaaatcca atcagatgac tggaaaacaa ataaaaatta aggcaactga 2160
ataaaatgct cacactccac tgcccatgat gtatctccct ggtcccccctc agctcactct 2220
tctggcatgg gtcagggaaa attgctttta ttggaaagac cagcatttgt tcaaagcata 2280
ctctttccct ccctcctccc attttgggcc ctcttttttg ttttgtttta agaaagaaaa 2340
ttaagttgcg cgctttaaaa tattttacta ctgctacaaa cagatgaaca atgtgtgtca 2400
ttttatgaca ctcatggaaa acagtgattt ttttttacc taaagaaaaa caaataaaaa 2460
taacccaaaa tattcttttt ttaaaaggca taaatattgg gtaaattgta atatggccta 2520
acagtgtttg cagataaaag ttattgtata caccagata cttagataag agcagggatc 2580
cacactgcc a ttgaaatagg actgaatggc cctgcgagg ctaagtggag ctgacatact 2640
atctcctggc agtgcaggag gaatttctga gtggccatcc taaggtctag gatggaggtg 2700
gggaatggta cttgagacat tcctaaagga aggctcggaa gcacccttca gacgaggctc 2760
tggaatgatg tgcoaagttg cttaggcctt ctgctttaag tgccacatt acctaacagt 2820
gctcaagagg ttctcgattg gagaaccaca ctcaaatcca tttatagcct ccatccatt 2880
tctaaataat tgtgtataaa gttggattaa cctggagcaa ctttgatcc aaatatggca 2940
cagcaataat gatattaatg cagcatgatg ggaaatgttt gctgtgaaga gaattgattt 3000
gctttgagct tagacttcag gaagcctag ttttttattt ttttattttt gagacatttt 3060
ggtaaaagga aaaaaagaaa acaaacaaac aaacaaacaa aaccagaaaa agcatcaaaa 3120
ctcaggcaga atgagcaatg tctgaaaggg ctagaaaaac aagacatagc aaggtgcttt 3180
cactgtgaaa gagacaagaa cacaggagga aatattgctt cagtgaagag cacagacggc 3240
tcctgccaat ttattacaag agtcccgtct gtactttacc ctttgggggtt agaagtcaag 3300
ttggaagcct gaatgaatgg acccaatgag aactagtgtt aagcccattt ccctagtcag 3360
gtttttttca agcgtgaatg tgttagtggg tactctcctg ggttctgag catcagaaaa 3420
aaaaaaaaaa agaggcaaac aatcgcttca tcttaggagt ggaaaggaaa cagaagtgga 3480
cgtccgctgt gactcagga gtgaagatac catcagcaaa tagtttcttt tttgttcatt 3540
cgttcctttc gagttagcct gtcttttgga ataccactga atatgctggt tttgaaagac 3600
ttcatgtagc atagattggt ttgtgccgtt taccaaatta acctttgtca tcgtttttta 3660
acctattcag gaatgcttgg aatatctgct ctatgttaac tttttgcagc ttcattctga 3720

ES 2 694 592 T3

gagacattag tcaaacaac aaaaggatcc ccatcacaat cttacagtac tgcaagggcc	3780
aggtctgtta atcggcttca caggagacat cagcaattgt gtggtcagtg gctggctctc	3840
ttaccacta agatacatca tagctacatg ttgggtggtt atggtgacct gagatttatt	3900
tgttaaaatc tcttcttctg ttctgttctg tctggttctg ttctgttctg ttctgttctg	3960
ttttggtttt aaagtcttgc tgtggtctct tgttggcaga aatgttttat gcatggcagc	4020
aggcctgttg cttttttata gtgattccca ttgaaactgt aagtaaactgt ctgtggcctt	4080
gttctctcta tggtaaagat attattcacc atgtaaaaca agaaaaata tttattgtat	4140
tttagtatat ttatataatt atggtattga aaaaattggc attaaaactt aaccacatca	4200
gaagcctatt gtaaatacag gttctattta agtgtaccaa ttaacatata atatatgttt	4260
taaatataga atttttaatg tttttaaata tattttcaaa gt	4302

<210> 3

<211> 1279

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 3

ES 2 694 592 T3

atcgcgagat caggaagggtg gccgagtgtg tcgccgcggc catcaggcac ttctccttcc 60
 tggccttgta tgaagaagga tgtgtttgct tccccttggtg ccatgattgt aaatttcctg 120
 aggcctcctc agccctgcag aactggctag agcaatgtat cttaggctca cttaaggaag 180
 ctgtagagat gagcccaagg agggaaacca gaagagcccc ccaggctcac cagttgtttg 240
 ttggctccct acaaacatgt cattcaagtg gctaatotta caacagcaca aattcatcta 300
 accagaaaga gaagaggagg ctccaaaggc acttgactac tgagcatcac cctggacgtg 360
 tacaagtctg cgtccttatt gttttcttca ttgggcccga ctttctggtc ctcatccaac 420
 agctcttcta tcacgtgttc gaaagtgtca gccaatgatg tcaagcctct tgaacctgcc 480
 ttgggcccat tcacgctctc cagagtccca tgggtccgca cacctggaga tactctatta 540
 tagcaaagaa gaaagataat ttcatlgagc catcctgttt tacaggattt tccctcctgg 600
 tgagtcaaaa tgaacaagaa ataccccagg acctcccttc cctccttggc cattaatgag 660
 atgaaggcaa ttaactcaca tagtataaat gaatcatttg aggtgatgac tgcattttag 720
 gcaaatgatg actttcttgg ttccattggt ttgcaagtaa aagttacaca cattgaaaag 780
 aactgaaac agatttccta aatgcttcat tttctggatg caccaatggt gacctactat 840
 acatgttaaa tggttttaaa atatcacctt aaaataaagg aaacttccag ctactaactc 900
 agctctgaat gggctatgaa aggtccaaa ggtatgtgaa aaattactgt tatttttgctt 960
 taaaaaatgt gatgtctaag agtgtctgca atgttctaata gttcaaaac atgtacgtaa 1020
 gccttgttta tctggaaatc atttctttct gcttatatca tttataaata gaaaatgttc 1080
 tgtaataact taaaatagtt ccacatacat aatgctttta gtgtcataat acttactact 1140
 ggtctatatt taccaacatt tatcacattt tacaaaatga agtagaagaa aaaaaagaca 1200
 acgactttat ggcctggaa ttccagtaat ggtgaccaac atgttttaaa ttccagtaaa 1260
 ggttatgggtt acatttcaa 1279

5 <210> 4
 <211> 1478
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10 <400> 4

ES 2 694 592 T3

atcgcgagat caggaaggtg gccgagtgtg tcgcccgggc catcaggcac ttctccttcc 60
 tgcccttgta tgaagaagga tgtgtttgct tccccttggt ccatgattgt aaatttcctg 120
 aggcctcctc agccctgcag aactgggggt atagccatgt gactgatctt cgtccaagaa 180
 tatgtaaaga aaaagtgttg agttggcttt tagggctaga gcaatgtatc ttaggctcac 240
 ttaaggaagc tgtagagatg agcccaagga gggaaaccag aagagccccc caggctcacc 300
 agttgtttgt tggctcccta caaacatgtc attcaagtgg ctaatcttac aacagcacia 360
 attcatctaa ccagaaagag aagaggaggc tccaaaggca cttgactact gagcatcacc 420
 ctggacgtgt acaagtctgc gtccttattg ttttcttcat tgggccgaac tttctggtcc 480
 tcatccaaca gctcttctat cacgtgttcg aaagtgtcag ccaatgatgt caagcctctt 540
 gaacctgcct tgggccatt cactctctcc agagtcccat ggggccgcac acctggagat 600
 actctattat agcaaagaag aaagataatt tcattgagcc atcctgtttt acaggaaatt 660
 ctgcaagtgg caacgtgggt ccattccgtg tgtgtcacta gagctggcgc aagcccatgg 720
 ccatggtgag gcagcgtttc cactggaact aatctgatac ctgcaccagc tcttgcaact 780
 gtgcagtgtt cccactgcaa actacggatg gggtaaaaga ctgctcacct cctattttctc 840
 atctaactct acacactctg tttgatgagg ctatggagaa acaggtcttc tcatacacta 900
 aaggtgggag taaaaacaat tcaagccctg tgcaggacaa ttaggcaata cctatcaaaa 960
 ttatacatga tttttcctgc tgaccagca attccacttc tgggaataat tgacagatat 1020
 aggtgcatat gtacaaaatg atggaaagct ctctggtata tattagtaag tgataaaaca 1080
 aggtgtaaaa tagtgtatat atggctacta ccttttggtt taaaaatggg ggaaaatggt 1140
 ggagcttgcg gtgagccgag atcgtgccac tgcactccag cctgggcgac agagcgagac 1200
 tccgtctcaa aaaaaaaca ggggtgggtg ggggggaaat aatagtacat actcatattt 1260
 acctgtatct atataaaaca cactatcaag gattcacaag aaactaatac aaatgatcac 1320
 cttatagatg gtatgtattg ggggatactg aggtgagcag ggtataagtg gggcaagact 1380
 tttcagtgta aacttctttt aaatatttatt ttgatttttg aataatgtaa attaactgtc 1440
 aaataattaa attaaaaata accaatttat taacaaaa 1478

