

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 987 225**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)
A61K 31/7088 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.06.2013 E 20182895 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2024 EP 3770258**

(54) Título: **Modulación de la expresión de UBE3A-ATS**

(30) Prioridad:

**25.06.2012 US 201261664083 P
18.12.2012 US 201261738959 P
10.01.2013 US 201361750939 P
23.01.2013 US 201361755617 P
05.03.2013 US 201361772925 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.11.2024

(73) Titular/es:

**IONIS PHARMACEUTICALS, INC. (50.0%)
2855 Gazelle Court
Carlsbad, CA 92010, US y
Baylor College of Medicine (50.0%)**

(72) Inventor/es:

**RIGO, FRANK;
WARD, AMANDA;
BEAUDET, ARTHUR L. y
MENG, LINYAN**

(74) Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

Observaciones:

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

ES 2 987 225 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

Modulación de la expresión de UBE3A-ATS

5 **Campo**

En la presente se describen métodos y compuestos para inhibir UBE3A-ATS, el transcripto antisentido endógeno de proteína E3A ubiquitina ligasa (UBE3A). Tales métodos y compuestos son útiles para inducir la expresión paterna de UBE3A en células y animales.

10

Antecedentes

El UBE3A se expresa maternalmente en neuronas y codifica una E3 ubiquitina ligasa llamada E6-AP. Se ha identificado un transcripto antisentido endógeno de UBE3A, denominado UBE3A-ATS, en humanos y ratones. UBE3A-ATS funciona para suprimir la expresión paterna de Ube3a. (Meng et al., Hum Mol Genet. 21: 3001 - 12, 2012).

20 El síndrome de Angelman (AS) es un trastorno del neurodesarrollo atribuido principalmente a la deficiencia de *UBE3A* materna en 15q11.2, mientras que el UBE3A paterno está sujeto a impronta genómica y silenciamiento en las neuronas. Los pacientes del síndrome de Angelman sufren retraso en el desarrollo, deterioro del habla y convulsiones. Las terapias para el síndrome de Angelman son limitadas y se centran principalmente en el tratamiento sintomático. (Williams, CA y col., Genet. Med., 12: 385 - 395, 2010).

25 Recientemente, se encontró que inhibidores de la topoisomerasa utilizados actualmente en el tratamiento del cáncer "activaron" la expresión paterna de Ube3a tanto en un sistema de cultivo neuronal como en los ratones. (Huang, HS y col., Nature, 481: 185 - 189, 2012; WO2012/064806). Sin embargo, el mecanismo exacto de activación de la expresión paterna de Ube3a sigue siendo desconocida y los inhibidores de la topoisomerasa están plagados de problemas de seguridad, ya que se sabe que son inespecíficos y capaces de inducir daño en el ADN, como roturas simples y de doble hebra.

30 La WO2012012467 A2 analiza el uso de oligonucleótidos antisentido para reducir la expresión de ARN retenidos nucleares en tejidos que tienen una baja absorción de oligonucleótidos antisentido.

35 **Resumen**

La presente invención se define en el conjunto de reivindicaciones adjunto.

40 En particular la presente invención proporciona un oligonucleótido modificado de cadena sencilla que consiste de 12 a 30 nucleósidos enlazados para su uso en el tratamiento del síndrome de Angelman, en donde la secuencia de nucleobases del oligonucleótido modificado es por lo menos un 85% complementaria en toda su longitud a una región de igual longitud de una secuencia de ácido nucleico de UBE3A-ATS que tiene la secuencia de nucleobases de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2; en donde el oligonucleótido modificado se dirige una región de UBE3A-ATS que está inmediatamente en sentido descendente del ARNsno de HBII-52 o MBII-52 y en sentido ascendente de la región de UBE3A-ATS complementaria al extremo 3' del pre-ARNm de UBE3A.

45 Varias realizaciones proporcionadas en la presente memoria se refieren al descubrimiento de que los compuestos antisentido dirigidos a UBE3A-ATS inducen la expresión paterna de UBE3A. En la presente se describen compuestos para inducir la expresión paterna de UBE3A usando compuestos antisentido dirigidos a UBE3A-ATS dentro de un punto caliente inesperado localizado en una región de UBE3A-ATS aguas arriba de la región que se solapa con UBE3A. El punto de acceso está ubicado entre una región aguas arriba de UBE3A-ATS que incluye la secuencia de al menos un ARN nucleolar pequeño (ARNsn), como HBII-52 o MBII-52, y una región aguas abajo de UBE3A-ATS que es complementario a UBE3A (es decir, antisentido para UBE3A). Antes del presente descubrimiento, era incierto si UBE3A-ATS podría dirigirse con éxito con compuestos antisentido e incluso no está claro dónde atacar dentro de UBE3A-ATS.

55 El descubrimiento de una región de punto de acceso de UBE3A-ATS descrita aquí fue impredecible en vista de varios informes que enseñan que la expresión de transcripción de sentido puede regularse positivamente dirigiendo transcriptos antisentido a regiones que se solapan o no solapan con las transcripciones de sentido. Por ejemplo, por un lado se ha demostrado que los compuestos antisentido diseñados para una región del transcripto antisentido natural BDNF-AS que se solapa con BDNF aumentan los niveles de ARNm de BDNF. (Madharessi et al., Nat Biotechnol., 30: 453 - 459, 2012). Se han informado hallazgos similares con transcriptos antisentido p21 y oct4 (Morris et al., PLoS Genet. 4:e1000258, 2008, Hawkins y Morris, Transcription 1: 165-175, 2010). Por otra parte, se ha demostrado que los compuestos antisentido que se dirigen a transcriptos antisentido naturales en regiones no solapantes con transcriptos con sentido pueden regular positivamente la expresión del transcripto de sentido. (Faghhihi y otros, PLoS ONE 5: e13177, 2010).

Descripción detallada

5 Ha de entenderse que tanto la descripción general anterior como la siguiente descripción detallada son ejemplares y explicativas solamente. Aquí, el uso del singular incluye el plural a menos que se indique específicamente lo contrario. Como se usa en el presente documento, el uso de "o" significa "y/o" a menos que se indique lo contrario. Además, el uso del término "incluir", así como otras formas, tales como "incluye" e "incluido", no es limitante. Además, los términos como "elemento" o "componente" abarcan tanto elementos como componentes que comprenden una unidad y elementos y componentes que comprenden más de una subunidad, a menos que se indique específicamente lo contrario.

10

15 Los encabezados de sección usados en este documento son sólo para fines de organización y no deben interpretarse como limitantes del objeto descrito.

20 Se entiende que la secuencia expuesta en cada SEQ ID NO descrita en el presente documento es independiente de cualquier modificación a un resto azúcar, un enlace internucleosídico o una base nucleotídica. Como tales, los compuestos antisentido definidos por una SEQ ID NO pueden comprender, independientemente, una o más modificaciones en un resto de azúcar, un enlace internucleosídico, o una nucleobase. Los compuestos antisentido descritos por Número Isis (Nº Isis) indican una combinación de secuencia de nucleobases y motivo.

Definiciones

25 A menos que se proporcionen definiciones específicas, la nomenclatura utilizada en relación con, y los procedimientos y técnicas de química analítica, química orgánica sintética y química médica y farmacéutica descritas en el presente documento son aquellos bien conocidos y comúnmente utilizados en la técnica. Las técnicas estándar se pueden usar para la síntesis química y el análisis químico.

30 A menos que se indique lo contrario, los siguientes términos tienen los siguientes significados:

35 "2'-O-metoxietilo" (también de 2'-MOE y 2'-O(CH₂)₂-OCH₃) se refiere a una modificación O-metoxietilo en la posición 2' de un anillo de furanosa. Un azúcar modificado 2'-O-metoxietilo es un azúcar modificado.

"2'-MOE nucleósido" (también nucleósido 2'-O-metoxietilo) significa un nucleósido que comprende un resto de azúcar modificado por 2'-MOE.

40 "Nucleósido sustituido en 2'" significa un nucleósido que comprende un sustituyente en la posición 2' del anillo de furanosilo distinto de H o OH. En ciertas realizaciones, los nucleósidos sustituidos en 2' incluyen nucleósidos con modificaciones de azúcar bicíclico.

45 El "sitio diana 3'" se refiere al nucleótido de un ácido nucleico diana que es complementario al nucleótido 3' más de un compuesto antisentido particular.

50 El "sitio diana en 5'" se refiere al nucleótido de un ácido nucleico diana que es complementario al extremo 5' más nucleótidos de un compuesto antisentido particular.

"5-metilcitosina" significa una citosina modificada con un grupo metilo unido a la posición 5. Una 5-metilcitosina es una nucleobase modificada.

55 "Acerca de" significa dentro de $\pm 7\%$ de un valor. Por ejemplo, si se establece, "los compuestos afectaron al menos aproximadamente el 70% de inhibición de UBE3A-ATS", se implica que los niveles de UBE3A-ATS están inhibidos dentro de un intervalo de 63% y 77%. De manera similar, si se establece, "los compuestos afectaron al menos aproximadamente el 20% de la inducción de la expresión paterna de UBE3A", se implica que los niveles de UBE3A están inducidos por un intervalo de 13% y 27%.

60 "Animal" se refiere a un humano o animal no humano, incluyendo, pero no limitado a, ratones, ratas, conejos, perros, gatos, cerdos y primates no humanos, incluyendo, pero no limitado a, monos y chimpancés.

"Actividad antisentido" significa cualquier actividad detectable o medible atribuible a la hibridación de un compuesto antisentido a su ácido nucleico diana. En ciertas realizaciones, la actividad antisentido es una disminución en la cantidad o expresión de un ácido nucleico diana o proteína codificada por dicho ácido nucleico diana.

65 "Compuesto antisentido" significa un compuesto oligomérico que es capaz de experimentar la hibridación con un ácido nucleico diana a través de puentes de hidrógeno. Los ejemplos de compuestos antisentido incluyen compuestos monocatenarios y bicatenarios, tales como, oligonucleótidos antisentido, siRNA, shRNA, ssRNA, y compuestos basados en la ocupación.

"Inhibición antisentido" significa reducción de los niveles de ácido nucleico diana en presencia de un compuesto antisentido complementario a un ácido nucleico diana en comparación con los niveles objetivo de ácido nucleico en la ausencia del compuesto antisentido.

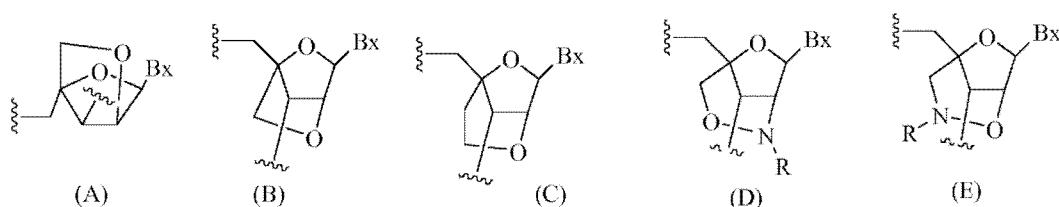
70 Los "mecanismos antisentido" son todos aquellos mecanismos que implican la hibridación de un compuesto con ácido nucleico diana, en donde el resultado o efecto de la hibridación es la degradación diana o la ocupación objetivo con el bloqueo concomitante de la maquinaria celular que implica, por ejemplo, transcripción o empalme.

75 "Oligonucleótido antisentido" significa un oligonucleótido monocatenario que tiene una secuencia de

nucleobases que permite la hibridación con una región correspondiente o segmento de un ácido nucleico diana. "Complementariedad de bases" se refiere a la capacidad para el apareamiento de bases preciso de nucleobases de un oligonucleótido antisentido con nucleobases correspondientes en un ácido nucleico diana (es decir, hibridación), y está mediada por Watson-Crick, Hoogsteen o unión de hidrógeno de Hoogsteen invertida de entre las nucleobases correspondientes.

5 "Resto de azúcar bicíclico" significa un resto de azúcar modificado que comprende un anillo de 4 a 7 miembros (incluyendo pero no limitado a un furanosilo) que comprende un puente que conecta dos átomos del anillo de 4 a 7 miembros para formar un segundo anillo, dando como resultado una estructura bicíclica. En ciertas realizaciones, el anillo de 4 a 7 miembros es un anillo de azúcar. En ciertas realizaciones el anillo de 4 a 7 miembros es un furanosilo. En ciertas de tales realizaciones, el puente conecta el carbono 2' y el carbono 4' del furanosilo.

10 "Ácido nucleico bicíclico" o "BNA" o "nucleósidos BNA" significa monómeros de ácido nucleico que tienen un puente que conecta dos átomos de carbono entre la posición 4' y 2' de la unidad de azúcar de nucleósido, formando de este modo un azúcar bicíclico. Ejemplos de tales azúcar bicíclico incluyen, pero no se limitan a A) 15 α-L-Metilenoxy (4'-CH₂-O-2') LNA, (B) β-D-metilenoxy (4'-CH₂-O-2') LNA, (C) Etienoxi (4'-(CH₂)₂-O-2') LNA, (D) Aminooxi (4'-CH₂-O-N(R)-2') LNA y (E) Oxiamino (4'-CH₂-N(R)-O-2') LNA, como se representa a continuación.



20 Como se usa en el presente documento, los compuestos de LNA incluyen, pero no se limitan a, compuestos que tienen al menos un puente entre la posición 4' y la posición 2' del azúcar, en donde cada uno de los puentes comprende independientemente 1 o de 2 a 4 grupos vinculados seleccionados independientemente de $-\text{[C(R}_1\text{)(R}_2\text{)]}_n-$, 30 $-\text{C(R}_1\text{)=C(R}_2\text{)-}$, $-\text{C(R}_1\text{)=N-}$, $-\text{C(=NR}_1\text{)-}$, $-\text{C(=O)-}$, $-\text{C(=S)-}$, $-\text{O-}$, $-\text{Si(R}_1\text{)}_2-$, $-\text{S(=O)}_x-$ y $-\text{N(R}_1\text{)-}$; donde: x es 0, 1 o 2; n es 1, 2, 3 o 4; cada R₁ y R₂ es, independientemente, H, un grupo protector, hidroxilo, C₁-C₁₂ alquilo, C₁-C₁₂ alquilo sustituido, C₂-C₁₂ alquenilo, C₂-C₁₂ alquenilo sustituido, C₂-C₁₂ alquinilo, C₂-C₁₂ alquinilo sustituido, C₅-C₂₀ arilo, C₅-C₂₀ arilo sustituido, un radical heterociclo, un heterociclo sustituido radical, heteroarilo, heteroarilo sustituido, C₅-C₇ alicíclico radical, C₅-C₇ alicíclico radical sustituido, halógeno, OJ₁, NJ₁J₂, SJ₁, N₃, COOJ₁, acilo (C=O)-H), acilo sustituido, CN, sulfonilo (S(=O)₂-J₁) o sulfoxilo (S(=O)-J₁); y cada J₁ y J₂ es, independientemente, H, C₁-C₁₂ alquilo, 35 sustituido C₁-C₁₂ alquilo, C₂-C₁₂ alquenilo, sustituido C₂-C₁₂ alquenilo, C₂-C₁₂ alquinilo, C₂-C₁₂ alquinilo sustituido, C₅-C₂₀ arilo, C₅-C₂₀ arilo sustituido, acilo (C=O)-H), acilo sustituido, un radical heterociclo, un radical heterociclo sustituido, C₁-C₁₂ aminoalquilo, C₁-C₁₂ aminoalquilo sustituido o un grupo protector.

40 Los ejemplos de grupos puentes 4'-2' englobados dentro de la definición de LNA incluyen, pero no se limitan a, una de las fórmulas: $-\text{[C(R}_1\text{)(R}_2\text{)]}_n-$, $-\text{[C(R}_1\text{))(R}_2\text{)]}_n\text{-O-}$, $-\text{C(R}_1\text{R}_2\text{)-N(R}_1\text{-O-}$ o $-\text{C(R}_1\text{R}_2\text{-O-N(R}_1\text{)-}}$. Además, otros grupos puente abarcados con la definición de LNA son 4'-CH₂-2', 4'-(CH₂)₂-2', 4'-(CH₂)₃-2', 4'-CH₂-O-2', 4'-CH₂-ON(R₁)-2' y 4'-CH₂-N(R₁)-O-2'- puentes, en donde cada R₁ y R₂ es, independientemente, H, un grupo protector o C₁-C₁₂ alquilo.

45 También se incluyen dentro de la definición de LNA de acuerdo con la invención los LNA en los que el grupo 2'-hidroxilo del anillo de azúcar ribosilo está conectado al átomo de carbono 4' del anillo de azúcar, formando de este modo un metilenoxy (4'-CH₂-O-2') puente para formar el resto de azúcar bicíclico. El puente también puede ser un grupo metileno (-CH₂-) que conecta el átomo de oxígeno 2' y el átomo de carbono 4', para lo cual se usa el término metilenoxy (4'-CH₂-O-2') LNA. Además; en el caso del resto de azúcar bicíclico que tiene un grupo etileno puente en esta posición, el término etienoxi (4'-CH₂CH₂-O-2') LNA se utiliza. α-L-metilenoxy (4'-CH₂-O-2'), un isómero de metilenoxy (4'-CH₂-O-2') LNA también está incluido dentro de la definición de LNA, como se usa en este documento.

55 La "estructura de tapa" o "resto de tapa terminal" significa modificaciones químicas, que se han incorporado en cualquier extremo de un compuesto antisentido.

"cEt" o "etilo restringido" significa un resto de azúcar bicíclico que comprende un puente que conecta 4'-carbono y el 2'-carbono, en donde el puente tiene la fórmula: 4'-CH(CH₃)-O-2'.

60 "Nucleósido de etilo restringido" (también nucleósido cEt) significa un nucleósido que comprende un resto de azúcar bicíclico que comprende un puente 4'-CH(CH₃)-O-2'.

"Región químicamente distinta" se refiere a una región de un compuesto antisentido que es de alguna forma químicamente diferente de otra región del mismo compuesto antisentido. Por ejemplo, una región que tiene nucleótidos de 2'-O-metoxietilo es químicamente distinta de una región que tiene nucleótidos sin modificaciones de 2'-O-metoxietilo.

65 "Compuestos antisentido químéricos" significa compuestos antisentido que tienen al menos 2 regiones

- químicamente distintas, teniendo cada posición una pluralidad de subunidades.
- "Complementariedad" significa la capacidad de emparejamiento entre nucleobases de un primer ácido nucleico y un segundo ácido nucleico.
- 5 "Cumplir" significa la adherencia con una terapia recomendada por un individuo.
- Se entenderá que "comprenden", "comprende" y "que comprende" implican la inclusión de un paso indicado o elemento o grupo de etapas o elementos, pero no la exclusión de cualquier otra etapa o elemento o grupo de etapas o elementos.
- 10 "Nucleobases contiguas" significa nucleobases inmediatamente adyacentes entre sí.
- "Desoxirribonucleótido" quiere decir un nucleótido que tiene un hidrógeno en la posición 2' de la porción de azúcar del nucleótido. Los desoxirribonucleótidos se pueden modificar con cualquiera de una variedad de sustituyentes.
- 15 "Diseñar" o "Diseñado para" se refieren al proceso de diseño de un compuesto oligomérico que se hibridiza específicamente con una molécula de ácido nucleico seleccionada.
- "Eficacia" significa la capacidad de producir un efecto deseado.
- 20 "Expresión" incluye todas las funciones mediante las cuales la información codificada de un gen se convierte en estructuras presentes y que operan en una célula. Tales estructuras incluyen, pero no se limitan a los productos de transcripción y traducción.
- 25 "Totalmente complementario" o "100% complementario" significa que cada nucleobase de un primer ácido nucleico tiene una nucleobase complementaria en un segundo ácido nucleico. En ciertas realizaciones, un primer ácido nucleico es un compuesto antisentido y un ácido nucleico diana es un segundo ácido nucleico.
- 30 "Motivo totalmente modificado" se refiere a un compuesto antisentido que comprende una secuencia contigua de nucleósidos en la que esencialmente cada nucleósido es un nucleósido modificado de azúcar que tienen una modificación uniforme.
- 35 "Gápmero" significa un compuesto antisentido químérico en el que se coloca una región interna tiene una pluralidad de nucleósidos que soporta la escisión H de RNasa de entre las regiones externas que tiene uno o más nucleósidos, en donde los nucleósidos que comprenden la región interna son químicamente distintos del nucleósido o nucleósidos que comprenden las regiones externas. La región interna se puede denominar "brecha" y las regiones externas se pueden denominar "alas".
- 40 "Ensanchado por brecha" significa un compuesto antisentido que tiene un segmento de hueco de 12 o más nucleótidos contiguos de 2'-desoxirribonucleótidos posicionados entre los segmentos del ala 3' y 5' que tienen de uno a seis nucleótidos que tienen restos de azúcar modificados.
- 45 "Hibridación" significa que la hibridación de moléculas de ácido nucleico complementarias. En ciertas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico complementarias incluyen, pero sin limitación, un compuesto antisentido y un objetivo de ácido nucleico. En ciertas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico complementarias incluyen, pero no se limitan a, un oligonucleótido antisentido y un objetivo de ácido nucleico.
- 50 "Inmediatamente adyacente" significa que no hay elementos intermedios entre los elementos inmediatamente adyacentes.
- "Individual" significa un animal humano o no humano seleccionado para tratamiento o terapia.
- 55 "Inducir", "inhibir", "potenciar", "elevar", "aumentar", "disminuir", "regular al alza", "regular a la baja", o similar, generalmente denotan diferencias cuantitativas entre dos estados.
- "La inhibición de la expresión o actividad" se refiere a una reducción, el bloqueo de la expresión o actividad y no indica necesariamente una eliminación total de la expresión o actividad.
- "Enlace internucleosídico" se refiere al enlace químico entre nucleósidos.
- 60 Los oligonucleótidos antisentido "alargados" son aquellos que tienen uno o más nucleósidos adicionales en relación con un oligonucleótido antisentido descrito en este documento.
- "Desoxinucleósido unido" significa una base de ácido nucleico (A, G, C, T, U) sustituida por desoxirribosa unida por un éster de fosfato para formar un nucleótido.
- "Nucleósidos unidos" significa nucleósidos adyacentes unidos por un enlace internucleosídico.
- 65 "No coincidencia" o "nucleobase no complementaria" se refiere al caso cuando una nucleobase de un primer ácido nucleico no es capaz de emparejarse con la nucleobase correspondiente de un ácido nucleico segundo o diana.
- "Enlace internucleosídico modificado" se refiere a una sustitución o cualquier cambio entre un enlace internucleosídico de origen natural (es decir, un enlace internucleósido de fosfodiéster).
- 70 "Nucleobase modificada" significa cualquier nucleobase distinta de adenina, citosina, guanina, timidina, o uracilo. Una "nucleobase no modificada" significa las bases de purina adenina (A) y guanina (G), y las bases de pirimidina timina (T), citosina (C) y uracilo (U).
- "Nucleósido modificado" significa un nucleósido que tiene, independientemente, un resto de azúcar modificado y/o nucleobase modificada.
- 75 "Nucleótido modificado" significa un nucleótido que tiene, independientemente, un resto de azúcar modificado, enlace de internucleósido modificado, o nucleobase modificada.
- "Oligonucleótido modificado" significa un oligonucleótido que comprende al menos un enlace internucleosídico modificado, un azúcar modificado y/o una nucleobase modificada.
- 80 "Azúcar modificado" significa la sustitución y/o cualquier cambio de un resto de azúcar natural. "Monómero" se refiere a una sola unidad de un oligómero. Los monómeros incluyen, pero no se limitan a, nucleósidos y nucleótidos, ya sean naturales o modificados.

- "Motivo" significa el patrón de nucleósidos no modificados y modificados en un compuesto antisentido.
- "Resto de azúcar natural" significa un resto de azúcar que se encuentra en el ADN (2'-H) o ARN (2'-OH).
- "Enlace internucleosídico que se produce de forma natural" significa un enlace fosfodiéster de 3' a 5'.
- 5 "Nucleobase no complementaria" se refiere a un par de nucleobases que no forman enlaces de hidrógeno entre sí o de otro modo apoyan la hibridación.
- "Ácido nucleico" se refiere a moléculas compuestas de nucleótidos monoméricos. Un ácido nucleico incluye, pero no se limita a ácidos ribonucleicos (ARN), ácidos desoxirribonucleicos (ADN), ácidos nucleicos monocatenarios, ácidos nucleicos bicatenarios, pequeños ácidos ribonucleicos interferentes (siRNA) y microRNAs (miRNA).
- 10 "Nucleobase" significa un resto heterocíclico capaz de emparejarse con una base de otro ácido nucleico. La "complementariedad de la nucleobase" se refiere a una nucleobase que es capaz de formar pares de bases con otra nucleobase. Por ejemplo, en el ADN, la adenina (A) es complementaria a la timina (T). Por ejemplo, en el ARN, la adenina (A) es complementaria del uracilo (U). En ciertas realizaciones, la nucleobase complementaria se refiere a una nucleobase de un compuesto antisentido que es capaz de emparejar bases con una nucleobase de su ácido nucleico diana. Por ejemplo, si una nucleobase en una determinada posición de un compuesto antisentido es capaz de formar puentes de hidrógeno con una nucleobase en una determinada posición de un ácido nucleico diana, entonces se considera que la posición de enlace de hidrógeno entre el oligonucleótido y el ácido nucleico diana es complementario en ese par de nucleobases.
- 15 "Secuencia de nucleobases" significa el orden de nucleobases contiguas independientes de cualquier azúcar, ligamiento, y/o la modificación nucleobase.
- 20 "Nucleósido" significa una nucleobase unida a un azúcar.
- "Nucleósido mimético" incluye aquellas estructuras usadas para reemplazar el azúcar o el azúcar y la base y no necesariamente el enlace en una o más posiciones de un compuesto oligomérico tal como, por ejemplo, miméticos de nucleósidos que tienen morfolino, ciclohexenilo, ciclohexilo, tetrahidropiranilo, miméticos de azúcar bicíclicos o tricíclicos, por ejemplo, unidades de azúcar sin furanosa. El nucleótido mimético incluye aquellas estructuras usadas para reemplazar el nucleósido y el enlace en una o más posiciones de un compuesto oligomérico tal como, por ejemplo, ácidos nucleicos peptídicos o morfolinos (morfolinos unidos por -N(H)-C(=O)-O- u otro enlace no fosfodiéster). El sustituto de azúcar se superpone con el término nucleósido mimético ligeramente más amplio, pero está destinado a indicar el reemplazo de la unidad de azúcar (anillo de furanosa) solamente. Los anillos de tetrahidropiranilo proporcionados en este documento son ilustrativos de un ejemplo de un sustituto de azúcar en el que el grupo de azúcar de furanosa se ha reemplazado por un sistema de anillo de tetrahidropiranilo. "Mimético" se refiere a grupos que están sustituidos por un azúcar, una nucleobase y/o un enlace inter-nucleósido. Generalmente, se usa un mimético en lugar de la combinación de enlace azúcar-azúcar o internucleósido de azúcar, y la nucleobase se mantiene para la hibridación con un objetivo seleccionado.
- 25 "Nucleótido" significa un nucleósido que tiene un grupo de fosfato unido covalentemente a la porción de azúcar del nucleósido.
- 30 "Compuesto oligomérico" se refiere a un polímero de subunidades monoméricas con enlaces que es capaz de hibridarse con al menos una región de una molécula de ácido nucleico.
- 35 "Oligonucleósido" significa un oligonucleótido en el que los enlaces internucleosídico no contienen un átomo de fósforo.
- 40 "Oligonucleótido" se refiere a un polímero de los nucleósidos ligados cada uno de los cuales puede ser modificado o no modificado, uno independiente de otro.
- 45 "Péptido" significa una molécula formada mediante la vinculación de al menos dos aminoácidos por enlaces amida. Sin limitación, como se usa en el presente documento, "péptido" se refiere a polipéptidos y proteínas.
- "Enlace de fosforotioato" significa un enlace entre nucleósidos donde el enlace fosfodiéster se modifica mediante la sustitución de uno de los átomos de oxígeno no puente con un átomo de azufre. Un enlace fosforotioato es un enlace inter-nucleósido modificado.
- 50 "Porción" significa un número definido de (es decir, enlaces) nucleobases contiguas de un ácido nucleico. En ciertas realizaciones, una porción es un número definido de nucleobases contiguas de un ácido nucleico diana. En ciertas realizaciones, una porción es un número definido de nucleobases contiguas de un compuesto antisentido.
- 55 "Región" se define como una porción del ácido nucleico diana que tiene al menos una estructura, función o característica identifiable.
- "Ribonucleótido" quiere decir un nucleótido que tiene un hidroxi en la posición de la porción azúcar del nucleótido 2'. Los ribonucleótidos se pueden modificar con cualquiera de una variedad de sustituyentes.
- 60 Los "segmentos" se definen como porciones más pequeñas o sub-porciones de regiones dentro de un ácido nucleico diana.
- 65 Los "sitios", tal como se usan en el presente documento, se definen como posiciones de nucleobases únicas dentro de un ácido nucleico diana.
- "Específicamente hibridable" se refiere a un compuesto antisentido que tiene un grado suficiente de complementariedad entre un oligonucleótido antisentido y un ácido nucleico diana para inducir un efecto deseado, mientras que exhibe efectos mínimos o nulos en ácidos nucleicos no diana en condiciones en las que se desea la unión específica, es decir, en condiciones fisiológicas en el caso de ensayos *in vivo* y tratamientos terapéuticos. "Condiciones de hibridación rigurosas" o "condiciones rigurosas" se refieren a las condiciones en

- las que un compuesto oligomérico se hibridará con su secuencia diana, pero a un número mínimo de otras secuencias.
- "Sujeto" significa un animal humano o no humano seleccionado para tratamiento o terapia.
- "Diana" se refiere a una proteína, cuya modulación se desea.
- 5 "Gen diana" se refiere a un gen que codifica un objetivo.
- "Orientación" significa el proceso de diseño y selección de un compuesto antisentido que hibridará específicamente a un ácido nucleico diana e inducir un efecto deseado.
- 10 "Ácido nucleico diana", "ARN diana", "transcripción de ARN diana" y "ácido nucleico diana" significan un ácido nucleico capaz de ser blanco de compuestos antisentido.
- 15 "Región diana" significa una parte de un ácido nucleico diana al que se dirigen uno o más compuestos antisentido.
- "Segmento diana" significa la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico diana al que está dirigido un compuesto antisentido. El "sitio objetivo 5'" se refiere al nucleótido 5'-más de un segmento diana. "Sitio objetivo 3'" se refiere al nucleótido 3'-más de un segmento diana.
- 20 "UBE3A-ATS" y "UBE3A-ATS" se pueden utilizar indistintamente sin capitalización de su ortografía que se refiere a cualquier especie particular u ortólogo.
- "UBE3A" y "Ube3a" se pueden utilizar indistintamente y sin capitalización de su ortografía se refiere a cualquier especie particular o ortólogo. Además, "UBE3A", "*UBE3A*", "Ube3A" y "*Ube3A*" se pueden usar de forma intercambiable sin cursiva que se refiera a ácido nucleico o proteína a menos que se indique específicamente lo contrario.
- 25 Las nucleobases "no modificadas" significan las bases de purina adenina (A) y guanina (G), y las bases de pirimidina timina (T), citosina (C) y uracilo (U).
- "Nucleótido no modificado" significa un nucleótido compuesto de nucleobases de origen natural, restos de azúcares, y enlaces de internucleósido. En ciertas realizaciones, un nucleótido no modificado es un nucleótido de ARN (es decir, β-D-ribonucleótidos) o un nucleótido de ADN (es decir, β-D-desoxirribonucleósido).
- 30 El "segmento diana validado" se define como al menos una porción de 8 nucleobases (es decir, 8 nucleobases consecutivas) de una región diana a la que se dirige un compuesto antisentido.
- "Segmento de ala" significa una pluralidad de nucleósidos modificados para impartir a propiedades de oligonucleótidos tales como la actividad inhibidora mejorada, aumento de la afinidad de unión para un ácido nucleico diana, o la resistencia a la degradación por nucleasas *in vivo*.

