TRATAMIENTO ANTISENTIDO DEL SÍNDROME DE ANGELMAN

REFERENCIA CRUZADA CON SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de Estados Unidos núm. 62/593.431, presentada el 1 de diciembre de 2017, y la solicitud núm. de serie 62/676.034, presentada el 24 de mayo de 2018, que se incorporan por la presente en su totalidad en la presente descripción como referencia.

LISTADO DE SECUENCIAS

Esta solicitud contiene un listado de secuencias presentado en formato electrónico como un archivo ASCII.txt titulado “922001-2020 Sequence Listing_ST25” creado el 30 de noviembre de 2018. El contenido del listado de secuencias se incorpora en la presente descripción en su totalidad.

ANTECEDENTES

El síndrome de Angelman (AS) es un trastorno del desarrollo neurológico que se asocia con déficits cognitivos y motores graves, epilepsia, trastorno del sueño y una disposición “feliz” atípica. Las personas con AS a menudo se diagnostican a los 2-3 años de edad y tienen una esperanza de vida normal. Requieren cuidados especiales y atención médica durante toda su vida. Actualmente existen pocas opciones de tratamiento para las personas con AS, la mayoría de las cuales involucran medicamentos antiepilépticos para tratar las convulsiones.

El síndrome de Angelman lo provocan mutaciones que afectan la expresión o la función del gen de la proteína ubiquitina ligasa E3A heredado por vía materna (*UBE3A*). A diferencia de la mayoría de los genes, el *UBE3A* está sujeto a la impronta genómica, que es un fenómeno raro y de origen natural que inactiva un alelo de un gen mientras deja el otro alelo activado. En las neuronas del sistema nervioso central (SNC), el alelo paterno de *UBE3A* está inactivado, mientras que en todos los demás tipos de células del cuerpo, ambos alelos de *UBE3A* están activados. Debido a esto, el AS siempre lo provocan mutaciones que afectan el alelo de *UBE3A* heredado por vía materna.

El alelo paterno de *UBE3A* se inactiva por el transcrito antisentido de *UBE3A* (*UBE3A-AS*), que es un componente de un transcrito de ARN largo que expresa varios transcritos codificantes y no codificantes de proteínas. *El UBE3A-AS* se expresa a partir del alelo paterno y solo en las neuronas del SNC y es tanto suficiente como necesario para desactivar la expresión del alelo paterno de *UBE3A*. No está claro por qué *UBE3A* se imprime en las neuronas, pero crea una oportunidad única

para tratar a las personas con AS, porque existe una copia funcional, aunque inactiva, de *UBE3A* en el cromosoma paterno. Los estudios realizados hasta la fecha indican que activar el alelo paterno de *UBE3A* es una terapia viable para tratar el AS.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

En la presente descripción se describe una región en el extremo 5' del transcrito *UBE3A-AS* que es importante para su estabilidad. En base a estos hallazgos, se diseñaron oligonucleótidos antisentido (ASO) para dirigirse a esta región para interrumpir la transcripción de *UBE3A-AS* y reactivar la expresión del alelo paterno de *UBE3A*. Estos ASO que se dirigen al extremo 5' de *UBE3A-AS* son capaces de detener la transcripción de *UBE3A-AS* y activar el alelo paterno de *UBE3A*. *SNHG14* es un transcrito policistrónico que codifica varios ARN diferentes, lo que incluye *UBE3A-AS*.

En consecuencia, se describen en la presente descripción varios ASO que contienen una secuencia de nucleótidos contigua de 10 a 30 nucleótidos (es decir, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30) de longitud con al menos 98 % (es decir, 98 %, 99 % o 100 %) de complementariedad con los exones objetivo entre el extremo 3' de *SNORD115* y el extremo 5' de *SNORD109B*, que se cree que representa el extremo 5' del transcrito antisentido de *UBE3A* (*UBE3A-AS*). En particular, los exones objetivo pueden estar en el extremo 5' de *UBE3A-AS*, que corresponde a las posiciones 25,511,577 a 25,516,681 en el ensamble del genoma humano del cromosoma 15 humano hg19. En algunas modalidades, el ácido nucleico objetivo es uno de los cinco exones ubicados en el extremo 5' de *UBE3A-AS*, que pueden corresponder a las posiciones 25,511,577 a 25,511,761 (exón 1), 25,512,059 a 25,512,191 (exón 2), 25,513,476 a 25,513,600 (exón 3), 25,514,752 a 25,514,880 (exón 4) y 25,516,565 a 25,516,681 (exón 5). Por lo tanto, el ácido nucleico objetivo puede ser una secuencia contigua de ácido nucleico de 10 a 30 nucleótidos dentro de la SEQ ID NO:1, 2, 3, 4 o 5.