5 <210> 5
 <211> 1437
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10 <400> 5

ES 2 694 592 T3

atcgcgagat caggaagggtg gccgagtgtg tcgcccgggc catcaggcac ttctccttcc 60
 tggccttgta tgaagaagga tgtgtttgct tccccttggtg ccatgattgt aaatttcctg 120
 aggcctcctc agccctgcag aactggctag agcaatgtat cttaggctca cttaaaggaag 180
 ctgtagagat gagcccaagg agggaaacca gaagagcccc ccaggctcac cagttgtttg 240
 ttggctccct acaaacatgt cattcaagtg gctaatotta caacagcaca aattcatcta 300
 accagaaaga gaagaggagg ctccaaaggc acttgactac tgagcatcac cctggacgtg 360
 tacaagtctg cgtccttatt gttttcttca ttggggccgaa ctttctggtc ctcatccaac 420
 agctcttcta tcacgtgttc gaaagtgtca gccaatgatg tcaagcctct tgaacctgcc 480
 ttgggcccac tcacgctctc cagagtccca tgggtccgca cacctggaga tactctatta 540
 tagcaaagaa gaaagataat ttcatgagc catcctgttt tacaggaaat tctgcaagtg 600
 gcaacgtggg tccattccgt gtgtgtcact agagctggcg caagcccatg gccatggtga 660
 ggcagcgttt ccaactggaac taatctgata cctgcaccag ctcttgcaac tgtgcagtgt 720
 tcccactgca aactacggat ggggattttc cctcctggtg agtcaaaatg aacaagaaat 780
 accccaggac ctcccctccc tccttggcca ttaatgagat gaaggcaatt aactcacata 840
 gtataaatga atcatttgag gtgatgactg cattttaggc aaatgatgac tttcttggtt 900
 ccattggttt gcaagtaaaa gttacacaca ttgaaaagac actgaaacag atttcctaaa 960
 tgcttcattt tctggatgca ccaatgttga cctactatac atgttaaatg gttttaaaat 1020
 atcaccttaa aataaaggaa acttccagct actaactcag ctctgaatgg gctatgaaag 1080
 gctccaaagg tatgtgaaaa attactgtta ttttgcttta aaaaatgtga tgtctaagag 1140
 tgtctgcaat gttctaatac ttcaaaacat gtacgtaagc cttgtttatc tggaaatcat 1200
 ttctttctgc ttatatcatt tataaataga aaatgttctg taataactta aaatagttcc 1260
 acatacataa tgcttttagt gtcataatac ttactactgg tctatattta ccaacattta 1320
 tcacatttta caaaatgaag tagaagaaaa aaaagacaac gactttatgg ccctggaatt 1380
 ccagtaatgg tgaccaacat gttttaaatt ccagtaaagg ttatggttac atttcaa 1437

<210> 6
 <211> 2322
 5 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 6

ES 2 694 592 T3

atcgcgagat caggaagggtg gccgagtggtg tcgccgcggc catcaggcac ttctccttcc 60
 tgcccttgta tgaagaagga tgtgtttgct tccccttggtg ccatgattgt aaatttcctg 120
 aggcctcctc agccctgcag aactgggggtt atagccatgt gactgatctt cgtccaagaa 180
 tatgtaaaga aaaagtgttg agttggcttt tagggctaga gcaatgtatc ttaggctcac 240
 ttaaggaagc tgtagagatg agcccaagga gggaaaccag aagagcccc caggctcacc 300
 agttgtttgt tggctcccta caaacatgtc attcaagtgg ctaatcttac aacagcacia 360
 attcatctaa ccagaaagag aagaggaggc tccaaaggca cttgactact gagcatcacc 420
 ctggacgtgt acaagtctgc gtccttattg tttcttcat tgggccgaac tttctggtcc 480
 tcatccaaca gctcttctat cacgtgttcg aaagtgtcag ccaatgatgt caagcctctt 540
 gaacctgcct tgggccatt cacgctctcc agagtcccat gggccgcac acctggagat 600
 actctattat agcaaagaag aaagataatt tcattgagcc atcctgtttt acagtattga 660
 attattacca caaggtacca accatatatg catacttaat agggtatattt gtcaaaacta 720
 tgcataaggg tcatttgttt gagatgtcag aacattttcc cgtgagaaga tctcattggg 780
 cattgaaaca gaaccacatg ctcttcagac cagcaaccgc gactaccaa tactcctctg 840
 tcaactctac ttgagtaaga acgctttcaa ttaaggccta agtgtcaaca tgcctttaa 900
 aaaaatcgtg gtgacacaaa atctttcttt ttagcaccca acagaatccc tccaagcct 960
 cgtggctgta caccctatgc tacgtgactt gtgaccatc catttgtcat gttcttcggg 1020
 aatgtggcta aggggctaag atgtgacttg aaaagaaagg tagaacaaga tcctctcaa 1080
 tttattatca aggaatagtt cagaaaacga cttcagacca cagagacagc agaacagatg 1140
 gtccggcatg gatagagcat cagacactca cagactgtgc caacaagagc catcgagtca 1200
 aaacagccaa aggaaggagg gtcattggaat gggttctctc acaccaaaact gatgccaga 1260
 ggccctcagc atgaataaca aaggcaacca gaccacaag ccatactgag tggatacaaa 1320
 acctatacct aggctgacat cccaaatgtg tgtggcaagt tagatgatga tggcacaaaa 1380
 gacagaacac cttgcttctg gccattgtca gctcttgga gagagcacac ttttagagga 1440
 gcagctgcaa ggagcctgag aacaaaactg gaaatgtctg ttatgaaagc cttcacagga 1500
 aattctgcaa gtggcaacgt gggccattc cgtgtgtgtc actagagctg gcgcaagccc 1560
 atggccatgg tgaggcagcg tttccactgg aactaatctg atacctgcac cagctcttgc 1620
 aactgtgcag tgttcccact gcaaaactag gatggggtaa aagactgctc acctcctatt 1680
 tctcatctaa tctcacacac tctgtttgat gaggctatgg agaaacaggt cttctcatac 1740
 actaaagggtg ggagtacaaa caattcaagc cctgtgcagg acaattaggc aatacctatc 1800
 aaaattatac atgatttttc ctgctgacct agcaattcca cttctgggaa taattgacag 1860

ES 2 694 592 T3

atataggtgc atatgtacaa aatgatggaa agctctctgg tatatattag taagtgataa 1920
aacaaggtgt aaaatagtgt atatatggct actacctttt gttttaaaaa tgggggaaaa 1980
tgggtggagct tgcggtgagc cgagatcgtg cactgcact ccagcctggg cgacagagcg 2040
agactccgtc tcaaaaaaaaa aacaggggtgg ggtggggggg aaataatagt acatactcat 2100
atttacctgt atctatataa aacacactat caaggattca caagaaacta atacaaatga 2160
tcaccttata gatggtatgt attgggggat actgaggtga gcaggtata agtggggcaa 2220
gacttttcag tgtaaacttc ttttaaattt tattttgatt tttgaataat gtaaattaac 2280
tgtcaaataa ttaaattaaa aataaccaat ttattaacaa aa 2322

<210> 7

<211> 2036

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 7

ES 2 694 592 T3

atcgcgagat	caggaagggtg	gccgagtgtg	tgcgcgcggc	catcaggcac	ttctccttcc	60
tgcccttgta	tgaagaagga	tgtgtttgct	tccccttggtg	ccatgattgt	aaatttcctg	120
aggcctcctc	agccctgcag	aactggctag	agcaatgtat	cttaggctca	cttaaggaag	180
ctgtagagat	gagcccaagg	agggaaacca	gaagagcccc	ccaggctcac	cagttgtttg	240
ttggctccct	acaacatgt	cattcaagtg	gctaattotta	caacagcaca	aattcatcta	300
accagaaaga	gaagaggagg	ctccaaaggc	acttgactac	tgagcatcac	cctggacgtg	360
tacaagtctg	cgctccttatt	gttttcttca	ttgggcccga	ctttctggtc	ctcatccaac	420
agctcttcta	tcacgtgttc	gaaagtgtca	gccaatgatg	tcaagcctct	tgaacctgcc	480
ttgggcccct	tcacgtcttc	cagagtccca	tgggtccgca	cacctggaga	tactctatta	540
tagcaaagaa	gaaagataat	ttcattgagc	catcctgttt	tacagcacc	aacagaatcc	600
cttcaaagcc	tcgtggctctg	acaccctatg	ctacgtgact	tgtgacctat	ccatttgtca	660
tgttcttcgg	gaatgtggct	aaggggctaa	gatgtgactt	gaaaagaaag	gtagaacaag	720
atcatctcaa	atttattatc	aaggaatagt	tcagaaaacg	acttcagacc	acagagacag	780
cagaacagat	ggtccggcat	ggatagagca	tcagacactc	acagactgtg	ccaacaagag	840
ccatcgagtc	aaaacagcca	aaggaaggag	ggcatggaa	tgggttctct	cacaccaaac	900
tgatgccag	aggccctcag	catgaataac	aaaggcaacc	agaccacaaa	gccatactga	960
gtggatacaa	aacctatacc	taggctgaca	tcccaaattgt	gtgtggcaag	ttagatgatg	1020
atggcacaaa	agacagaaca	ccttgcttct	ggccattgtc	agctcttggg	agagagcaca	1080
cttttagagg	agcagctgca	aggagcctga	gaacaaaact	ggaaatgtct	gttatgaaag	1140
ccttcacagg	aaattctgca	agtggcaacg	tgggtccatt	ccgtgtgtgt	cactagagct	1200