Ciertas realizaciones

35 En la presente se describe un método de inducir la expresión paterna de UBE3A en una célula que comprende poner en contacto la célula con un compuesto antisentido dirigido a UBE3A-ATS. En varios aspectos UBE3A-ATS comprende una secuencia de ácido nucleico al menos 85% idéntica a SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.

40 En la presente se describe un método para inducir la expresión paterna de UBE3A en una célula que comprende poner en contacto la célula con un compuesto antisentido dirigido a una región de UBE3A-ATS aguas arriba de una región de UBE3A-ATS que es complementaria al menos el extremo 3' de un pre-ARNm de UBE3A. En la presente se describe un método para reducir UBE3A-ATS en una célula que comprende poner en contacto la célula con un compuesto antisentido dirigido a una región de UBE3A-ATS aguas arriba de una región de UBE3A-ATS complementaria a al menos el extremo 3' de un UBE3A pre-mRNA. UBE3A-ATS puede comprender una secuencia de ácido nucleico al menos 85% idéntica a SEQ ID NO: 1. La región complementaria a al menos el extremo 3' del pre-ARNm de UBE3A puede comenzar en la nucleobase 1032967 de la SEQ ID NO 1. UBE3A-ATS puede comprender una secuencia de ácido nucleico al menos 85% idéntica a la SEQ ID NO: 2. En el mismo aspecto, la región complementaria a al menos el extremo 3' del pre-ARNm de UBE3A puede comenzar en la nucleobase 513603 de la SEQ ID NO: 2. En ciertos aspectos de los métodos anteriores se induce la expresión paterna de UBE3A y/o el UBE3A-ATS se reduce en la célula sin reducir los niveles de los ARN nucleolares pequeños vecinos (snoRNA) Snrpn, MBII-85/HBII-85 y/o MBII-52/HBII-52, algunos de los cuales están implicados en el síndrome de Prader-Willi y se eliminan en pacientes que padecen el síndrome de Prader-Willi (Sahoo, T. y col., Nat. Genet., 2008, 40: 719-21; Tsai, T. et al., Hum. Mol. Genet. 1999. 8: 1357 - 64). En varios aspectos, poner en contacto una célula con un compuesto antisentido dirigido a una región de UBE3A-ATS aguas arriba de una región de UBE3A-ATS que es complementaria al menos al extremo 3' de un pre-ARNm de UBE3A induce la expresión paterna de UBE3A y/o reduce UBE3A-ATS en la célula sin reducir los niveles de Snrpn, MBII-85/HBII-85, y/o MBII-52/HBII-52 en más de aproximadamente 0%, 1%, 2%, 3%, 4%, 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%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87 %, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%.

65 En la presente se describe un método para inducir la expresión paterna de UBE3A en una célula que comprende poner en contacto la célula con un compuesto antisentido dirigido a una primera región de UBE3A-ATS, dicha primera región flanqueada por (a) una región aguas arriba y (b) una región aguas abajo complementaria a al

menos el extremo 3' de un pre-ARNm de UBE3A. En la presente también se describe un método para reducir UBE3A-ATS en una célula que comprende poner en contacto la célula con un compuesto antisentido dirigido a una primera región de UBE3A-ATS, dicha primera región flanqueada por (a) una región aguas arriba y (b) una región aguas abajo complementaria al menos en el extremo 3' de un pre-ARN UBE3A. En un aspecto, la región aguas arriba comprende la secuencia de al menos un snoRNA. En el mismo aspecto, el snoRNA es HBII-52 o MBII-52. UBE3A-ATS puede comprender una secuencia de ácido nucleico al menos 85% idéntica a SEQ ID NO: 1 y la primera región de UBE3A-ATS consiste en nucleobases al menos 85% idéntica a las nucleobases 997469 a 1032966 de SEQ ID NO: 1. En algunos aspectos, UBE3A pre-mRNA comprende una secuencia de ácido nucleico al menos 85% idéntica a SEQ ID NO: 5. UBE3A-ATS puede comprender una secuencia de ácido nucleico al menos 85% idéntica a SEQ ID NO: 2 y la primera región de UBE3A-ATS consiste de nucleobases al menos 85% idéntica a nucleobases 446213 a 513602 de SEQ ID NO: 2. En varios aspectos, el pre-mRNA de UBE3A comprende una secuencia de ácido nucleico al menos 85% idéntica a SEQ ID NO: 6. En ciertos aspectos de los métodos anteriores, se induce la expresión paterna de UBE3A y/o UBE3A-ATS se reduce en la célula sin reducir los niveles de los ARN nucleolares pequeños vecinos (snoRNA) Snrpn, MBII-85/HBII-85 y/o MBII-52/HBII-52. En varios aspectos, poner en contacto una célula con un compuesto antisentido dirigido a una primera región de UBE3A-ATS, dicha primera región flanqueada por (a) una región aguas arriba y (b) una región aguas abajo complementaria al menos al extremo 3' de un pre-ARNm de UBE3A, induce la expresión paterna de UBE3A y/o reduce UBE3A-ATS en la célula sin reducir los niveles de Snrpn, MBII-85/HBII-85, y/o MBII-52/HBII-52 en más de aproximadamente 0%, 1%, 2%, 3%, 4%, 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%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%.

En la presente se describe un método para inducir la expresión paterna de UBE3A en una célula que comprende poner en contacto la célula con un compuesto antisentido dirigido a UBE3A-ATS dentro de 35498 nucleobases aguas arriba del inicio de una región complementaria al pre-ARNm de UBE3A, en donde el UBE3A-ATS comprende una secuencia de ácido nucleico al menos 85% idéntica a la secuencia de la SEQ ID NO: 1. También se describe un método de inhibición de UBE3A-ATS en una célula que comprende poner en contacto la célula con un compuesto antisentido dirigido a UBE3A-ATS dentro de 35498 nucleobases aguas arriba del inicio de una región complementaria al pre-ARNm de UBE3A, en donde UBE3A-ATS comprende una secuencia de ácido nucleico al menos 85% idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 1. En un aspecto, la región complementaria al pre-ARNm de UBE3A consiste en las nucleobases 1032967 a 1110944 de la SEQ ID NO: 1. En ciertos aspectos de los métodos anteriores, se induce la expresión paterna de UBE3A y/o se reduce UBE3A-ATS en la célula sin reducir los niveles de los ARN nucleolares pequeños vecinos (snoRNA) Snrpn, MBII-85/HBII-85 y/o MBII-52/HBII-52. En varios aspectos, poner en contacto una célula con un compuesto antisentido dirigido a UBE3A-ATS dentro de 35498 nucleobases aguas arriba del inicio de una región complementaria al pre-ARNm de UBE3A, en donde UBE3A-ATS comprende una secuencia de ácido nucleico al menos 85% idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 1, induce la expresión paterna de UBE3A y/o reduce UBE3A-ATS en la célula sin reducir los niveles de Snrpn, MBII-85/HBII-85, y/o MBII-52/HBII-52 por más de aproximadamente 0%, 1%, 2%, 3%, 4%, 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%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99%.

En la presente se describe un método para inducir la expresión paterna de UBE3A en una célula que comprende poner en contacto la célula con un compuesto antisentido dirigido a UBE3A-ATS dentro de 67390 nucleobases aguas arriba del inicio de una región complementaria al pre-ARNm de UBE3A, en donde UBE3A-ATS comprende una secuencia de ácido nucleico al menos 85% idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 2. También se describe un método de inhibición de UBE3A-ATS en una célula que comprende poner en contacto la célula con un antisentido compuesto dirigido a UBE3A-ATS dentro de 67390 nucleobases aguas arriba del inicio de una región complementaria al pre-ARNm de UBE3A, en donde UBE3A-ATS comprende una secuencia de ácido nucleico al menos 85% idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 2. En un aspecto, la región complementaria al pre-ARNm de UBE3A consiste en las nucleobases 513603 a 615382 de la SEQ ID NO: 2. En ciertos aspectos de los métodos anteriores, se induce la expresión paterna de UBE3A y/o se reduce el UBE3A-ATS en la célula sin reducir los niveles de los ARN nucleolares pequeños vecinos (snoRNA) Snrpn, MBII-85/HBII-85 y/o MBII-52/HBII-52. En varios aspectos, se pone en contacto una célula con un compuesto antisentido dirigido a UBE3A-ATS dentro de 67390 nucleobases aguas arriba del inicio de una región complementaria al pre-ARNm de UBE3A, donde UBE3A-ATS comprende una secuencia de ácido nucleico al menos 85% idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 2, induce la expresión paterna de UBE3A y/o reduce UBE3A-ATS en la célula sin reducir los niveles de Snrpn, MBII-85/HBII-85, y/o MBII-52/HBII-52 por más de aproximadamente 0%, 1%, 2%, 3%, 4%, 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%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99%.

73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82 %, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99%.

5 Poner en contacto la célula con el compuesto antisentido puede reducir el nivel de UBE3A-ATS en la célula y/o induce la expresión de la proteína UBE3A paterna en la célula.

La célula puede ser una célula cultivada. La célula puede ser un animal.

10 En la presente se describe un método para inducir la expresión paterna de UBE3A en un animal que comprende administrar al animal un compuesto antisentido dirigido a UBE3A-ATS. UBE3A-ATS puede comprender una secuencia de ácido nucleico al menos 85% idéntica a SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.

15 En la presente se describe un método para inducir la expresión paterna de UBE3A y/o UBE3A-ATS reductor en un animal que comprende administrar al animal un compuesto antisentido dirigido a una región de UBE3A-ATS aguas arriba de una región de UBE3A-ATS complementaria a al menos el extremo 3' de un pre-ARNm de UBE3A. UBE3A-ATS puede comprender una secuencia de ácido nucleico al menos 85% idéntica a SEQ ID NO: 1. La región complementaria a al menos el extremo 3' del pre-ARNm de UBE3A puede comenzar en la nucleobase 1032967 de la SEQ ID NO 1. UBE3A-ATS puede comprender una secuencia de ácido nucleico al menos 85% idéntica a SEQ ID NO: 2. La región complementaria a al menos el extremo 3' del premRNA de UBE3A puede comenzar en la nucleobase 513603 de SEQ ID NO: 2. En ciertos aspectos de los métodos anteriores, se induce la expresión paterna de UBE3A y/o se reduce UBE3A-ATS en el animal sin reducir los niveles de los snoRNAs vecinos Snrpn, MBII-85/HBII-85 y/o MBII-52/HBII-52. En varios aspectos de la divulgación, la administración de un compuesto antisentido dirigido a una región de UBE3A-ATS aguas arriba de una región de UBE3A-ATS que es complementaria a al menos el extremo 3' de un pre-ARNm de UBE3A induce la expresión paterna de UBE3A y/o reduce UBE3A-ATS en el animal sin reducir los niveles de Snrpn, MBII-85/HBII-85, y/o MBII-52/HBII-52 en más de aproximadamente 0%, 1%, 2%, 3%, 4%, 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%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88 %, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%.

30 En la presente se describe un método para inducir la expresión paterna de UBE3A y/o reducir UBE3A-ATS en un animal que comprende administrar al animal un compuesto antisentido dirigido a una primera región de UBE3A-ATS, dicha primera región flanqueada por (a) una región aguas arriba y (b) una región aguas abajo complementaria a un pre-ARNm de UBE3A. En un aspecto, la región aguas arriba comprende la secuencia de al menos un ARN nucleolar pequeño (ARNsn). En el mismo aspecto, el snoRNA es HBII-52 o MBII-52. UBE3A-ATS puede comprender una secuencia de ácido nucleico al menos 85% idéntica a SEQ ID NO: 1 y la primera región de UBE3A-ATS consiste en nucleobases al menos 85% idéntica a las nucleobases 997469 a 1032966 de SEQ ID NO: 1. En varios aspectos, el pre-ARNm de UBE3A comprende una secuencia de ácido nucleico al menos 85% idéntica a la SEQ ID NO: 5. UBE3A-ATS puede comprender una secuencia de ácido nucleico al menos 85% idéntica a nucleobases 446213 a 513602 de SEQ ID NO: 2. En varios aspectos, el pre-mRNA de UBE3A comprende una secuencia de ácido nucleico al menos 85% idéntica a SEQ ID NO: 6. En ciertos aspectos de los métodos anteriores, se induce la expresión paterna de UBE3A y/o se reduce UBE3A-ATS en el animal sin reducir los niveles de los ARN nucleolares pequeños vecinos (snoRNA) Snrpn, MBII-85/HBII-85, y/o MBII-52/HBII-52. En varios aspectos, la administración de un componente antisentido dirigida a una primera región de UBE3A-ATS, dicha primera región flanqueada por (a) una región aguas arriba y (b) una región aguas abajo complementaria al menos al extremo 3' de un pre-ARN UBE3A, induce la expresión paterna de UBE3A y/o reduce UBE3A-ATS en el animal sin reducir los niveles de Snrpn, MBII-85/HBII-85, y/o MBII-52/HBII-52 en más de aproximadamente 0%, 1%, 2%, 3%, 4%, 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%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%.

55 En la presente se describe un método para inducir la expresión paterna de UBE3A y/o UBE3A-ATS reductor en un animal que comprende administrar al animal un compuesto antisentido dirigido a UBE3A-ATS dentro de 35498 nucleobases aguas arriba del inicio de una región complementaria al pre-ARNm de UBE3A, donde UBE3A-ATS comprende una secuencia de ácido nucleico al menos 85% idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 1. En un aspecto, la región complementaria al pre-ARNm de UBE3A consiste en nucleobases 1032967 a 1110944 de SEQ ID NO: 1. En ciertos aspectos de los métodos anteriores, se induce la expresión paterna de UBE3A y/o se reduce UBE3A-ATS en el animal sin reducir los niveles de los ARN nucleolares pequeños vecinos (snoRNA) Snrpn, MBII-85/HBII-85 y/o MBII-52/HBII-52. En varios aspectos, administrar un compuesto antisentido dirigido a UBE3A-ATS dentro de 35498 nucleobases aguas arriba del inicio de una región complementaria al pre-ARNm de UBE3A, en donde el ATS-UBE3A comprende una secuencia de ácido nucleico al menos 85% idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 1, induce

la expresión paterna de UBE3A y/o reduce UBE3A-ATS en el animal sin reducir los niveles de Snrpn, MBII-85/HBII-85, y/o MBII-52/HBII-52 en más de aproximadamente 0%, 1%, 2%, 3%, 4%, 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%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%.

En la presente se describe un método para inducir la expresión paterna de UBE3A y/o reducir UBE3A-ATS en un animal que comprende administrar al animal un compuesto antisentido dirigido a UBE3A-ATS dentro de 67390 nucleobases aguas arriba del comienzo de una región complementaria al pre-ARNm de UBE3A, donde UBE3A-ATS comprende una secuencia de ácido nucleico al menos 85% idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 2. En un aspecto, la región complementaria al pre-ARNm de UBE3A consiste en las nucleobases 513603 a 615382 de la SEQ ID NO: 2. En ciertos aspectos de los métodos anteriores, se induce la expresión paterna de UBE3A y/o se reduce el UBE3A-ATS en el animal sin reducir los niveles de ARN nucleolares pequeños vecinos (snoRNAs) Snrpn, MBII-85/HBII-85, y/o MBII-52/HBII-52. En varios aspectos, administrar un compuesto antisentido dirigido a UBE3A-ATS dentro de 67390 nucleobases aguas arriba del inicio de una región complementaria al pre-ARNm de UBE3A, donde UBE3A-ATS comprende una secuencia de ácido nucleico al menos 85% idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 2, induce la expresión paterna de UBE3A y/o reduce UBE3A-ATS en el animal sin reducir los niveles de Snrpn, MBII-85/HBII-85, y/o MBII-52/HBII-52 en más de aproximadamente 0%, 1%, 2%, 3%, 4%, 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%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%.

En cualquiera de las realizaciones mencionadas anteriormente y los aspectos de las mismas, el compuesto antisentido comprende un oligonucleótido que consiste en 12 a 30 nucleósidos enlazados, para su uso de acuerdo con las reivindicaciones, en el que el oligonucleótido es de al menos 85% complementaria a una secuencia de ácido nucleico UBE3A-ATS. En ciertos aspectos, el oligonucleótido es al menos 90%, al menos 95%, o 100% complementario en toda su longitud a una regíon de igual longitud de una secuencia de ácido nucleico UBE3A-ATS. El compuesto u oligonucleótido antisentido puede ser un oligonucleótido monocatenario. El oligonucleótido puede ser un oligonucleótido modificado. En el mismo aspecto, el oligonucleótido modificado puede comprender al menos un enlace internucleosídico modificado. Una vez más, en el mismo aspecto, el enlace internucleosídico modificado puede ser un enlace internucleosídico fosforotioato. En varios aspectos, al menos un nucleósido comprende un azúcar modificado. En el mismo aspecto, el azúcar modificado es un azúcar bicíclico que comprende un puente entre las posiciones 4' y 2' del azúcar, tal como un puente se selecciona de 4'-CH(CH₃)-O-2', 4'-CH₂-2', 4'-(CH₂)₂-2', 4'-CH₂-O-2', 4'-(CH₂)₂-O-2', 4'-CH₂-ON(R₁)-2' y 4'-CH₂-N(R₁)-O-2', en donde cada R₁ es, independientemente, H, un grupo protector o C₁-C₁₂ alquilo. Además, en el mismo aspecto, el puente es 4'-CH(CH₃)-O-2'.

En cualquiera de las realizaciones anteriores y aspectos de las mismas que incluyen un azúcar modificado, el azúcar modificado puede comprender un grupo 2'-O-metoxietilo.

En cualquiera de las realizaciones anteriores y aspectos de las mismas que incluyen un oligonucleótido modificado, al menos un nucleósido puede comprender una nucleobase modificada, tal como una 5-metilcitosina.

En cualquiera de las realizaciones anteriores y aspectos de las mismas, el compuesto antisentido o un oligonucleótido modificado induce la expresión de UBE3A paterno por al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 100%, al menos 110%, al menos 120%, al menos 130%, al menos 140%, al menos 150%, al menos 160%, al menos 170%, al menos 180%, al menos 190%, al menos 200%, al menos 210%, al menos 220%, al menos 230%, al menos 240% o al menos 250%.

En la presente se describe un método de tratamiento de un animal con un compuesto antisentido dirigido a UBE3A-ATS que comprende seleccionar un animal en necesidad del mismo y administrando al animal un compuesto antisentido dirigido a UBE3A-ATS. UBE3A-ATS puede comprender una secuencia de ácido nucleico al menos 85% idéntica a SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.

En la presente se describe un método para tratar un animal con un compuesto antisentido dirigido a UBE3A-ATS que comprende seleccionar un animal que lo necesita y administrar al animal un compuesto antisentido dirigido a una regíon de UBE3A-ATS aguas arriba de una regíon de UBE3A-ATS complementaria a al menos el extremo 3' de un pre-ARNm de UBE3A. UBE3A-ATS puede comprender una secuencia de ácido nucleico al menos 85% idéntica a la SEQ ID NO: 1. En el mismo aspecto, la regíon complementaria a al menos el extremo 3' del pre-ARNm de UBE3A puede comenzar en la nucleobase 1032967 de SEQ ID NO: 1. UBE3A-ATS puede comprender una secuencia de ácido nucleico al menos 85% idéntica a SEQ ID NO: 2. En el mismo aspecto, la regíon complementaria a al menos el extremo 3' del pre-ARNm de UBE3A puede comenzar en la nucleobase 513603 de la

SEQ ID NO: 2.

En la presente se describe un método para tratar un animal con un compuesto antisentido dirigido a UBE3A-ATS que comprende seleccionar un animal que lo necesita y administrar al animal un compuesto antisentido dirigido a una primera región de UBE3A-ATS, dicha primera región flanqueada por (a) una región aguas arriba y (b) una región aguas abajo complementaria a al menos el extremo 3' de un pre-ARNm de UBE3A. En un aspecto de la divulgación, la región aguas arriba comprende la secuencia de al menos un ARN nucleolar pequeño (ARNsn). En el mismo aspecto, el snoRNA es HBII-52 o MBII-52. UBE3A-ATS puede comprender una secuencia de ácido nucleico al menos 85% idéntica a SEQ ID NO: 1 y la primera región de UBE3A-ATS consiste en nucleobases al menos 85% idéntica a las nucleobases 997469 a 1032966 de SEQ ID NO: 1. En varios aspectos, el pre-ARNm de UBE3A comprende una secuencia de ácido nucleico al menos 85% idéntica a la SEQ ID NO: 5. UBE3A-ATS puede comprender una secuencia de ácido nucleico al menos 85% idéntica a SEQ ID NO: 2 y la primera región de UBE3A-ATS consiste en nucleobases al menos 85% idéntica a nucleobases 446213 a 513602 de SEQ ID NO: 2. En varios aspectos, el UBE3A pre-mRNA comprende una secuencia de ácido nucleico al menos 85% idéntica a SEQ ID NO: 6.

En la presente se describe un método de tratamiento de un animal con un compuesto antisentido dirigido a UBE3A-ATS que comprende seleccionar un animal en necesidad de los mismos y administrar al animal un compuesto antisentido dirigido a UBE3A-ATS dentro de 35498 nucleobases aguas arriba del inicio de la región complementaria a un pre-ARNm de UBE3A, donde UBE3A-ATS comprende una secuencia de ácido nucleico al menos 85% idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 1. En un aspecto de la divulgación, la región complementaria al pre-mRNA de UBE3A se compone de nucleobases 1032967 a 1110944 de la SEQ ID NO: 1.

En la presente se describe un método de tratamiento de un animal con un compuesto antisentido dirigido a UBE3A-ATS que comprende seleccionar un animal que lo necesita y administrar al animal un compuesto antisentido dirigido a UBE3A-ATS dentro de 67390 nucleobases aguas arriba del inicio de una región complementaria al pre-ARNm de UBE3A, donde UBE3A-ATS comprende una secuencia de ácido nucleico al menos 85% idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 2. En un aspecto de la divulgación, la región complementaria al pre-ARNm de UBE3A consiste en de nucleobases 513603 a través de 615382 de la SEQ ID NO: 2.

En la presente se describe un método de tratamiento de un animal, el animal tiene Síndrome de Angelman. En ciertos aspectos de la descripción, el animal que tiene el Síndrome de Angelman tratado según los métodos proporcionados en la presente memoria muestra una mejora en la ansiedad, el aprendizaje, el equilibrio, la función motora y/o las convulsiones.

En la presente se describe un método de tratamiento de un animal, la administración de un compuesto antisentido trata el animal sin reducir los niveles de los ARN nucleolares vecinos pequeños (snoRNAs) SNRPN, MBII-85/HBII-85 y/o MBII-52/HBII-52. En varios aspectos, la administración de un compuesto antisentido proporcionado aquí trata al animal sin reducir los niveles de Snrpn, MBII-85/HBII-85 y/o MBII-52/HBII-52 en más de aproximadamente 0%, 1%, 2%, 3%, 4%, 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%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%.

Ciertas realizaciones se refieren a un compuesto antisentido dirigido a UBE3A-ATS, para su uso de acuerdo con las realizaciones. UBE3A-ATS puede comprender una secuencia de ácido nucleico al menos 85% idéntica a SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.

Varias realizaciones proporcionan un compuesto antisentido dirigido a una región de UBE3A-ATS aguas arriba de una región de UBE3A-ATS complementaria a al menos el extremo 3' de un pre-ARNm de UBE3A para su uso de acuerdo con las reivindicaciones. UBE3A-ATS puede comprender una secuencia de ácido nucleico al menos 85% idéntica a la SEQ ID NO: 1. En el mismo aspecto, la región complementaria a al menos el extremo 3' del pre-ARNm de UBE3A puede comenzar en la nucleobase 1032967 de SEQ ID NO: 1. UBE3A-ATS puede comprender una secuencia de ácido nucleico al menos 85% idéntica a SEQ ID NO: 2. En el mismo aspecto, la región complementaria a al menos el extremo 3' de la UBE3A pre-mRNA puede comenzar en nucleobase 513603 de la SEQ ID NO: 2.

Varias realizaciones están dirigidas a un compuesto antisentido dirigido a una primera región de UBE3A-ATS, dicha primera región flanqueada por (a) una región aguas arriba y (b) una región aguas abajo complementaria al menos al extremo 3' de un pre-ARNm de UBE3A, para su uso de acuerdo con las reivindicaciones. En un aspecto, la región aguas arriba comprende la secuencia de al menos un ARN nucleolar pequeño (ARNsn). En el mismo aspecto, el snoRNA es HBII-52 o MBII-52. UBE3A-ATS puede comprender una secuencia de ácido nucleico al menos 85% idéntica a SEQ ID NO: 1 y la primera región de UBE3A-ATS consiste en nucleobases al menos 85% idéntica a las nucleobases 997469 a 1032966 de SEQ ID NO: 1. En varios aspectos, el pre-ARNm de UBE3A

comprende una secuencia de ácido nucleico al menos 85% idéntica a la SEQ ID NO: 5. UBE3A-ATS puede comprender una secuencia de ácido nucleico al menos 85% idéntica a SEQ ID NO: 2 y la primera región de UBE3A-ATS consiste en nucleobases al menos 85% idéntica a nucleobases 446213 a 513602 de SEQ ID NO: 2. En varios aspectos, el pre-mRNA de UBE3A comprende una secuencia de ácido nucleico al menos 85% idéntica a SEQ ID NO: 6.

En la presente se describe un compuesto antisentido dirigido a UBE3A-ATS dentro de 35498 nucleobases aguas arriba del inicio de una región complementaria al pre-ARNm de UBE3A, en el que UBE3A-ATS comprende una secuencia de ácido nucleico al menos 85% idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 1. En un aspecto de la divulgación, la región complementaria al pre-ARNm de UBE3A consiste en las nucleobases 1032967 a 1110944 de la SEQ ID NO 1.

En la presente se describe un compuesto antisentido dirigido a UBE3A-ATS dentro de 67390 nucleobases aguas arriba del comienzo de una región complementaria al pre-ARNm de UBE3A, en donde el UBE3A-ATS comprende una secuencia de ácido nucleico al menos 85% idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 2. En un aspecto de la divulgación, la región complementaria al pre-mRNA de UBE3A se compone de nucleobases 513603 a través de 615382 de la SEQ ID NO: 2.

El compuesto antisentido para su uso de acuerdo con las reivindicaciones es capaz de reducir el nivel de UBE3A-ATS en la célula y/o inducir expresión de la proteína UBE3A paterna en la célula.

En cualquiera de las realizaciones mencionadas anteriormente y aspectos de las mismas, el compuesto antisentido comprende un oligonucleótido que consiste en 12 a 30 nucleósidos unidos, para su uso de acuerdo con las reivindicaciones, en donde el oligonucleótido es al menos 85% complementaria a una secuencia de ácido nucleico de UBE3A-ATS. En ciertos aspectos, el oligonucleótido es al menos 90%, al menos 95%, o 100% complementaria en toda su longitud a una región de igual longitud de una secuencia de ácido nucleico UBE3A-ATS. El compuesto u oligonucleótido antisentido puede ser un oligonucleótido monocatenario. En varios aspectos, el oligonucleótido es un oligonucleótido modificado. En el mismo aspecto, el oligonucleótido modificado puede comprender al menos un enlace internucleosídico modificado. Una vez más, en el mismo aspecto, el enlace internucleosídico modificado puede ser un enlace internucleosídico fosforotioato. En varios aspectos, al menos un nucleósido comprende un azúcar modificado. En el mismo aspecto, el azúcar modificado es un azúcar bicíclico que comprende un puente entre las posiciones 4' y 2' del azúcar, tal como un puente se selecciona de 4'-CH(CH₃)-O-2', 4'-CH₂-2', 4'-(CH₂)₂-2', 4'-CH₂-O-2', 4'-(CH₂)₂-O-2', 4'-CH₂-ON(R₁)-2' y 4'-CH₂-N(R₁)-O-2', en el que cada R₁ es, independientemente, H, un grupo protector o C₁-C₁₂ alquilo. Además en el mismo aspecto, el puente es 4'-CH(CH₃)-O-2'.

En cualquiera de las realizaciones anteriores y aspectos de las mismas que incluyen un azúcar modificado, el azúcar modificado puede comprender un grupo 2'-O-metoxietilo.

En cualquiera de las realizaciones anteriores y aspectos de las mismas que incluyen un oligonucleótido, al menos un nucleósido puede comprender una nucleobase modificada, tal como una 5-metilcitosina.

En cualquiera de las realizaciones anteriores y aspectos de las mismas, el compuesto antisentido o un oligonucleótido modificado es capaz de inducir la expresión de UBE3A paterno por al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 100%, al menos 110%, al menos 120%, al menos 130%, al menos 140%, al menos 150%, al menos 160%, al menos 170%, al menos 180%, al menos 190%, al menos 200%, al menos 210%, al menos 220%, al menos 230%, al menos 240% o al menos 250%.

50 Compuestos antisentido

Los compuestos oligoméricos incluyen, pero no se limitan a, oligonucleótidos, oligonucleósidos, análogos de oligonucleótidos, miméticos de oligonucleótidos, compuestos antisentido, oligonucleótidos antisentido y siARN. Un compuesto oligomérico puede ser "antisentido" para un ácido nucleico diana, lo que significa que es capaz de someterse a hibridación con un ácido nucleico diana mediante enlaces de hidrógeno.

En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido tiene una secuencia de nucleobases que, cuando se escribe en la dirección 5' a 3', comprende el complemento inverso del segmento diana de un ácido nucleico diana al que está dirigido. En ciertas de tales realizaciones, un oligonucleótido antisentido tiene una secuencia de nucleobases que, cuando se escribe en la dirección 5' a 3', comprende el complemento inverso del segmento diana de un ácido nucleico diana al que se dirige.

Un compuesto antisentido puede tener una longitud de 10-30 subunidades. En la invención, el compuesto antisentido tiene de 12 a 30 subunidades de longitud. En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido tiene de 12 a 22 subunidades de longitud. En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido tiene de 14 a 30 subunidades de

longitud. En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido tiene de 14 a 20 subunidades de longitud. En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido tiene 15 a 30 subunidades de longitud. En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido tiene de 15 a 20 subunidades de longitud. En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido tiene de 16 a 30 subunidades de longitud. En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido tiene una longitud de 16 a 20 subunidades. En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido tiene de 17 a 30 subunidades de longitud. En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido tiene de 17 a 20 subunidades de longitud. En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido tiene una longitud de 18 a 30 subunidades. En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido tiene de 18 a 21 subunidades de longitud. En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido tiene una longitud de 18 a 20 subunidades. En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido tiene de 20 a 30 subunidades de longitud. En otras palabras, tales compuestos antisentido son de 12 a 30 subunidades unidas, 14 a 30 subunidades unidas, 14 a 20 subunidades, 15 a 30 subunidades, 15 a 20 subunidades, 16 a 30 subunidades, 16 a 20 subunidades, 17 a 30 subunidades, 17 a 20 subunidades, 18 a 30 subunidades, 18 a 20 subunidades, 18 a 21 subunidades, 20 a 30 subunidades, o 12 a 22 subunidades vinculadas, respectivamente. En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido tiene 14 subunidades de longitud. En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido tiene 16 subunidades de longitud. En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido tiene 17 subunidades de longitud. En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido tiene 20 subunidades de longitud. El compuesto antisentido puede tener de 8 a 80, de 12 a 50, de 13 a 30, de 13 a 50, de 14 a 30, de 14 a 50, de 15 a 30, de 15 a 50, de 16 a 30, de 16 a 50, de 17 a 30, de 17 a 50, de 18 a 22, de 18 a 24, de 18 a 30, de 18 a 50, de 19 a 22, de 19 a 30, de 19 a 50 o 20 a 30 subunidades enlazadas. En otros casos, los compuestos antisentido son 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 subunidades unidas, o un rango definido por cualquiera de los dos valores anteriores. El compuesto antisentido puede ser un oligonucleótido antisentido, y las subunidades unidas son nucleótidos.