En algunas modalidades, la secuencia objetivo es un límite exónico que involucra los exones 1-5 de *UBE3A-AS*, el exón 5 de *UBE3A-AS* y el exón 1 de *SNORD109B* y/o los exones 1-2 de *SNORD109B*.

Los métodos y estrategias para diseñar los ASO se conocen en la técnica. En algunas modalidades, el ASO se diseña para dirigirse a secuencias que se conservan entre sujetos humanos. En algunas modalidades, el ASO se diseña para dirigirse a secuencias que se conservan entre sujetos primates.

El oligonucleótido puede ser un oligonucleótido antisentido (es decir, como entenderán los expertos en la técnica: antisentido con respecto a su ácido nucleico objetivo), por ejemplo, con un diseño de gapmer. El oligonucleótido descrito es capaz de inducir la expresión del *UBE3A* paterno en una

neurona mediante la degradación, reducción o eliminación del transcrito *UBE3A-AS*. Esto lo hace al dirigirse al extremo *5′* de *UBE3A-AS* en un sitio aguas arriba del ARNpn *SNORD109B*. En las Tablas 1, 2, 3, 4 o 5 se proporcionan ejemplos de ASO diseñados para dirigirse a los exones 1-5. Por ejemplo, en algunas modalidades, el ASO comprende la secuencia de ácido nucleico SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9, 10 u 11.

Los ASO descritos también pueden tener una o más modificaciones para mejorar la estabilidad, la solubilidad, la actividad, la distribución celular y/o la captación celular. Por ejemplo, el ASO descrito puede contener uno o más nucleósidos modificados en el azúcar y/o enlaces internucleosídicos modificados. Por ejemplo, en algunas modalidades, el oligonucleótido comprende uno o más enlaces internucleosídicos modificados a partir del fosfodiéster natural a un enlace que es, por ejemplo, más resistente al ataque de nucleasa. En algunas modalidades, el ASO contiene una o más nucleobases modificadas que difieren de las nucleobases de origen natural, pero son funcionales durante la hibridación del ácido nucleico.

En algunas modalidades, el ASO es un oligonucleótido de ADN. En algunas modalidades, el ASO es un oligonucleótido de ARN. En aún otras modalidades, el ASO contiene tanto desoxinucleótidos como ribonucleótidos. Por ejemplo, el ASO puede ser un oligonucleótido gapmero, headmero o tailmero. En algunas modalidades, el bloque central de un gapmero se flanquea por bloques de ribonucleótidos modificados que protegen el bloque interno de la degradación por nucleasas. Por ejemplo, el ASO puede contener un tramo de 7, 8, 9, 10 o más monómeros de ADN natural para activar la escisión por ARNasa H del ARN objetivo, junto con 3, 4 o 5 monómeros de ribonucleótidos modificados en los extremos 3' y 5' para la protección contra exonucleasas. En algunos casos, los ribonucleótidos modificados son nucleótidos ARN 2'-O-metil (OMe), nucleótidos modificados con 2'-O-metoxietil (MOE) o ácidos nucleicos bloqueados en 2' (LNA). Se proporcionan ejemplos de ASO gapmeros en las Tablas 7, 11 y 17. De esta forma, en algunas modalidades, el ASO descrito tiene una secuencia de ácido nucleico seleccionada de SEQ ID NO:362 a 392.

Además, se describen composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más de los ASO descritos en la presente descripción y diluyentes, portadores, sales y/o adyuvantes farmacéuticamente aceptables.