ES 2 694 592 T3

ggcgcaagcc catggccatg gtgaggcagc gtttccactg gaactaatct gatacctgca	1260
ccagctcttg caactgtgca gtgttcccac tgcaaaactac ggatgggaga ggataaagaa	1320
cttcaatctt taaaaaagag aggattttcc ctctctggtga gtcaaaatga acaagaaata	1380
ccccaggacc tcccttccct ccttggccat taatgagatg aaggcaatta actcacatag	1440
tataaatgaa tcatttgagg tgatgactgc attttaggca aatgatgact ttcttggttc	1500
cattggtttg caagtaaaag ttacacacat tgaaaagaca ctgaaacaga tttcctaaat	1560
gcttcatttt ctggatgcac caatgttgac ctactataca tgttaaatgg ttttaaaata	1620
tcaccttaaa ataaaggaaa cttccagcta ctaactcagc tctgaatggg ctatgaaagg	1680
ctccaaaggt atgtgaaaaa ttactgttat tttgctttta aaaatgtgat gtctaagagt	1740
gtctgcaatg ttctaagct tcaaaacatg tacgtaagcc ttgtttatct ggaaatcatt	1800
tctttctgct tatatcattt ataaatagaa aatgttctgt aataacttaa aatagttcca	1860
catacataat gcttttagtg tcataatact tactactggt ctatatttac caacatttat	1920
cacattttac aaaatgaagt agaagaaaaa aaagacaacg actttatggc cctggaattc	1980
cagtaatggt gaccaacatg ttttaaatc cagtaaaggt tatggttaca tttcaa	2036

<210> 8

<211> 2364

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 8

ES 2 694 592 T3

gtcatcgctg tctggaacag cgatgactcg atcgcgagat caggaagggtg gccgagtgtg	60
tcgccgcggc catcaggcac ttctccttcc tgcccttgta tgaagaagga tgtgtttgct	120
tccccttggtg ccatgattgt aaatttcctg aggccctcctc agccctgcag aactgggggtt	180
atagccatgt gactgatctt cgtccaagaa tatgtaaaga aaaagtgttg agttggcttt	240
tagggctaga gcaatgtatc ttaggctcac ttaaggaagc tgtagagatg agcccaagga	300
gggaaaccag aagagcccc caggctcacc agttgtttgt tggctcccta caaacatgtc	360
attcaagtgg ctaatcttac aacagcacia attcatctaa ccagaaagag aagaggaggc	420
tccaaaggca cttgactact gagcatcacc ctggacgtgt acaagtctgc gtccttattg	480
ttttcttcat tgggccgaac tttctggctc tcatccaaca gctcttctat cacgtgttcg	540
aaagtgtcag ccaatgatgt caagcctctt gaacctgcct tgggccatt cacgctctcc	600
agagtcccat gggtcgcac acctggagat actctattat agcaaagaag aaagataatt	660
tcattgagcc atcctgtttt acagtattga attattacca caaggtacca accatatatg	720
catacttaat agggatattt gtcaaaaacta tgcatgaagg tcatttgttt gagatgtcag	780
aacattttcc cgtgagaaga tctcattggg cattgaaaca gaaccacatg ctcttcagac	840

ES 2 694 592 T3

cagcaaccgc gactaccaa tactcctctg tcaactctac ttgagtaaga acgctttcaa 900
 ttaaggccta agtgtcaaca tgcctttaa aaaaatcgtg gtgacacaaa atctttcttt 960
 ttagcaccca acagaatccc ttcaaagcct cgtggtctga caccctatgc tacgtgactt 1020
 gtgaccatc catttgtcat gttcttcggg aatgtggcta aggggctaag atgtgacttg 1080
 aaaagaaagg tagaacaaga tcatotcaaa tttattatca aggaatagtt cagaaaacga 1140
 cttcagacca cagagacagc agaacagatg gtccggcatg gatagagcat cagacactca 1200
 cagactgtgc caacaagagc catcgagtca aaacagccaa aggaaggagg gtcattggaat 1260
 gggttctctc acaccaaact gatgcccaga ggcctcagc atgaataaca aaggcaacca 1320
 gaccacaag ccatactgag tggatacaaa acctatacct aggctgacat cccaaatgtg 1380
 tgtggcaagt tagatgatga tggcacaaaa gacagaacac cttgcttctg gccattgtca 1440
 gctcttgaa gagagcacac ttttagagga gcagctgcaa ggagcctgag aacaaaactg 1500
 gaaatgtctg ttatgaaagc cttcacagga aattctgcaa gtggcaacgt gggccattc 1560
 cgtgtgtgtc actagagctg gcgcaagccc atggccatgg tgaggcagcg tttccactgg 1620
 aactaatctg atacctgcac cagctcttgc aactgtgcag tgttcccact gcaaactacg 1680
 gatggggtaa aagactgctc acctcctatt tctcatctaa tctcacacac tctgtttgat 1740
 gaggctatgg agaaacaggt cttctcatac actaaagggt ggagtacaaa caattcaagc 1800
 cctgtgcagg acaattaggg aatacctatc aaaattatac atgatttttc ctgctgacct 1860
 agcaattcca cttctgggaa taattgacag atataggtgc atatgtacaa aatgatggaa 1920
 agctctctgg tatatattag taagtgataa aacaagggtg aaaatagtgt atatatggct 1980
 actacctttt gttttaaaaa tgggggaaaa tgggtggagct tgcggtgagc cgagatcgtg 2040
 cactgcact ccagcctggg cgacagagcg agactccgtc tcaaaaaaaaa aacagggtgg 2100
 ggtggggggg aaataatagt acatactcat atttacctgt atctatataa aacacactat 2160
 caaggattca caagaaacta atacaaatga tcacctata gatggtatgt attgggggat 2220
 actgaggtga gcagggtata agtggggcaa gacttttcag tgtaaacttc ttttaaattt 2280
 tttttgatt tttgaataat gtaaattaac tgtcaataa ttaaattaa aataaccaat 2340
 ttattaacaa aaaaaaaaaa aaaa 2364