En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos antisentido, para su uso de acuerdo con las reivindicaciones, pueden acortarse o truncarse. Por ejemplo, una sola subunidad puede eliminarse del extremo 5' (truncamiento 5'), o alternativamente del extremo 3' (truncamiento 3'). Un compuesto antisentido acortado o truncado dirigido a un ácido nucleico de UBE3A-ATS puede tener dos subunidades eliminadas del extremo 5', o alternativamente pueden tener dos subunidades eliminadas del extremo 3', del compuesto antisentido. Alternativamente, los nucleósidos eliminados pueden dispersarse en todo el compuesto antisentido, por ejemplo, en un compuesto antisentido que tiene un nucleósido eliminado del extremo 5' y un nucleósido eliminado del extremo 3'.

Cuando una subunidad adicional única está presente en un compuesto antisentido alargado, la subunidad adicional puede localizarse en el extremo 5' o 3' del compuesto antisentido. Cuando están presentes dos o más subunidades adicionales, las subunidades añadidas pueden estar adyacentes entre sí, por ejemplo, en un compuesto antisentido que tiene dos subunidades añadidas al extremo 5' (adición 5'), o alternativamente al extremo 3' (adición 3'), del compuesto antisentido. Alternativamente, las subunidades añadidas se pueden dispersar en todo el compuesto antisentido, por ejemplo, en un compuesto antisentido que tiene una subunidad añadida al extremo 5' y una subunidad añadida al extremo 3'.

Es posible aumentar o disminuir la longitud de un compuesto antisentido, tal como un oligonucleótido antisentido, y/o introducir bases desajustadas sin eliminar la actividad. Por ejemplo, en Woolf et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 89: 7305-7309, 1992), se ensayó una serie de oligonucleótidos antisentido de 13-25 nucleobases de longitud para determinar su capacidad para inducir la escisión de un ARN diana en un modelo de inyección de oocitos. Los oligonucleótidos antisentido de 25 nucleobases de longitud con 8 u 11 bases desacopladas cerca de los extremos de los oligonucleótidos antisentido fueron capaces de dirigir la escisión específica del ARNm diana, aunque en menor medida que los oligonucleótidos antisentido que no contenían desapareamientos. De forma similar, se logró la escisión específica del objetivo usando 13 nucleótidos oligonucleótidos antisentido, que incluyen aquellos con 1 o 3 desapareamientos.

Gautschi et al. (J. Natl. Cancer Inst. 93: 463-471, marzo de 2001) demostraron la capacidad de un oligonucleótido que tiene un 100% de complementariedad con el mRNA bcl-2 y que tiene 3 desajustes con el mRNA bcl-xL para reducir la expresión de ambos bcl-2 y bcl-xL *in vitro* e *in vivo*. Además, este oligonucleótido demostró una potente actividad antitumoral *in vivo*.

Maher y Dolnick (Nuc Acid Res 16:3341-3358, 1988) ensayaron una serie de oligonucleótidos antisentido de nucleobase tándem 14, y 28 y 42 oligonucleótidos antisentido de nucleobases compuestos de la secuencia de dos o tres de los oligonucleótidos antisentido tándem, respectivamente, por su capacidad para detener la traducción de DHFR humana en un ensayo de reticulocitos de conejo. Cada uno de los tres oligonucleótidos antisentido de 14 nucleobases solos fue capaz de inhibir la traducción, aunque a un nivel más modesto que los oligonucleótidos antisentido de 28 o 42 nucleobases.

Ciertos motivos y mecanismos compuestos antisentido

En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido tienen subunidades modificadas químicamente dispuestas en patrones, o motivos, para conferir a los compuestos antisentido propiedades tales como la actividad inhibidora mejorada, aumento de la afinidad de unión para un ácido nucleico diana, o la resistencia a la degradación por nucleasas *in vivo*. Los compuestos antisentido químéricos típicamente contienen al menos una región modificada para conferir una resistencia incrementada a la degradación de la nucleasa, una captación celular incrementada, una afinidad de unión incrementada por el ácido nucleico diana y/o una actividad inhibidora incrementada. Una segunda región de un compuesto antisentido químérico puede conferir otra propiedad deseada, por ejemplo, servir como sustrato para la ribonucleasa RNasa H celular, que escinde la hebra de ARN de un dúplex de ARN: ADN.

- La actividad antisentido puede resultar de cualquier mecanismo que implica la hibridación del compuesto antisentido (por ejemplo, oligonucleótido) con un ácido nucleico diana, en el que la hibridación en última instancia resulta en un efecto biológico. En ciertas realizaciones, la cantidad y/o actividad del ácido nucleico diana está modulada. En ciertas realizaciones, se reduce la cantidad y/o actividad del ácido nucleico diana. En ciertas realizaciones, la hibridación del compuesto antisentido con el ácido nucleico diana finalmente da como resultado la degradación del ácido nucleico diana. En ciertas realizaciones, la hibridación del compuesto antisentido con el ácido nucleico diana no da como resultado la degradación del ácido nucleico diana. En ciertas de tales realizaciones, la presencia del compuesto antisentido hibridado con el ácido nucleico diana (ocupación) da como resultado una modulación de la actividad antisentido. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido para su uso de acuerdo con las reivindicaciones que tienen un motivo químico particular o patrón de modificaciones químicas son particularmente adecuados para explotar uno o más mecanismos. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido para su uso de acuerdo con las reivindicaciones funcionan a través de más de un mecanismo y/o a través de mecanismos que no se han elucidado. Por consiguiente, los compuestos antisentido para su uso de acuerdo con las reivindicaciones descritas en este documento no están limitados por un mecanismo particular.
- Los mecanismos antisentido incluyen, sin limitación, antisentido mediado por RNasa H; Mecanismos de RNAi, que utilizan la ruta de RISC e incluyen, sin limitación, mecanismos de siRNA, ssRNA y microRNA; y mecanismos basados en la ocupación. Ciertos compuestos antisentido pueden actuar a través de más de uno de tales mecanismos y/o a través de mecanismos adicionales.

30 Antisentido mediado por RNasa H

En ciertas realizaciones, la actividad antisentido resulta al menos en parte de la degradación del ARN diana por la RNasa H. La RNasa H es una endonucleasa celular que escinde la hebra de ARN de un dúplex de ARN: ADN. Se sabe en la técnica que los compuestos antisentido monocatenarios que son "similares a ADN" provocan actividad de RNasa H en células de mamífero. Por consiguiente, los compuestos antisentido que comprenden al menos una porción de ADN o nucleósidos de tipo ADN pueden activar la RNasa H, dando como resultado la escisión del ácido nucleico diana. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido para su uso de acuerdo con las reivindicaciones que utilizan RNasa H comprenden uno o más nucleósidos modificados. En ciertas realizaciones, tales compuestos antisentido comprenden al menos un bloque de 1-8 nucleósidos modificados. En ciertas de dichas realizaciones, los nucleósidos modificados no son compatibles con la actividad RNasa H. En ciertas realizaciones, tales compuestos antisentido son gápmberos, como se describe en este documento. En ciertas de dichas realizaciones, el espacio del gápmero comprende nucleósidos de ADN. En ciertas de tales realizaciones, el espacio del gápmero comprende nucleósidos de tipo ADN. En ciertas de tales realizaciones, el espacio del gápmero comprende nucleósidos de ADN y nucleósidos de tipo ADN.

Ciertos compuestos antisentido que tienen un motivo gápmero se consideran compuestos antisentido químéricos. En un gápmero, una región interna que tiene una pluralidad de nucleótidos que soporta la escisión de RNasa H se coloca entre regiones externas que tienen una pluralidad de nucleótidos que son químicamente distintos de los nucleósidos de la región interna. En el caso de un oligonucleótido antisentido que tiene un motivo gápmero, el segmento hueco generalmente sirve como sustrato para la escisión de endonucleasa, mientras que los segmentos de ala comprenden nucleósidos modificados. En ciertas realizaciones, las regiones de un gápmero se diferencian por los tipos de restos de azúcar que comprenden cada región distinta. Los tipos de restos de azúcar que se usan para diferenciar las regiones de un gápmero pueden en algunas realizaciones incluir β -D-ribonucleósidos, β -D-desoxirribonucleósidos, 2'-nucleósidos modificados (tales 2'-nucleósidos modificados pueden incluir 2'-MOE y 2'-O-CH₃, entre otros), y nucleósidos bicíclicos modificados de azúcar (tales nucleósidos bicíclicos modificados en el azúcar pueden incluir los que tienen un acetato constreñido). En ciertas realizaciones, los nucleósidos en las alas pueden incluir varios restos de azúcar modificados, que incluyen, por ejemplo, 2'-MOE y restos de azúcar bicíclicos tales como etilo o LNA constreñido. En ciertas realizaciones, las alas pueden incluir varios restos de azúcar modificados y no modificados. En ciertas realizaciones, las alas pueden incluir diversas combinaciones de nucleósidos 2'-MOE, restos de azúcar bicíclicos tales como nucleósidos de etilo constreñidos o nucleósidos de LNA, y 2'-desoxinucleósidos.

Cada región distinta puede comprender fracciones de azúcar uniformes, variantes o restos de azúcares alternados. El motivo del ala-hueco-ala se describe con frecuencia como "XYZ", donde "X" representa la longitud del ala 5', "Y" representa la longitud del hueco, y "Z" representa la longitud del ala 3'. "X" y "Z" pueden comprender

restos de azúcar uniformes, variantes o alternantes. En ciertas realizaciones, "X" e "Y" pueden incluir uno o más 2'-desoxinucleósidos. "Y" puede comprender 2'-desoxinucleósidos. Como se usa en el presente documento, un gápmero descrito como "XYZ" tiene una configuración tal que el hueco se coloca inmediatamente adyacente a cada una de las alas 5' y 3'. Por lo tanto, no existen nucleótidos intermedios entre el ala 5' y la brecha, o la brecha y el ala 5'. Cualquiera de los compuestos antisentido descritos en este documento puede tener un motivo de gápmero. En ciertas realizaciones, "X" y "Z" son iguales; en otras realizaciones, son diferentes. En ciertas realizaciones, "Y" está entre 8 y 15 nucleósidos. X, Y o Z pueden ser cualquiera de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30 o más nucleósidos.

10 En ciertas realizaciones, el compuesto antisentido para su uso de acuerdo con las reivindicaciones dirigido a un ácido nucleico UBE3A-ATS tiene un motivo gápmero en el que el hueco consiste en 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 nucleósidos unidos

15 En ciertas realizaciones, el oligonucleótido antisentido para su uso de acuerdo con las reivindicaciones tiene un motivo de azúcar descrito por la Fórmula A como sigue: $(J)_m-(B)_n-(J)_p-(B)_r-(A)_t-(D)_g-(A)_v-(B)_w-(J)_x-(B)_y-(J)_z$ en donde:

- cada A es independientemente un nucleósido 2'-sustituido;
- cada B es independientemente un nucleósido bicíclico;
- 20 cada J es independientemente un nucleósido 2'-sustituido o un 2'-desoxinucleósido;
- cada D es un 2'-desoxinucleósido;
- m es 0-4; n es 0-2; p es 0-2; r es 0-2; t es 0-2; v es 0-2; w es 0-4; x es 0-2; y es 0-2; z es 0-4; g es 6-14; siempre que:
- 25 al menos uno de m, n, y r es distinto de 0;
- al menos uno de w e y es distinto de 0;
- la suma de m, n, p, r y t es de 2 a 5; y
- la suma de v, w, x, y, y z es de 2 a 5.

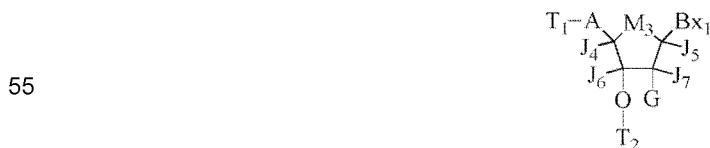
30 *Compuestos de RNAi*

En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido para su uso de acuerdo con las reivindicaciones son compuestos de ARN interferente (RNAi), que incluyen compuestos de ARN de doble hebra (también denominados ARN de interferencia corta o siRNA) y compuestos de RNAi monocatenarios (o ARNss). Dichos compuestos funcionan al menos en parte a través de la ruta de RISC para degradar y/o secuestrar un ácido nucleico diana (de este modo, incluyen compuestos de microARN/imitación de microARN). En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido para su uso de acuerdo con las reivindicaciones comprenden modificaciones que los hacen particularmente adecuados para tales mecanismos.

40 *i. Compuestos de ssRNA*

En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido para su uso de acuerdo con las reivindicaciones que incluyen aquellos particularmente adecuados para uso como compuestos de RNAi monocatenarios (ssRNA) comprenden un extremo 5' terminal modificado. En ciertas de dichas realizaciones, el extremo 5' terminal comprende un resto de fosfato modificado. En ciertas realizaciones, dicho fosfato modificado se estabiliza (por ejemplo, es resistente a la degradación/escisión en comparación con el 5'-fosfato no modificado). En ciertas realizaciones, dichos nucleósidos 5'-terminales estabilizan el resto 5'-fósforo. Ciertos nucleósidos 5'-terminales modificados pueden encontrarse en la técnica, por ejemplo en el documento WO/2011/139702.

50 En ciertas realizaciones, el 5'-nucleósido de un compuesto de ssRNA tiene la Fórmula IIc:



60

en donde:

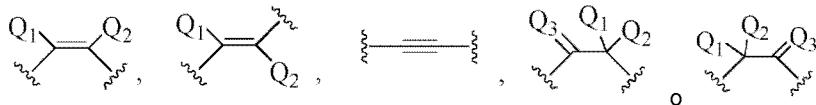
T₁ es un resto fósforo opcionalmente protegido;

65

T₂ es un grupo de enlace internucleosídico que une el compuesto de Fórmula IIc en el compuesto oligomérico;

A tiene una de las fórmulas:

5



10

Q₁ y Q₂ son cada uno, independientemente, H, halógeno, C₁-C₆ alquilo, C₁-C₆ alquilo sustituido, C₁-C₆ alcoxi, C₁-C₆ alcoxi sustituido, C₂-C₆ alquenilo, C₂-C₆ alquenilo sustituido, C₂-C₆ alquinilo, C₂-C₆ alquinilo sustituido o N(R₃)(R₄);

15

Q₃ es O, S, N(R₅) o C(R₆)(R₇);

cada R₃, R₄ R₅, R₆ y R₇ es, independientemente, H, C₁-C₆ alquilo, C₁-C₆ alquilo sustituido o C₁-C₆ alcoxi;

20

M₃ es O, S, NR₁₄, C(R₁₅)(R₁₆), C(R₁₅)(R₁₆)C(R₁₇)(R₁₈), C(R₁₅)=C(R₁₇), OC(R₁₅)(R₁₆) o OC(R₁₅)(BX₂);

25

R₁₄ es H, C₁-C₆ alquilo, C₁-C₆ alquilo sustituido, C₁-C₆ alcoxi, C₁-C₆ alcoxi sustituido, C₂-C₆ alquenilo, C₂-C₆ alquenilo sustituido, C₂-C₆ alquinilo o C₂-C₆ alquinilo sustituido;

30

R₁₅, R₁₆, R₁₇ y R₁₈ son cada uno, independientemente, H, halógeno, C₁-C₆ alquilo, C₁-C₆ alquilo sustituido, C₁-C₆ alcoxi, C₁-C₆ alcoxi sustituido, C₂-C₆ alquenilo, C₂-C₆ alquenilo sustituido, C₂-C₆ alquinilo o C₂-C₆ alquinilo sustituido;

BX₁ es un resto básico heterocíclico;

35

o si BX₂ está presente, entonces BX₂ es un resto de base heterocíclica y BX₁ es H, halógeno, C₁-C₆ alquilo, C₁-C₆ alquilo sustituido, C₁-C₆ alcoxi, C₁-C₆ alcoxi sustituido, C₂-C₆ alquenilo, C₂-C₆ alquenilo sustituido, C₂-C₆ alquinilo o C₂-C₆ alquinilo sustituido;

40

J₄, J₅, J₆ y J₇ son cada uno, independientemente, H, halógeno, C₁-C₆ alquilo, C₁-C₆ alquilo sustituido, C₁-C₆ alcoxi, C₁-C₆ alcoxi sustituido, C₂-C₆ alquenilo, C₂-C₆ alquenilo sustituido, C₂-C₆ alquinilo o C₂-C₆ alquinilo sustituido;

o J₄ forma un puente con uno de J₅ o J₇ en el que dicho puente comprende de 1 a 3 grupos birradicales vinculados seleccionados de O, S, NR₁₉, C(R₂₀)(R₂₁), C(R₂₀)=C(R₂₁), C[=C(R₂₀)(R₂₁)] y C(=O) y los otros dos de J₅, J₆ y J₇ son cada uno, independientemente, H, halógeno, C₁-C₆ alquilo, C₁-C₆ alquilo sustituido, C₁-C₆ alcoxi, C₁-C₆ alcoxi sustituido, C₂-C₆ alquenilo, C₂-C₆ alquenilo sustituido, C₂-C₆ alquinilo o C₂-C₆ alquinilo sustituido;

cada R₁₉, R₂₀ y R₂₁ es, independientemente, H, C₁-C₆ alquilo, C₁-C₆ alquilo sustituido, C₁-C₆ alcoxi, C₁-C₆ alcoxi sustituido, C₂-C₆ alquenilo, C₂-C₆ alquenilo sustituido, C₂-C₆ alquinilo o C₂-C₆ alquinilo sustituido;

45

G es H, OH, halógeno u O-[C(R₈)(R₉)]_n-[(C=O)_m-X₁]-Z;

cada R₈ y R₉ es, independientemente, H, halógeno, alquilo C₁-C₆ o alquilo C₁-C₆ sustituido;

50

X₁ es O, S o N(E₁);

Z es H, halógeno, C₁-C₆ alquilo, C₁-C₆ alquilo sustituido, C₂-C₆ alquenilo, C₂-C₆ alquenilo sustituido, C₂-C₆ alquinilo, C₂-C₆ alquinilo sustituido o N(E₂)(E₃);

55

E₁, E₂ y E₃ son cada uno, independientemente, H, C₁-C₆ alquilo o C₁-C₆ alquilo sustituido;

n es de 1 a aproximadamente 6;

60

m es 0 o 1;

j es 0 o 1;

65

cada grupo sustituido comprende uno o más grupos sustituyentes opcionalmente protegidos seleccionados independientemente de halógeno, OJ₁, N(J₁)(J₂), = NJ₁, SJ₁, N₃, CN, OC(=X₂)J₁, OC(=X₂)N(J₁)(J₂) y C(=X₂)N(J₁)(J₂);

X₂ es O, S o NJ₃;

5 cada J₁, J₂ y J₃ es, independientemente, H o C₁-C₆ alquilo;

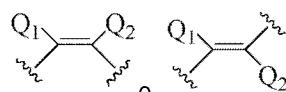
cuando j es 1 entonces Z es distinto de halógeno o N(=)(E₃); y

10 en el que dicho compuesto oligomérico comprende de 8 a 40 subunidades monoméricas y es hibridable a al menos una porción de un ácido nucleico diana.

10 En ciertas realizaciones, M₃ es O, CH=CH, OCH₂ o OC(H)(BX₂). En ciertas realizaciones, M₃ es O.

15 En ciertas realizaciones, J₄, J₅, J₆ y J₇ son cada uno H. En ciertas realizaciones, J₄ forma un puente con una de J₅ o J₇.

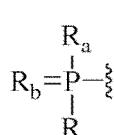
15 En ciertas realizaciones, A tiene una de las fórmulas:



20 en donde:

25 Q₁ y Q₂ son cada uno, independientemente, H, halógeno, C₁-C₆ alquilo, C₁-C₆ alquilo sustituido, C₁-C₆ alcoxi o C₁-C₆ alcoxi sustituido. En ciertas realizaciones, Q₁ y Q₂ son cada uno H. En ciertas realizaciones, Q₁ y Q₂ son cada uno, independientemente, H o halógeno. En ciertas realizaciones, Q₁ y Q₂ es H y el otro de Q₁ y Q₂ es F, CH₃ o OCH₃.

30 En ciertas realizaciones, T₁ tiene la fórmula:



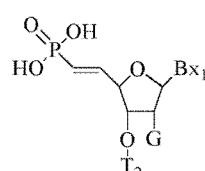
35 en donde:

40 R_a y R_c son cada uno, independientemente, hidroxilo protegido, tiol protegido, C₁-C₆ alquilo, C₁-C₆ alquilo sustituido, C₁-C₆ alcoxi, C₁-C₆ alcoxi sustituido, amino protegido o amino sustituido; y

45 R_b es O o S. En ciertas realizaciones, R_b es O y R_a y R_c son cada uno, independientemente, OCH₃, OCH₂CH₃ o CH(CH₃)₂.

45 En ciertas realizaciones, G es halógeno, OCH₃, OCH₂F, OCF₃, OCH₂CH₃, O(CH₂)₂F, OCH₂CHF₂, OCH₂CF₃, OCH₂-CH=CH₂, O(CH₂)₂-OCH₃, O(CH₂)₂-SCH₃, O(CH₂)₂-OCF₃, O(CH₂)₃-N(R₁₀)(R₁₁), O(CH₂)₂-ON(R₁₀)(R₁₁), O(CH₂)₂-O(CH₂)₂-N(R₁₀)(R₁₁), OCH₂C(=O)-N(R₁₀)(R₁₁), OCH₂C(=O)-N(R₁₂)-(CH₂)₂-N(R₁₀)(R₁₁) u O(CH₂)₂-N(R₁₂)-C(=NR₁₃)[N(R₁₀)(R₁₁)]. En donde R₁₀, R₁₁, R₁₂ y R₁₃ son cada uno, independientemente, H o C₁-C₆ alquilo. En ciertas realizaciones, G es halógeno, OCH₃, OCF₃, OCH₂CH₃, OCH₂CF₃, OCH₂-CH=CH₂, O(CH₂)₂-OCH₃, O(CH₂)₂-O(CH₂)₂-N(CH₃)₂, OCH₂C(=O)-N(H)CH₃, OCH₂C(=O)-N(H)-(CH₂)₂-N(CH₃)₂ o OCH₂-N(H)-C(=NH)NH₂. En ciertas realizaciones, G es F, OCH₃ o O(CH₂)₂-OCH₃. En ciertas realizaciones, G es O(CH₂)₂-OCH₃.

55 En ciertas realizaciones, el nucleósido 5'-terminal tiene Fórmula IIe:



IIe

En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido para su uso de acuerdo con las reivindicaciones, que incluyen aquellos particularmente adecuados para ssRNA comprenden uno o más tipos de restos de azúcar modificados y/o restos de azúcar de origen natural dispuestos a lo largo de un oligonucleótido o región del mismo en un patrón definido o motivo de modificación de azúcar. Dichos motivos pueden incluir cualquiera de las 5 modificaciones de azúcar discutidas aquí y/u otras modificaciones de azúcar conocidas.

En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos para su uso de acuerdo con las reivindicaciones comprenden o consisten en una región que tiene modificaciones de azúcar uniformes. En ciertas de tales realizaciones, cada nucleósido de la región comprende la misma modificación de azúcar similar a ARN. En ciertas realizaciones, cada nucleósido de la región es un nucleósido 2'-F. En ciertas realizaciones, cada nucleósido de la región es un nucleósido 2'-OMe. En ciertas realizaciones, cada nucleósido de la región es un nucleósido 2'-MOE. En ciertas realizaciones, cada nucleósido de la 10 región es un nucleósido cEt. En ciertas realizaciones, cada nucleósido de la región es un nucleósido de LNA. En ciertas realizaciones, la región uniforme constituye todo o esencialmente todo el oligonucleótido. En ciertas realizaciones, la región constituye el oligonucleótido completo excepto por 1-4 nucleósidos terminales.

En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos para su uso de acuerdo con las reivindicaciones comprenden una o más regiones de modificaciones alternas de azúcar, en donde los nucleósidos alternan entre nucleótidos que tienen una modificación de azúcar de un primer tipo y nucleótidos que tienen una modificación de azúcar de un 20 segundo tipo. En ciertas realizaciones, los nucleósidos de ambos tipos son nucleósidos de tipo ARN. En ciertas realizaciones, los nucleósidos alternativos se seleccionan de: 2'-OMe, 2'-F, 2'-MOE, LNA y cEt. En ciertas realizaciones, las modificaciones alternas son 2'-F y 2'-OMe. Dichas regiones pueden ser contiguas o pueden estar interrumpidas por nucleósidos modificados de forma diferente o nucleósidos conjugados.

En ciertas realizaciones, la región alternante de modificaciones alternas cada una consiste en un único nucleósido (es decir, el patrón es $(AB)_x A_y$ donde A es un nucleósido que tiene una modificación de azúcar de un primer tipo y B es un nucleósido que tiene una modificación de azúcar de un segundo tipo; x es 1-20 e y es 0 o 1). En ciertas realizaciones, una o más regiones alternas en un motivo alternativo incluyen más de un único nucleósido de un tipo. Por ejemplo, los oligonucleótidos pueden incluir una o más regiones de cualquiera de los siguientes 30 motivos de nucleósidos:

AABBAA;
ABBABB;
AABAAB;
35 ABBABAABB;
ABABAA;
AABABAB;
ABABAA;
ABBAABBABABAA;
40 BABBAABBABABAA; o
ABBABAAABBABABAA;

en donde A es un nucleósido de un primer tipo y B es un nucleósido de un segundo tipo. En ciertas realizaciones, A y B se seleccionan cada uno entre 2'-F, 2'-OMe, BNA y MOE.

45 En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos para su uso de acuerdo con las reivindicaciones que tienen dicho motivo alternante también comprenden un nucleósido 5' terminal modificado, tal como los de fórmula IIc o IIe.

En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos comprenden una región que tiene un motivo 2-2-3. Tales 50 regiones comprenden el siguiente motivo:
-(A)₂-(B)_x-(A)₂-(C)_y-(A)₃-

en donde: A es un primer tipo de nucleosido modificado;
55 B y C son nucleósidos que están modificados de forma diferente que A, sin embargo, B y C pueden tener las mismas o diferentes modificaciones entre sí;
x e y son del 1 al 15.

En ciertas realizaciones, A es un nucleósido modificado 2'-OMe. En ciertas realizaciones, B y C son nucleósidos modificados en 2'-F. En ciertas realizaciones, A es un nucleósido modificado 2'-OMe y B y C son ambos 60 nucleósidos modificados en 2'-F.

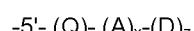
En ciertas realizaciones, los oligonucleósidos tienen el siguiente motivo de azúcar:

-5'-(Q)-(AB)_xA_y-(D)_z

en donde:

- Q es un nucleósido que comprende un resto de fosfato estabilizado. En ciertas realizaciones, Q es un nucleósido que tiene la Fórmula IIc o IIe;
- 5 A es un primer tipo de nucleósido modificado;
- B es un segundo tipo de nucleósido modificado;
- D es un nucleósido modificado que comprende una modificación diferente del nucleósido adyacente al mismo. Por lo tanto, si y es 0, entonces D debe modificarse de forma diferente que B y si y es 1, entonces D debe modificarse de manera diferente que A. En ciertas realizaciones, D difiere de A y B.
- 10 X es 5-15;
- Y es 0 o 1;
- Z es 0-4.

En ciertas realizaciones, los oligonucleósidos tienen el siguiente motivo de azúcar:



en donde:

- 20 Q es un nucleósido que comprende un resto de fosfato estabilizado. En ciertas realizaciones, Q es un nucleósido que tiene la Fórmula IIc o IIe;
- A es un primer tipo de nucleósido modificado;
- D es un nucleósido modificado que comprende una modificación diferente de A.
- 25 X es 11-30;
- Z es 0-4.

En ciertas realizaciones, A, B, C y D en los motivos anteriores se seleccionan entre: 2'-OMe, 2'-F, 2'-MOE, LNA y cEt. En ciertas realizaciones, D representa nucleósidos terminales. En ciertas realizaciones, dichos nucleósidos terminales no están diseñados para hibridar con el ácido nucleico diana (aunque uno o más podrían hibridar por casualidad). En ciertas realizaciones, la nucleobase de cada nucleósido D es adenina, independientemente de la identidad de la nucleobase en la posición correspondiente del ácido nucleico diana. En ciertas realizaciones, la nucleobase de cada nucleósido D es timina.

35 En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido para su uso de acuerdo con las reivindicaciones, que incluyen aquellos particularmente adecuados para su uso como ssRNA comprenden enlaces internucleosídicos modificados dispuestos a lo largo del oligonucleótido o región del mismo en un patrón definido o motivo de vinculación internucleósido modificado. En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos para su uso de acuerdo con las reivindicaciones comprenden una región que tiene un motivo de enlace inter-nucleósido alternativo. En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos comprenden una región de enlaces internucleosídicos modificados uniformemente. En ciertas de dichas realizaciones, el oligonucleótido comprende una región que está unida uniformemente por enlaces internucleosídicos de fosforotioato. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido para su uso de acuerdo con las reivindicaciones está unido uniformemente mediante enlaces internucleosídicos de fosforotioato. En ciertas realizaciones, cada enlace internucleosídico del oligonucleótido se selecciona de fosfodiéster y fosforotioato. En ciertas realizaciones, cada enlace internucleosídico del oligonucleótido se selecciona de fosfodiéster y fosforotioato y al menos un enlace internucleosídico es fosforotioato.

45 En ciertas realizaciones, el oligonucleótido para su uso de acuerdo con las reivindicaciones comprende al menos 6 enlaces internucleosídicos de fosforotioato. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido para su uso de acuerdo con las reivindicaciones comprende al menos 8 enlaces internucleosídicos de fosforotioato. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido para su uso de acuerdo con las reivindicaciones comprende al menos 10 enlaces internucleosídicos de fosforotioato. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido para su uso de acuerdo con las reivindicaciones comprende al menos un bloque de al menos 6 enlaces internucleosídicos de fosforotioato consecutivos. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido para su uso de acuerdo con las reivindicaciones comprende al menos un bloque de al menos 8 enlaces internucleosídicos de fosforotioato consecutivos. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido para su uso de acuerdo con las reivindicaciones comprende al menos 10 enlaces internucleosídicos de fosforotioato consecutivos. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido para su uso de acuerdo con las reivindicaciones comprende al menos un bloque de al menos 12 enlaces internucleosídicos de fosforotioato consecutivos. En ciertas de dichas realizaciones, al menos uno de dichos bloques está ubicado en el extremo 3' del oligonucleótido. En ciertas de dichas realizaciones, al menos uno de dichos bloques está ubicado dentro de 3 nucleósidos del extremo 3' del oligonucleótido.