Además, se describen métodos para inducir *in vivo* o *in vitro* la expresión de *UBE3A* en una célula objetivo donde la expresión del *UBE3A* paterno se suprime, al administrar uno o más de los ASO descritos o la composición descrita en la presente descripción en una cantidad eficaz a dicha célula.

Además, se describen métodos para tratar o prevenir una enfermedad, trastorno o disfunción asociada con la actividad de UBE3A *in vivo* que comprende administrar una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de uno o más de los ASO descritos a un sujeto que padece o es susceptible a la enfermedad, trastorno o disfunción, tal como el síndrome de Angelman.

Los detalles de una o más modalidades de la invención se muestran en los dibujos adjuntos y en la descripción más abajo. Otras características, objetos, y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción y los dibujos, y de las reivindicaciones. Por ejemplo, los expertos en la técnica, al leer la descripción apreciarán que la presente descripción demuestra la utilidad de ciertas secuencias como se describe en la presente descripción para impactar la expresión de *UBE3A*, y además enseña la utilidad de formatos de oligonucleótidos que son, o se dirigen (por ejemplo, son complementarios a), a dichas secuencias. Los expertos en la técnica apreciarán que la presente descripción no se limita a ningún mecanismo de acción en particular: los oligonucleótidos proporcionados pueden ser útiles independientemente de si actúan a través de un mecanismo antisentido, por ejemplo, que implica actividad de ARNasa H, y también se proporcionan otros formatos terapéuticos (por ejemplo, ARNip, ARNhp, ARNg de nucleasa, etcétera) de oligonucleótidos que son o se dirigen a dichas secuencias. Análogamente, los expertos en la técnica apreciarán que la presente descripción, al definir secuencias útiles como se describe en la presente descripción, también describe una variedad de formatos para dichas secuencias (por ejemplo, como parte de un vector de ácido nucleico tal como un vector del que pueden expresarse (por ejemplo, *in vivo*, *in vitro*, o ambos, etcétera). Por lo tanto, los expertos en la técnica, que lean la presente descripción, apreciarán que la referencia a “ASO” en la presente descripción es ilustrativa, y los ácidos nucleicos apropiados (por ejemplo, oligonucleótidos) pueden usarse independientemente del mecanismo de acción; los expertos en la técnica conocen la extensa literatura con respecto al formato y la estructura apropiadas de los ácidos nucleicos (por ejemplo, oligonucleótidos) que operan a través de cualquiera de una variedad de mecanismos (por ejemplo, ARNip, ARNhp, ARNg de nucleasa, etcétera). En algunas modalidades, los ácidos nucleicos proporcionados incorporan características de formato y/o estructurales conocidas en la técnica que son útiles en uno o más contextos mecanicísticos (por ejemplo, que involucran ARNasa H, RISC, una nucleasa dirigida hacia el ácido nucleico tal como una Cas, etcétera).

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las Figuras 1A a 1D ilustran la región impresa del síndrome de Prader-Willi/Angelman (PWS/AS) en humanos y ratones. La Figura 1A muestra la anotación RefSeq de la región impresa de PWS/AS humana. La Figura 1B muestra la anotación RefSeq de la región ortóloga impresa de PWS/AS en ratón. La Figura 1C muestra *UBE3A-AS* y el extremo 3′ de *UBE3A*. La Figura 1D muestra el alineamiento de la cadena que muestra regiones ortólogas entre humanos, macacos (macacos Cynomolgus), cerdos, elefantes, ratones y ratas. La región objetivo se conserva entre primates no humanos pero no en roedores. La Figura 1D también muestra el gráfico de perfil de tasa evolutiva genómica (GERP) de la región. Los valores positivos representan la restricción evolutiva en bases de ADN específicas.