<210> 9

<211> 3136

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

ES 2 694 592 T3

<400> 9

ctgcataaag atttcttcac agggtccttt aaaactgtct atttctaaga ggtcccttcc 60

actacaggta aaaggaaatt ccctctaccc tagggcccct caggatccct tcctctctca 120

ES 2 694 592 T3

cacgtttctt cgactgctcc tgatttaage attcagctgg ccacgcaacg caagaagcaa 180
taagaacaca aaaaccctac cctgttctc ctctatccgt ggcctttgcc accacctcca 240
caacctagtt cagattcctc ttcttttctc aagggaacgt ctaaagctct caagtccgtt 300
ttggcagggc gattttgtaa gtctgaaaca tttcagtggt tctctcgatc tcaggcagct 360
caaaagaaaa gatctgctgg ctgctggaag gtgcattaga aacctgctgc taccttgagc 420
cctgggctga gcatatgctc cggaaacttg cttctctcca acatcctgca cctcagggtt 480
gcacgctctg gttcccaaac ccccgccgcg tggcttatgc aaatcactta ggtacatgca 540
aaagtatccc ttctcccgga gcgccattgg cccggggagg tctcgagctc attactatgc 600
agagaggaga gccgccattg gccaaagagga ggaccagagg ggcgtgtttc tcgggcaaat 660
tggatctcct aaattggatg acctgggctg aaagacaact taaagacccc cagaaaactc 720
tggttttata gataagaaat ctgaggctcg agagagagtg tgttctgccc aacatcatca 780
cggaacagct cctgggctcc tggctcctaa tctgatcgcg agatcaggaa ggtggccgag 840
tgtgtcgccg cggccatcag gcactttctc ttctgcccct tgtatgaaga aggatgtgtt 900
tgcttcccct tgtgccatga ttgtaaattt cctgaggcct cctcagccct gcagaactgg 960
ggttatagcc atgtgactga tcttcgtcca agaatatgta aagaaaaagt gttgagttgg 1020
cttttagggc tagagcaatg tatcttaggc tcacttaagg aagctgtaga gatgagccca 1080
aggagggaaa ccagaagagc cccccaggct caccagttgt ttggtggctc cctacaaaca 1140
tgtcattcaa gtggctaata ttacaacagc acaaatcat ctaaccagaa agagaagagg 1200
aggctccaaa ggcacttgac tactgagcat caccctggac gtgtacaagt ctgctcctt 1260
attgttttct tcattgggcc gaactttctg gtccctcatcc aacagctctt ctatcacgtg 1320
ttcgaaagtg tcagccaatg atgtcaagcc tcttgaacct gccttgggcc cattcaagct 1380
ctccagagtc ccatgggtcc gcacacctgg agatacteta ttatagcaa gaagaaagat 1440
aatttcattg agccatcctg ttttacagta ttgaattatt accacaaggt accaaccata 1500
tatgcatact taatagggtg ttttgtaaaa actatgcatg aaggtcattt gtttgagatg 1560
tcagaacatt ttcccgtgag aagatctcat tgggcattga aacagaacca catgctcttc 1620
agaccagcaa ccgcgactac caaatactcc tctgtcaact ctacttgagt aagaacgctt 1680
tcaattaagg cctaagtgtc aacatgcott taaaaaaaaat cgtggtgaca caaaatcttt 1740
ctttttagca cccaacagaa tcccttcaaa gcctcgtggt ctgacaccct atgctacgtg 1800
actgtgacc catccatttg tcatgttctt cgggaatgtg gctaaggggc taagatgtga 1860
cttgaaaaga aaggtagaac aagatcatct caaatattt atcaaggaat agttcagaaa 1920
acgacttcag accacagaga cagcagaaca gatggtccgg catggataga gcatcagaca 1980
ctcacagact gtgccaacaa gagccatcga gtcaaaacag ccaaaggaag gagggtcatg 2040

ES 2 694 592 T3

gaatgggttc tctcacacca aactgatgcc cagaggccct cagcatgaat aacaaaggca	2100
accagaccca caagccatac tgagtggata caaacctat acctaggctg acatcccaaa	2160
tgtgtgtggc aagttagatg atgatggcac aaaagacaga acaccttgct tctggccatt	2220
gtcagctctt ggaagagagc acacttttag aggagcagct gcaaggagcc tgagaacaaa	2280
actggaaatg tctgttatga aagccttcac aggaaattct gcaagtggca acgtgggtcc	2340
attccgtgtg tgtcactaga gctggcgcaa gcccatggcc atggtgaggc agcgtttcca	2400
ctggaactaa tctgatacct gcaccagctc ttgcaactgt gcagtgttcc cactgcaaac	2460
tacggatggg gtaaaagact gctcacctcc tattttctcat ctaatctcac acactctggt	2520
tgatgaggct atggagaaac aggtcttctc atacactaaa ggtgggagta caaacaattc	2580
aagccctgtg caggacaatt aggcaatacc tatcaaaatt atacatgatt tttcctgctg	2640
accagcaat tccacttctg ggaataattg acagatatag gtgcatatgt acaaaatgat	2700
ggaaagctct ctggtatata ttagtaagtg ataaaacaag gtgtaaaata gtgtatatat	2760
ggctactacc ttttgtttta aaaatggggg aaaatggtgg agcttgcggt gagccgagat	2820
cgtgccactg cactccagcc tgggcgacag agcgagactc cgtctcaaaa aaaaaacagg	2880
gtggggtggg ggggaaataa tagtacatac tcatatttac ctgtatctat ataaaacaca	2940
ctatcaagga ttcacaagaa actaatacaa atgatcacct tatagatggt atgtattggg	3000
ggatactgag gtgagcaggg tataagtggg gcaagacttt tcagtgtaaa cttcttttaa	3060
atthttatthtt gattthttgaa taatgtaaat taactgtcaa ataattaaat taaaaataac	3120
caatttatta acaaaa	3136

<210> 10

<211> 906

5 <212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 10

ES 2 694 592 T3

cgctgtctca atataatcta tacaacataa atccactatc ttcccctttt aatggtcagt	60
gtacatacac aggaagtgtc tateccttatg aatcgccagc caattctctt tttgctatcc	120
atagtaaggg cccgaacata cgattgggta gttcggcatt gcgagttcca gtgccttttg	180
tctatgcccc tgcagccttc cttggtgtaa cccatgggat tacacttggg ctcgtagaaa	240
tactgcttca gttggccttt ggataccggg actttctcta ggactgtgac cgtcccgcc	300
gacatgtcca ctgcagtctt tttatctgcc gctgtgacct actcgctaat actgtcacac	360
acgctcagct ccccacggcg ggcagggctg gagtggcgcc gaaccctcat agacatgttt	420
gcggcatcca ggtaattttt gtattcctcc agcagaaaga gtagaggagg ctccaaaggc	480
acttgactgc tgagcatcac ccgggaagtg tacaagtccg cgtccttatg gttttcttcg	540
ttgggccgaa ccttctggtc ctcatccagc agctcttcga tgacgtgctc aaaagtgtca	600
gccagtgatg tcgtcgtcag acctctcgaa cctgccctgg gccattcac gctctccaga	660
gtcccatggg tccgcacacc tgggtaggcc aagttgcctt gtccgtggac gtttacttct	720
ttcatgggcg ccgccttcat gcaaccgaag tatgaaataa ccatagtaag gaaaaggatg	780
gtcatcactc ttctcacctg gtggaactgt ggggaaggaag cagagacaga cacagaacag	840
gttagaactt ctttctcggg gacagcatgt ggcccatctg cttcaataat ttaatttaa	900
aaaaaa	906

5 <210> 11
 <211> 992
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

10 <400> 11

ES 2 694 592 T3

cgctgtctca atataatcta tacaacataa atccactatc ttcccctttt aatggtcagt 60
gtacatacac aggaagtgtc tatecctatg aatcgccagc caattctctt tttgctatcc 120
atagtaaggg cccgaacata cgattgggta gttcggcatt gcgagttcca gtgccttttg 180
tctatgcccc tgcagccttc cttgggtgtaa cccatgggat tacacttggg ctcgtagaaa 240
tactgcttca gttggccttt ggataccggg actttctcta ggactgtgac cgtcccgcc 300
gacatgtcca ctgcagtctt tttatctgcc gctgtgacct actcgctaat actgtcacac 360
acgctcagct ccccacggcg ggcagggctg gagtggcgcc gaaccctcat agacatgttt 420
gcgggcatcca ggtaattttt gtattcctcc agcagaaaga gtagaggagg ctccaaaggc 480
acttgactgc tgagcatcac ccgggaagtg tacaagtccg cgtccttatg gttttcttctg 540
ttgggccgaa ccttctggtc ctcatccagc agctcttcga tgacgtgctc aaaagtgtca 600
gccagtgatg tcgtcgtcag acctctogaa cctgccttgg gccattcac gctctccaga 660
gtcccatggg tccgcacacc tgggtaggcc aagttgcctt gtccgtggac gtttacttct 720
ttcatgggcy ccgccttcat gcaaccgaag tatgaaataa ccatagtaag gaaaaggatg 780
gtcatcactc ttctcacctg gtggaactgt gggaaaggaag cagagacaga cacagaacag 840
gatgggttggc tccagcctca ttccttctgt cccagcttct gaagttctgg gaatacaaca 900
tgtaccatca tgccaagctc tactttttga aatcatggct cctgatatgt tgggcagccc 960
tgttgtgctt tgaagataaa atgctccaca aa 992

<210> 12

<211> 43

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido antisentido

10

<400> 12

ararcrar arcrarcr urgrurgr argrcrur grg 43

<210> 13

15 <211> 44

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Oligonucleótido antisentido

<400> 13

rurgrargr rcrurargr rarurarcr rururgrcu rcr 44

25 <210> 14

<211> 44

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido

<400> 14
rgrurgcru rgrurgru rarargraru rurargrcrcrc 44

10 <210> 15
<211> 44
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido

<400> 15
20 rararurgra rcrarurgru rururgrura rgrgrargrcrc 44

<210> 16
<211> 23
<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido

30 <400> 16
cmcmagmgmu gmumgmcgmg mac 23

<210> 17
<211> 23

35 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido

40 <400> 17
cmcmaumgmg gmamcmucmu mgg 23

<210> 18
45 <211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
50 <223> Oligonucleótido antisentido

<400> 18
amgmagmcmg uMgmamaumg mgg 23

55 <210> 19
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60 <220>

	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 19	
5	cmcmcamamg gmcmmamggmu muc	23
	<210> 20	
	<211> 23	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 20	
15	amamgamumg cmumumgamc mau	23
	<210> 21	
	<211> 23	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
25	<400> 21	
	cmamuumgmg cmumgmacma mcu	23
	<210> 22	
	<211> 23	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
35	<400> 22	
	umumcgmama cmamcmgumg mau	23
	<210> 23	
40	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 23	
	amgmaamgma gmcmmumgumu mgg	23
50	<210> 24	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
55	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 24	
60	amumgamgmg amcmcmagma maa	23