60 Los oligonucleótidos que tienen cualquiera de los diversos motivos de azúcar descritos en este documento, pueden tener cualquier motivo de enlace. Por ejemplo, los oligonucleótidos, que incluyen, pero no se limitan a, los descritos anteriormente, pueden tener un motivo de enlace seleccionado de la siguiente tabla no limitativa:

| | 5' más enlace | Región central | Región 3' |
|----|---------------|------------------|-----------|
| 5 | PS | PO/PS alternante | 6 PS |
| 10 | PS | PO/PS alternante | 7 PS |
| | PS | PO/PS alternante | 8 PS |

10 *ii. Compuestos siRNA*

Los compuestos antisentido pueden ser compuestos de RNAi de doble hebra (ARNip). En tales realizaciones, una o ambas hebras pueden comprender cualquier motivo de modificación descrito anteriormente para ssRNA. En ciertas realizaciones, los compuestos de ssRNA pueden ser RNA no modificado. En ciertas realizaciones, los compuestos de siRNA pueden comprender nucleósidos de ARN no modificados, pero enlaces internucleosídicos modificados.

En la presente se divultan composiciones bicatenarias en las que cada hebra comprende un motivo definido por la ubicación de uno o más nucleósidos modificados o no modificados. Se divultan composiciones que comprenden un primer y un segundo compuesto oligomérico que están hibridados completamente o al menos parcialmente para formar una región dúplex y que comprende además una región que es complementaria e hibrida con un objetivo de ácido nucleico. Es adecuado que dicha composición comprenda un primer compuesto oligomérico que es una hebra antisentido que tiene complementariedad total o parcial con un objetivo de ácido nucleico y un segundo compuesto oligomérico que es una hebra sentido que tiene una o más regiones de complementariedad y que forma al menos una región dúplex con el primer compuesto oligomérico.

Las composiciones de varias formas de realización modular la expresión génica hibridando con un objetivo de ácido nucleico dando como resultado la pérdida de su función normal. En algunas realizaciones, el ácido nucleico diana es UBE3A-ATS. La degradación del UBE3A-ATS diana puede verse facilitada por un complejo de RISC activado que se forma con las composiciones de la invención.

En la presente se describen composiciones bicatenarias en las que una de las hebras es útil, por ejemplo, en la carga preferencial de la hebra opuesta en el complejo RISC (o división). Las composiciones son útiles para dirigir moléculas de ácido nucleico seleccionadas y modular la expresión de uno o más genes. Las composiciones pueden hibridar con una porción de un ARN diana dando como resultado la pérdida de la función normal del ARN diana.

En la presente se describen composiciones de doble hebra en las que ambas hebras comprenden un motivo de hemimal, un motivo completamente modificado, un motivo modificado posicionalmente o un motivo alternante. Cada hebra de las composiciones de la presente invención puede modificarse para cumplir un papel particular en, por ejemplo, la ruta de siRNA. Al usar un motivo diferente en cada hebra o el mismo motivo con diferentes modificaciones químicas en cada hebra permite dirigir la hebra antisentido para el complejo RISC mientras que se inhibe la incorporación de la hebra sentido. Dentro de este modelo, cada hebra se puede modificar de forma independiente de modo que se mejore para su función particular. La hebra antisentido puede modificarse en el extremo 5' para mejorar su función en una región del RISC, mientras que el extremo 3' puede modificarse diferencialmente para mejorar su función en una región diferente del RISC.

Las moléculas de doble hebra de oligonucleótidos puede ser una molécula de polinucleótido bicatenario que comprende regiones con sentido y antisentido autocomplementarias, en donde la región antisentido comprende la secuencia de nucleótidos que es complementaria a la secuencia de nucleótidos en una molécula de ácido nucleico diana o una parte de la misma y la región sentido tiene una secuencia de nucleótidos correspondiente a la secuencia de ácido nucleico diana o una porción de la misma. Las moléculas de oligonucleótidos bicatenarias se pueden ensamblar a partir de dos oligonucleótidos separados, donde una hebra es la hebra sentido y la otra es la hebra antisentido, donde las hebras sentido y antisentido son autocomplementarias (es decir, cada hebra comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a la secuencia de nucleótidos en la otra hebra, tal como cuando la hebra antisentido y la hebra sentido forman una estructura dúplex o bicatenaria, por ejemplo, en donde la región bicatenaria es de aproximadamente 15 a aproximadamente 30, por ejemplo, aproximadamente 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 pares de bases; la hebra antisentido comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a la secuencia de nucleótidos en una molécula de ácido nucleico diana o una porción de la misma y la hebra sentido comprende la secuencia de nucleótidos correspondiente a la secuencia de ácido nucleico diana o una porción de la misma (p. ej., aproximadamente 15 a aproximadamente 25 o más nucleótidos de la molécula de oligonucleótido bicatenario son complementarios al ácido nucleico diana o una porción del mismo). Alternativamente, el oligonucleótido bicatenario se ensambla a partir de un solo oligonucleótido, donde las regiones sentido y antisentido autocomplementarias del siRNA se unen por medio de un (unos)

enlazador(es) basado(s) en ácido nucleico o no ácido nucleico.

El oligonucleótido de doble hebra puede ser un polinucleótido con un duplex, dúplex asimétrica, horquilla o estructura secundaria de horquilla asimétrica, que tiene regiones con sentido y antisentido autocomplementarias, en donde la región antisentido comprende la secuencia de nucleótidos que es complementaria a la secuencia de nucleótidos en una molécula de ácido nucleico diana separada o una porción de la misma y la región de sentido que tiene una secuencia de nucleótidos correspondiente a la secuencia de ácido nucleico diana o una porción de la misma. El oligonucleótido bicatenario puede ser un polinucleótido monocatenario circular que tiene dos o más estructuras de bucle y un vástago que comprende regiones sentido y antisentido autocomplementarias, donde la región antisentido comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a la secuencia de nucleótidos en una molécula de ácido nucleico diana o una parte de la misma y la región de sentido que tiene una secuencia de nucleótidos correspondiente a la secuencia de ácido nucleico diana o una porción de la misma, y en la que el polinucleótido circular puede procesarse *in vivo* o *in vitro* para generar una molécula de siRNA activa capaz de mediar RNAi.

El oligonucleótido bicatenario puede comprender secuencias o regiones sentido y antisentido separadas, en donde las regiones sentido y antisentido están unidas covalentemente por moléculas de enlace de nucleótido o no nucleótido como se conoce en la técnica, o son alternativamente enlazadas no covalentemente por interacciones iónicas, enlaces de hidrógeno, interacciones de van der waals, interacciones hidrofóbicas e/o interacciones de apilamiento. El oligonucleótido bicatenario puede comprender una secuencia de nucleótidos que es complementaria a la secuencia de nucleótidos de un gen diana. En otra realización, el oligonucleótido bicatenario interacciona con la secuencia de nucleótidos de un gen objetivo de una manera que causa la inhibición de la expresión del gen diana.

Tal como se usa en la presente memoria, los oligonucleótidos bicatenarios no necesitan limitarse a las moléculas que contienen solo ARN, sino que incluyen además nucleótidos y no nucleótidos modificados químicamente. Las moléculas de ácido nucleico diferentes cortas pueden carecer de nucleótidos que contienen 2'-hidroxi (2'-OH). Los ácidos nucleicos que interfieren brevemente pueden no incluir opcionalmente ningún ribonucleótido (por ejemplo, nucleótidos que tengan un grupo 2'-OH). Dichos oligonucleótidos bicatenarios que no requieren la presencia de ribonucleótidos dentro de la molécula para soportar RNAi pueden sin embargo tener un enlazador unido o enlazadores u otros grupos, restos o hebras unidas o asociadas que contienen uno o más nucleótidos con grupos 2'-OH. Opcionalmente, los oligonucleótidos bicatenarios pueden comprender ribonucleótidos a aproximadamente 5, 10, 20, 30, 40 o 50% de las posiciones de nucleótidos. Como se usa en el presente documento, el término siRNA pretende ser equivalente a otros términos utilizados para describir moléculas de ácido nucleico que son capaces de mediar RNAi específico de la secuencia, por ejemplo, ARN corto de interferencia (siRNA), ARN bicatenario (dsRNA), micro-ARN (miARN), ARN corto en horquilla (shRNA), oligonucleótido interferente corto, ácido nucleico interferente corto, oligonucleótido modificado interferente corto, ARNsi modificado químicamente, ARN silenciador de genes postranscripcionales (ARNgst) y otros. Además, como se usa en el presente documento, el término RNAi pretende ser equivalente a otros términos usados para describir la interferencia de ARN específica de la secuencia, tal como silenciamiento génico postranscripcional, inhibición traduccional o epigenética. Por ejemplo, los oligonucleótidos bicatenarios se pueden usar para silenciar epigenéticamente genes tanto a nivel post-transcripcional como a nivel pre-transcripcional. En un ejemplo no limitante, la regulación epigenética de la expresión génica por moléculas de siRNA de la invención puede resultar de la modificación mediada por siRNA de la estructura de la cromatina o el patrón de metilación para alterar la expresión génica (véase, por ejemplo, Verdel et al., 2004, *Science*, 303), 672 - 676; Pal-Bhadra et al., 2004, *Science*, 303, 669 - 672; Allshire, 2002, *Science*, 297, 1818 - 1819; Volpe et al., 2002, *Science*, 297, 1833 - 1837; Jenuwein., 2002, *Science*, 297, 2215 - 2218, y Hall et al., 2002, *Science*, 297, 2232 - 2223).

Se contempla que los compuestos y composiciones pueden dirigirse UBE3A-ATS por un silenciamiento génico mediado por dsRNA o mecanismo de RNAi, incluyendo, por ejemplo, "horquilla" o moléculas efectoras de ARN de doble hebra de bucle de tallo en donde una única hebra de ARN con secuencias autocomplementarias es capaz de asumir una conformación bicatenaria, o moléculas efectoras dsRNA dúplex que comprenden dos hebras separadas de ARN. El dsRNA puede consistir completamente de ribonucleótidos o consiste en una mezcla de ribonucleótidos y deoxinucleótidos, tales como los híbridos de ARN/ADN descritos, por ejemplo, por el documento WO 00/63364, presentado el 19 de abril de 2000, o el documento de EE.UU. Nº 60/130,377, presentado el 21 de abril de 1999. La molécula efectora dsRNA o dsRNA puede ser una molécula individual con una región de autocomplementariedad tal que los nucleótidos en un segmento de la molécula forman pares de bases con nucleótidos en otro segmento de la molécula. Un dsRNA que consiste en una sola molécula consiste completamente en ribonucleótidos o incluye una región de ribonucleótidos que es complementaria a una región de desoxirribonucleótidos. Alternativamente, el dsRNA puede incluir dos hebras diferentes que tienen una región de complementariedad entre sí.

Ambas hebras pueden consistir completamente en ribonucleótidos, una hebra está compuesta completamente por ribonucleótidos y una hebra está compuesta completamente por desoxirribonucleótidos, o una o ambas hebras contienen una mezcla de ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos. Las regiones de complementariedad pueden ser al menos 70, 80, 90, 95, 98 o 100% complementarias entre sí y con una secuencia

de ácido nucleico diana. La región del dsRNA que está presente en una conformación bicatenaria puede incluir al menos 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 50, 75, 100, 200, 500, 1000, 2000 o 5000 nucleótidos o incluye todos los nucleótidos en un ADNc u otra secuencia de ácido nucleico diana representada en el ARNbC. El dsRNA puede no contener ninguna región monocatenaria, como los extremos monocatenarios, o el dsRNA es una horquilla.

5 El dsRNA puede tener una o más regiones monocatenarias o salientes. Los híbridos de ARN/ADN pueden incluir una hebra o región de ADN que es una hebra o región antisentido (p. ej., Tiene al menos 70, 80, 90, 95, 98 o 100% de complementariedad con un ácido nucleico diana) y un ARN hebra o región que es una hebra sentido o región (por ejemplo, tiene al menos 70, 80, 90, 95, 98 o 100% de identidad con un ácido nucleico diana), y viceversa.

10 El híbrido ARN/ADN se prepara *in vitro* usando métodos enzimáticos o de síntesis química tales como los descritos en la presente memoria o los descritos en el documento WO 00/63364, presentado el 19 de abril de 2000, o el documento de EE.UU. Nº de serie 60/130.377, presentado el 21 de abril de 1999. Una hebra de ADN sintetizada *in vitro* puede formar complejos con una hebra de ARN producida *in vivo* o *in vitro* antes, después o concurrentemente con la transformación de la hebra de ADN en la célula. El dsRNA puede ser un único ácido nucleico circular que contiene una región sentido y antisentido, o el dsRNA incluye un ácido nucleico circular y un segundo ácido nucleico circular o un ácido nucleico lineal (véase, por ejemplo, WO 00/63364, presentado el 19 de abril de 2000, o el documento de EE.UU. Nº de serie 60/130.377, presentado el 21 de abril de 1999). Ejemplos de ácidos nucleicos circulares incluyen estructuras de lariat en las que el grupo 5' fosforilo libre de un nucleótido se une al grupo hidroxilo 2' de otro nucleótido en una forma de retorno de bucle.

20 El dsRNA puede incluir uno o más nucleótidos modificados en los que la posición 2' en el azúcar contiene un halógeno (tal como un grupo flúor) o contiene un grupo alcoxi (tal como un grupo metoxi) que aumenta la vida media del dsRNA *in vitro* o *in vivo* en comparación con el dsRNA correspondiente en el que la posición 2' correspondiente contiene un hidrógeno o un grupo hidroxilo. En otras realizaciones más, el dsRNA incluye uno o más enlaces entre nucleótidos adyacentes distintos de un enlace fosfodiéster de origen natural. Los ejemplos de tales enlaces incluyen enlaces de fosforamida, fosforotioato y fosforoditioato. Los dsRNAs también pueden ser moléculas de ácido nucleico modificadas químicamente como se describe en la patente de EE.UU. Nº 6.673.661. En otras realizaciones, el dsARN contiene una o dos hebras coronadas, como se describe, por ejemplo, por el documento WO 00/63364, presentado el 19 de abril de 2000, o el documento de EE.UU. Nº 60/130.377, presentado el 21 de abril de 1999.

30 El dsRNA puede ser cualquiera de las moléculas de dsRNA al menos parcialmente descritas en el documento WO 00/63364, así como cualquiera de las moléculas de dsRNA descritas en la Solicitud Provisional de EE.UU. 60/399,998; y la Solicitud Provisional de EE.UU. 60/419.532, y PCT/US2003/033466. Cualquiera de los dsRNAs se puede expresar *in vitro* o *in vivo* usando los métodos descritos en este documento o métodos estándar, tales como los descritos en el documento WO 00/63364.

Ocupación

40 En ciertas realizaciones, no se espera que los compuestos antisentido para su uso de acuerdo con las reivindicaciones den como resultado la escisión o el ácido nucleico diana a través de la RNasa H o que den como resultado la escisión o el secuestro a través de la ruta RISC. En ciertas de tales realizaciones, la actividad antisentido puede resultar de la ocupación, en donde la presencia del compuesto antisentido hibrido interrumpe la actividad del ácido nucleico diana. En ciertas de tales realizaciones, el compuesto antisentido puede modificarse uniformemente o puede comprender una mezcla de modificaciones y/o nucleósidos modificados y no modificados.

Ácidos nucleicos diana, regiones diana y secuencias de nucleótidos

50 El ácido nucleico UBE3A-ATS puede comprender la secuencia indicada en el complemento de GENBANK Nº de acceso NT_187035.1 truncado de los nucleótidos 66484120 a 67595063 (incorporado aquí como SEQ ID NO: 1) o la secuencia establecida en el número de acceso de GENBANK NT_026446.14 truncado de los nucleótidos 25068794 a 25684175 (incorporado aquí como SEQ ID NO: 2). La SEQ ID NO: 1 proporciona la secuencia del cromosoma 7 del genoma del ratón y la SEQ ID NO: 2 proporciona la secuencia del cromosoma 15 del genoma humano. Los loci genómicos de ratón y humanos correspondientes a estas SEQ ID NOs comparten una organización genómica altamente conservada que incluye un gen Snrpn, snoRNAs y UBE3A-ATS en la misma disposición estructural a lo largo de sus cromosomas sintéticos. Además del mapa genómico altamente conservado de los loci sintéticos humanos y de ratón, el mecanismo de impresión genómica también se conserva en este loci; en ratones y humanos, la mayoría de las neuronas expresan Ube3a solo del alelo heredado por la madre. (Huang, HS y col., Nature, 481: 185-189, 2012)

60 UBE3A-ATS puede comprender una secuencia de ácido nucleico al menos 85%, al menos 90%, al menos 95% o 100% idéntica al complemento del GENBANK Nº de acceso NT_187035.1 truncado de los nucleótidos 66484120 a 67595063 (incorporado aquí como SEQ ID NO: 1) o al GENBANK Nº de acceso NT_026446.14 truncado desde los nucleótidos 25068794 a 25684175 (incorporado aquí como SEQ ID NO: 2). En ciertas realizaciones, UBE3A comprende una secuencia de ácido nucleico al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, o

100% idéntica al complemento inverso de los nucleótidos 1032967 a 1110944 de SEQ ID NO: 1 (incorporada aquí como SEQ ID NO: 5) o el complemento inverso de los nucleótidos 513603 a 615382 de la SEQ ID NO: 2 (incorporado aquí como SEQ ID NO: 6).

5 El direccionamiento incluye la determinación de al menos un segmento diana al que se hibrida un compuesto antisentido, de manera que se produce un efecto deseado. En ciertas realizaciones, el efecto deseado es una reducción en los niveles de ácido nucleico de UBE3A-ATS. En ciertas realizaciones, el efecto deseado es la expresión inducida de UBE3A paterno.

10 Los compuestos antisentido pueden dirigirse a UBE3A-ATS, que comprende una secuencia de ácido nucleico al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, o 100% idéntica al complemento de GENBANK Nº de acceso NT_187035.1 truncado desde los nucleótidos 66484120 a 67595063 (incorporado aquí como SEQ ID NO: 1) o el GENBANK Nº de acceso NT_026446.14 truncado desde los nucleótidos 25068794 a 25684175 (incorporado aquí como SEQ ID NO: 2). En ciertos aspectos, los compuestos antisentido para su uso de acuerdo con las reivindicaciones se dirigen a una región de UBE3A-ATS aguas arriba de la región de UBE3A-ATS complementaria a al menos el extremo 3' de un pre-ARNm de UBE3A. Dicho de otra manera, en ciertos aspectos, los compuestos antisentido para su uso de acuerdo con las reivindicaciones se dirigen a una región de UBE3A-ATS que está aguas arriba de la región de UBE3A-ATS que se solapa o antisentido con UBE3A. Por ejemplo, la región de UBE3A-ATS complementaria a al menos el extremo 3' del pre-ARNm de UBE3A puede comenzar en la nucleobase 1032967 de la SEQ ID NO 1 o la nucleobase 513603 de la SEQ ID NO: 2. En ciertos aspectos, la región de UBE3A-ATS complementaria a al menos el extremo 3' del pre-ARNm de UBE3A puede consistir en las nucleobases 1032967 a 1110944 de la SEQ ID NO: 1 o las nucleobases 513603 a 615382 de la SEQ ID NO: 2.

25 En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido para su uso de acuerdo con las reivindicaciones se dirigen a una primera región de UBE3A-ATS flanqueada por (a) una región aguas arriba y (b) una región aguas abajo complementaria al menos al extremo 3' de un pre-ARNm de UBE3A. Dicho de otra manera, en ciertas realizaciones, los compuestos antisentido para su uso de acuerdo con las reivindicaciones se dirigen a una primera región de UBE3A-ATS que está flanqueada por (a) una región aguas arriba y (b) una región aguas abajo que se solapa o es antisentido con UBE3A. En ciertas realizaciones, la primera región puede consistir en una secuencia de 30 nucleótidos al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, o 100% idéntica a nucleobases 997469 a 1032966 de SEQ ID NO: 1 (el complemento de GENBANK Nº de acceso NT_187035.1 truncado desde los nucleótidos 66484120 a 67595063). En ciertas realizaciones, la primera región puede consistir en una secuencia de nucleótidos al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, o 100% idéntica a las nucleobases 446213 a 513602 de la SEQ ID NO: 2 (GENBANK Nº de acceso NT_026446.14 truncado de los nucleótidos 25068794 a 25684175). En ciertos aspectos, 35 la región aguas abajo complementaria a al menos el extremo 3' del pre-ARNm de UBE3A puede consistir en las nucleobases 1032967 a 1110944 de la SEQ ID NO 1 o las nucleobases 513603 a 615382 de la SEQ ID NO: 2.

40 En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido para su uso de acuerdo con las reivindicaciones se dirigen a UBE3A-ATS dentro de 35498 nucleobases aguas arriba del inicio de una región complementaria a al menos el extremo 3' del pre-ARNm de UBE3A, en donde UBE3A-ATS comprende una secuencia de ácido nucleico en al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, o 100% idéntico al complemento de GENBANK Nº de registro NT_187035.1 truncado de los nucleótidos 66484120 a 67595063 (incorporado aquí como SEQ ID NO: 1). En ciertos aspectos, la región complementaria a al menos el extremo 3' del pre-ARNm de UBE3A consiste en las nucleobases 1032967 a 1110944 de la SEQ ID NO: 1. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido para su uso de acuerdo con las reivindicaciones se dirigen a UBE3A-ATS dentro de 35498 nucleobases aguas arriba de la región de 45 UBE3A-ATS (SEQ ID NO: 1) solapante o antisentido a UBE3A.

50 En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido para su uso de acuerdo con las reivindicaciones están dirigidos a UBE3A-ATS dentro de 67390 nucleobases aguas arriba del inicio de una región complementaria a la pre-ARNm de UBE3A, en donde UBE3A-ATS comprende una secuencia de ácido nucleico al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, o 100% idéntica al GENBANK Nº de acceso NT_026446.14 truncado desde los nucleótidos 25068794 a 25684175. En ciertos aspectos, la región complementaria al pre-ARNm de UBE3A consiste en nucleobases 513603 a 615382 de SEQ ID NO: 2. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido para su uso de acuerdo con las reivindicaciones se dirigen a UBE3A-ATS dentro de 67390 nucleobases aguas arriba de la región de UBE3A-ATS (SEQ ID NO: 2) solapante o antisentido a UBE3A.

55 En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido para su uso de acuerdo con las reivindicaciones se dirigen a UBE3A-ATS inmediatamente aguas abajo del snoRNA HBII-52 o MBII-52 a la región solapante o antisentido a UBE3A. En varios aspectos, dichos compuestos antisentido se dirigen a UBE3A-ATS entre las nucleobases 1 a 35499 de SEQ ID NO: 3. En varios aspectos, tales compuestos antisentido se dirigen a UBE3A-ATS entre las nucleobases 1 a 67391 de SEQ ID NO: 4.

60 Puede haber variación en la actividad (por ejemplo, como se define por reducción porcentual de los niveles de ácido nucleico de UBE3A-ATS o porcentaje de inducción de la expresión de UBE3A paterna) de los compuestos antisentido dentro de una región diana activa. En ciertas realizaciones, una inducción de la expresión paterna de

UBE3A es indicativa de la inhibición de la expresión de UBE3A-ATS.

Hibridación

5 En algunas realizaciones, se produce hibridación entre un compuesto antisentido para su uso de acuerdo con las reivindicaciones y un UBE3A-ATS. El mecanismo más común de hibridación implica enlaces de hidrógeno (por ejemplo, Watson-Crick, Hoogsteen o enlaces de hidrógeno invertidos de Hoogsteen) entre nucleobases complementarias de las moléculas de ácido nucleico.

10 La hibridación puede ocurrir en condiciones variables. Las condiciones rigurosas dependen de la secuencia y se determinan por la naturaleza y la composición de las moléculas de ácido nucleico a hibridar.

15 Los métodos para determinar si una secuencia es específicamente hibridable con un ácido nucleico diana son bien conocidos en la técnica. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido proporcionados en este documento son específicamente hibridables con UBE3A-ATS.

Complementariedad

20 Un compuesto antisentido y un ácido nucleico diana son complementarios entre sí cuando un número suficiente de nucleobases del compuesto antisentido puede unirse por hidrógeno con las nucleobases correspondientes del ácido nucleico diana, de modo que se producirá un efecto deseado (por ejemplo, inhibición antisentido de un ácido nucleico diana, tal como un ácido nucleico UBE3A-ATS).

25 Nucleobases no complementarias entre un compuesto antisentido y un ácido nucleico UBE3A-ATS pueden tolerarse siempre que el compuesto antisentido sigue siendo capaz de hibridarse específicamente a un ácido nucleico diana. Además, un compuesto antisentido puede hibridarse sobre uno o más segmentos de un ácido nucleico UBE3A-ATS de manera que los segmentos intermedios o adyacentes no estén implicados en el evento de hibridación (por ejemplo, estructura de bucle, falta de coincidencia o estructura en horquilla).

30 En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido para su uso de acuerdo con las reivindicaciones, o una porción específica de los mismos, son, o son al menos, 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% complementarios a un ácido nucleico de UBE3A-ATS, una región diana, segmento diana o una porción específica de los mismos. El porcentaje de complementariedad de un compuesto antisentido con un ácido nucleico diana puede determinarse usando métodos rutinarios.

35 Por ejemplo, un compuesto antisentido en el que 18 de 20 nucleobases del compuesto antisentido son complementarios a una región diana, y por lo tanto hibridarían específicamente, representaría el 90 por ciento de complementariedad. En este ejemplo, las nucleobases no complementarias restantes pueden agruparse o intercalarse con nucleobases complementarias y no necesitan ser contiguas entre sí o con nucleobases complementarias. Como tal, un compuesto antisentido que tiene una longitud de 18 nucleobases que tiene cuatro nucleobases no complementarias que están flanqueadas por dos regiones de complementariedad completa con el ácido nucleico diana tendría una complementariedad total del 77,8% con el ácido nucleico diana y estaría así dentro del alcance de la presente invención. El porcentaje de complementariedad de un compuesto antisentido con una región de un ácido nucleico diana se puede determinar rutinariamente usando programas BLAST (herramientas de búsqueda de alineación local básica) y programas PowerBLAST conocidos en la técnica (Altschul y col., J. Mol. Biol., 1990, 215, 403-410; Zhang y Madden, Genome Res., 1997, 7, 649-656). El porcentaje de homología, identidad de secuencia o complementariedad, puede determinarse mediante, por ejemplo, el programa Gap (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison, WI), utilizando la configuración predeterminada, que utiliza el Algoritmo de Smith y Waterman (Adv. Appl. Math., 1981, 2, 482-489).

55 En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido para su uso de acuerdo con las reivindicaciones, o partes específicas de los mismos, son completamente complementarios (es decir, 100% complementarios) a un ácido nucleico diana, o a una porción específica del mismo. Por ejemplo, un compuesto antisentido puede ser completamente complementario a un ácido nucleico de UBE3A-ATS, o una región diana, o un segmento diana o una secuencia diana del mismo. Como se usa en el presente documento, "completamente complementario" significa que cada nucleobase de un compuesto antisentido es capaz de emparejar bases de manera precisa con las nucleobases correspondientes de un ácido nucleico diana. Por ejemplo, un compuesto antisentido de 20 nucleobases es completamente complementario a una secuencia diana que tiene una longitud de 400 nucleobases, siempre que haya una porción correspondiente de 20 nucleobases del ácido nucleico diana que sea completamente complementaria al compuesto antisentido. Completamente complementario también puede usarse en referencia a una porción especificada del primer y/o el segundo ácido nucleico. Por ejemplo, una porción de 20 nucleobases de un compuesto antisentido de 30 nucleobases puede ser "completamente complementaria" a una secuencia diana que tiene una longitud de 400 nucleobases. La porción de 20 nucleobases del oligonucleótido de 30 nucleobases es completamente complementaria a la secuencia diana si la secuencia diana tiene una porción correspondiente de 20

nucleobases en la que cada nucleobase es complementaria a la porción de 20 nucleobases del compuesto antisentido. Al mismo tiempo, el compuesto antisentido de 30 nucleobases completo puede o no ser completamente complementario a la secuencia diana, dependiendo de si las 10 nucleobases restantes del compuesto antisentido también son complementarias a la secuencia diana.

5 La ubicación de una nucleobase no complementaria puede estar en el extremo 5' o en el extremo 3' del compuesto antisentido. Alternativamente, la nucleobase o nucleobases no complementarias pueden estar en una posición interna del compuesto antisentido. Cuando dos o más nucleobases no complementarias están presentes, 10 pueden ser contiguas (es decir, unidas) o no contiguas. En una realización, una nucleobase no complementaria está localizada en el segmento de ala de un oligonucleótido antisentido gápmero.

15 En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido para su uso de acuerdo con las reivindicaciones que son, o son hasta 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 nucleobases de longitud comprenden no más de 4, no más de 3, no más de 2, o no más de 1 nucleobase(s) no complementaria(s) relativa(s) a un ácido nucleico diana, tal como un ácido nucleico UBE3A-ATS, o porción especificada del mismo.

20 En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido para su uso de acuerdo con las reivindicaciones que son, o son hasta 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleobases de longitud comprenden no más de 6, no más de 5, no más de 4, no más de 3, no más de 2, o no más de 1 25 nucleobase(s) no complementaria(s) relativa(s) a ácido nucleico diana, tal como un ácido nucleico de UBE3A-ATS, o una porción especificada de los mismos.

30 Los compuestos antisentido proporcionados también incluyen los que son complementarios a una porción de un ácido nucleico diana. Como se usa en el presente documento, "parte" se refiere a un número definido de nucleobases contiguas (es decir, unidas) dentro de una región o segmento de un ácido nucleico diana. Una "porción" 35 también se puede referir a un número definido de nucleobases contiguas de un compuesto antisentido. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido son complementarios a al menos una porción de 8 nucleobases de un segmento diana. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido son complementarios a al menos una porción de 9 nucleobases de un segmento diana. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido para su uso de acuerdo con las reivindicaciones son complementarios a al menos una porción de 10 nucleobases de un segmento diana. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido para su uso de acuerdo con las reivindicaciones son complementarios a al menos una porción de 11 nucleobases de un segmento diana. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido para su uso de acuerdo con las reivindicaciones son complementarios a al menos una porción de 12 nucleobases de un segmento diana. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido para su uso de acuerdo con las reivindicaciones son complementarios a al menos una porción de 13 nucleobases de un segmento diana. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido para su uso de acuerdo con las reivindicaciones son complementarios a al menos una porción de 14 nucleobases de un segmento diana. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido son complementarios a al menos una porción de 15 nucleobases de un 40 segmento diana. También se contemplan compuestos antisentido que son complementarios a al menos 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, o más porciones de nucleobase de un segmento diana, o un rango definido por cualquiera de estos dos valores.