Las Figuras 2A a 2E muestran un análisis de ASO dirigidos al *Ube3a-AS* de ratón. La Figura 2A es un esquema del transcrito *Ube3a-AS* de ratón y la ubicación aproximada de ASO específicos de ratón. Los cuadros y las líneas representan exones e intrones, respectivamente. La flecha representa la dirección de la transcripción. La Figura 2B es un esquema del alelo indicador *Ube3aYFP* usado para medir los niveles de proteína Ube3a paterna. El modelo de ratón Ube3aYFP se generó al dirigir la proteína fluorescente amarilla (YFP) al extremo 3' del locus endógeno de *Ube3a*. La expresión de *Ube3a-AS* inhibe la transcripción del alelo paterno de Ube3aYFP y la pérdida de *Ube3a-AS* reactiva la expresión del Ube3aYFP paterno, que puede detectarse mediante obtención de imágenes por inmunofluorescencia mediante el uso de un anticuerpo anti-YFP. La Figura 2C es un esquema de la línea de tiempo experimental para examinar los ASO en las neuronas primarias del hipocampo de ratón. Las neuronas primarias del hipocampo de ratón se generaron a partir de ratones recién nacidos con un alelo Ube3aYFP heredado por vía paterna (0 DIV) y se trataron después de 7 días *in vitro* (7 DIV). Tres días después del tratamiento (10 DIV), se midieron los niveles de proteína Ube3aYFP en células individuales. La Figura 2D contiene imágenes inmunofluorescentes que muestran la proteína paterna Ube3aYFP en neuronas primarias tratadas con vehículo (veh), un ASO control negativo (ASO-C), Topotecán (Topo), ASO-B y ASO 1.1. La Figura 2E muestra los niveles medios de intensidad de Ube3aYFP paterno en células neuronales individuales tratadas con vehículo (veh, DMSO al 1 %; n = 3), ASO control (ASO-C, 15 μM; n = 3), Topotecán (Topo, 0.3 μM; n = 3), ASO-B (1, 5, 15 μM; n = 3), ASO-1.1 (1, 5, 15 μM), ASO-1.2 (1, 5, 15 μM) y ASO 3.1 (1, 5, 15 μM). Abreviaturas: YFP, proteína fluorescente amarilla; Tx, tratamiento; DIV, días *in vitro*; n.s., no significativo. Las barras de error representan el error estándar de la media.

Las Figuras 3A a 3D muestran análisis de ASO dirigidos al *UBE3A-AS* humano. La Figura 3A es una muestra esquemática del *UBE3A-AS* humano y la ubicación aproximada de ASO específicos para humanos (ASO 1-6). ASO-7 se ubica en un intrón de *UBE3A-AS*. Los cuadros y las líneas representan exones e intrones, respectivamente. La Figura 3B es un esquema de la línea de tiempo experimental para examinar ASO en neuronas derivadas de células madre pluripotentes inducidas (iPSC) GABAérgicas humanas de un individuo cariotípicamente normal. Las neuronas derivadas de iPSC humanas se trataron después de 14 DIV y después se procesaron para aislamiento de ARN a 20 DIV. Las Figuras 3C y 3D muestran los niveles de ARN relativos de estado estacionario (normalizados a ASO-C) de *UBE3A-AS* (Figura 3C) y *UBE3A* (Figura 3D) en neuronas derivadas de iPSC tratadas con ASO control (ASO-C, 10 μM) y ASO 1-7 (10 μM), y Topotecán (Topo, 1 μM). Abreviaturas: Tx, tratamiento; DIV, días *in vitro*. Las barras de error representan el error estándar de la media.

Las Figuras 4A a 4I muestran el análisis de ASO-4 humano y Topotecán en neuronas derivadas de iPSC GABAérgicas. Las Figuras 4A a 4F muestran la expresión relativa (normalizada a 1 nM) de los niveles de ARN de estado estacionario de *UBE3A-AS* (Figura 4A), *SNORD116* (Figura 4B), *IPW* (Figura 4C), *SNORD115* (Figura 4D), *SNORD109A/B* (FIG. 4E), y *UBE3A* (Figura 4F) en neuronas derivadas de iPSC tratadas con una curva de 10 puntos ½ log de dosis de ASO-4 y Topotecán (1 nM, 3 nM, 10 nM, 30 nM, 100 nM, 300 nM, 1 μM, 3 μM, 10 μM y 30 μM). La Figura 4G es un esquema de la línea de tiempo experimental para examinar ASO-4 en neuronas derivadas de iPSC GABAérgicas tratadas a 59 DIV. La Figura 4H a 4I muestra la expresión relativa (normalizada a ASO-C) de los niveles de ARN de estado estacionario de *UBE3A-AS* (Fig. 4H) y *UBE3A* (Fig. 4I) en neuronas derivadas de iPSC tratadas con ASO-C (10 μM) y ASO-4 (1, 5 y 10 μM). Abreviaturas: Tx, tratamiento. Las barras de error representan el error estándar de la media.