	<210> 25	
	<211> 23	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
10	<400> 25	
	gmumucmgmg cmcmcaamu mga	23
	<210> 26	
	<211> 23	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
20	<400> 26	
	amgmaamama cmamamuama mgg	23
	<210> 27	
25	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 27	
	amcmgcmamg amcmumugmu mac	23
35	<210> 28	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 28	
	amcmgumcmc amgmgmgumg mau	23
45	<210> 29	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 29	
55	gmcmucmamg uMamgmucma mag	23
	<210> 30	
	<211> 23	
60	<212> ADN	

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido

5 <400> 30
umgmccmumu uMgmgmagmc mcu 23

<210> 31
10 <211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
15 <223> Oligonucleótido antisentido

<400> 31
cmcmucmumu cmumcmumu mcu 23

20 <210> 32
<211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido

<400> 32
cccgtatcc aaaggc 16

30 <210> 33
<211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido

<400> 33
40 gtattagcga gtgggt 16

<210> 34
<211> 16
<212> ADN
45 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido

50 <400> 34
gtctatgagg gttcgg 16

<210> 35
<211> 16
55 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido

60

<400> 35
 cctcctctac tctttc 16

<210> 36
 5 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 10 <223> Oligonucleótido antisentido

<400> 36
 gccaggttcg agaggt 16

15 <210> 37
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

<400> 37
 ttcctccca cagttc 16

25 <210> 38
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

<400> 38
 35 cggttgcatg aaggcg 16

<210> 39
 <211> 16
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

45 <400> 39
 tggctggcga ttcata 16

<210> 40
 <211> 16
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido antisentido
 55 caacatatca ggagcc 16

<210> 41
 <211> 16
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia artificial

	<220>		
	<223> Oligonucleótido antisentido		
5	<400> 41		
	tgtattccca gaactt	16	
	<210> 42		
	<211> 56		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido antisentido		
15	<400> 42		
	rurarurgrg rururaruru rurcrarura rcrururcrg rgrururgrc rarurg		56
	<210> 43		
20	<211> 56		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
25	<223> Oligonucleótido antisentido		
	<400> 43		
	rargrararg rurarararc rgrurrcra rcrgrgrarc rarargrc rararc		56
30	<210> 44		
	<211> 56		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
35	<220>		
	<223> Oligonucleótido antisentido		
	<400> 44		
	rarururrc rurarcrga rgrarcra rargrurgru rararurrc rcraru		56
40	<210> 45		
	<211> 56		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<223> Oligonucleótido antisentido		
	<400> 45		
50	rurarargrg rarcrgcrg rgrarcruu rgrurarcra rcrururrc rgrgrg		56
	<211> 56		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
55	<220>		
	<223> Oligonucleótido antisentido		
	<400> 46		
	rargrarara rgrararg rururcra rarcrcrg rururcrg rurgru		56
60			

<210> 47
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 47
 10 gatttcagag ccgcag 16

 <210> 48
 <211> 16
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

 20 <400> 48
 gacacatcca tcccag 16

 <210> 49
 <211> 16
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido
 30
 <400> 49
 cctcgtcatg tctgtg 16

 <210> 50
 35 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 40 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 50
 ctggaattgt ttgta 15

 45 <210> 51
 <211> 15
 <212> ADN

 <220>
 50 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 51
 agttgcaaga gttgg 15

 55 <210> 52
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 60 <220>

<223> Oligonucleótido antisentido

<400> 52
atctgttctg ctgtc 15

5

<210> 53
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido

<400> 53
catattcttg gacga 15

15

<210> 54
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido

<400> 54
tgtgctgttg taaga 15

25

<210> 55
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido

<400> 55
tgacagagga gtatt 15

35

<210> 56
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40

<220>
<223> Complemento inverso del oligonucleótido antisentido, SEQ ID NO: 11

<400> 56
rgrgrcrurc rarcrcrarg rururgruru rurgruru 38

50

<210> 57
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55

<220>
<223> Complemento inverso del oligonucleótido antisentido, SEQ ID NO: 12

<400> 57
rgrcrararu rgrurarurc rururargrg rcrurcra 38

60

ES 2 694 592 T3

<210> 58
<211> 38
<212> ADN
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Complemento inverso del oligonucleótido antisentido, SEQ ID NO: 13

10 <400> 58
rgrcrurara rurcrurura rcrararcra rgrcrarc 38

<210> 59
<211> 38
15 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Complemento inverso del oligonucleótido antisentido, SEQ ID NO: 14

20 <400> 59
rurrcrcru rarcrarara rcrarurgu rcraruru 38

<210> 60
25 <211> 50
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
30 <223> Complemento inverso del oligonucleótido antisentido, SEQ ID NO: 41

<400> 60
rgrcrarc rcrgrararg rurarurgra rararurara rcrarurara 50

35 <210> 61
<211> 50
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Complemento inverso del oligonucleótido antisentido, SEQ ID NO: 42

<400> 61

45 rgrcrcruru rgrurrcrg rurgrgrarc rgrururura rcrurrcru 50

<210> 62
<211> 50
<212> ADN
50 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Complemento inverso del oligonucleótido antisentido, SEQ ID NO: 43

55 <400> 62
rgrgraruru rarcrarcru rurgrgrurc rurrcgrura rgrarararu 50

<210> 63
<211> 50
60 <212> ADN

ES 2 694 592 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Complemento inverso del oligonucleótido antisentido, SEQ ID NO: 44

5

<400> 63

rgrgrararg rurgrurarc rarargrurc rcrgrcrgru rrcrurura 50

<210> 64

10 <211> 50

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Complemento inverso del oligonucleótido antisentido, SEQ ID NO: 45

<400> 64

rcrargrara rcrargrgru rurargrara rcrurururc rurururcru 50

20 <210> 65

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Secuencia artificial

<400> 65

gcacacctgg agatactcta ttata 25

30

<210> 66

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Secuencia artificial

<400> 66

40 cctgcagaat ggctggaat taaa 25

REIVINDICACIONES

1. Un oligonucleótido que se orienta a un transcrito antisentido natural de un factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) para uso como un compuesto terapéutico, donde el oligonucleótido aumenta la expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), y donde el transcrito antisentido natural tiene la secuencia de ácido nucleico como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 3-8, y con la condición de que los oligonucleótidos que tienen las SEQ ID NO: 50-55 se excluyen.
2. Un oligonucleótido antisentido que se orienta a un transcrito antisentido natural de factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), para uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado al factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), donde dicho oligonucleótido aumenta la expresión de un factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), donde la enfermedad o trastorno se selecciona de entre el grupo consistente en enfermedad o trastorno neurootológico, pérdida de audición, síndrome de Rett, enfermedad de Alzheimer, esquizofrenia, enfermedad de Huntington, lesión de médula espinal, depresión, deterioro cognitivo, un trastorno bipolar, síndrome de WAGR y obesidad, donde el transcrito antisentido natural tiene la secuencia de ácido nucleico como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 3-8, y con la condición de que los oligonucleótidos que tienen las SEQ ID NO: 50-55 se excluyen.
3. Uso de un oligonucleótido antisentido que se orienta a un transcrito antisentido natural del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) para la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado al factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), donde dicho oligonucleótido aumenta la expresión de un factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), donde la enfermedad o trastorno se selecciona de entre el grupo consistente en enfermedad o trastorno neurootológico, pérdida de audición, síndrome de Rett, enfermedad de Alzheimer, esquizofrenia, enfermedad de Huntington, lesión de médula espinal, depresión, deterioro cognitivo, un trastorno bipolar, síndrome de WAGR y obesidad, donde el transcrito antisentido natural tiene la secuencia de ácido nucleico como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 3-8, y con la condición de que los oligonucleótidos que tienen las SEQ ID NO: 50-55 se excluyen.
4. Un procedimiento *in vitro* de aumento de la expresión de un factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en células o tejidos de un paciente que comprende: poner en contacto dichas células o tejidos con un oligonucleótido antisentido que se orienta a un transcrito antisentido natural de factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF); aumentando así la expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), donde el transcrito antisentido natural tiene la secuencia de ácido nucleico como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 3-8, y con la condición de que los oligonucleótidos que tienen las SEQ ID NO: 50-55 se excluyen.
5. El oligonucleótido antisentido para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, o el uso de acuerdo con la reivindicación 3, o el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, donde el oligonucleótido antisentido es monocatenario.
6. El oligonucleótido antisentido para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, o el uso de acuerdo con la reivindicación 3, o el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, donde el oligonucleótido antisentido es un compuesto de siARN.
7. El oligonucleótido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 5 o 6, o el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3, 5 o 6, o el procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, donde el oligonucleótido antisentido comprende una de las SEQ ID NO: 16, 17, 19, 23, 24, 27, 29 y 30.
8. El oligonucleótido antisentido para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 5 a 7, o el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 o 5 a 7 o el procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, donde la expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) aumenta al menos un 10 %.
9. El oligonucleótido antisentido para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 5 a 8, o el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 o 5 a 8, o el procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, donde el oligonucleótido comprende, además, una o más modificaciones que comprenden:
- a. al menos un grupo de enlace internucleosídico modificado seleccionado de entre: un fosforotioato, alquifosfonato, fosforditioato, alquifosfotioato, fosforamidato, carbamato, carbonato, triéster de fosfato, acetamidato, éster

carboximetílico, y combinaciones de los mismos;

b. al menos un nucleótido modificado seleccionado de entre: un ácido peptidonucleico (APN), un ácido nucleico bloqueado (ANB), un ácido arabinonucleico, un análogo, un derivado, y combinaciones de los mismos; o

5

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'-fluoro, 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.