Identidad

45 Los compuestos antisentido p para su uso de acuerdo con las reivindicaciones también pueden tener un porcentaje de identidad definido a una secuencia particular de nucleótidos, SEQ ID NO, o compuesto representado por un número Isis específico, o porción del mismo. Como se usa en el presente documento, un compuesto antisentido es idéntico a la secuencia descrita en este documento si tiene la misma capacidad de emparejamiento de nucleobases. Por ejemplo, un ARN que contiene uracilo en lugar de timidina en una secuencia de ADN descrita se consideraría idéntico a la secuencia de ADN ya que tanto el uracilo como la timidina se emparejan con la adenina. Se contemplan versiones acortadas y alargadas de los compuestos antisentido descritos en la presente memoria así como también compuestos que tienen bases no idénticas en relación con los compuestos antisentido proporcionados en este documento. Las bases no idénticas pueden ser adyacentes entre sí o dispersarse por todo el compuesto antisentido. El porcentaje de identidad de un compuesto antisentido se calcula de acuerdo con el 50 número de bases que tienen un apareamiento de bases idéntico relativo a la secuencia a la que se está comparando.

55 En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido, o porciones de los mismos, son al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntico a uno o más de los compuestos antisentido o SEQ ID NOs, o una porción de los mismos, descritos en este documento.

60 En ciertas realizaciones, una porción del compuesto antisentido para su uso de acuerdo con las reivindicaciones se compara con una porción de igual longitud del ácido nucleico diana. En ciertas realizaciones, se compara una porción de nucleobase de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 con una 65 porción de igual longitud del ácido nucleico diana.

En ciertas realizaciones, una porción del oligonucleótido antisentido se compara con una porción de igual longitud del ácido nucleico diana. En ciertas realizaciones, se compara una porción de nucleobase de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 con una porción de igual longitud del ácido nucleico diana.

5

Modificaciones

Un nucleósido es una combinación a base de azúcar. La porción de nucleobases (también conocida como base) del nucleósido es normalmente un resto de base heterocíclica. Los nucleótidos son nucleósidos que incluyen además un grupo fosfato unido covalentemente a la porción de azúcar del nucleósido. Para aquellos nucleósidos que incluyen un azúcar de pentofuranosilo, el grupo fosfato se puede unir al resto hidroxilo 2', 3' o 5' del azúcar. Los oligonucleótidos se forman a través del enlace covalente de nucleósidos adyacentes entre sí, para formar un oligonucleótido polimérico lineal. Dentro de la estructura del oligonucleótido, los grupos fosfato se refieren comúnmente como formadores de los enlaces internucleosídicos del oligonucleótido.

15

Las modificaciones de los compuestos antisentido comprenden sustituciones o cambios a enlaces internucleosídicos, restos de azúcar, o nucleobases. Los compuestos antisentido modificados a menudo se prefieren sobre las formas nativas debido a propiedades deseables tales como, por ejemplo, captación celular potenciada, afinidad potenciada por el objetivo de ácido nucleico, estabilidad aumentada en presencia de nucleasas o actividad inhibidora incrementada.

20

Los nucleósidos modificados químicamente también se pueden emplear para aumentar la afinidad de unión de un oligonucleótido antisentido acortado o truncado por su ácido nucleico diana. En consecuencia, a menudo se pueden obtener resultados comparables con compuestos antisentido más cortos que tienen tales nucleósidos modificados químicamente.

25

Enlaces internucleosídicos modificados

El enlace internucleosídico de origen natural de ARN y ADN es un enlace fosfodiéster 3' a 5'. Los compuestos antisentido que tienen uno o más enlaces internucleosídicos modificados, es decir, no naturales se seleccionan a menudo sobre compuestos antisentido que tienen enlaces internucleosídicos naturales debido a las propiedades deseables tales como, por ejemplo, captación celular potenciada, afinidad potenciada por ácidos nucleicos diana y aumento de la afinidad estabilidad en presencia de nucleasas.

30

Los oligonucleótidos que tienen enlaces internucleosídicos modificados incluyen enlaces internucleosídicos que retienen un átomo de fósforo así como enlaces internucleosídicos que no tienen un átomo de fósforo. El fósforo representativo que contiene enlaces internucleosídicos incluye, pero sin limitación, fosfodiésteres, fosfotriésteres, metilfosfonatos, fosforamidato y fosforotioatos. Los métodos de preparación de enlaces que contienen fósforo y que no contienen fosfatos son bien conocidos.

35

En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido para su uso de acuerdo con las reivindicaciones dirigidos a un ácido nucleico de UBE3A-ATS comprenden uno o más enlaces internucleosídicos modificados. En ciertas realizaciones, los enlaces internucleosídicos modificados son enlaces fosforotioato. En ciertas realizaciones, cada enlace internucleosídico de un compuesto antisentido es un enlace interonucleósido fosforotioato.

40

Restos de azúcar modificados

Los compuestos antisentido pueden contener opcionalmente uno o más nucleósidos en los que el grupo azúcar ha sido modificado. Dichos nucleósidos modificados con azúcar pueden impartir estabilidad de nucleasas potenciada, afinidad de unión incrementada, o alguna otra propiedad biológica beneficiosa a los compuestos antisentido. En ciertas realizaciones, los nucleósidos comprenden restos anulares de ribofuranosa modificados químicamente. Los ejemplos de anillos de ribofuranosa modificados químicamente incluyen sin limitación, la adición de grupos sustituyentes (incluyendo grupos sustituyentes 5' y 2', puente de átomos del anillo no geminal para formar ácidos nucleicos bicíclicos (BNA), reemplazo del átomo de oxígeno del anillo ribosilo con S, N(R) o C(R₁)(R₂)(R, R₁ y R₂ son cada uno independientemente H, alquilo C₁-C₁₂ o un grupo protector) y combinaciones de los mismos. Ejemplos de azúcares químicamente modificados incluyen nucleósido sustituido con 2-F-5'-metilo (véase la solicitud internacional PCT WO2008/101157 publicada el 21/8/08 para otros nucleósidos sustituidos en 5',2'-bis) o el reemplazo del átomo de oxígeno del anillo ribosilo con S con sustitución adicional en la posición 2' (véase la solicitud de patente estadounidense publicada US2005-0130923, publicada el 16 de junio de 2005) o, alternativamente, una sustitución 5' de un BNA (véase la solicitud internacional PCT WO2007/134181 publicado el 22/11/07 en donde LNA está sustituido con, por ejemplo, un grupo 5'-metilo o un grupo 5'-vinilo).

45

Los ejemplos de nucleósidos que tienen restos de azúcar modificados incluyen, sin limitación, nucleósidos que comprenden grupos sustituyentes 5'-vinilo, 5'-metilo (R o S), 4'-S, 2'-F, 2'-OCH₃, 2'-OCH₂CH₃, 2'-OCH₂CH₂F y 2'-O(CH₂)₂OCH₃. El sustituyente en la posición 2' también se puede seleccionar de alilo, amino, azido, tio, O-alilo, O-

50

C_1-C_{10} alquilo, OCF_3 , OCH_2F , $O(CH_2)_2 SCH_3$, $O(CH_2)_2-ON(R_m)(R_n)$, $O-CH_2-C(=O)-N(R_m)(R_n)$, y $O-CH_2-C(=O)-N(R_1)-(CH_2)_2-N(R_m)(R_n)$, en donde cada R_1 , R_m y R_n es, independientemente, H o C_1-C_{10} alquilo sustituido o no sustituido.

Como se usa en este documento, "nucleósidos bicíclicos" se refieren a nucleósidos modificados que comprenden un resto de azúcar bicíclico. Los ejemplos de nucleósidos bicíclicos incluyen, sin limitación, nucleósidos que comprenden un puente entre los átomos del anillo ribosilo 4' y 2'. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido para su uso de acuerdo con las reivindicaciones proporcionadas en este documento incluyen uno o más nucleósidos bicíclicos que comprenden un puente 4' a 2'. Los ejemplos de tales nucleósidos bicíclicos en puente de 4' a 2' incluyen, pero sin limitación, una de las fórmulas: 4'-(CH_2)-O-2' (LNA); 4'-(CH_2)-S-2'; 4'-(CH_2)₂-O-2' (ENA); 4'- $CH(CH_3)$ -O-2' (también denominado como etilo constreñido o cEt) y 4'- $CH(CH_2OCH_3)$ -O-2' (y análogos de los mismos véase Patente de EE.UU. 7.399.845, emitida el 15 de julio de 2008); 4'-C(CH_3)(CH_3)-O-2' (y análogos de los mismos véase solicitud internacional publicada WO/2009/006478, publicada el 8 de enero de, 2009); 4'- $CH_2-N(OCH_3)$ -2' (y análogos de los mismos véase solicitud internacional publicada WO/2008/150729, publicada el 11 de diciembre de 2008); 4'- $CH_2-ON(CH_3)$ -2' (véase la Solicitud de Patente de EE.UU. US2004-0171570, publicada septiembre 2, 2004); 4'- $CH_2-N(R)$ -O-2', en donde R es H, C_1-C_{12} alquilo, o un grupo protector (véase la patente de EE.UU. 7.427.672, expedida el 23 de septiembre de 2008); 4'- $CH_2-C(H)(CH_3)$ -2' (véase Chattopadhyaya et al, J. Org Chem, 2009, 74, 118-134); y 4'- $CH_2-C(=CH_2)$ -2' (y análogos de los mismos véase la solicitud internacional publicada WO2008/154401, publicada el 8 de diciembre, 2008).

Otros informes relacionados con nucleósidos bicíclicos también se pueden encontrar en la literatura publicada (véase, por ejemplo, Singh y col., Chem. Commun., 1998, 4, 455-456; Koshkin y col., Tetrahedron, 1998, 54, 3607 - 3630; Wahlestedt y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 2000, 97, 5633 - 5638; Kumar y col., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998, 8, 2219 - 2222; Singh. y col., J. Org. Chem., 1998, 63, 10035 - 10039; Srivastava y col., J. Am. Chem. Soc., 2007, 129 (26) 8362 - 8379; Elayadi et al., Curr. Opinion Invest. Drugs, 2001, 2, 558 - 561; Braasch y col., Chem. Biol., 2001, 8, 1 - 7 y Orum et al., Curr. Opinion Mol. Ther., 2001, 3, 239. -243; Patentes de EE.UU. Nº 6.268.490, 6.525.191, 6.670.461, 6.770.748, 6.794.499, 7.034.133, 7.053.207, 7.399.845, 7.547.684 y 7.696.345; Publicación de Patente de EE.UU. Nº US2008-0039618; US2009-0012281; Patente de EE.UU. Nº de serie 60/989.574; 61/026.995; 61/026.998; 61/056.564; 61/086.231; 61/097.787; y 61/099.844; Solicitudes internacionales PCT publicadas WO 1994/014226; WO2004/106356; WO2005/0 21570; WO2007/134181; WO2008/150729; WO2008/154401; y WO2009/006478. Cada uno de los nucleósidos bicíclicos anteriores puede prepararse con una o más configuraciones estereoquímicas de azúcar que incluyen, por ejemplo, α -L-ribofuranosa y β -D-ribofuranosa (véase la solicitud internacional PCT PCT/DK98/00393, publicada el 25 de marzo de 1999 como WO 99/14226).

En ciertas realizaciones, restos de azúcares bicíclicos de nucleósidos BNA incluyen, pero no se limitan a, compuestos que tienen al menos un puente entre la posición 4' y la posición 2' del resto de azúcar pentofuranosilo en donde dichos puentes comprenden independientemente 1 o de 2 a 4 grupos vinculados independientemente seleccionados de $-[C(R_a)(R_b)]_n-$, $-C(R_a)=C(R_b)-$, $-C(R_a)=N-$, $-C(=O)-$, $-C(=NR_a)-$, $-C(=S)-$, $-O-$, $-Si(R_a)_2-$, $-S(=O)_x-$ y $-N(R_a)-$; en donde:

x es 0, 1 o 2;

n es 1, 2, 3 o 4;

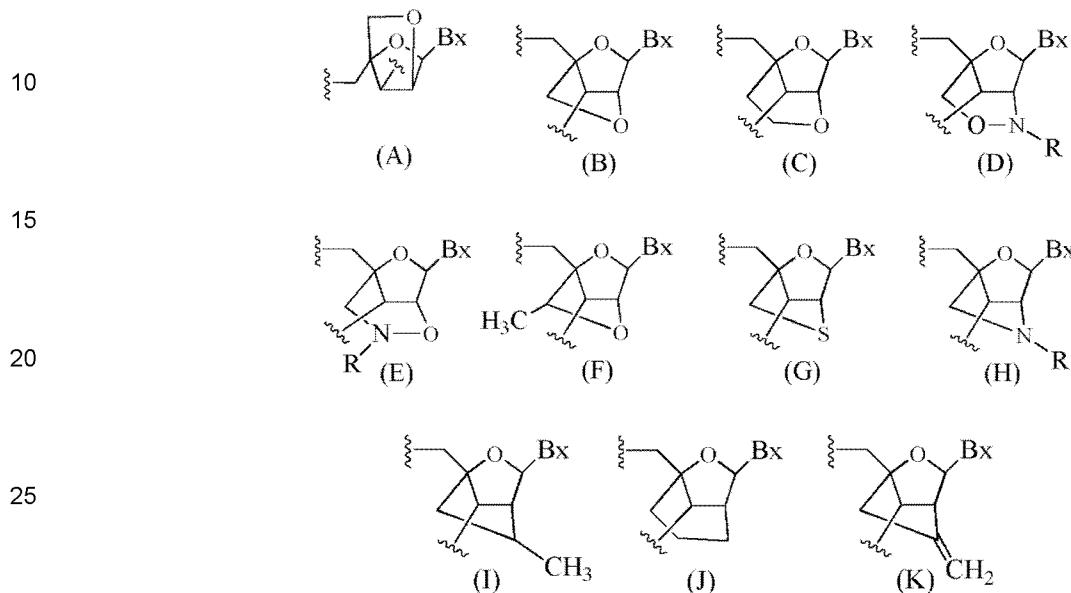
cada R_a y R_b es, independientemente, H, un grupo protector, hidroxilo, C_1-C_{12} alquilo, C_1-C_{12} alquilo sustituido, C_2-C_{12} alquenilo, C_2-C_{12} alquenilo sustituido, C_2-C_{12} alquinilo, C_2-C_{12} alquinilo sustituido, C_5-C_{20} arilo, C_5-C_{20} arilo sustituido, heterociclo radical, heterociclo sustituido radical, heteroarilo, heteroarilo sustituido, C_5-C_7 alicíclico radical, radical alicíclico C_5-C_7 sustituido, halógeno, OJ₁, NJ₁J₂, SJ₁, N₃, COOJ₁, acilo ($C(=O)-H$), acilo sustituido, CN, sulfonilo ($S(=O)_2$ -J₁) o sulfoxilo ($S(=O)-J_1$); y

cada J₁ y J₂ es, independientemente, H, C_1-C_{12} alquilo, C_1-C_{12} alquilo sustituido, C_2-C_{12} alquenilo, C_2-C_{12} alquenilo sustituido, C_2-C_{12} alquinilo, C_2-C_{12} alquinilo sustituido, C_5-C_{20} arilo, C_5-C_{20} arilo sustituido, acilo ($C(=O)-H$), acilo sustituido, un radical de heterociclo, un radical de heterociclo sustituido, C_1-C_{12} aminoalquilo, C_1-C_{12} aminoalquilo sustituido o un grupo protector.

En ciertas realizaciones, el puente de un resto de azúcar bicíclico es $-[C(R_a)(R_b)]_n-$, $-[C(R_a)(R_b)]_n-O-$, $-C(R_aR_b)-N(R)-O-$ o $-C(R_aR_b)-ON(R)-$. En ciertas realizaciones, el puente es 4'- CH_2-2' , 4'- $(CH_2)_2-2'$, 4'- $(CH_2)_3-2'$, 4'- CH_2-O-2' , 4'- $(CH_2)_2-O-2'$, 4'- $CH_2-ON(R)-2'$ y 4'- $CH_2-N(R)-O-2'$, en donde cada R es, independientemente, H, un grupo protector o alquilo C_1-C_{12} .

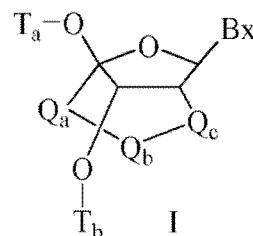
En ciertas realizaciones, los nucleósidos bicíclicos se definen adicionalmente por configuración isomérica. Por ejemplo, un nucleósido que comprende un puente 4'-2'metileno-oxi, puede estar en la configuración α -L o en la configuración β -D. Previamente, se han incorporado los BNA de α -L-metileno-oxi (4'- CH_2-O-2') en oligonucleótidos antisentido que mostraron actividad antisentido (Frieden et al., Nucleic Acids Research, 2003, 21, 6365 - 6372).

En ciertas realizaciones, los nucleósidos bicíclicos que incluyen, pero no se limitan a, (A) α -L-metilenoxi ($4'-\text{CH}_2-\text{O}-2'$) BNA, (B) β -D-metilenoxi ($4'-\text{CH}_2-\text{O}-2'$) BNA, (C) etilenoxi ($4'-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-2'$) BNA, (D) aminooxi ($4'-\text{CH}_2-\text{O}-\text{N}(\text{R})-2'$) BNA, (E) oxiamino ($4'-\text{CH}_2-\text{N}(\text{R})-\text{O}-2'$) BNA, y (F) metilo(metilenoxi) ($4'-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{O}-2'$) BNA, (G) metileno-tio ($4'-\text{CH}_2-\text{S}-2'$) BNA, (H) metileno-amino ($4'-\text{CH}_2-\text{N}(\text{R})-2'$) BNA, (I) carbocíclico de metilo ($4'-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-2'$) BNA, (J) carbocíclico de propileno ($4'-(\text{CH}_2)_3-2'$) BNA y (K) vinilo BNA, como se representa a continuación:



en donde Bx es el resto de base y R es independientemente H, un grupo protector, C₁-C₁₂ alquilo o C₁-C₁₂ alcoxi.

En ciertas realizaciones, se proporcionan nucleósidos bicíclicos que tienen Fórmula I:



en donde:

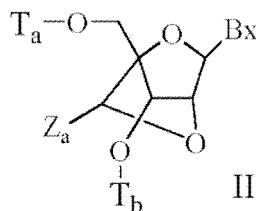
Bx es un resto básico heterocíclico;

$-\text{Q}_a-\text{Q}_b-\text{Q}_c-$ es $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{R}_c)-\text{CH}_2-$, $-\text{C}(=\text{O})-\text{N}(\text{R}_c)-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2-\text{ON}(\text{R}_c)-$, $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{R}_c)-\text{O}-$ o $-\text{N}(\text{R}_c)-\text{O}-\text{CH}_2-$

R_c es C₁-C₁₂ alquilo o un grupo protector de amino; y

T_a y T_b son cada uno, independientemente H, un grupo protector de hidroxilo, un grupo conjugado, un grupo de fósforo reactivo, un resto de fósforo o una unión covalente a un medio de soporte.

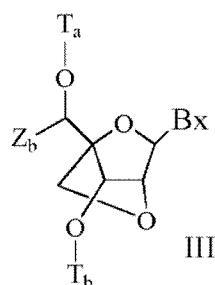
En ciertas realizaciones, se proporcionan nucleósidos bicíclicos que tienen la Fórmula II:



en donde:

- 5 Bx es un resto de base heterocíclico;
- 10 T_a y T_b son cada uno, independientemente H, un grupo protector de hidroxilo, un grupo conjugado, un grupo de fósforo reactivo, un resto de fósforo o una unión covalente a un medio de soporte;
- 15 Z_a es C_1-C_6 alquilo, C_2-C_6 alquenilo, C_2-C_6 alquinilo, C_1-C_6 alquilo sustituido, C_2-C_6 alquenilo sustituido, C_2-C_6 alquinilo sustituido, acilo, acilo sustituido, amida sustituida, tiol o tio sustituido.
- En una realización, cada uno de los grupos sustituidos está, independientemente, mono o poli sustituido con grupos sustituyentes seleccionados independientemente entre halógeno, oxo, hidroxilo, OJ_c , NJ_cJ_d , SJ_c , N_3 , $OC(=X)J_c$, y $NJ_eC(=X)NJ_cJ_d$, en donde cada J_c , J_d y J_e es, independientemente, H, C_1-C_6 alquilo, o C_1-C_6 alquilo sustituido y X es O o NJ_c .

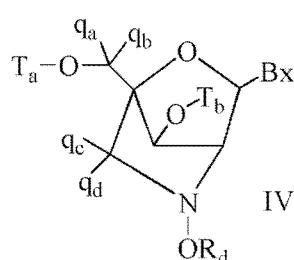
20 En ciertas realizaciones, se proporcionan nucleósidos bicíclicos que tienen la Fórmula III:



en donde:

- 35 Bx es un resto de base heterocíclico;
- 40 T_a y T_b son cada uno, independientemente H, un grupo protector de hidroxilo, un grupo conjugado, un grupo de fósforo reactivo, un resto de fósforo o una unión covalente a un medio de soporte;
- 45 Z_b es C_1-C_6 alquilo, C_2-C_6 alquenilo, C_2-C_6 alquinilo, C_1-C_6 alquilo sustituido, C_2-C_6 alquenilo sustituido, C_2-C_6 alquinilo sustituido o acilo sustituido ($C(=O)-$).

En ciertas realizaciones, se proporcionan nucleósidos bicíclicos que tienen la Fórmula IV:



en donde:

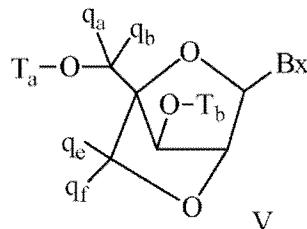
- 55 Bx es un resto de base heterocíclico;
- 60 T_a y T_b son cada uno, independientemente H, un grupo protector de hidroxilo, un grupo conjugado, un grupo de fósforo reactivo, un resto de fósforo o una unión covalente a un medio de soporte;
- 65 R_d es C_1-C_6 alquilo, C_1-C_6 alquilo sustituido, C_2-C_6 alquenilo, C_2-C_6 alquenilo sustituido, C_2-C_6 alquinilo o C_2-C_6 alquinilo sustituido;
- cada q_a , q_b , q_c y q_d es, independientemente, H, halógeno, C_1-C_6 alquilo, C_1-C_6 alquilo sustituido, C_2-C_6 alquenilo, C_2-C_6 alquenilo sustituido, C_2-C_6 alquinilo o C_2-C_6 alquinilo sustituido, C_1-C_6 alcoxi, C_1-C_6 alcoxi sustituido, acilo,

acilo sustituido, C₁-C₆ aminoalquilo o C₁-C₆ aminoalquilo sustituido;

En ciertas realizaciones, se proporcionan nucleósidos bicíclicos que tienen la Fórmula V:

5

10



15 en donde:

Bx es un resto de base heterocíclico;

20 T_a y T_b son cada uno, independientemente H, un grupo protector de hidroxilo, un grupo conjugado, un grupo de fósforo reactivo, un resto de fósforo o una unión covalente a un medio de soporte;

25 q_a, q_b, q_e y q_f son cada uno, independientemente, hidrógeno, halógeno, C₁-C₁₂ alquilo, C₁-C₁₂ alquilo sustituido, C₂-C₁₂ alquenilo, C₂-C₁₂ alquenilo sustituido, C₂-C₁₂ alquinilo, C₂-C₁₂ alquinilo sustituido, C₁-C₁₂ alcoxi, C₁-C₁₂ alcoxi sustituido, OJ_j, SJ_j, SOJ_j, SO₂J_j, NJ_jJ_k, N₃, CN, C(=O)OJ_j, C(=O)NJ_jJ_k, C(=O)J_j, OC(=O)-NJ_jJ_k,

N(H)C(=NH)NJ_jJ_k, N(H)C(=O)NJ_jJ_k o N(H)C(=S)NJ_jJ_k;

o q_e y q_f juntos son = C(q_g)(q_h);

30 q_g y q_h son cada uno, independientemente, H, halógeno, C₁-C₁₂ alquilo o C₁-C₁₂ alquilo sustituido.

35 La síntesis y la preparación de los monómeros BNA de metilenoxi (4'-CH₂-O-2') adenina, citosina, guanina, 5-metilo-citosina, timina y uracilo, junto con su oligomerización y las propiedades de reconocimiento de ácidos nucleicos se han descrito (Koshkin et al., Tetrahedron, 1998, 54, 3607 - 3630). Los BNA y la preparación de los mismos se describen también en los documentos WO 98/39352 y WO 99/14226.

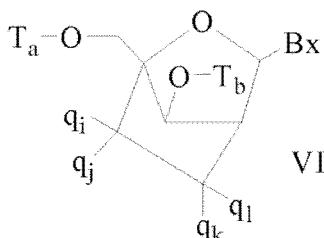
40 45 Los análogos de metilenoxi (4'-CH₂-O-2') BNA y 2'-tio-BNA, también han sido preparados (Kumar et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998, 8, 2219-2222). También se ha descrito la preparación de análogos de nucleósidos bloqueados que comprenden dúplex de oligodesoxirribonucleótidos como sustratos para las polimerasas de ácidos nucleicos (Wengel et al., Documento WO 99/14226). Además, se ha descrito en la técnica la síntesis de 2'-amino-BNA, un nuevo análogo de oligonucleótido de alta afinidad restringido de forma conformacional (Singh y col., J. Org. Chem., 1998, 63, 10035-10039). Además, se han preparado BNA 2'-amino y 2'-metilamino y se ha informado previamente de la estabilidad térmica de sus dúplex con hebras complementarias de ARN y ADN.

En ciertas realizaciones, se proporcionan nucleósidos bicíclicos que tienen la Fórmula VI:

45

50

55



en donde:

Bx es un resto de base heterocíclico;

60 T_a y T_b son cada uno, independientemente H, un grupo protector de hidroxilo, un grupo conjugado, un grupo de fósforo reactivo, un resto de fósforo o una unión covalente a un medio de soporte;

65 cada q_i, q_j, q_k y q_l es, independientemente, H, halógeno, C₁-C₁₂ alquilo, C₁-C₁₂ alquilo sustituido, C₂-C₁₂ alquenilo, C₂-C₁₂ alquenilo sustituido, C₂-C₁₂ alquinilo, C₂-C₁₂ alquinilo sustituido, C₁-C₁₂ alcoxi, C₁-C₁₂ alcoxi sustituido, OJ_j, SJ_j, SOJ_j, SO₂J_j, NJ_jJ_k, N₃, CN, C(=O)OJ_j, C(=O)NJ_jJ_k, C(=O)J_j, OC(=O)-NJ_jJ_k, N(H)C(=NH)NJ_jJ_k,

N(H)C(=O)NJ_jJ_k o N(H)C(=S)NJ_jJ_k; y

q_i y q_j o q_k y q_l juntos son = C(q_g)(q_h), en donde q_g y q_h son cada uno, independientemente, H, halógeno, C₁-C₁₂ alquilo o C₁-C₁₂ alquilo sustituido.

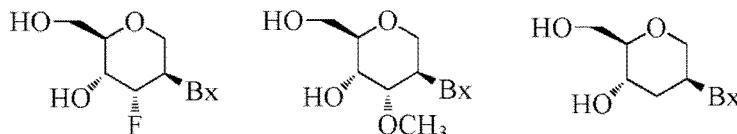
5 Un nucleósido bicíclico carbocíclico que tiene un puente 4'-(CH₂)₃-2' y el puente analógico alquenilo 4'-CH=CH-CH₂-2' han sido descritos (Freier et al, Nucleic Acids Research, 1997, 25 (22), 4429 - 4443 y Albaek y col., J. Org. Chem., 2006, 71, 7731 - 7740). También se han descrito la síntesis y preparación de nucleósidos bicíclicos carbocíclicos junto con sus estudios de oligomerización y bioquímicos (Srivastava y col., J. Am. Chem. Soc., 2007, 129 (26), 8362 - 8379).

10 15 Como se usa en este documento, "nucleósido bicíclico 4'-2'" o "nucleósido bicíclico 4' a 2'" se refiere a un nucleósido bicíclico que comprende la preparación de un anillo de furanosa que comprende un puente que conecta dos átomos de carbono del anillo de furanosa conecta el átomo de carbono 2' y el átomo de carbono 4' del anillo de azúcar.

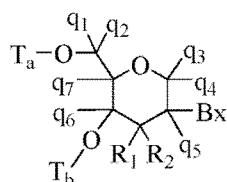
20 25 Tal como se usa en la presente memoria, "nucleósidos monocíclicos" se refiere a nucleósidos que comprenden restos de azúcar modificados que no son restos de azúcar bicíclicos. En ciertas realizaciones, el resto de azúcar, o análogo de resto de azúcar, de un nucleósido se puede modificar o sustituir en cualquier posición.

30 35 40 45 Tal como se usa en la presente memoria, "azúcar modificado en 2'" significa un azúcar de furanosilo modificado en la posición 2'. En ciertas realizaciones, tales modificaciones incluyen sustituyentes seleccionados entre: un haluro, que incluye, pero no se limita a, alcoxi sustituido y no sustituido, tioalquilo sustituido y no sustituido, aminoalquilo sustituido y no sustituido, alquilo sustituido y no sustituido, alilo sustituido y no sustituido y alquinilo sustituido y no sustituido. En ciertas realizaciones, modificaciones 2' se seleccionan de sustituyentes incluyendo, pero no limitados a: O[(CH₂)_nO]_mCH₃, O(CH₂)_nNH₂, O(CH₂)_nCH₃, O(CH₂)_nF, O(CH₂)_nONH₂, OCH₂C(=O)N(H)CH₃, y O(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂, donde n y m son de 1 a aproximadamente 10. Otros grupos sustituyentes 2' también se pueden seleccionar a partir de: C₁-C₁₂ alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquinilo, alcarilo, aralquilo, o-alcarilo o o-arylquilo, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, F, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, polialquilamino, siliolo sustituido, un grupo de escisión de ARN, un grupo informador, un intercalador, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas, o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un compuesto antisentido, y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. En ciertas realizaciones, los nucleósidos modificados comprenden una hebra lateral 2'-MOE (Baker y col., J. Biol. Chem., 1997, 272, 11944-12000). Dicha sustitución en 2'-MOE se ha descrito por tener una afinidad de unión mejorada en comparación con nucleósidos no modificados y con otros nucleósidos modificados, tales como 2'-O-metilo, O-propilo y O-aminopropilo. También se ha demostrado que los oligonucleótidos que tienen el sustituyente 2'-MOE son inhibidores antisentido de la expresión génica con características prometedoras para uso *in vivo* (Martin, Helv. Chim. Acta, 1995, 78, 486-504; Altmann et al., Chimia, 1996, 50, 168 - 176, Altmann et al., Biochem. Soc. Trans., 1996, 24, 630 - 637 y Altmann et al., Nucleosides Nucleotides, 1997, 16, 917 - 926).