Las Figuras 5A a 5F muestran el análisis de ASO optimizados en neuronas derivadas de iPSC GABAérgicas y glutamatérgicas humanas. La Figura 5A es un esquema de la línea de tiempo experimental para examinar ASO optimizados en neuronas derivadas de iPSC GABAérgicas. La Figura 5B muestra la expresión relativa de (normalizado al control de agua) los niveles de ARN de estado estacionario de *UBE3A-AS* en neuronas derivadas de iPSC tratadas con una curva de 5 puntos ½ log de dosis (30 nM, 100 nM, 300 nM, 1 μM, 3 μM; n = 6) de ASO-3.1, ASO-3.2, ASO- 4.1, ASO-4.2, ASO-4.3, ASO-4.4, ASO-6.1, ASO-4.I y ASO-4.S. ASO-4.I y ASO-4.S representan ASO-4 fabricado por dos compañías (ASO-4.I, Integrated DNA Technologies; ASO-4.S, Sigma-Aldrich). La Figura 5C es un esquema de la línea de tiempo experimental para examinar ASO-4 y ASO-6.1

en neuronas derivadas de iPSC GABAérgicas. La Figura 5D muestra la expresión relativa de (normalizada a 1 nM) los niveles de ARN de estado estacionario de *UBE3A-AS* y *UBE3A* en neuronas derivadas de iPSC tratadas con una curva de 10 puntos ½ log de dosis (1 nM, 3 nM, 10 nM, 30 nM, 100 nM, 300 nM, 1 μM, 3 μM, 10 μM y 30 μM; n = 3) de ASO-4 (ASO-4.I y ASO-4.S) y ASO-6.1. La Figura 5E es un esquema de la línea de tiempo experimental para examinar ASO-4 y ASO-6.1 en neuronas glutamatérgicas derivadas de iPSC. La Figura 5F muestra la expresión relativa de (normalizado al control de agua) los niveles de ARN de estado estacionario de *UBE3A-AS* y *UBE3A* en neuronas derivadas de iPSC tratadas con una curva de 10 puntos ½ log de dosis (1 nM, 3 nM, 10 nM, 30 nM, 100 nM, 300 nM, 1 μM, 3 μM, 10 μM y 30 uM; n = 3) de ASO-4 (ASO-4.I y ASO-4.S) y ASO-6.1. Las barras de error representan el error estándar de la media.

Las Figuras 6A a 6D muestran la identificación de la región objetivo de ASO en la región impresa de PWS/AS de ratón. La Figura 6A muestra la anotación RefSeq de la región impresa ortóloga de PWS/AS en el cromosoma 7C de ratón. La Figura 6B ilustra un ensamble de transcrito generado a partir de datos de secuenciación de ARN (ARN-sec) de cerebro del ratón. La Figura 6C muestra la región objetivo de ASO que muestra ARNpn *Snord115* retenidos en exones del transcrito del gen huésped/extremo 5' de *Snord115* de *Ube3a-AS*. Las lecturas alineadas por ARN-sec se representan más abajo de los transcritos ensamblados. Los exones y los intrones se representan mediante cajas y líneas, respectivamente. La Figura 6D es un alineamiento de secuencia de ARNpn en los exones retenidos Snord115_ENSMUST00000101836 (SEQ ID NO:490), Snord115_ENSMUST00000101936 (SEQ ID NO:491), Snord115_ENSMUST00000104493 (SEQ ID NO:492), Snord115_ENSMUST00000082443 (SEQ ID NO:493), y Snord115_ENSMUST00000104427 (SEQ ID NO:494)), que muestra que los ARNpn retenidos tienen una Caja C degenerada, que se requiere para la formación de ARNpn funcional.