10 10. Un oligonucleótido antisentido que tiene los rasgos de un oligonucleótido antisentido definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

11. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con la reivindicación 10, donde el oligonucleótido antisentido tiene una longitud de entre 10 y 30 nucleótidos.

15

12. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con la reivindicación 10 o la reivindicación 11, donde el oligonucleótido antisentido tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con un complemento del transcrito antisentido natural de factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) que tiene una secuencia seleccionada de entre las SEQ ID NO: 3-8.

20

13. Una composición farmacéutica que comprende al menos un oligonucleótido antisentido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

FIG. 1

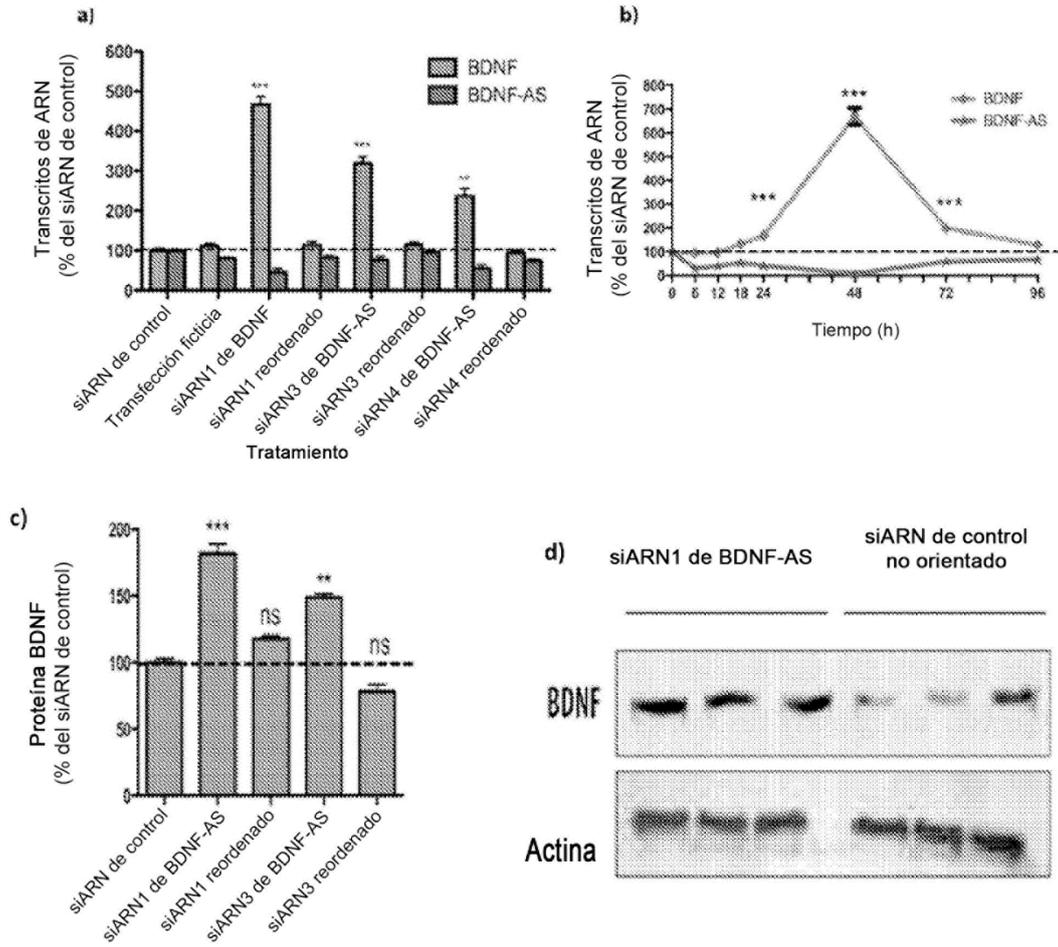


FIG. 1
CON'T

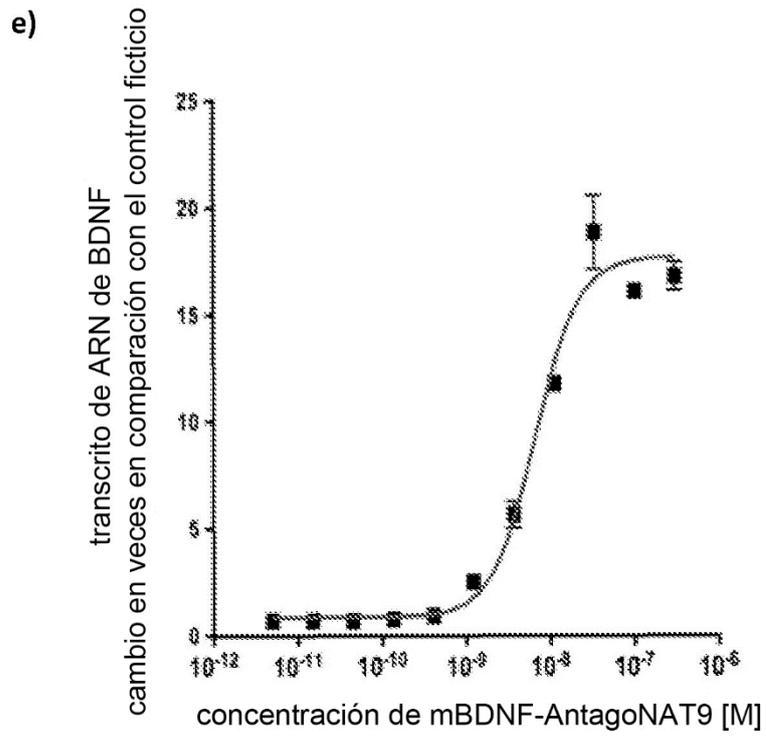


FIG. 2

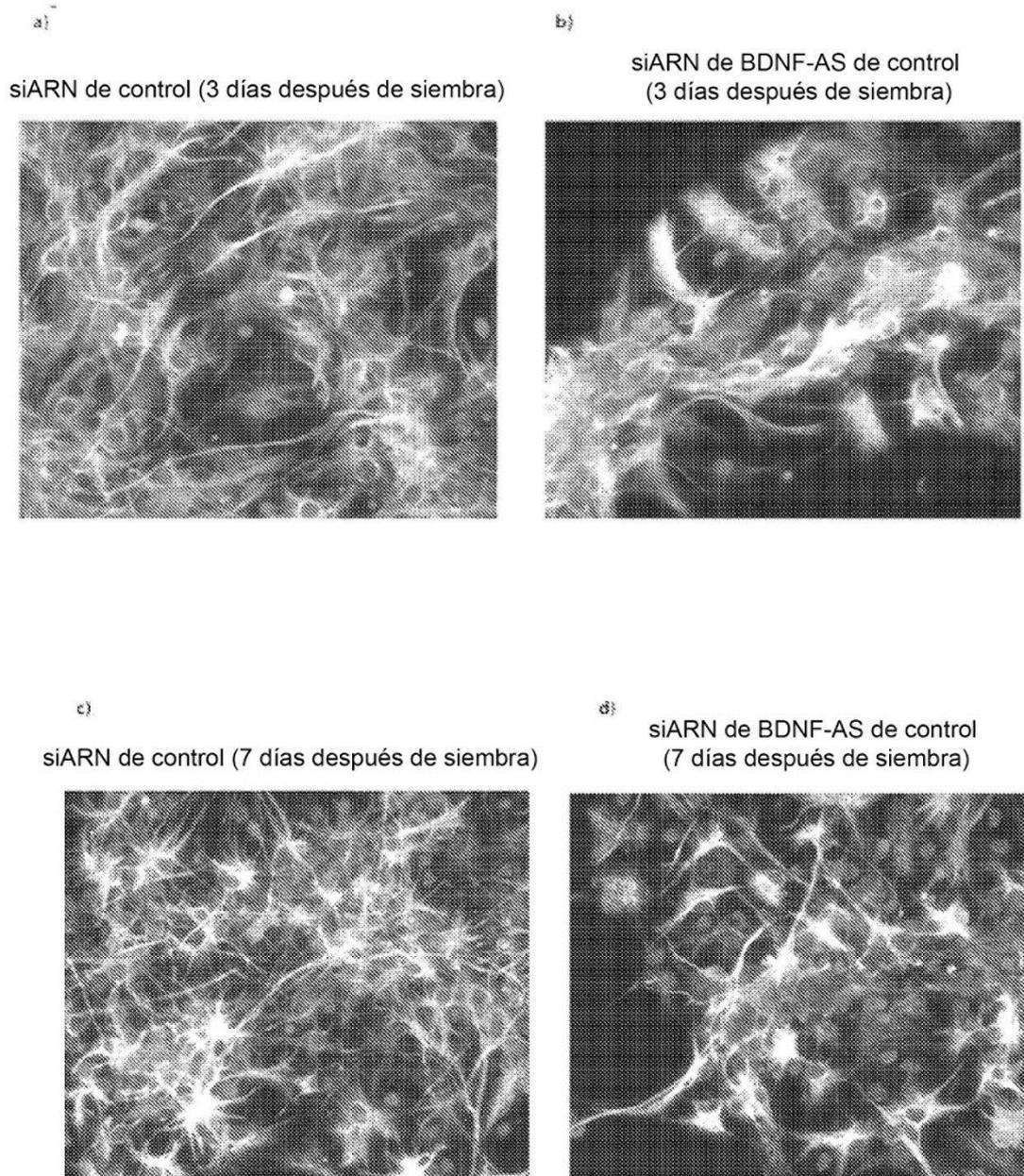


FIG. 3

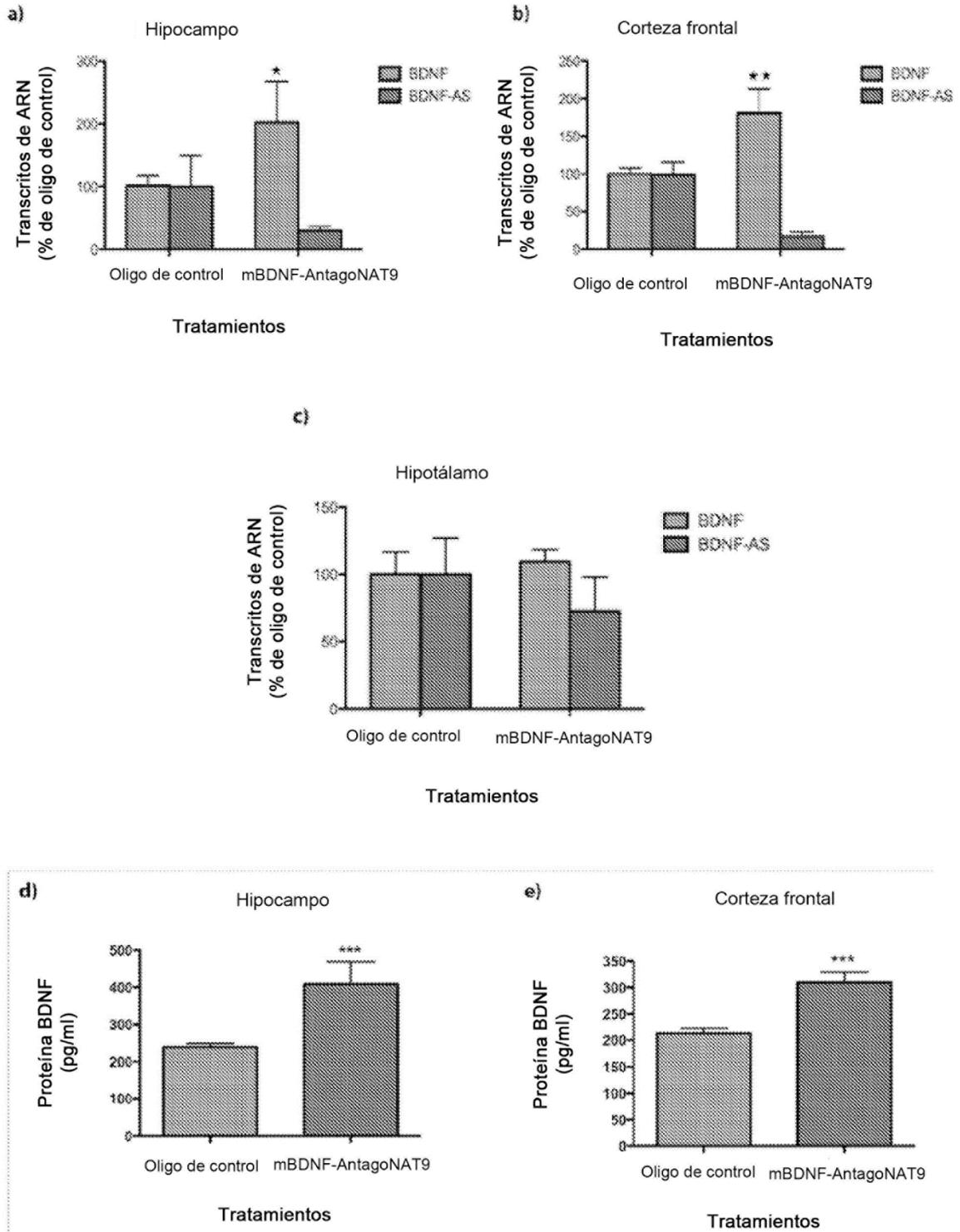


FIG. 4

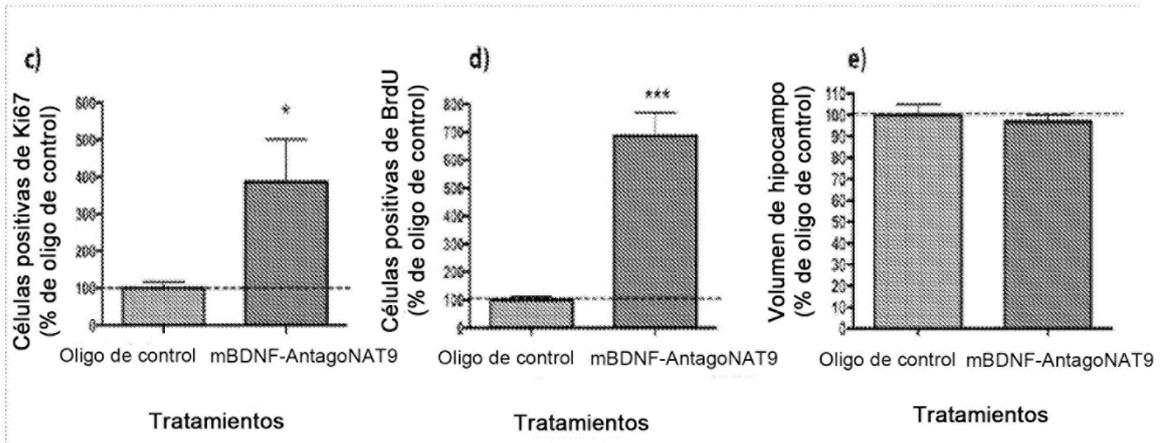
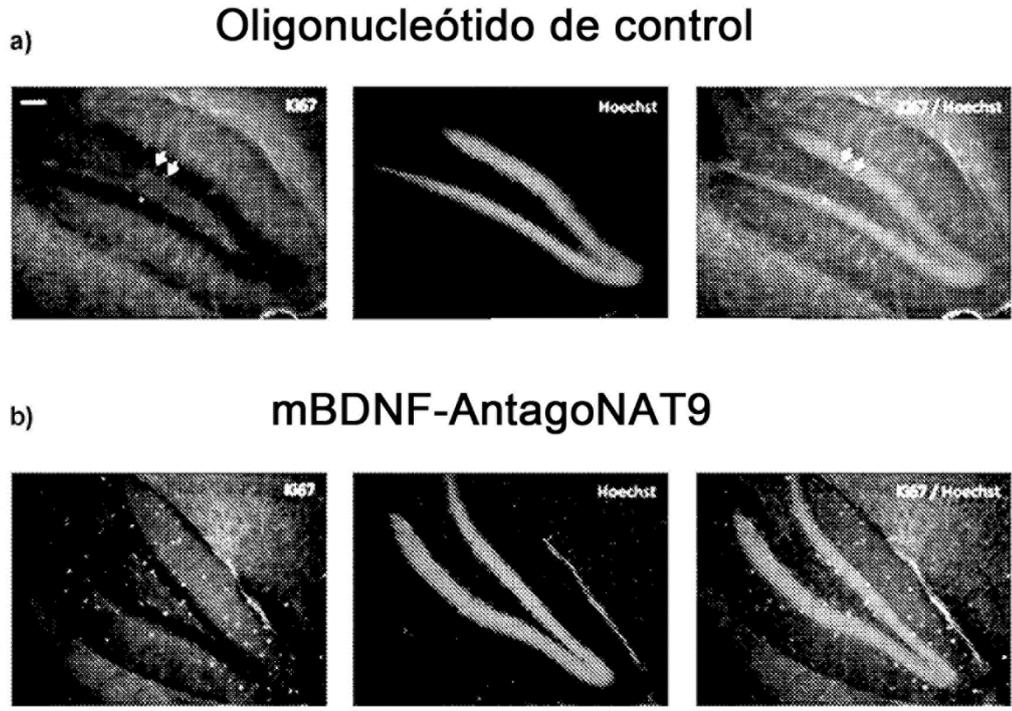