Como se usa en este documento, un "nucleósido tetrahidropirano modificado" o "nucleósido THP modificado" significa un nucleósido que tiene un tetrahidropirano de seis miembros sustituido por el residuo pentofuranosilo en nucleósidos normales (un sustituto de azúcar). Los nucleósidos de THP modificados incluyen, pero sin limitación, lo que en la técnica se denomina ácido nucleico de hexitol (HNA), ácido nucleico de anitol (ANA), ácido nucleico de manitol (MNA) (véase Leumann, Bioorg. Med. Chem., 2002, 10, 841-854) o fluoro HNA (F-HNA) que tiene un sistema de anillo de tetrahidropirano como se ilustra a continuación:



55 En ciertas realizaciones, los sustitutos de azúcar se seleccionan teniendo la Fórmula VII:



en donde independientemente para cada uno de dicho al menos un análogo de nucleósido de tetrahidropirano de Fórmula VII:

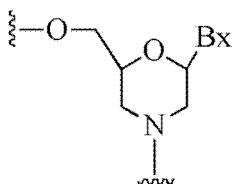
Bx es un resto de base heterocíclico;

T_a y T_b son cada uno, independientemente, un grupo de unión internucleosídico que une el análogo de nucleósido de tetrahidropirano con el compuesto antisentido o uno de T_a y T_b es un grupo de unión internucleosídico que une el análogo de nucleósido de tetrahidropirano con el compuesto antisentido y el otro de T_a y T_b es H, un grupo protector de hidroxilo, un grupo conjugado unido o un grupo terminal 5' o 3';

q₁, q₂, q₃, q₄, q₅, q₆ y q₇ son cada uno independientemente, H, C₁-C₆ alquilo, C₁-C₆ alquilo sustituido, C₂-C₆ alquenilo, C₂-C₆ alquenilo sustituido, C₂-C₆ alquinilo o C₂-C₆ alquinilo sustituido; y cada uno de R₁ y R₂ se selecciona de hidrógeno, hidroxilo, halógeno, alcoxi sustituido o no sustituido, NJ₁J₂, SJ₁, N₃, OC(=X)J₁, OC(=X)NJ₁J₂, NJ₃C(=X)NJ₁J₂ y CN, en donde X es o, S o NJ₁ y cada J₁, J₂ y J₃ es, independientemente, H o alquilo C₁-C₆.

En ciertas realizaciones, se proporcionan los nucleósidos THP modificados de Fórmula VII en donde q₁, q₂, q₃, q₄, q₅, q₆ y q₇ son cada uno H. En ciertas realizaciones, al menos uno de q₁, q₂, q₃, q₄, q₅, q₆ y q₇ es distinto de H. En ciertas realizaciones, al menos uno de q₁, q₂, q₃, q₄, q₅, q₆ y q₇ es metilo. En ciertas realizaciones, los nucleósidos de THP de fórmula VII se proporcionan en donde uno de R₁ y R₂ es flúor. En ciertas realizaciones, R₁ es flúor y R₂ es H; R₁ es metoxi y R₂ es H, y R₁ es metoxietoxi y R₂ es H.

En ciertas realizaciones, los sustitutos de azúcar comprenden anillos que tienen más de 5 átomos y más de un heterocromato. Por ejemplo, se han informado de nucleósidos que comprenden restos morfolino de azúcar y su uso en compuestos oligoméricos (véase, por ejemplo, Braasch et al., Biochemistry, 2002, 41, 4503 - 4510 y las patentes de EE.UU. 5.698.685, 5.166.315, 5.185.444 y 5.034.506). Como se usa aquí, el término "morfólico" significa un sustituto de azúcar que tiene la siguiente fórmula:



En ciertas realizaciones, los morfolinos pueden modificarse, por ejemplo, añadiendo o alterando varios grupos sustituyentes de la estructura morfolino anterior. Dichos sustitutos de azúcar se denominan aquí morfolinos modificados.

Las combinaciones de modificaciones también se proporcionan sin limitación, como por Ejemplo nucleósidos sustituidos por 2'-F-5'-metilo (véase la Solicitud Internacional PCT WO2008/101157 publicada el 21/8/08 para otros nucleósidos sustituidos 5',2'-bis) y la sustitución del átomo de oxígeno del anillo de ribosilo por S y la sustitución adicional en la posición 2' (véase la solicitud de patente estadounidense publicada US2005-0130923, publicada el 16 de junio de 2005) o, alternativamente, la sustitución 5' de un ácido nucleico bicíclico (véase la solicitud internacional PCT WO2007/134181, publicada el 22/11/07, en la que un nucleósido bicíclico 4'-CH₂-O-2' está además sustituido en la posición 5' con un 5'-metilo o un grupo 5'-vinilo). También se han descrito la síntesis y preparación de nucleósidos bicíclicos carbocíclicos junto con sus estudios de oligomerización y bioquímicos (véase, por ejemplo, Srivastava y col., J. Am. Chem. Soc. 2007, 129 (26), 8362 - 8379).

En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido para su uso de acuerdo con las reivindicaciones comprenden uno o más nucleósidos de ciclohexenilo modificados, que es un nucleósido que tiene un ciclohexenilo de seis miembros en lugar del resto de pentofuranosilo en nucleótidos naturales. Los nucleósidos de ciclohexenilo modificados incluyen, pero no se limitan a, los descritos en la técnica (véase, por ejemplo, la solicitud PCT publicada de propiedad común WO2010/036696, publicada el 10 de abril de 2010, Robeyns y col., J. Am. Chem. Soc., 2008, 130 (6), 1979 - 1984; Horváth y col., Tetrahedron Letters, 2007, 48, 3621 - 3623; Nauwelaerts y col., J. Am. Chem. Soc., 2007, 129 (30), 9340 - 9348; Gu y col., Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids, 2005, 24 (5-7), 993-998; Nauwelaerts y col., Nucleic Acids Research, 2005, 33 (8), 2452-2463; Robeyns. et al., Acta Crystallographica, Section F: Structural Biology and Crystallization Communications, 2005, F61 (6), 585-586; Gu y col., Tetrahedron, 2004, 60 (9), 2111-2123; Gu et al., Oligonucleotides, 2003, 13 (6), 479 - 489; Wang y col., J. Org. Chem., 2003, 68, 4499 - 4505; Verbeure y col., Nucleic Acids Research, 2001, 29 (24), 4941 - 4947; Wang y col., J. Org. Chem., 2001, 66, 8478-82; Wang y col., Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids, 2001, 20 (4-7), 785-788; Wang y col., J. Am. Chem., 2000, 122, 8595 - 8602; Solicitud PCT publicada, WO 06/047842; y Solicitud PCT Publicada WO 01/049687). Ciertos nucleósidos de ciclohexenilo modificados tienen Fórmula X.



en donde independientemente para cada uno de dichos al menos un análogo de nucleósido de ciclohexenilo de Fórmula X:

15 Bx es un resto de base heterocíclico;

20 T₃ y T₄ son cada uno, independientemente, un grupo de enlace internucleosídico que une el ciclohexenilo análogo de nucleósido a un compuesto antisentido o uno de T₃ y T₄ es un grupo de enlace internucleosídico que une el análogo nucleosídico de tetrahidropirano a un compuesto antisentido y el otro de T₃ y T₄ es H, un grupo protector de hidroxilo, un grupo conjugado unido, o un grupo terminal 5' o 3'; y

25 q₁, q₂, q₃, q₄, q₅, q₆, q₇, q₈ y q₉ son cada uno, independientemente, H, C₁-C₆ alquilo, C₁-C₆ alquilo sustituido, C₂-C₆ alquenilo, C₂-C₆ alquenilo sustituido, C₂-C₆ alquinilo, C₂-C₆ alquinilo sustituido u otro grupo sustituyente de azúcar.

30 Tal como se usa en la presente memoria, "2'-modificado" o "2'-sustituido" se refiere a un nucleósido que comprende un azúcar que comprende un sustituyente en la posición 2' distinta de H u OH. Los nucleósidos modificados en 2' incluyen, pero no se limitan a, nucleósidos bicíclicos en donde el puente que conecta dos átomos de carbono del anillo de azúcar conecta el 2'-carbono y otro carbono del anillo de azúcar; y nucleósidos con 35 sustituyentes 2' sin puente, tales como alilo, amino, azido, tio, O-alilo, O-C₁-C₁₀ alquilo, -OCF₃, O-(CH₂)₂-O-CH₃, 2'-O(CH₂)₂SCH₃, O-(CH₂)₂-ON(R_m)(R_n), o O-CH₂-C(=O)-N(R_m)(R_n), donde cada R_m y R_n es, independientemente, H o C₁-C₁₀ alquilo sustituido o no sustituido. Los nucleósidos modificados en 2' pueden comprender además otras modificaciones, por ejemplo en otras posiciones del azúcar y/o en la base nitrogenada.

35 Como se usa en este documento, "2'-F" se refiere a un nucleósido que comprende un azúcar que comprende un grupo fluoro en la posición 2' del anillo de azúcar.

40 Como se usa en este documento, "2'-OMe" o "2'-OCH₃" o "2'-O-metilo" se refieren a un nucleósido que comprende un azúcar que comprende un grupo -OCH₃ en la posición 2' del anillo de azúcar.

45 Como se usa en este documento, "MOE" o "2'-MOE" o "2'-OCH₂CH₂OCH₃" o "2'-O-metoxietilo" se refieren a un nucleósido que comprende un azúcar que comprende un grupo -OCH₂CH₂OCH₃ en la posición 2' del anillo de azúcar.

50 Como se usa en el presente documento, "oligonucleótido" se refiere a un compuesto que comprende una pluralidad de nucleósidos unidos. En ciertas realizaciones, se modifican uno o más de la pluralidad de nucleósidos. En ciertas realizaciones, un oligonucleótido comprende uno o más ribonucleósidos (ARN) y/o desoxirribonucleósidos (ADN).

55 Muchos otros sistemas de anillo de sustituto de azúcar biciclo y triciclo también son conocidos en la técnica que se puede utilizar para modificar los nucleósidos para su incorporación en compuestos antisentido (véase por ejemplo artículo de revisión: Leumann, Bioorg Med Chem, 2002, 10, 841-854). Dichos sistemas de anillos pueden someterse a varias sustituciones adicionales para mejorar la actividad.

60 Los métodos para las preparaciones de azúcares modificados son bien conocidos por los expertos en la técnica. Algunas patentes estadounidenses representativas que enseñan la preparación de tales azúcares modificados incluyen, sin limitación, los documentos US: 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; 5.670.633; 5.700.920; 5.792.847 y 6.600.032 y la Solicitud internacional PCT/US2005/019219, presentada el 2 de junio de 2005 y publicada como WO2005/121371 el 22 de diciembre de 2005.

65 En nucleótidos que tienen restos de azúcar modificados, los restos de nucleobases (naturales, modificados o una combinación de los mismos) se mantienen para la hibridación con una diana de ácido nucleico apropiada.

En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido para su uso de acuerdo con las reivindicaciones comprenden uno o más nucleósidos que tienen restos de azúcar modificados. En ciertas realizaciones, el resto de azúcar modificado es 2'-MOE. En ciertas realizaciones, los nucleósidos modificados en 2'-MOE están dispuestos en un motivo gápmero. En ciertas realizaciones, el resto de azúcar modificado es un nucleósido bicíclico que tiene un grupo puente (4'-CH(CH₃)-O-2'). En ciertas realizaciones, los nucleósidos modificados (4'-CH(CH₃)-O-2') están dispuestos a lo largo de las alas de un motivo gápmero.

Nucleobases modificadas

Las modificaciones o sustituciones de nucleobases (o bases) son estructuralmente distinguibles de, pero funcionalmente intercambiables con, nucleobases naturales o sintéticas no modificadas. Ambas nucleobases naturales y modificadas son capaces de participar en enlaces de hidrógeno. Tales modificaciones de nucleobases pueden impartir estabilidad de nucleasas, afinidad de unión o alguna otra propiedad biológica beneficiosa a compuestos antisentido. Las nucleobases modificadas incluyen nucleobases sintéticas y naturales tales como, por ejemplo, 5-metilcitosina (5-me-C). Ciertas sustituciones de nucleobases, que incluyen sustituciones de 5-metilcitosina, son particularmente útiles para aumentar la afinidad de unión de un compuesto antisentido por un ácido nucleico diana. Por ejemplo, se ha demostrado que las sustituciones de 5-metilcitosina aumentan la estabilidad dúplex de ácidos nucleicos en 0,6-1,2°C (Sanghvi, Y.S., Crooke, S.T. y Lebleu, B., eds., Antisense Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278).

Las nucleobases modificadas adicionales incluyen 5-hidroximetilo citosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metilo y otros derivados alquílicos de adenina y guanina, 2-propilo y otros derivados alquílicos de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracilo y citosina, 5-propinilo (-C=C-CH₃) uracilo y citosina y otros derivados alquinílicos de bases de pirimidina, 6-azouracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo y otras adeninas 8-sustituidas y guaninas, 5-halo particularmente 5-bromo, 5-trifluorometilo y otros uracilos 5-sustituidos y citosinas, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 2-F-adenina, 2-amino-adenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-deazaguanina y 7-deazaadenina y 3-deazaguanina y 3-deazaadenina.

Restos de bases heterocíclicos también pueden incluir aquellos en los que la base de purina o pirimidina se reemplaza con otros heterociclos, por ejemplo 7-desaza-adenina, 7-desazaguanosina, 2-aminopiridina y 2-piridona. Las nucleobases que son particularmente útiles para aumentar la afinidad de unión de los compuestos antisentido incluyen pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y purinas N-2, N-6 y O-6 sustituidas, que incluyen 2 aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina.

En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido para su uso de acuerdo con las reivindicaciones dirigidos a UBE3A-ATS comprenden una o más nucleasas modificadas. En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos antisentido acortados o abiertos al hueco dirigidos a UBE3A-ATS comprenden una o más nucleobases modificadas. En ciertas realizaciones, la nucleobase modificada es 5-metilcitosina. En ciertas realizaciones, cada citosina es una 5-metilcitosina.

Compuestos antisentido conjugados

Los compuestos antisentido se pueden unir covalentemente a uno o más restos o conjugados que potencian la actividad, distribución celular o captación celular de los oligonucleótidos antisentido resultantes. Los grupos conjugados típicos incluyen restos de colesterol y restos lipídicos. Los grupos conjugados adicionales incluyen carbohidratos, fosfolípidos, biotina, fenilamina, folato, fenantridina, antraquinona, acridina, fluoresceínas, rodaminas, cumarinas y colorantes.

Los compuestos antisentido también pueden modificarse para tener uno o más grupos estabilizadores que están generalmente unidos a uno o a ambos extremos de compuestos antisentido para potenciar propiedades tales como, por ejemplo, estabilidad de nucleasas. Incluidos en grupos estabilizadores son estructuras de tapa. Estas modificaciones terminales protegen el compuesto antisentido que tiene ácido nucleico terminal de la degradación de exonucleasa, y pueden ayudar a la administración y/o localización dentro de una célula. El capuchón puede estar presente en el extremo 5' (5'-tapa), o en el extremo 3' (3'-tapa), o puede estar presente en ambos extremos. Las estructuras de tapa son bien conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, tapas desoxiastásicas invertidas. Grupos 3' y 5' estabilizadores adicionales que pueden usarse para tapar uno o ambos extremos de un compuesto antisentido para impartir estabilidad a la nucleasa incluyen los descritos en el documento WO 03/004602 publicado el 16 de enero de 2003.

En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido para su uso de acuerdo con las reivindicaciones, que incluyen, pero no se limitan a, aquellos particularmente adecuados para uso como ssRNA, se modifican mediante la unión de uno o más grupos conjugados. En general, los grupos conjugados modifican una o más propiedades del oligonucleótido unido, que incluyen, pero no se limitan a, farmacodinamia, farmacocinética, estabilidad, unión, absorción, distribución celular, captación celular, carga y eliminación. Los grupos conjugados se usan rutinariamente

en las técnicas químicas y se unen directamente o a través de un resto de unión conjugado opcional o un grupo de unión conjugado a un compuesto parental tal como un oligonucleótido. Los grupos conjugados incluyen, sin limitación, intercaladores, moléculas indicadoras, poliaminas, poliamidas, polietilenglicoles, tioéteres, poliéteres, colesteroles, tiocolosteroles, restos de ácido cílico, ácido fólico, lípidos, fosfolípidos, biotina, fenazina, fenantridina, antraquinona, adamantano, acridina, fluoresceínas, rodilaminas, cumarinas y colorantes. Ciertos grupos conjugados se han descrito anteriormente, por ejemplo: resto de colesterol (Letsinger y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 1989, 86, 6553-6556), ácido cílico (Manoharan y col., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4, 1053 - 1060), un tioéter, por ejemplo, hexilo-S-trilitiol (Manoharan y col., Ann. NY Acad. Sci., 1992, 660, 306 - 309; Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1993, 3, 2765-2770), un tiocolosterol (Oberhauser et al., Nucl. Acids Res., 1992, 20, 533-538), una hebra alifática, por ejemplo, do-decano-diol o residuos de undecilo (Saison-Behmoaras y col., EMBO J., 1991, 10, 1111-1118; Kabanov y col., FEBS Lett., 1990, 259, 327-330; Svinarchuk y col., Biochimie, 1993, 75, 49-54), un fosfolípido, por ejemplo, di-hexadecilo-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecilo-rac-glicero-3-H-fosfonato de trietilo-amonio (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651 - 3654; Shea et al., Nucl. Acids Res., 1990, 18, 3777 - 3783), una poliamina o una hebra de polietilenglicol (Manoharan y col., Nucleosides & Nucleotides, 1995), 14, 969-973), o ácido acético adamantina (Manoharan y col., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654), un resto de palmitilo (Mishra et al., Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264, 229 - 237), o un resto de octadecilamina o hexilamino-carbonilo-oxicolesterol (Crooke et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277, 923 - 937).

Para conjugados adicionales que incluyen aquellos útiles para ssRNA y su colocación dentro de compuestos antisentido, véase, por ejemplo, el Nº de Solicitud de los Estados Unidos; 61/583,963.

Prueba in vitro de oligonucleótidos antisentido

Aquí se describen métodos para el tratamiento de células con oligonucleótidos antisentido, que pueden modificarse de manera apropiada para el tratamiento con otros compuestos antisentido.

Las células pueden tratarse con oligonucleótidos antisentido cuando las células alcanzan aproximadamente un 60-80% de confluencia en cultivo.

Un reactivo comúnmente usado para introducir oligonucleótidos antisentido en células cultivadas incluye el reactivo de transfección de lípidos catiónicos LIPOFECTINA (Invitrogen, Carlsbad, CA). Los oligonucleótidos antisentido se pueden mezclar con LIPOFECTINA en OPTI-MEM 1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) para lograr la concentración final deseada de oligonucleótido antisentido y una concentración de LIPOFECTINA que puede variar de 2 a 12 ug/mL por 100 nM de oligonucleótido antisentido.

Otro reactivo utilizado para introducir oligonucleótidos antisentido en células cultivadas incluye LIPOFECTAMINA (Invitrogen, Carlsbad, CA). El oligonucleótido antisentido se mezcla con LIPOFECTAMINA en medio de suero reducido OPTI-MEM 1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) para lograr la concentración deseada de oligonucleótido antisentido y una concentración de LIPOFECTAMINA que puede variar de 2 a 12 ug/mL por oligonucleótido antisentido 100 nM.

Otra técnica utilizada para introducir oligonucleótidos antisentido en células cultivadas incluye electroporación.

Todavía otra técnica utilizada para introducir oligonucleótidos antisentido en células cultivadas incluye la absorción libre de los oligonucleótidos por las células.

Las células se tratan con oligonucleótidos antisentido por métodos de rutina. Las células se pueden recoger 16-24 horas después del tratamiento con oligonucleótidos antisentido, en cuyo momento se miden los niveles de ARN o proteína de los ácidos nucleicos diana mediante métodos conocidos en la técnica y descritos en este documento. En general, cuando los tratamientos se realizan en múltiples repeticiones, los datos se presentan como el promedio de los tratamientos duplicados.

La concentración de oligonucleótido antisentido utilizado varía de línea celular a línea celular. Los métodos para determinar la concentración óptima de oligonucleótidos antisentido para una línea celular particular son bien conocidos en la técnica. Los oligonucleótidos antisentido se usan típicamente a concentraciones que varían de 1 nM a 300 nM cuando se transfieren con LIPOFECTAMINA. Los oligonucleótidos antisentido se usan a concentraciones más altas que varían de 625 a 20.000 nM cuando se transfieren usando electroporación.

Aislamiento de ARN

El análisis de ARN puede realizarse en ARN celular total o ARNm poli(A)+. Los métodos de aislamiento de ARN son bien conocidos en la técnica. El ARN se prepara usando métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, usando el Reactivo TRIZOL (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acuerdo con los protocolos recomendados por el fabricante.

EJEMPLOS*Descripción no limitativa*

- 5 Mientras que ciertos compuestos, composiciones y métodos descritos en este documento se han descrito con especificidad de acuerdo con ciertas realizaciones, los siguientes ejemplos sirven solo para ilustrar los compuestos descritos en este documento y no se pretende que limiten el mismo.
- 10 **Ejemplo 1: Inhibición antisentido de la secuencia antisentido de la proteína ligasa de ubiquitina E3A (Ube3a-ATS) en células neuronales primarias**
- 15 Los oligonucleótidos antisentido se diseñaron dirigidos a la secuencia de ratón inmediatamente aguas abajo de MBII-52 snoRNA al comienzo de la secuencia antisentido Ube3a, descritos en este documento como los nucleótidos 997469 hasta 1110944 millones de SEQ ID NO: 1 y se ensayaron para determinar sus efectos sobre la regulación al alza de la expresión del alelo paterno de Ube3a *in vitro*.
- 20 Los oligonucleótidos antisentido químéricos recientemente diseñados en la Tabla 1 se diseñaron como espaciadores 5-10-5 MOE. Los gápmberos tienen una longitud de 20 nucleótidos, en los que el segmento de brecha central comprende diez desoxinucleótidos 2' y está flanqueado por segmentos de ala en la dirección 5' y la dirección 3' comprende cinco nucleótidos cada uno. Cada nucleótido en el segmento de ala 5' y cada nucleótido en el segmento de ala 3' tiene una modificación 2'-MOE. Los enlaces internucleosídicos a lo largo de cada gápmero son enlaces fosforotioato (P = S). Todos los residuos de citosina a lo largo de cada gápmero son 5-metilcitosinas.
- 25 Cultivos primarios de hipocampo y neuronas corticales se obtuvieron de descendencia P0-P2 Ube3a+/YFP de ratones hembra C57BL/6 cruzados a ratones macho Ube3a-YFP (Dindot, SV et al, Hum Mol Genet 2008. 17: 111 -118). Los hemisferios corticales cortados se digirieron con 0,25% de tripsina y se disociaron mecánicamente. Las neuronas se cultivaron en un medio Neurobasal (Invitrogen, Carlsbad, CA) complementado con B27 (Invitrogen) en placas recubiertas con poli-D-lisina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). La mitad del medio fue cambiado en el día 4 y el cultivo se mantuvo adicionalmente durante 3 días más a 37°C en 5% de CO₂. Los conjuntos de cultivo celular se trataron con oligonucleótidos antisentido por absorción libre a una concentración final de 15 µM en presencia de Ara-C para inhibir la proliferación glial. Se usó un conjunto de células tratadas con PBS como el control no tratado.
- 30 Tres días después del tratamiento con oligonucleótidos antisentido, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 1 hora. Las células se lavaron luego tres veces con PBS y se bloquearon con suero de cabra al 5% (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las células se co-tiñeron con anti-GFP (NB600-308, Novus Biologicals, Littleton, CO) a una dilución 1: 2.500 y anti-NeuN (MAB377, Millipore, Billerica, MA) a una dilución 1: 500 a 4°C durante la noche en una cámara humidificada con agitación suave. Despues de tres lavados en Tween-20 al 0,5% en PBS, las células se tiñeron con anticuerpo anti-conejo de cabra secundario conjugado con Alexa Fluor 488 o anticuerpo anti-ratón de cabra conjugado con Alexa Fluor 555 (Invitrogen, Calsbad, CA) ambos a una dilución de 1: 1000. Despues de los lavados, se obtuvieron imágenes de las placas con los canales Texas Red y FITC mediante el sistema confocal ImageXpress Ultra (Dispositivo molecular) con un objetivo de 20X. La potencia del láser se ajustó manualmente para cada placa para evitar la saturación de fluorescencia en las muestras. Nueve imágenes fueron tomadas de cada pozo. Las imágenes se procesaron con el software MetaXpress (dispositivo molecular) para cuantificar la intensidad de FITC en las células positivas de Texas Red. Típicamente, se puntuaron 200-800 células por pocillo y se promedió la intensidad de la señal, y se normalizaron para las células de control no transfectadas.
- 35 Cuarenta y tres oligonucleótidos antisentido dirigidos a sitios únicos dentro de la región antisentido para el premRNA Ube3a en los nucleótidos 1032967 a 1110944 de SEQ ID NO: 1) se ensayaron para determinar su efecto sobre la expresión de la proteína Ube3a, cuantificada por fluorescencia. La inducción promedia de la proteína después del tratamiento con estos ASO fue del 18% sobre el control no tratado. Ciento setenta y seis oligonucleótidos dirigidos a sitios únicos dentro de la región de nucleótidos inmediatamente aguas abajo del snoRNA MBII-52 y aguas arriba de la región antisentido al pre-ARNm de Ube3a (nucleótidos 997469 a 1032966 de SEQ ID NO: 1), designado en las Tablas como el "punto de acceso", también se probaron por su efecto sobre la inducción de la expresión de la proteína Ube3a-YFP. La inducción promedia de la proteína después del tratamiento con estos ASO fue del 83% sobre el control no tratado. Los resultados del cribado completo de los oligonucleótidos antisentido se presentan en las Tablas 1-3; cada Tabla representa cada placa de cribado utilizada. '% de inducción' se expresa como el porcentaje de inducción de la proteína sobre el control no tratado. El "sitio de inicio objetivo" indica el nucleótido 5'-más al que se dirige el gápmero en SEQ ID NO: 1. "Sitio de detención objetivo" indica el nucleótido 3'-más al que se dirige el gápmero en SEQ ID NO: 1.

ES 2 987 225 T3

Tabla 1

| | Sitio de inicio diana | Sitio de parada diana | Región | Secuencia | Nº ISIS | % regulación al alza | SEQ ID NO |
|----|-----------------------|-----------------------|-------------|-----------------------|---------|----------------------|-----------|
| 5 | 1003255 | 1003274 | punto clave | GTTATACACACATATATTTC | 592429 | 0 | 7 |
| | 1003431 | 1003450 | punto clave | TAGCTTAAACACACTTTTC | 592430 | 25 | 8 |
| 10 | 1003601 | 1003620 | punto clave | ATATGTTGGTCAGCTACTAC | 592431 | 81 | 9 |
| | 1003801 | 1003820 | punto clave | GTATATCCTCCAGATCCTT | 592432 | 157 | 10 |
| 15 | 1003971 | 1003990 | punto clave | TGAGTTCATGGCACATTCA | 592433 | 102 | 11 |
| | 1004144 | 1004163 | punto clave | CTAGAAGGTGATATGAGGAT | 592434 | 59 | 12 |
| 20 | 1004318 | 1004337 | punto clave | ATAAATATTCTGCATATTG | 592435 | 2 | 13 |
| | 1004488 | 1004507 | punto clave | CATGTACATCCCTATACCTG | 592436 | 126 | 14 |
| 25 | 1004658 | 1004677 | punto clave | GACACTTTCTTGATCAAAT | 592437 | 67 | 15 |
| | 1004833 | 1004852 | punto clave | GTCAAAATAGTTATTTGGG | 592438 | 38 | 16 |
| 30 | 1005007 | 1005026 | punto clave | AAAATTTTATCTCAGCTAC | 592439 | 4 | 17 |
| | 1005178 | 1005197 | punto clave | TAAGAACGAAAGCAACTAGGG | 592440 | 54 | 18 |
| 35 | 1005348 | 1005367 | punto clave | AGCACATGCAATGATTAGAT | 592441 | 95 | 19 |
| | 1005518 | 1005537 | punto clave | ACAATATATATTTGAAACT | 592442 | 0 | 20 |
| 40 | 1005688 | 1005707 | punto clave | CAAGATGGAGAATTCTTGGC | 592443 | 9 | 21 |
| | 1005858 | 1005877 | punto clave | TGAATATGCTTGACCCATAG | 592444 | 161 | 22 |
| 45 | 1006028 | 1006047 | punto clave | TTCCTTGTGAAATGTACC | 592445 | 72 | 23 |
| | 1006245 | 1006264 | punto clave | TCAAGCATACTGGGCCTTC | 592446 | 135 | 24 |
| 50 | 1006420 | 1006439 | punto clave | AACACCTGGCAGCTGCATAC | 592447 | 97 | 25 |
| | 1006590 | 1006609 | punto clave | TGTTAGTGTCCCTATCGTC | 592448 | 158 | 26 |
| 55 | 1006760 | 1006779 | punto clave | CTGCAAGAACAGCATAGCAT | 592449 | 89 | 27 |
| | 1006930 | 1006949 | punto clave | CAAAGGTCCAGGTTAGTTGA | 592450 | 41 | 28 |
| 60 | 1007104 | 1007123 | punto clave | TTTCAGGCCACCCCTCGGG | 592451 | 73 | 29 |
| | 1007275 | 1007294 | punto clave | AGGTCCAACATCTTCTTC | 592452 | 140 | 30 |
| 65 | 1007483 | 1007502 | punto clave | AATATGCTGGTCAAGCCTTC | 592453 | 97 | 31 |
| | 1007699 | 1007718 | punto clave | AATGCAGTTGCTATGGCTC | 592454 | 110 | 32 |