Las Figuras 7A a 7G muestran la identificación de la región objetivo ASO en la región impresa de PWS/AS humana. La Figura 7A muestra la anotación RefSeq de la región impresa del síndrome de Prader-Willi/Angelman (PWS/AS). La Figura 7B muestra el ensamble por ARN-sec del transcrito policistrónico de PWS humano. La Figura 7C muestra que *SNORD115-45* se retiene en un exón en el extremo 3' del transcrito del gen huésped/extremo 5' *SNORD115* de *UBE3A-AS*. Las lecturas de ARN-sec alineadas generadas a partir de cerebro humano adulto que muestran la Línea L1 se transcriben. La Figura 7D muestra la anotación RefSeq del extremo 3' del conglomerado *SNORD115* (*SNORD115*-39-48 y *SNORD109B*). La Figura 7E muestra la ubicación del elemento Línea L1 entre *SNORD115*-44 y *SNORD115*-45. La Figura 7F muestra el alineamiento de cadena de mamíferos

placentarios que representan clados principales que muestran la conservación en la región *SNORD115*-45-48, aunque reducida en roedores. La Figura 7G muestra la alineación de secuencia de ARNpn en la región objetivo con SNORD115-44 (ARNpn funcional) (SEQ ID NO:495), SNORD115-48 (SEQ ID NO:496), SNORD115-45 (SEQ ID NO:497), SNORD115-46 (SEQ ID NO:498) y SNORD115-47 (SEQ ID NO:499), que muestran que SNORD115-45 (retenido), SNORD115-46 (parcialmente retenido) y SNORD116-47 tienen una Caja C degenerada, que es necesaria para la formación de ARNpn funcional.

Las Figuras 8A a 8C muestran análisis farmacodinámicos de candidatos a ASO. La Figura 8A muestra curvas de respuesta a la dosis ajustadas de niveles de ARN de estado estacionario de *UBE3A-AS* en neuronas derivadas de iPSC GABAérgicas tratadas con una curva de 10 puntos ½ log de dosis (1 nM, 3 nM, 10 nM, 30 nM, 100 nM, 300 nM, 1 μM, 3 μM, 10 μM y 30 μM; n = 2) de ASO-4 y ASO-6.1 con diferentes diseños de modificación de ARN y cadena principal. Curvas de respuesta a la dosis ajustadas mediante el uso de un modelo de regresión logística de 4 parámetros (Hill). Los gráficos representan modelos ajustados y el error estándar. El eje Y representa los niveles de ARN relativos de *UBE3A-AS* y el eje X representa las concentraciones logarítmicas molares (M) de ASO. Las Figuras 8B y 8C son dendrogramas de agrupamiento jerárquico y gráficos de constelación de curvas de respuesta a la dosis ajustadas que muestran la relación entre los candidatos a ASO y la agrupación en 3 conglomerados.

La Figura 9 muestra el análisis farmacodinámico de ASO-6.1.PO-1.O y ASO-4.4.PS.L en neuronas derivadas de iPSC con síndrome de Angelman. Modelo de regresión logística de 4 parámetros (Hill) de niveles de ARN de estado estacionario de *UBE3A-AS* normalizados en neuronas derivadas de iPSC con síndrome de Angelman tratadas con una curva de 10 puntos ½ log de dosis (1 nM, 3 nM, 10 nM, 30 nM, 100 nM, 300 nM, 1 μM, 3 μM, 10 μM, y 30 μM; n = 3) de ASO-6.1.PO-1.O y ASO-4.4.PS.L.