FIG. 5

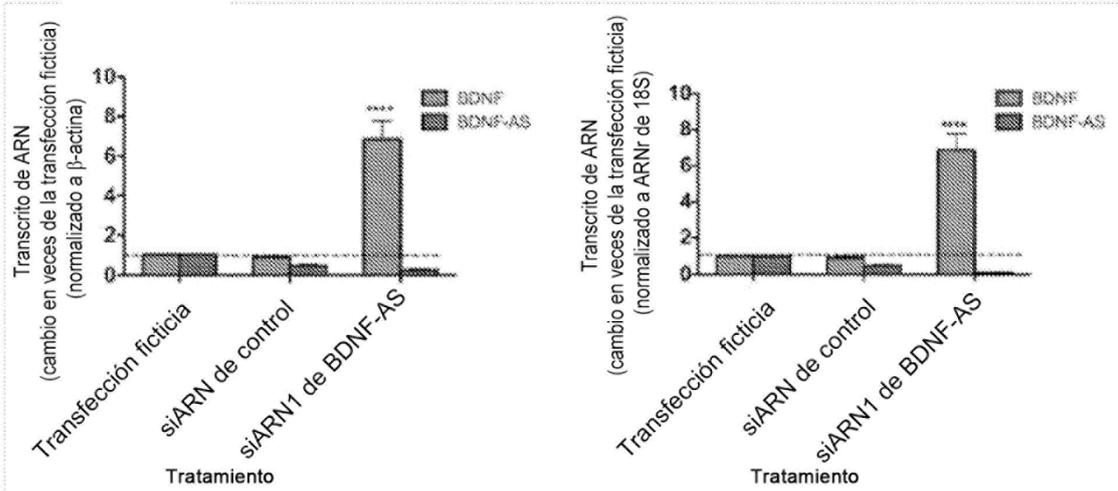


FIG. 6

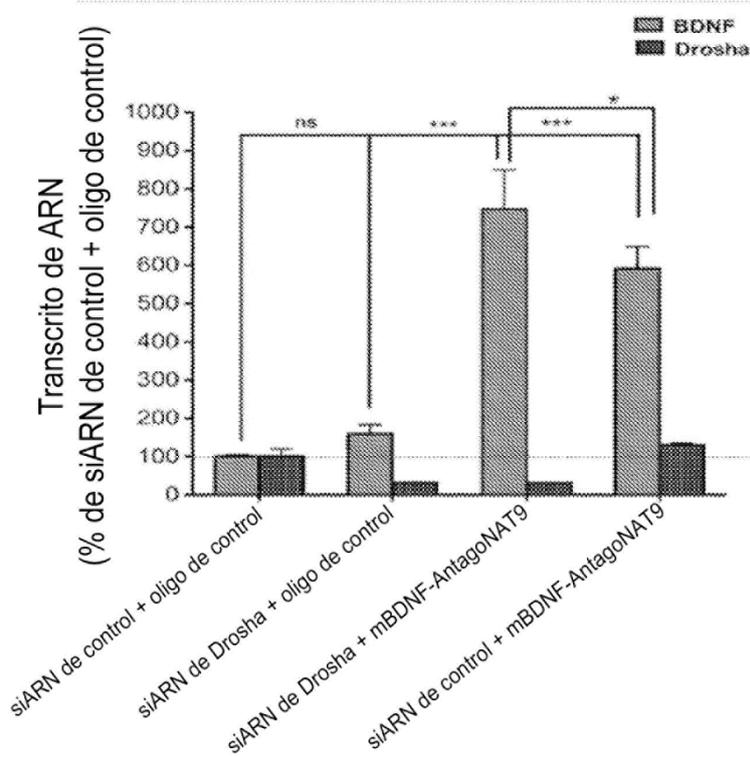


FIG. 7

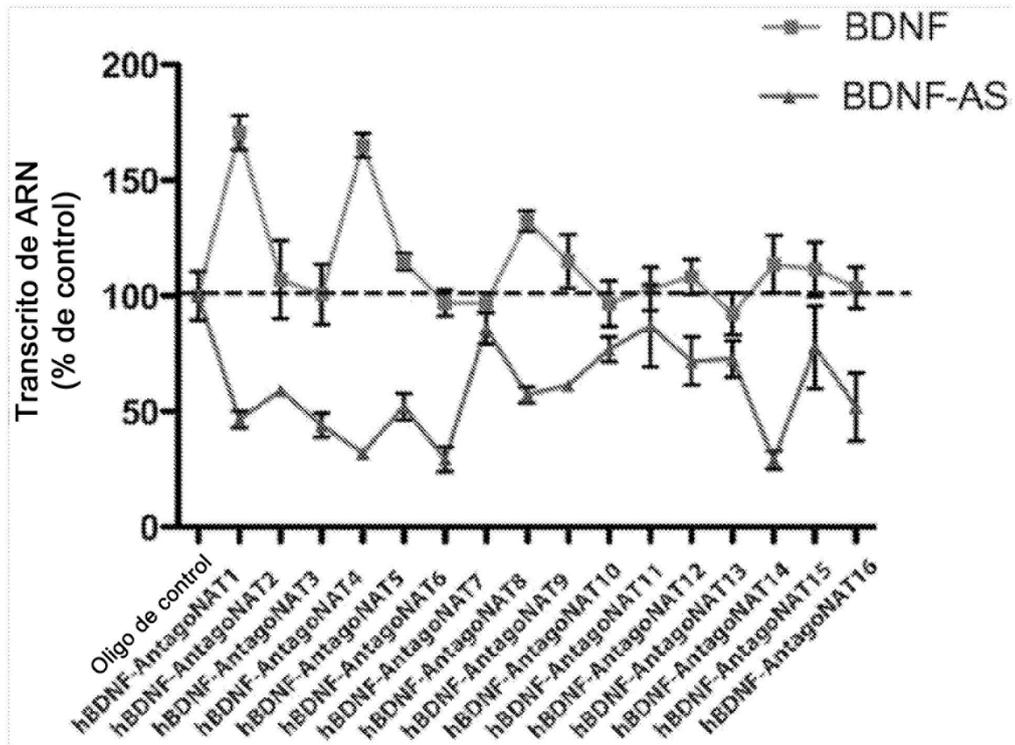


FIG. 8

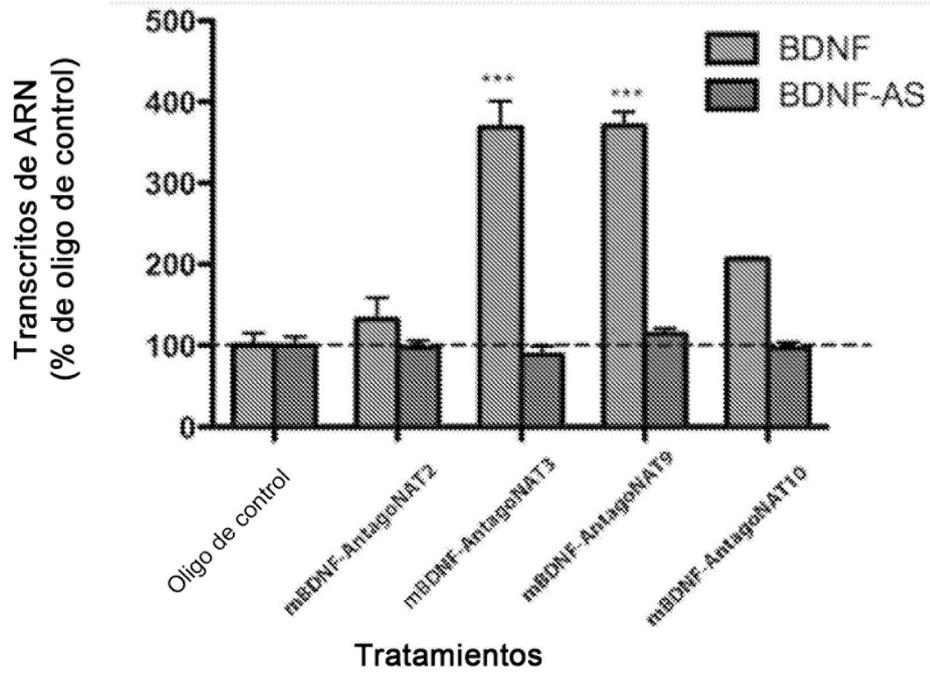


FIG. 9