50

55

60

65

ES 2 987 225 T3

(continuación)

| | Sitio de inicio diana | Sitio de parada diana | Región | Secuencia | Nº ISIS | % regulación al alza | SEQ ID NO |
|-----|-----------------------|-----------------------|-------------|-------------------------|---------|----------------------|-----------|
| 5 | 1009790 | 1009809 | punto clave | TGGATCCTCAGGTGCGACTC | 592465 | 80 | 41 |
| 10 | 1010033 | 1010052 | punto clave | GTACTGGTTAACCAATTAAATTG | 592466 | 6 | 42 |
| 15 | 1010298 | 1010317 | punto clave | ATTTCAAGTGTATCCCCTT | 592467 | 192 | 43 |
| 20 | 1010468 | 1010487 | punto clave | TATTGAAAATGTGAATCACT | 592468 | 31 | 44 |
| 25 | 1010638 | 1010657 | punto clave | GTTTTATCAGAATGGCTCTA | 592469 | 138 | 45 |
| 30 | 1010808 | 1010827 | punto clave | CACCATTATTAAAGATGTT | 592470 | 36 | 46 |
| 35 | 1010978 | 1010997 | punto clave | CCTGCAGAGGTATCTGAACC | 592471 | 70 | 47 |
| 40 | 1011152 | 1011171 | punto clave | TTAAATAAAGCCTTATTAA | 592472 | 1 | 48 |
| 45 | 1011331 | 1011350 | punto clave | TGAAACAGCTGAGCAATCTC | 592473 | 108 | 49 |
| 50 | 1011707 | 1011726 | punto clave | TTAACCCACAATTGTTCTGG | 592475 | 84 | 50 |
| 55 | 1011877 | 1011896 | punto clave | TAGAGGTAGCCTTCTGATG | 592476 | 132 | 51 |
| 60 | 1012050 | 1012069 | punto clave | AGTCCCAGAGATCCTACCTG | 592477 | 117 | 52 |
| 65 | 1012220 | 1012239 | punto clave | GTGTGTGCAAATGGAGGCTA | 592478 | 55 | 53 |
| 70 | 1012404 | 1012423 | punto clave | ATGGTAGTTGTAATTTCGG | 592479 | 93 | 54 |
| 75 | 1012579 | 1012598 | punto clave | AAATGTGATCATTACTCT | 592480 | 50 | 55 |
| 80 | 1012751 | 1012770 | punto clave | GTTCTACTTTAACATCACATT | 592481 | 114 | 56 |
| 85 | 1012921 | 1012940 | punto clave | GTAGTTGCTTCAGACAAAT | 592482 | 215 | 57 |
| 90 | 1013122 | 1013141 | punto clave | TGTTTACATCCCCAAATCTG | 592483 | 191 | 58 |
| 95 | 1013292 | 1013311 | punto clave | GTGTAATGTGTGGCTGACTT | 592484 | 153 | 59 |
| 100 | 1013488 | 1013507 | punto clave | GTGTATATGCTAGCTTGTGC | 592485 | 132 | 60 |
| 105 | 1013658 | 1013677 | punto clave | TACCCATTCCCTGATCAATT | 592486 | 138 | 61 |
| 110 | 1013857 | 1013876 | punto clave | TGTAGATAAAGAAATTATCT | 592487 | 0 | 62 |
| 115 | 1014197 | 1014216 | punto clave | AGCCAACATTGTTAACCAAG | 592488 | 180 | 63 |
| 120 | 1014367 | 1014386 | punto clave | TTGCCAGGCTTGCCAGAT | 592489 | 196 | 64 |
| 125 | 1014538 | 1014557 | punto clave | AATAATATCTACTTGTGTCC | 592490 | 80 | 65 |
| 130 | 1014708 | 1014727 | punto clave | ATCCAATTCTAGTTGAATC | 592491 | 141 | 66 |
| 135 | 1014878 | 1014897 | punto clave | TACTTAAGTGTGACTGA | 592492 | 132 | 67 |
| 140 | 1015048 | 1015067 | punto clave | TAATCTTGTGATATGGTATG | 592493 | 101 | 68 |
| 145 | 1015218 | 1015237 | punto clave | GAGTGAAAATCAGTCTAATC | 592494 | 76 | 69 |
| 150 | 1015546 | 1015565 | punto clave | GAGATTTAGGATGTGTTTC | 592495 | 40 | 70 |
| 155 | 1015716 | 1015735 | punto clave | ACACTACTTGTGACACA | 592496 | 181 | 71 |
| 160 | 1015911 | 1015930 | punto clave | ATTCTTAAATGTGAAC | 592497 | 28 | 72 |
| 165 | 1016081 | 1016100 | punto clave | ATATCATCAAGGAAAATGTT | 592498 | 14 | 73 |
| 170 | 1016262 | 1016281 | punto clave | ATTAATCCTAGGTTGCTC | 592499 | 68 | 74 |
| 175 | 1016432 | 1016451 | punto clave | CTGCCAACCAAGAATTACTA | 592500 | 158 | 75 |
| 180 | 1016602 | 1016621 | punto clave | AAGACATGGCTACAGACAAC | 592501 | 177 | 76 |
| 185 | 1016772 | 1016791 | punto clave | GAGGAAACAGTTGTTATGAC | 592502 | 53 | 77 |
| 190 | 1017123 | 1017142 | punto clave | CAGCACCCAAGGAGCTGAAG | 592504 | 52 | 78 |
| 195 | 1017650 | 1017669 | punto clave | TTAAGAGGCTGAAGAATTA | 592507 | 42 | 79 |

55

60

65

ES 2 987 225 T3

Tabla 2

| | Sitio de inicio diana | Sitio de parada diana | Región | Secuencia | Nº ISIS | % regulación al alza | SEQ ID NO |
|----|-----------------------|-----------------------|-------------|-----------------------|---------|----------------------|-----------|
| 5 | 1017820 | 1017839 | punto clave | GGAAGTTTGTGGCATTGGTG | 592508 | 95 | 80 |
| | 1018002 | 1018021 | punto clave | TGATTGAGGATTCAAAACAA | 592509 | 65 | 81 |
| 10 | 1018172 | 1018191 | punto clave | TTATTACAAGGGTCAAAAGA | 592510 | 38 | 82 |
| | 1018342 | 1018361 | punto clave | GTGCTAGGCCAGTGTAGAGTT | 592511 | 115 | 83 |
| 15 | 1018516 | 1018535 | punto clave | TGCCAGATGGAATTGGTCTG | 592512 | 66 | 84 |
| | 1018687 | 1018706 | punto clave | CTAGTGAATGAATTGGATAA | 592513 | 42 | 85 |
| 20 | 1019053 | 1019072 | punto clave | CAAACAAAAGCTTCCACAT | 592515 | 159 | 86 |
| | 1019228 | 1019247 | punto clave | CAAAGATGAAATATATTGGT | 592516 | 44 | 87 |
| 25 | 1019398 | 1019417 | punto clave | CGAGTCCAACAATGAACCAA | 592517 | 191 | 88 |
| | 1019568 | 1019587 | punto clave | CTCAATCTTCACAAAATGTT | 592518 | 105 | 89 |
| 30 | 1019738 | 1019757 | punto clave | ATTAAAATTAACACTGATCTC | 592519 | 11 | 90 |
| | 1019929 | 1019948 | punto clave | GTAGACAATAGTCGAATAA | 592520 | 52 | 91 |
| 35 | 1020102 | 1020121 | punto clave | ACCCCTACCTCAACAAAGAGC | 592521 | 78 | 92 |
| | 1020285 | 1020304 | punto clave | AACAAGGAATATTATGTGGG | 592522 | 61 | 93 |
| 40 | 1020480 | 1020499 | punto clave | TTTACATATACGAGCAATAA | 592523 | 15 | 94 |
| | 1020650 | 1020669 | punto clave | ACGAGCCAAAATGTGACATT | 592524 | 60 | 95 |
| 45 | 1020820 | 1020839 | punto clave | TGTTGGAACCTTGAATTACTA | 592525 | 123 | 96 |
| | 1021024 | 1021043 | punto clave | GTGATCCTAAGTACTGAATC | 592526 | 27 | 97 |
| 50 | 1021212 | 1021231 | punto clave | GAAGCCTCTTGCAATTAAATC | 592527 | 151 | 98 |
| | 1021382 | 1021401 | punto clave | AAGGAACAATTCGACTCAG | 592528 | 184 | 99 |
| 55 | 1021567 | 1021586 | punto clave | TTTTGAGAAATCACTACTAC | 592529 | 68 | 100 |
| | 1021749 | 1021768 | punto clave | AATGATTGGATAGCTTGT | 592530 | 44 | 101 |
| 60 | 1021930 | 1021949 | punto clave | CTGGAAAAAGTGCATT | 592531 | 58 | 102 |
| | 1022276 | 1022295 | punto clave | CAACAGTGAATGACAATT | 592532 | 28 | 103 |
| 65 | 1022446 | 1022465 | punto clave | GGAAGAACATCTAGAACCTT | 592533 | 94 | 104 |
| | 1022791 | 1022810 | punto clave | TGCTCAATTAAATAAAAGC | 592535 | 22 | 105 |
| | 1022961 | 1022980 | punto clave | GAGACAGTGATTCTCATACA | 592536 | 52 | 106 |
| | 1023136 | 1023155 | punto clave | TGTGGCTTTAGAATAAGCTG | 592537 | 54 | 107 |
| | 1023311 | 1023330 | punto clave | GCATGTGTAATCAAAGCTC | 592538 | 66 | 108 |
| | 1023510 | 1023529 | punto clave | ACACTGGTACTATAATT | 592539 | 61 | 109 |
| | 1023851 | 1023870 | punto clave | GTCTTTAACTATTAAATAA | 592540 | 19 | 110 |
| | 1024021 | 1024040 | punto clave | CCCCGAAAAATTCTGCCACT | 592541 | 135 | 111 |
| | 1024192 | 1024211 | punto clave | ACTATGTGTCAGTTTCTT | 592542 | 24 | 112 |
| | 1024989 | 1025008 | punto clave | GGTATGAACTCAGTTTCTT | 592543 | 110 | 113 |
| | 1025159 | 1025178 | punto clave | TGTTTCTACATAACCAACTC | 592544 | 100 | 114 |
| | 1025339 | 1025358 | punto clave | AAATCCATCATGTTTATA | 592545 | 32 | 115 |
| | 1025509 | 1025528 | punto clave | GTGTATGAAAGACTCATCCTG | 592546 | 114 | 116 |
| | 1025708 | 1025727 | punto clave | GGAGTGGTTCAACTTTCT | 592547 | 133 | 117 |
| | 1025898 | 1025917 | punto clave | GTTCACAAACTCTGCATC | 592548 | 120 | 118 |
| | 1026088 | 1026107 | punto clave | TGAGCTACATCCCTATCCC | 592549 | 118 | 119 |
| | 1026258 | 1026277 | punto clave | ATAATTGAAATATTAAACTCT | 592550 | 3 | 120 |
| | 1026437 | 1026456 | punto clave | ACCATACAAATGAGCAGACTG | 592551 | 108 | 121 |
| | 1026607 | 1026626 | punto clave | AATTACTATCCTTGAGAGG | 592552 | 22 | 122 |
| | 1026777 | 1026796 | punto clave | TAAGTCACATTCTTGTGTA | 592553 | 29 | 123 |
| | 1026947 | 1026966 | punto clave | GATTGTTGCTATAGTTGCAG | 592554 | 62 | 124 |
| | 1027117 | 1027136 | punto clave | TTGGGTTGAGATAAGTAGCT | 592555 | 84 | 125 |
| | 1027287 | 1027306 | punto clave | GTTTAAATGAACGACTTGT | 592556 | 93 | 126 |
| | 1027459 | 1027478 | punto clave | TAGGAGGACCTGAGCAGGAG | 592557 | 75 | 127 |
| | 1027629 | 1027648 | punto clave | CCAAGAAGGTAAATTCTGAA | 592558 | 88 | 128 |
| | 1027799 | 1027818 | punto clave | GCCATACATATATCATTATT | 592559 | 118 | 129 |

ES 2 987 225 T3

(continuación)

| | Sitio de inicio diana | Sitio de parada diana | Región | Secuencia | Nº ISIS | % regulación al alza | SEQ ID NO |
|----|-----------------------|-----------------------|-------------|----------------------|---------|----------------------|-----------|
| 5 | 1027971 | 1027990 | punto clave | TTGAAATAATATACTTTGAA | 592560 | 3 | 130 |
| 10 | 1028485 | 1028504 | punto clave | ATTGAAGTGGCAAGAGTGTA | 592563 | 51 | 131 |
| 15 | 1028655 | 1028674 | punto clave | TGTATTAACCTTATACTG | 592564 | 36 | 132 |
| 20 | 1029011 | 1029030 | punto clave | CATCAAGATAATTTACCTG | 592566 | 23 | 133 |
| 25 | 1029188 | 1029207 | punto clave | CTATCTTGTCAAAAACACG | 592567 | 70 | 134 |
| 30 | 1029389 | 1029408 | punto clave | AACACTTTGTGTACATGTTT | 592568 | 40 | 135 |
| 35 | 1029559 | 1029578 | punto clave | TCCACAAAGCAATGAGTTCA | 592569 | 85 | 136 |
| 40 | 1029736 | 1029755 | punto clave | TCCAGAGCATTTCATCGCTG | 592570 | 133 | 137 |
| 45 | 1029908 | 1029927 | punto clave | AAGACTTATTTCTAAAACC | 592571 | 6 | 138 |
| 50 | 1030078 | 1030097 | punto clave | TCCCTTGACTTGGATTATAC | 592572 | 93 | 139 |
| 55 | 1030248 | 1030267 | punto clave | AAATTAAGATTATTATGCTG | 592573 | 7 | 140 |
| 60 | 1030418 | 1030437 | punto clave | CCTTCATTTCACAAAGCCA | 592574 | 150 | 141 |
| 65 | 1030607 | 1030626 | punto clave | GCAACTGATACCTTAATTG | 592575 | 93 | 142 |

40

45

50

55

60

65

Tabla 3

| | Sitio de inicio diana | Sitio de parada diana | Región | Secuencia | Nº ISIS | % regulación al alza | SEQ ID NO |
|----|-----------------------|-----------------------|------------------------------|------------------------|---------|----------------------|-----------|
| 5 | 997638 | 997657 | punto clave | GAAATTCCAAGAGTAGAAT | 592398 | 0 | 154 |
| 10 | 997810 | 997829 | punto clave | GGCTCAGAATTGAAACAAA | 592399 | 142 | 155 |
| 15 | 997998 | 998017 | punto clave | ATACTAAAAATGTCATCTTC | 592400 | 19 | 156 |
| 20 | 998168 | 998187 | punto clave | CCAGCCTGTTGGATATCAT | 592401 | 147 | 157 |
| 25 | 998338 | 998357 | punto clave | TGAGGTTAGTAAGAGCCCC | 592402 | 178 | 158 |
| 30 | 998518 | 998537 | punto clave | GATCCATTGTTAACGCTG | 592403 | 111 | 159 |
| 35 | 998688 | 998707 | punto clave | AGGTATTCGAGTGTGATT | 592404 | 224 | 160 |
| 40 | 998870 | 998889 | punto clave | TACCATAGAGAAACCTAATT | 592405 | 83 | 161 |
| 45 | 999040 | 999059 | punto clave | TGGGACTTAATGACCTTGA | 592406 | 151 | 162 |
| 50 | 999213 | 999232 | punto clave | GTCCCAGAAAAGAACCTCTC | 592407 | 145 | 163 |
| 55 | 999393 | 999412 | punto clave | TCAGTCCAGCTCTTAGTC | 592408 | 199 | 164 |
| 60 | 999733 | 999752 | punto clave | TTGGATCCTAAATTAGTTAG | 592409 | 30 | 165 |
| 65 | 999903 | 999922 | punto clave | GAATTATTATTATTGCATGGTG | 592410 | 122 | 166 |
| | 1000100 | 1000119 | punto clave | GCATGAAATTGTCAAAGAAC | 592411 | 104 | 167 |
| | 1000270 | 1000289 | punto clave | AATGGATAATTCTGAAGTCT | 592412 | 46 | 168 |
| | 1000440 | 1000459 | punto clave | AGCTCATAGTACCAAGTGGCT | 592413 | 145 | 169 |
| | 1000626 | 1000645 | punto clave | CATGGTCATGAAAACAAGTA | 592414 | 100 | 170 |
| | 1000796 | 1000815 | punto clave | TAGTGACATAGTTTATGGT | 592415 | 62 | 171 |
| | 1000971 | 1000990 | punto clave | GTATACCATTATTTCTA | 592416 | 188 | 172 |
| | 1001141 | 1001160 | punto clave | AAGAAACACTGAGAGCCTGA | 592417 | 142 | 173 |
| | 1001313 | 1001332 | punto clave | ATTAGGCTTATTGATGTCG | 592418 | 127 | 174 |
| | 1001483 | 1001502 | punto clave | AATACAATATTATTGCCATG | 592419 | 36 | 175 |
| | 1001830 | 1001849 | punto clave | GATTAGGTGTGCTTTCAGAC | 592421 | 157 | 176 |
| | 1002002 | 1002021 | punto clave | CGGGTTAGAGGAAGAATTAT | 592422 | 15 | 177 |
| | 1002172 | 1002191 | punto clave | TATAAGCCACAAACATCTTG | 592423 | 148 | 178 |
| | 1002355 | 1002374 | punto clave | TCATTGTGACAGTAAAGAAA | 592424 | 106 | 179 |
| | 1002525 | 1002544 | punto clave | TAACCTGGGTTAATTACTAC | 592425 | 49 | 180 |
| | 1002695 | 1002714 | punto clave | TATGTAGGAACATTTTAGT | 592426 | 43 | 181 |
| | 1002894 | 1002913 | punto clave | ACCAAGTTGATCATGTTTTAT | 592427 | 95 | 182 |
| | 1033418 | 1033437 | antisentido a Ube3a pre-mRNA | TACAAGCTACAGATAACCTG | 592348 | 32 | 183 |
| | 1037625 | 1037644 | antisentido a Ube3a pre-mRNA | TGAGAGACATTGTCTCTGG | 592351 | 30 | 184 |
| | 1039051 | 1039070 | antisentido a Ube3a pre-mRNA | ATTCTACATGGTCATTCCCT | 592352 | 59 | 185 |
| | 1046085 | 1046104 | antisentido a Ube3a pre-mRNA | AGATGTCTACTAAGAAC | 592356 | 2 | 186 |
| | 1047501 | 1047520 | antisentido a Ube3a pre-mRNA | CAACTTAATTGCTTTTGAA | 592357 | 16 | 187 |
| | 1050351 | 1050370 | antisentido a Ube3a pre-mRNA | GATACATTATCATTGTTATA | 592358 | 10 | 188 |
| | 1051751 | 1051770 | antisentido a Ube3a pre-mRNA | TCTGGTTTCTCAAGTTAG | 592359 | 49 | 189 |
| | 1053151 | 1053170 | antisentido a Ube3a pre-mRNA | ACAGTTGATATGTGTGGC | 592360 | 39 | 190 |
| | 1054551 | 1054570 | antisentido a Ube3a pre-mRNA | GCTTAATTGTCCTTGAGACC | 592361 | 41 | 191 |
| | 1055951 | 1055970 | antisentido a Ube3a pre-mRNA | AGTGTCAAGACCTACCTATT | 592362 | 36 | 192 |
| | 1057351 | 1057370 | antisentido a Ube3a pre-mRNA | GGCGGGTTGTATTTGAGAG | 592363 | 0 | 193 |
| | 1058771 | 1058790 | antisentido a Ube3a pre-mRNA | GCAACAAGAACTTGATTAA | 592364 | 35 | 194 |
| | 1060171 | 1060190 | antisentido a Ube3a pre-mRNA | GTAGGCGAGTAAATTAGAAT | 592365 | 20 | 195 |
| | 1062997 | 1063016 | antisentido a Ube3a pre-mRNA | ACTAGAAACCGAACCTGGCG | 592366 | 31 | 196 |

(continuación)

| | Sitio de inicio diana | Sitio de parada diana | Región | Secuencia | Nº ISIS | % regulaci ón al alza | SEQ ID NO |
|----|-----------------------|-----------------------|------------------------------|-----------------------|---------|-----------------------|-----------|
| 5 | 1064397 | 1064416 | antisentido a Ube3a pre-mRNA | GGAATACATAAGATGAGTCA | 592367 | 28 | 197 |
| | 1065809 | 1065828 | antisentido a Ube3a pre-mRNA | AAAAAGTTCTTACTTAAC | 592368 | 0 | 198 |
| 10 | 1067235 | 1067254 | antisentido a Ube3a pre-mRNA | AGGACTGGTATTAGTTGT | 592369 | 14 | 199 |
| | 1068635 | 1068654 | antisentido a Ube3a pre-mRNA | CATGAAGTTTAGAATGAAA | 592370 | 0 | 200 |
| 15 | 1070036 | 1070055 | antisentido a Ube3a pre-mRNA | GCATATCCATTTCAATAAA | 592371 | 11 | 201 |
| | 1071436 | 1071455 | antisentido a Ube3a pre-mRNA | AAAAAGGCATATTTTATT | 592372 | 0 | 202 |
| 20 | 1072836 | 1072855 | antisentido a Ube3a pre-mRNA | TACTTTCAGTCTTGTAATAC | 592373 | 20 | 203 |
| | 1074250 | 1074269 | antisentido a Ube3a pre-mRNA | GATTCCAATTCTTCATC | 592374 | 10 | 204 |
| 25 | 1075650 | 1075669 | antisentido a Ube3a pre-mRNA | CCAAACAATTTCAGATATA | 592375 | 1 | 205 |
| | 1077065 | 1077084 | antisentido a Ube3a pre-mRNA | GGTATTTCCCTCAATTACAT | 592376 | 23 | 206 |
| 30 | 1078467 | 1078486 | antisentido a Ube3a pre-mRNA | GCCACCATAATGGTTGCTGGG | 592377 | 147 | 207 |
| | 1079867 | 1079886 | antisentido a Ube3a pre-mRNA | CAGGCATAAGAGTCAGAACG | 592378 | 24 | 208 |
| 35 | 1081267 | 1081286 | antisentido a Ube3a pre-mRNA | TTGAGGAAGAGGGCTAATT | 592379 | 2 | 209 |
| | 1084067 | 1084086 | antisentido a Ube3a pre-mRNA | GTTCAGTGAGTACCAAGC | 592380 | 4 | 210 |
| 40 | 1085491 | 1085510 | antisentido a Ube3a pre-mRNA | TAACTAGAGGAATACCAACT | 592381 | 2 | 211 |
| | 1086900 | 1086919 | antisentido a Ube3a pre-mRNA | GAAAGCATCCTAGTTCTC | 592382 | 9 | 212 |
| 45 | 1088316 | 1088335 | antisentido a Ube3a pre-mRNA | TTGCAGCATTAAATTAAACAA | 592383 | 9 | 213 |
| | 1091119 | 1091138 | antisentido a Ube3a pre-mRNA | GGCAATTAAATTCTACTTT | 592384 | 1 | 214 |
| 50 | 1093920 | 1093939 | antisentido a Ube3a pre-mRNA | CTGGAGTTGTGATGGTTGT | 592386 | 9 | 215 |
| | 1095320 | 1095339 | antisentido a Ube3a pre-mRNA | AGGATATATTTGGCAACTT | 592387 | 0 | 216 |
| 55 | 1096720 | 1096739 | antisentido a Ube3a pre-mRNA | TTTATCAGAAATGCCTGGGA | 592388 | 1 | 217 |
| | 1099541 | 1099560 | antisentido a Ube3a pre-mRNA | GTCCATCTATCAATTATTA | 592389 | 22 | 218 |
| 60 | 1100945 | 1100964 | antisentido a Ube3a pre-mRNA | TTTAAATAGCTGATTATCTG | 592390 | 4 | 219 |
| | 1102346 | 1102365 | antisentido a Ube3a pre-mRNA | CAAGAGATAATAGCTTAATT | 592391 | 6 | 220 |
| 65 | 1103750 | 1103769 | antisentido a Ube3a pre-mRNA | ATTAGTTGATACCACTCTC | 592392 | 23 | 221 |
| | 1105150 | 1105169 | antisentido a Ube3a pre-mRNA | AGTGAACACCAGAGTAGTAGT | 592393 | 3 | 222 |
| 70 | 1106554 | 1106573 | antisentido a Ube3a pre-mRNA | CATGTGGTATATATAAAATG | 592394 | 0 | 223 |
| | 1107954 | 1107973 | antisentido a Ube3a pre-mRNA | AGCCTAGACTAAGAGGCGAG | 592395 | 0 | 224 |
| 75 | 1109354 | 1109373 | antisentido a Ube3a pre-mRNA | GCTAAATATCAAAGGCCAT | 592396 | 8 | 225 |

Ejemplo 2: inhibición antisentido de la secuencia antisentido de la proteína ligasa de ubiquitina E3A (Ube3a-ATS) en células neuronales primarias

Los oligonucleótidos antisentido seleccionados del estudio descrito anteriormente se analizaron en cuanto a sus efectos sobre la inhibición de la expresión del ARNm de Ube3a-ATS *in vitro*.

Se prepararon cultivos neuronales primarios de ratones Ube3a-YFP paternos^{+/−}, como se describió anteriormente. Las células se sembraron en placas de 24 pocillos de poli-D-lisina a una densidad de $2,5 \times 10^5$ células/cm² en 500 µL de medio de cultivo. En el día 4, 400 µL de medio se retiró de conjuntos de pozos y 100 µL de medio fresco, junto con 10 µM de oligonucleótido antisentido y se añadieron 2 µM Ara-C. Se usó un conjunto de células tratadas con PBS como el control no tratado. El día 7, los conjuntos se lavaron con PBS dos veces y se realizó el aislamiento del ARN.

El ARN total se prepara con miRNAeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA). El tratamiento con ADNasa en columna se realizó para todas las muestras. El ARNm se purificó a partir del ARN total con perlas de oligo (dT) suministradas en el kit de preparación de muestras de ARNm de Illumina, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Illumina, San Diego, CA). El ADNc se generó luego con el SuperScript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen) y la q-PCR se realizó usando el sistema de PCR en tiempo real StepOnePlus de Applied Biosystems y SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Carlsbad, CA).

Los resultados se presentan en la Tabla 4, expresadas como un porcentaje del control no tratado. Los datos indican que el tratamiento con oligonucleótidos antisentido dirigidos a la región de puntos críticos que identificamos

da como resultado una marcada inhibición del transcripto de ARNm de UBE3a-YFP-ATS e induce correspondientemente la expresión del transcripto de Ube3a-YFP paterno.

5 **Tabla 4**

| % de expresión de la expresión del transcripto de ARNm en relación con el control no tratado | | |
|--|----------------------------------|-----------------------------|
| | % de inhibición de Ube3a-YFP-ATS | % de inducción de Ube3a-YFP |
| ISIS 592467 | 88±2 | 71±23 |
| ISIS 592517 | 94±5 | 128±5 |
| ISIS 592528 | 81±9 | 288±71 |
| ISIS 592404 | 94±4 | 137±12 |

15 **Ejemplo 3: Inhibición antisentido dependiente de la dosis de Ube3a-ATS y regulación positiva de Ube3a paterno en células neuronales primarias**

20 Los oligonucleótidos antisentido seleccionados del estudio descrito anteriormente se analizaron en cuanto a sus efectos sobre la inhibición de la expresión del ARNm de Ube3a-ATS y la regulación positiva de la expresión paterna de UBE3A *in vitro*. El efecto sobre los genes de snoRNA cerca de la zona de punto crítico y algunos de los cuales se ha demostrado que están implicados en el síndrome de Prader-Willi (Sahoo, T. y col., Nat. Genet., 2008, 40: 719-21; Tsai, T. et. al., Hum. Mol. Genet. 1999. 8: 1357 - 64) también se evaluó.

25 Se prepararon cultivos neuronales primarios de ratones Ube3a-YFP paternos +/-, como se describió anteriormente, y se transfectaron con 39 nM, 156 nM, 625 nM, 2500 nM, o 10.000 concentraciones nM de oligonucleótido antisentido. Las células se trataron por separado con el inhibidor de la topoisomerasa, Topotecan, a concentraciones de 1,17 nM, 4,69 nM, 18,75 nM, 75,00 nM o 300,00 nM. El ARN total se preparó con el kit RNeasy 96 (Qiagen). El tratamiento con ADNasa en columna se realizó para todas las muestras. qRT-PCR se realizó 30 utilizando EXPRESS One-Step SuperScript qRT-PCR Kit (Qiagen) y EX-PRESS One-Step SYBR GreenER Kit (Qiagen).

35 Los resultados se presentan en las Tablas 5 y 6, expresados como un porcentaje del control no tratado. Los datos indican que el tratamiento con oligonucleótidos antisentido dirigidos a la región de punto clave que identificamos dio como resultado una marcada inhibición del transcripto de Ube3a-YFP-ATS y la expresión inducida correspondiente del transcripto de Ube3a-YFP paterno. El tratamiento con Topotecan también inhibió los niveles de transcripción de Ube3a-YFP-ATS e indujo la expresión del ARNm de Ube3a-YFP como se esperaba. Varios de los oligonucleótidos antisentido de ISIS inhibieron UBE3a-YFP-ATS y regularon al alza los niveles de Ube3a-YFP.

40 Las células también se evaluaron para la inducción de la proteína Ube3a-YFP, cuantificada por fluorescencia, usando el método descrito en el Ejemplo 1. Los resultados se presentan en la Tabla 7 y demuestran que el tratamiento con oligonucleótidos antisentido se dirige a la región de puntos clave que identificamos dio como resultado un aumento en los niveles de proteína Ube3a-YFP, como lo indica el aumento de la fluorescencia YFP. El tratamiento con Topotecan también indujo la expresión de los niveles de proteína Ube3a-YFP, como se esperaba. 45 También se evaluaron los niveles de expresión de los snoRNAs y Snrpn MBII-85 y MBII-52. Los resultados se presentan en las Tablas 8-10. Los datos indican que el tratamiento con oligonucleótidos antisentido dirigidos a la región de punto clave dio como resultado una reducción mínima en estos genes de snoRNA, cuya reducción se asocia con el síndrome de Prader-Willi. Por el contrario, el tratamiento con Topotecan redujo los niveles del gen snoRNA MBII-52 y los niveles de Snrpn.

50

55

60

65

ES 2 987 225 T3

Tabla 5

| % de inhibición de la expresión del transcripto Ube3a-YFP-ATS en relación con el control no tratado | | | | | |
|---|--------------------------------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------|
| | Nº de ISIS | 39 nM | 156 nM | 625 nM | 2,500 nM |
| 5 | 592401 | 0 | 0 | 40 | 68 |
| 10 | 592404 | 32 | 50 | 78 | 93 |
| 15 | 592408 | 29 | 40 | 49 | 67 |
| 20 | 592413 | 34 | 43 | 63 | 75 |
| | 592482 | 0 | 16 | 55 | 86 |
| | 592483 | 19 | 49 | 62 | 91 |
| | 592489 | 0 | 33 | 62 | 85 |
| | 592515 | 6 | 37 | 69 | 87 |
| | 592517 | 12 | 66 | 71 | 89 |
| | 592528 | 0 | 59 | 77 | 92 |
| | Inhibidor de molécula pequeña | 1,17 nM | 4,69 nM | 18,75 nM | 75,00 nM |
| | Topotecan | 23 | 33 | 50 | 73 |
| | | | | | 88 |

Tabla 6

| % Expresión de transcripción Ube3a-YFP relativa al control no tratado | | | | | |
|---|--------------------------------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------|
| | Nº de ISIS | 39 nM | 156 nM | 625 nM | 2.500 nM |
| 25 | 592401 | 103 | 183 | 305 | 753 |
| 30 | 592404 | 151 | 260 | 499 | 890 |
| 35 | 592408 | 89 | 97 | 189 | 240 |
| 40 | 592413 | 136 | 145 | 254 | 556 |
| | 592482 | 142 | 167 | 372 | 697 |
| | 592483 | 150 | 163 | 237 | 607 |
| | 592489 | 149 | 188 | 215 | 514 |
| | 592515 | 145 | 136 | 192 | 467 |
| | 592517 | 151 | 189 | 237 | 528 |
| | 592528 | 215 | 268 | 378 | 715 |
| | Inhibidor de molécula pequeña | 1,17 nM | 4,69 nM | 18,75 nM | 75,00 nM |
| | Topotecan | 124 | 127 | 193 | 430 |
| | | | | | 734 |

Tabla 7

| % Expresión de proteína Ube3a-YFP relativa al control no tratado | | | | | |
|--|--------------------------------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------|
| | Nº de ISIS | 39 nM | 156 nM | 625 nM | 2.500 nM |
| 50 | 592401 | 95 | 102 | 109 | 154 |
| 55 | 592404 | 95 | 108 | 153 | 183 |
| 60 | 592408 | 100 | 96 | 105 | 134 |
| | 592413 | 107 | 104 | 109 | 126 |
| | 592482 | 95 | 110 | 130 | 135 |
| | 592483 | 94 | 109 | 97 | 148 |
| | 592489 | 102 | 105 | 104 | 132 |
| | 592515 | 101 | 112 | 104 | 134 |
| | 592517 | 97 | 104 | 121 | 137 |
| | 592528 | 102 | 121 | 117 | 146 |
| | Inhibidor de molécula pequeña | 1,17 nM | 4,69 nM | 18,75 nM | 75,00 nM |
| | Topotecan | 102 | 112 | 139 | 217 |
| | | | | | 290 |

ES 2 987 225 T3

Tabla 8

| % Expresión de transcripción MBII-85 relativa al control no tratado | | | | | | |
|---|--------------------------------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------|------------------|
| | ISIS No | 39 nM | 156 nM | 625 nM | 2.500 nM | 10.000 nM |
| 5 | 592401 | 96 | 114 | 118 | 122 | 125 |
| | 592404 | 108 | 79 | 87 | 101 | 93 |
| 10 | 592408 | 83 | 66 | 81 | 75 | 81 |
| | 592413 | 74 | 72 | 68 | 79 | 85 |
| 15 | 592482 | 121 | 91 | 81 | 106 | 88 |
| | 592483 | 84 | 84 | 91 | 97 | 102 |
| 20 | 592489 | 74 | 78 | 100 | 94 | 69 |
| | 592515 | 66 | 108 | 93 | 88 | 118 |
| | 592517 | 54 | 73 | 94 | 74 | 98 |
| | 592528 | 81 | 98 | 119 | 139 | 115 |
| | Inhibidor de molécula pequeña | 1,17 nM | 4,69 nM | 18,75 nM | 75,00 nM | 300,00 nM |
| | Topotecan | 93 | 84 | 79 | 67 | 85 |

Tabla 9

| % Expresión de transcripción MBII-52 relativa al control no tratado | | | | | | |
|---|--------------------------------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------|------------------|
| | Nº de ISIS | 39 nM | 156 nM | 625 nM | 2,500 nM | 10,000 nM |
| 25 | 592401 | 98 | 138 | 106 | 112 | 86 |
| | 592404 | 91 | 66 | 73 | 63 | 31 |
| 30 | 592408 | 94 | 62 | 97 | 89 | 75 |
| | 592413 | 80 | 83 | 92 | 104 | 82 |
| 35 | 592482 | 107 | 94 | 87 | 95 | 63 |
| | 592483 | 104 | 102 | 103 | 100 | 97 |
| | 592489 | 106 | 98 | 101 | 99 | 87 |
| 40 | 592515 | 100 | 103 | 104 | 104 | 120 |
| | 592517 | 109 | 95 | 106 | 95 | 92 |
| | 592528 | 106 | 119 | 143 | 131 | 111 |
| | Inhibidor de molécula pequeña | 1,17 nM | 4,69 nM | 18,75 nM | 75,00 nM | 300,00 nM |
| | Topotecan | 112 | 92 | 81 | 50 | 40 |

Tabla 10

| % Expresión de transcripción Snrpn relativa al control no tratado | | | | | | |
|---|--------------------------------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------|------------------|
| | ISIS No | 39 nM | 156 nM | 625 nM | 2,500 nM | 10,000 nM |
| 45 | 592401 | 93 | 127 | 107 | 133 | 114 |
| 50 | 592404 | 76 | 88 | 99 | 102 | 92 |
| | 592408 | 75 | 81 | 94 | 80 | 85 |
| | 592413 | 83 | 74 | 78 | 88 | 78 |
| 55 | 592482 | 126 | 105 | 105 | 74 | 46 |
| | 592483 | 115 | 115 | 99 | 108 | 103 |
| | 592489 | 125 | 12 | 98 | 87 | 72 |
| 60 | 592515 | 101 | 114 | 101 | 95 | 103 |
| | 592517 | 99 | 109 | 99 | 71 | 45 |
| | 592528 | 122 | 108 | 109 | 114 | 111 |
| | Inhibidor de molécula pequeña | 1,17 nM | 4,69 nM | 18,75 nM | 75,00 nM | 300,00 nM |
| | Topotecan | 102 | 99 | 87 | 71 | 54 |

Ejemplo 4: Comparación del efecto de los ASO que se dirigen a la región de punto clave y los ASO que se dirigen dentro de la región antisentido al pre-ARNm de Ube3a en la regulación positiva de la transcripción de Ube3a paterno en células neuronales primarias

5 Para evaluar la región óptima para la orientación con oligonucleótidos antisentido que da como resultado la regulación positiva de la transcripción del gen Ube3a paterno, se evaluó el tratamiento con ASO dirigidos a la región de puntos clave y el tratamiento con ASOs dirigidos dentro de la región antisentido del pre-ARNm de Ube3a.