La Figura 10 muestra el análisis de expresión de ARN codificados por el transcrito policistrónico de PWS en neuronas iPSC con síndrome de Angelman tratadas con ASO-6.1-PO-1.O y ASO-4.4.PS.L. Se muestran los niveles de ARN de estado estacionario normalizados de ARNpn *SNURF*, *SNRPN*, *SNHG116*, ARNpn de *SNORD116*, *IPW*, *SNHG115*, ARNpn de *SNORD115*, *UBE3A-AS* y *UBE3A* en neuronas derivadas de iPSC con AS tratadas con vehículo (1 % H_2O n = 3), ASO-6.1.PO-1.O (30 μM; n = 3) y ASO-4.4.PS.L (30 μM; n = 3). Los datos representan el porcentaje medio de ARN con relación al vehículo. Las barras de error representan el error estándar de la media. El asterisco (*)

denota diferencias estadísticamente significativas (p <0.05) mediante el uso de ANOVA de una vía con la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett con relación al vehículo.

La Figura 11 muestra el análisis farmacodinámico de ASO-6.1.PO-1.O y ASO-4.4.PS.L en macacos Cynomolgus. Se muestran los niveles de ARN de estado estacionario de *UBE3A-AS* en regiones del SNC de macaco tratadas con vehículo (solución salina al 0.9 %; n = 5), ASO-6.1.PO-1.O (10 mg; n = 3) y ASO-4.4.PS.L (10 mg; n = 3). Los datos representan el porcentaje medio de ARN de *UBE3A-AS* con relación al vehículo. Las barras de error representan el error estándar de la media. El asterisco (*) denota diferencias estadísticamente significativas (p <0.05) mediante el uso de ANOVA de una vía con la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett con relación al vehículo.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

El transcrito *UBE3A-AS/Ube3a-AS* conocido de cualquier otra manera como transcrito antisentido de la proteína ubiquitina ligasa *E3A* y *UBE3A-AS/Ube3a-AS*, es el nombre para el transcrito generado por la transcripción del transcrito *UBE3A-AS*, que está en la cadena de ADN antisentido con relación al gen *UBE3A*. Tenga en cuenta que los nombres de genes con todo en mayúsculas indican genes humanos (por ejemplo, *UBE3A*) y los nombres de genes con solo la primera letra en mayúscula indican genes de ratón (por ejemplo, *Ube3a*). El transcrito *UBE3A-AS* se transcribe como parte de una gran unidad de transcripción policistrónica que codifica *SNURF-SNRPN*, un conglomerado de ARN pequeños nucleares de caja C/D huérfanos (SNORD) y varios ARN largos no codificantes no caracterizados. Tanto en ratón como en humanos, el gen *UBE3A*/*Ube3a* está impreso en las neuronas del sistema nervioso central, donde se expresa solo a partir del alelo materno. El transcrito *UBE3A-AS/Ube3a-AS*es tanto necesario como suficiente para silenciar la transcripción del alelo paterno de *UBE3A/Ube3a*, y la inhibición de *UBE3A-AS/Ube3a-AS* reactiva la transcripción del alelo paterno de *UBE3A/Ube3a*. Las mutaciones que afectan la función o la expresión del alelo de *UBE3A* heredado por vía materna provoca el síndrome de Angelman (AS). En el AS, el alelo paterno es funcional pero epigenéticamente silenciado. Si no se silencia en pacientes con AS, el alelo paterno de *UBE3A* podría ser una fuente de *UBE3A* funcional en neuronas. La unidad de transcripción policistrónica (en lo sucesivo denominada como la PTU) que codifica *UBE3A-AS* tiene aproximadamente 450,000 pares de bases de largo. La transcripción de la PTU comienza en los exones aguas arriba (exones U) en el locus *SNURF-SNRPN* y se detiene hacia el extremo 5′ de *UBE3A*. El PTU se organiza (5′-3′) de la siguiente manera: *SNURF-SNRPN*, *SNORD107*, *SNORD64*, *SNORD109A*, *SNORD116* (29 copias), *IPW*, *SNORD115* (48 copias),