10 Se prepararon cultivos neuronales primarios de ratones Ube3a-YFP paternos^{+/}, como se describió anteriormente, y se transfecaron con 15 µM de concentración de oligonucleótido antisentido. El ARN total se preparó con el kit RNeasy 96 (Qiagen). El tratamiento de DNase en columna se realizó para todas las muestras. qRT-PCR se realizó utilizando EXPRESS One-Step SuperScript qRT-PCR Kit (Qiagen) y EXPRESS One-Step SYBR GreenER Kit (Qiagen). Los resultados se presentan en la Tabla 10, expresada como un porcentaje del control no tratado.

15 Los datos indican que el tratamiento con oligonucleótidos antisentido dirigidos a ambas regiones resultó en una marcada inhibición de la transcripción Ube3a-YFP-ATS mRNA. Sin embargo, el tratamiento con ASO dirigidos a la región de punto clave dio como resultado una regulación al alza marcadamente más alta de la expresión de la transcripción de Ube3a-YFP paterno en comparación con el tratamiento con ASO dirigidos a la región antisentido del pre-ARNm de Ube3a.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Tabla 11

| % de niveles de expresión en comparación con el control no tratado | | | | | | |
|--|-----------------------|-----------------------|------------------------------|------------|------------------------------|--------------------------|
| | Sitio de inicio diana | Sitio de parada diana | Región | Nº de ISIS | % expresión de Ube3a-YFP-ATS | % expresión de Ube3a-YFP |
| 5 | 997810 | 997829 | punto clave | 592399 | 4 | 624 |
| 10 | 997998 | 998017 | punto clave | 592400 | 7 | 259 |
| 15 | 998168 | 998187 | punto clave | 592401 | 3 | 936 |
| 20 | 998688 | 998707 | punto clave | 592404 | 7 | 1139 |
| 25 | 998870 | 998889 | punto clave | 592405 | 9 | 518 |
| 30 | 999040 | 999059 | punto clave | 592406 | 7 | 644 |
| 35 | 999213 | 999232 | punto clave | 592407 | 10 | 555 |
| 40 | 999393 | 999412 | punto clave | 592408 | 6 | 670 |
| 45 | 1000270 | 1000289 | punto clave | 592412 | 14 | 827 |
| 50 | 1000440 | 1000459 | punto clave | 592413 | 16 | 576 |
| | 1000971 | 1000990 | punto clave | 592416 | 10 | 802 |
| | 1001141 | 1001160 | punto clave | 592417 | 15 | 935 |
| | 1001830 | 1001849 | punto clave | 592421 | 12 | 1042 |
| | 1002172 | 1002191 | punto clave | 592423 | 13 | 624 |
| | 1002355 | 1002374 | punto clave | 592424 | 20 | 871 |
| | 1033418 | 1033437 | punto clave | 592348 | 9 | 704 |
| | 1046085 | 1046104 | antisentido a Ube3a pre-mRNA | 592356 | 15 | 288 |
| | 1057351 | 1057370 | antisentido a Ube3a pre-mRNA | 592363 | 9 | 158 |
| | 1058771 | 1058790 | antisentido a Ube3a pre-mRNA | 592364 | 16 | 315 |
| | 1062997 | 1063016 | antisentido a Ube3a pre-mRNA | 592366 | 18 | 163 |
| | 1072836 | 1072855 | antisentido a Ube3a pre-mRNA | 592373 | 20 | 131 |
| | 1078467 | 1078486 | antisentido a Ube3a pre-mRNA | 592377 | 7 | 435 |
| | 1085491 | 1085510 | antisentido a Ube3a pre-mRNA | 592381 | 16 | 158 |
| | 1086900 | 1086919 | antisentido a Ube3a pre-mRNA | 592382 | 16 | 94 |
| | 1099541 | 1099560 | antisentido a Ube3a pre-mRNA | 592389 | 12 | 296 |
| | 1100945 | 1100964 | antisentido a Ube3a pre-mRNA | 592390 | 13 | 111 |
| | 1102346 | 1102365 | antisentido a Ube3a pre-mRNA | 592391 | 15 | 88 |
| | 1103750 | 1103769 | antisentido a Ube3a pre-mRNA | 592392 | 4 | 100 |
| | 1109354 | 1109373 | antisentido a Ube3a pre-mRNA | 592396 | 18 | 182 |

Ejemplo 5: Inhibición antisentido de la secuencia antisentido de Ube3a-ATS *in vivo*

55 Los oligonucleótidos antisentido, seleccionados del estudio de cribado *in vitro* descrito anteriormente, se cribaron para determinar la eficacia *in vivo* en ratones C57BL6 de tipo salvaje

60 La administración de oligonucleótidos antisentido se llevó a cabo mediante inyección de bolo intracerebroventricular de 300µg en los ratones. Los ratones se sacrificaron 4 semanas después de la administración y se evaluó el nivel de regulación hacia abajo del ARNm de Ube3a-ATS utilizando secciones de la corteza, el hipocampo y la médula espinal. El aislamiento del ARN y qRT-PCR se realizó como se describe en el Ejemplo 4. También se evaluaron la expresión de MBII-85, MBII-52 y Snrpn.

65 Los datos se presentan en las Tablas 12-15, normalizados para el gen de mantenimiento de la casa, GAPDH. Los resultados indican que el tratamiento con oligonucleótidos antisentido dirigidos a la región de punto

clave que identificamos dio como resultado la inhibición de la transcripción de ARNm de Ube3a-ATS. Además, la expresión de MBII-85, MBII-52 y Snrpn se mantuvo después del derribo de Ube3a-ATS.

Tabla 12

| % expresión de la expresión de la transcripción de Ube3a-ATS en relación con el control no tratado | | | |
|--|---------|-----------|----------------|
| Nº de ISIS | Corteza | Hipocampo | Médula espinal |
| 592401 | 35 | 44 | 48 |
| 592408 | 50 | 43 | 45 |
| 592413 | 38 | 45 | 67 |
| 592482 | 30 | 31 | 32 |
| 592489 | 28 | 36 | 52 |
| 592515 | 67 | 66 | 79 |
| 592517 | 39 | 43 | 44 |

Tabla 13

| % expresión de expresión de transcripción MBII-85 relativa al control no tratado | | | |
|--|---------|-----------|----------------|
| Nº de ISIS | Corteza | Hipocampo | Médula espinal |
| 592401 | 82 | 104 | 98 |
| 592408 | 99 | 96 | 112 |
| 592413 | 121 | 99 | 90 |
| 592482 | 85 | 74 | 99 |
| 592489 | 98 | 105 | 99 |
| 592515 | 101 | 100 | 92 |
| 592517 | 78 | 82 | 94 |

Tabla 14

| % expresión de MB II-52 expresión de transcripción relativa al control no tratado | | | |
|---|---------|-----------|----------------|
| Nº de ISIS | Corteza | Hipocampo | Médula espinal |
| 592401 | 90 | 103 | 92 |
| 592408 | 95 | 85 | 115 |
| 592413 | 103 | 103 | 91 |
| 592482 | 81 | 91 | 103 |
| 592489 | 135 | 118 | 124 |
| 592515 | 112 | 140 | 97 |
| 592517 | 92 | 103 | 98 |

Tabla 15

| % expresión de expresión de transcripción Snrpn relativa al control no tratado | | | |
|--|---------|-----------|----------------|
| Nº de ISIS | Corteza | Hipocampo | Médula espinal |
| 592401 | 92 | 90 | 92 |
| 592408 | 96 | 90 | 84 |
| 592413 | 97 | 97 | 80 |
| 592482 | 85 | 74 | 46 |
| 592489 | 96 | 88 | 74 |
| 592515 | 95 | 93 | 82 |
| 592517 | 88 | 87 | 49 |

Ejemplo 6: Inhibición antisentido de Ube3a-ATS en ratones Ube3a-YFP

Los oligonucleótidos antisentido seleccionados de los estudios descritos anteriormente se rastrearon para determinar su eficacia y tolerabilidad *in vivo* en el modelo de ratón Ube3a-YFP (Dindot, SV y col., Hum. Mol. Genet., 2008, 17: 111-118).

Oligonucleótido antisentido se administró a los ratones mediante inyección de bolo intracerebroventricular de 300 µg de ISIS 592401 o ISIS 592489. Los ratones se sacrificaron después de 4 semanas de administración. Los niveles de mRNA de Ube3a-YFP-ATS y mRNA de Ube3a-YFP se evaluaron en la corteza, el hipocampo y la médula espinal. Los ensayos se realizaron como se describió previamente (Meng, L. y col., Hum. Mol. Genet., 2012. doi: 10.1093/hmg/ddz1).

Se aisló ARN de las diferentes secciones cerebrales y se analizó mediante qRT-PCR. Los resultados se presentan en Tablas 16 y 17, normalizados a GAPDH. Los datos indican que la administración de ASO dio como resultado una reducción del 50-65% de la transcripción de Ube3a-YFP-ATS en el cerebro y la médula espinal. De forma correspondiente, hubo un aumento aproximado de 1,5-2 veces del ARNm de Ube3a-YFP en ratones tratados con ASO. Como se muestra en la Figura 1, el análisis de transferencia de Western se realizó usando un anticuerpo anti-YFP y confirmó que el tratamiento con ASO aumentó la expresión de la proteína Ube3a paterna.

También se evaluaron la expresión de MBII-85, MBII-52 y Snrpn. Como se presenta en las Tablas 18-20, la expresión de MBII-85, MBII-52 y Snrpn se mantuvo después de la caída de Ube3a-YFP-ATS. Los niveles del marcador microglial AIF1 también se evaluaron como una medida de la toxicidad del SNC. Como se presenta en la Tabla 21, hubo un aumento insignificante en los niveles de Aifl, lo que indica que el tratamiento con ASO fue neurotolerable.

Tabla 16

| % de inhibición de expresión de la transcripción de ARNm de Ube3a-YFP-ATS en relación con el control no tratado | | | |
|---|---------|-----------|----------------|
| | Corteza | Hipocampo | Médula espinal |
| ISIS 592401 | 48±9 | 59±9 | 63±12 |
| ISIS 592489 | 59±16 | 65±5 | 64±7 |

Tabla 17

| % expresión de la transcripción de ARNm de Ube3a-YFP en relación con el control no tratado (indicado como 100%) | | | |
|---|---------|-----------|----------------|
| | Corteza | Hipocampo | Médula espinal |
| ISIS 592401 | 169±7 | 198±22 | 176±72 |
| ISIS 592489 | 140±31 | 156±22 | 142±22 |

Tabla 18

| % MBII-85 expresión de la transcripción de ARNm en relación con el control no tratado (indicado como 100%) | | | |
|--|---------|-----------|----------------|
| | Corteza | Hipocampo | Médula espinal |
| ISIS 592401 | 107±13 | 114±3 | 108±11 |
| ISIS 592489 | 73±25 | 102±5 | 109±16 |

Tabla 19

| % expresión de MBII-52 de la transcripción de ARNm en relación con el control no tratado (indicado como 100%) | | | |
|---|---------|-----------|----------------|
| | Corteza | Hipocampo | Médula espinal |
| ISIS 592401 | 75±1 | 99±0 | 83±13 |
| ISIS 592489 | 95±33 | 109±9 | 91±13 |

Tabla 20

| % expresión de transcripción de ARNm de Snrpn con respecto al control no tratado (indicado como 100%) | | | |
|---|---------|-----------|----------------|
| | Corteza | Hipocampo | Médula espinal |
| ISIS 592401 | 103±3 | 95±4 | 91±7 |
| ISIS 592489 | 94±12 | 90±6 | 92±5 |

Tabla 21

| % expresión de transcripción de ARNm de Aif1 con respecto al control no tratado (indicado como 100%) | | | |
|--|---------|-----------|----------------|
| | Corteza | Hipocampo | Médula espinal |
| ISIS 592401 | 94±4 | 106±7 | 111±5 |
| ISIS 592489 | 92±11 | 112±21 | 182±30 |

Ejemplo 7: Inhibición antisentido de Ube3a-ATS en ratones Ube3a-YFP

Los oligonucleótidos antisentido seleccionados de los estudios descritos anteriormente se cribaron para determinar la eficacia y tolerabilidad *in vivo* en el modelo de ratón Ube3a-YFP (Dindot, SV y col., Hum. Mol. Genet., 2008, 17: 111-118).

Oligonucleótido antisentido se administró a los ratones mediante inyección de bolo intracerebroventricular de 500 µg de ISIS 592401. Los ratones se sacrificaron después de 4 semanas de administración. Se evaluaron los niveles de ARNm de Ube3a-YFP-ATS, ARNm de Ube3a-YFP y proteína Ube3a en la corteza, el hipocampo y la médula espinal. Los ensayos se realizaron como se describió previamente (Meng, L. y col., Hum. Mol. Genet., 2012. doi: 10.1093/hmg/ddz1).

Se aisló ARN de las diferentes secciones del cerebro y se analizó mediante qRT-PCR. Los resultados se presentan en los cuadros 22 y 23, normalizados para GAPDH. Los datos indican que la administración de ASO dio como resultado aproximadamente una disminución del 65-85% de la transcripción de Ube3a-YFP-ATS en el cerebro y la médula espinal. De forma correspondiente, hubo un aumento aproximado de 2,5 a 4,5 veces del ARNm de Ube3a-YFP en ratones tratados con ASO. Como se muestra en la Figura 2, el análisis de transferencia Western se realizó usando un anticuerpo anti-YFP y confirmó que el tratamiento con ASO aumentó la expresión de proteína Ube3a paterna.

También se evaluó la expresión de MBII-85, MBII-52 y Snrpn. Como se presenta en las Tablas 24-26, la expresión de MBII-85, MBII-52 y Snrpn se vio mínimamente afectada tras la caída de Ube3a-YFP-ATS. Los niveles del marcador microglial AIF1 también se evaluaron como una medida de la toxicidad del SNC. Como se presenta en la Tabla 27, hubo un aumento insignificante en los niveles de Aif1, lo que indica que el tratamiento con ASO fue neurotolerable.

Tabla 22

| % de inhibición de la expresión de la transcripción de ARNm de Ube3a-YFP-ATS en relación con el control no tratado | | | |
|--|---------|-----------|----------------|
| | Corteza | Hipocampo | Médula espinal |
| ISIS 592401 | 84±6 | 66±4 | 69±1 |

Tabla 23

| % expresión de la transcripción de ARNm de Ube3a-YFP en relación con el control no tratado (indicado como 100%) | | | |
|---|---------|-----------|----------------|
| | Corteza | Hipocampo | Médula espinal |
| ISIS 592401 | 445±81 | 263±8 | 284±25 |

Tabla 24

| % MBII-85 expresión de la transcripción de ARNm en relación con el control no tratado (indicado como 100%) | | | |
|--|---------|-----------|----------------|
| | Corteza | Hipocampo | Médula espinal |
| ISIS 592401 | 65±183 | 98±12 | 98±7 |

Tabla 25

| % MBII-52 expresión de la transcripción de ARNm en relación con el control no tratado (indicado como 100%) | | | |
|--|---------|-----------|----------------|
| | Corteza | Hipocampo | Médula espinal |
| ISIS 592401 | 72±17 | 92±8 | 89±10 |

Tabla 26

| % expresión de transcripto de ARNm de Snrpn con respecto al control no tratado (indicado como 100%) | | | |
|---|---------|-----------|----------------|
| | Corteza | Hipocampo | Médula espinal |
| ISIS 592401 | 102±11 | 101±3 | 95±2 |

Tabla 27

| % expresión de la transcripción de ARNm de Aif1 con respecto al control no tratado (indicado como 100%) | | | |
|---|---------|-----------|----------------|
| | Corteza | Hipocampo | Médula espinal |
| ISIS 592401 | 104±13 | 80±8 | 113±14 |

Ejemplo 8: Inhibición antisentido de Ube3a-ATS en ratones con deficiencia materna en Ube3a

Los oligonucleótidos antisentido seleccionados de los estudios descritos anteriormente se rastrearán para determinar la eficacia *in vivo* en un modelo de ratón genético del Síndrome de Angelman descrito en Jiang, Y. et al., Neuron. 1998. 21: 799-811. Los ratones tienen una mutación nula en el alelo materno Ube3a. Un vector de direccionamiento reemplaza un fragmento de ADN genómico de 3 kb que contiene el exón 2 (299 pb; 3-302 pb en el GENBANK Nº de acceso U82122) del alelo materno Ube3a, eliminando así cien de los aminoácidos más N terminal, cambiando el marco de lectura e inactivando todas las supuestas isoformas de Ube3a materna. Los ratones tienen neuroanatomía normal pero muestran una deficiencia en el aprendizaje dependiente del contexto de potenciación a largo plazo (LTP), disfunción motora y convulsiones similares al Síndrome de Angelman humano.

Los oligonucleótidos antisentido descritos en la presente memoria se administran a los ratones mediante inyección en bolo intracerebroventricular en un intervalo de dosis de 10 µg a 1 mg de concentración final. Los ratones se sacrifican y los niveles de regulación hacia abajo del mRNA de Ube3a-ATS así como la inducción de proteína Ube3a se evalúan utilizando secciones de hipocampo o cerebro completo.

Los ratones tratados con ASO se evalúan mediante diversos ensayos fenotípicos y de comportamiento para el tratamiento o la mejora de los defectos fenotípicos. El ensayo de campo abierto como se describe en Miller, BH y col., PLoS One. 2010. 5: e14458 se lleva a cabo para evaluar si el fenotipo hipoactivo se trata con la administración de ASO. El ensayo de enterramiento de mármol como se describe en Njung'e, K. y Handley, SL Pharmacol. Biochem. Behav. 1991. 38: 63-67 se lleva a cabo para evaluar si la ansiedad en los ratones se trata mediante administración de ASO. El ensayo de rotarod y la prueba de espiga tal como se describe en Chen, M. y Xu, R. BMC Neurosci. 2011. 12: 1 se lleva a cabo para evaluar las mejoras en el equilibrio y las funciones motoras de los ratones mediante la administración de ASO.

Los ratones tratados con ASO se ensayan para la función motora utilizando el análisis de huella. Las patas traseras de los ratones se sumergen en tinta roja impermeable y los ratones se colocan en un extremo abierto de un túnel oscuro. La longitud del paso, el ancho del paso y el coeficiente de alternancia izquierda-derecha se calculan como se describe en Clark, HB y col., J. Neurosci. 1997. 17: 7385 - 7395.

5 Los ratones tratados con ASO se prueban para la reducción de las convulsiones mediante un ensayo que implica arañar un bolígrafo de plástico a través de una jaula de acero inoxidable, rallando lo más rápida e intensamente posible hasta que se producen convulsiones o durante un máximo de 45 segundos. Cada animal será probado una vez entre las 5 y 10 semanas de edad. Se realizarán grabaciones de EEG, como se describe en Cattanach, BM y col., Mamm. Genome 1997. 8: 472-478.

10 Los ratones tratados con ASO se ensayan para la mejora en el aprendizaje dependiente del contexto con el ensayo de acondicionamiento de miedo, que usa una cámara de prueba estándar con un suelo rallado de acero inoxidable a través del cual se administra choque de pie revuelto. La congelación se evaluará y se puntuará como 1 (postura de congelación) o 0 (postura de no congelación). Los puntajes se promediarán durante un intervalo de 1 minuto y se convertirán en porcentajes.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un oligonucleótido monocatenario modificado que consiste en 12 a 30 nucleósidos enlazados para su uso en el tratamiento del síndrome de Angelman, en donde la secuencia de nucleobases del oligonucleótido modificado es por lo menos un 85% complementaria en toda su longitud a una región de igual longitud de una secuencia de ácido nucleico de UBE3A-ATS que tiene la secuencia de nucleobases de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2; en donde el oligonucleótido modificado se dirige a una región de UBE3A-ATS que está inmediatamente en sentido descendente del snoARN de HBII-52 o MBII-52 y en sentido ascendente de la región de UBE3A-ATS complementaria al extremo 3' del pre-ARNm de UBE3A.
- 10 2. El oligonucleótido modificado para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la secuencia de nucleobases del oligonucleótido modificado es por lo menos un 90%, por lo menos un 95% o un 100% complementaria en toda su longitud a una región de igual longitud de la secuencia de nucleobases de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2.
- 15 3. El oligonucleótido modificado para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el oligonucleótido modificado consiste en de 15 a 20, de 16 a 20, de 17 a 20 o de 18 a 20 nucleósidos enlazados, por ejemplo, en donde el oligonucleótido modificado consiste en 15, 16, 17, 18, 19 o 20 nucleobases.
- 20 4. El oligonucleótido modificado para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la expresión de UBE3A paterna se induce sin reducir los niveles de Snrpn, MBII-85/HBII-85, y/o MBII-52/HBII-52.
- 25 5. El oligonucleótido modificado para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el oligonucleótido modificado comprende por lo menos un enlace internucleosídico modificado.
- 30 6. El oligonucleótido modificado para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el por lo menos un enlace internucleosídico modificado es un enlace internucleosídico de fosforotioato, opcionalmente en donde cada enlace internucleosídico es un enlace internucleosídico de fosforotioato.
- 35 7. El oligonucleótido modificado para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde cada enlace internucleosídico del oligonucleótido modificado se selecciona entre un enlace internucleosídico de fosfodiéster y un enlace internucleosídico de fosforotioato y por lo menos un enlace internucleosídico es un enlace internucleosídico de fosforotioato.
- 40 8. El oligonucleótido modificado para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde por lo menos un nucleósido del oligonucleótido modificado comprende un azúcar modificado.
- 45 9. El oligonucleótido modificado para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el azúcar modificado es un azúcar bicíclico que comprende un puente entre las posiciones 4' y 2' del azúcar.
- 50 10. El oligonucleótido modificado para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el puente se selecciona de 4'-CH(CH₃)-O-2', 4'-CH₂-2', 4'-(CH₂)₂-2', 4'-CH₂-O-2', 4'-(CH₂)₂-O-2', 4'-CH₂-ON(R₁)-2' y 4'-CH₂-N(R₁)-O-2' en donde cada R₁ es, independientemente, H, un grupo protector o alquilo C₁-C₁₂.
- 55 11. El oligonucleótido modificado para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el puente es 4'-CH(CH₃)-O-2'.
- 60 12. El oligonucleótido modificado para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el azúcar modificado comprende un grupo 2'-O-metoxietilo o un grupo 2'-O-metilo.
- 65 13. El oligonucleótido modificado para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde por lo menos un nucleósido comprende una nucleobase modificada, en donde opcionalmente la nucleobase modificada es una 5-metilcitosina.
- 70 14. El oligonucleótido modificado para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde el oligonucleótido es un compuesto antisentido gapmer.
- 75 15. El oligonucleótido modificado para su uso de acuerdo con la reivindicación 14, en donde la brecha consiste en 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 nucleósidos enlazados.
- 80 16. El oligonucleótido modificado para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde el oligonucleótido modificado funciona a través de un mecanismo antisentido mediado por RNasa H.
- 85 17. El oligonucleótido modificado para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-16, en donde el oligonucleótido es un compuesto antisentido conjugado.

18. El oligonucleótido modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 o la reivindicación 13, en donde el oligonucleótido modificado tiene un motivo de azúcar descrito por la Fórmula A de la siguiente manera: (J)_m-(B)_n-(J)_p-(B)-(A)-r-(D)_g-(A)-v-(B)_w-(J)_x-(B)_y-(J)_z, en donde:

- 5 cada A es independientemente un nucleósido 2'-sustituido;
 cada B es independientemente un nucleósido bicíclico;
 cada J es independientemente o un nucleósido 2'-sustituido o un 2'-desoxinucleósido;
10 cada D es un 2'-desoxinucleósido;
 m es 0-4; n es 0-2; p es 0-2; r es 0-2; v es 0-2; w es 0-4; x es 0-2; y es 0-2; z es 0-4; g es 6-14;

siempre que:

- 15 por lo menos uno de m, n, y r sea distinto de 0;
 por lo menos uno de w e y sea distinto de 0;
 la suma de m, n, p, r y t sea de 2 a 5; y
 la suma de v, w, x, y, y z sea de 2 a 5.

20 19. El oligonucleótido modificado de la reivindicación 18, en donde el nucleósido bicíclico comprende un azúcar bicíclico que comprende un puente entre las posiciones 4' y 2' del azúcar, en donde opcionalmente el puente se selecciona entre 4'-CH(CH₃)-O-2', 4'-CH₂-2', 4'-(CH₂) 2', 4'-CH₂-O-2', 4'-(CH₂)₂-O-2', 4'-CH₂-ON(R₁)-2' y 4'-CH₂-N(R₁)-O-2'- en donde cada R₁ es, independientemente, H, un grupo protector o alquilo C₁-C₁₂.

25

30

35

40

45

50

55

60

65



Figura 1

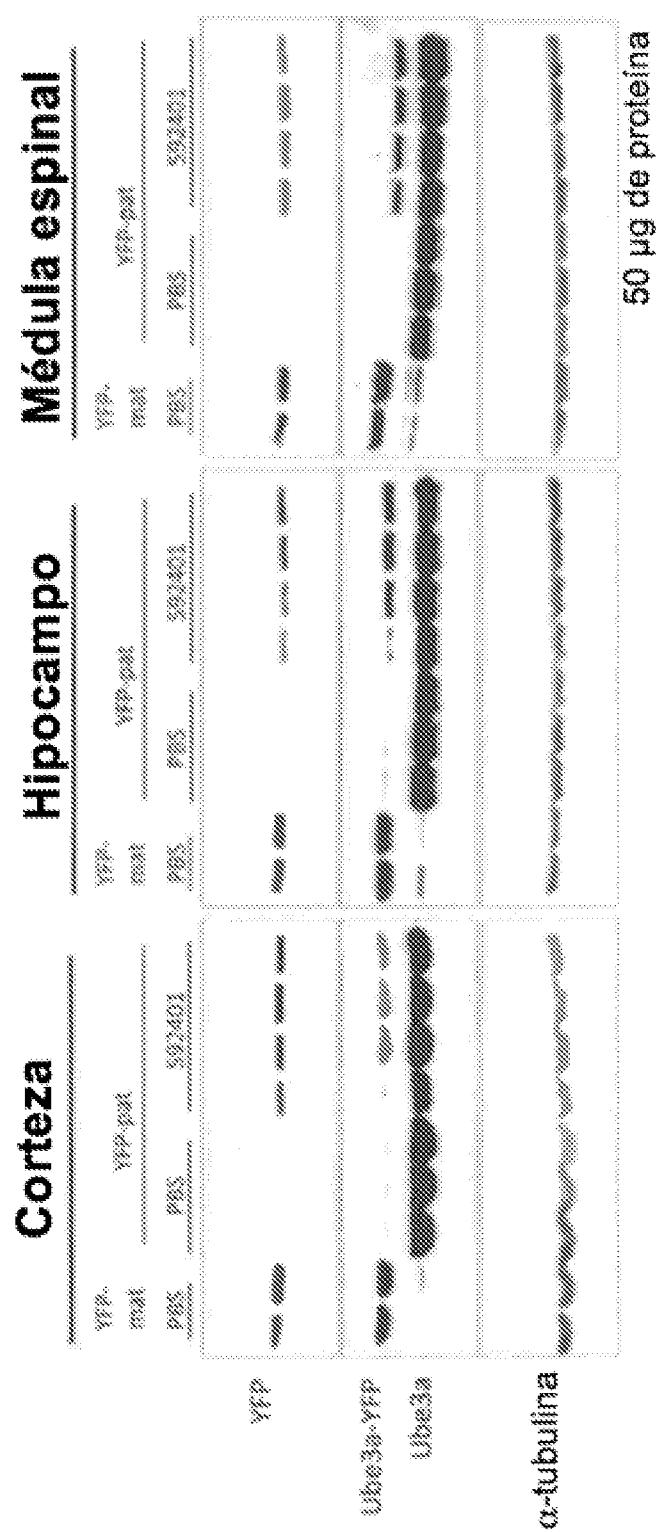


Figura 2