*SNORD109B*y *UBE3A*, que se orienta en la dirección opuesta de los transcritos aguas arriba. El transcrito policistrónico se empalma alternativamente y se somete a un procesamiento 3′ alternativo. *SNURF-SNRPN* codifica dos polipéptidos. Los SNORD están en los intrones de un transcrito de gen huésped (*SNHG14*) y se generan por desramificación exonucleolítica de los intrones empalmados. *UBE3A-AS* representa el extremo 3' del transcrito que se superpone al gen *UBE3A*. La mayoría de los ARNpn de caja C/D juegan un papel en la biogénesis de ribosomas donde dirigen la 2'-O-metilación de los ARN ribosómicos (ARNr); sin embargo, los ARNpn ubicados en la región de PWS/AS carecen de cualquier complementariedad de secuencia con los ARNr conocidos; sin embargo, se ha descubierto que el ARNpn *SNORD115* cambia el corte y empalme alternativo del pre-ARNm del receptor de serotonina 2C.

En la presente descripción se describe evidencia de que el extremo 5' del transcrito *UBE3A-AS* es importante para su estabilidad. Como se describe en la presente descripción, los ASO que se dirigen al extremo 5' de *UBE3A-AS* son capaces de reducir los niveles de*UBE3A-AS*, presumiblemente al detener la transcripción de *UBE3A-AS* y activar el alelo paterno de *UBE3A*.

El término “oligonucleótido”, como se usa en la presente, se define como generalmente lo entiende el experto como una molécula que comprende dos o más nucleósidos unidos covalentemente. Dichos nucleósidos unidos covalentemente también pueden denominarse como moléculas de ácido nucleico u oligómeros. Los oligonucleótidos se fabrican comúnmente en el laboratorio mediante síntesis química en fase sólida seguida de purificación. Cuando se hace referencia a una secuencia del oligonucleótido, se hace referencia a la secuencia u orden de los restos de nucleobase, o modificaciones de estos, de los nucleótidos o nucleósidos unidos covalentemente. El oligonucleótido descrito en la presente descripción se fabrica por el hombre, por ejemplo, se sintetiza químicamente. El oligonucleótido descrito en la presente descripción puede comprender, además, uno o más nucleósidos o nucleótidos modificados.

El término “oligonucleótido antisentido”, como se usa en la presente, se define como oligonucleótidos capaces de modular la expresión de un gen objetivo al hibridar con un ácido nucleico objetivo, en particular con una secuencia contigua en un ácido nucleico objetivo. En algunas modalidades, los oligonucleótidos antisentido descritos en la presente descripción son monocatenarios.

El término “secuencia de nucleótidos contigua” se refiere a la región del oligonucleótido que es complementaria al ácido nucleico objetivo. El término se usa indistintamente en la presente descripción con el término “secuencia de nucleobases contigua” y el término “secuencia de motivos

de oligonucleótidos". En algunas modalidades, todos los nucleótidos del oligonucleótido se presentan en la secuencia de nucleótidos contigua. En algunas modalidades, el oligonucleótido comprende la secuencia de nucleótidos contigua y puede, opcionalmente, comprender nucleótidos adicionales, por ejemplo, una región enlazadora de nucleótidos que puede usarse para unir un grupo funcional a la secuencia de nucleótidos contigua. La región enlazadora de nucleótidos puede o no ser complementaria al ácido nucleico objetivo.

Los nucleótidos son los bloques de construcción de oligonucleótidos y polinucleótidos, y pueden incluir tanto nucleótidos de origen natural como de origen no natural. En la naturaleza, los nucleótidos, tales como los nucleótidos de ADN y ARN, comprenden un resto de azúcar ribosa, un resto de nucleobase y uno o más grupos fosfato (que está ausente en los nucleósidos). Los nucleósidos y nucleótidos también pueden denominarse indistintamente como "unidades" o "monómeros".

El término "nucleósido modificado" o "modificación de nucleósido", como se usa en la presente, se refiere a nucleósidos modificados en comparación con el nucleósido de ADN o ARN equivalente mediante la introducción de una o más modificaciones del resto de azúcar o el resto de (nucleo)base. En algunas modalidades, el nucleósido modificado comprende un resto de azúcar modificado. El término nucleósido modificado también puede usarse en la presente descripción indistintamente con el término "análogo de nucleósido" o "unidades" modificadas o "monómeros" modificados.

El término "enlace internucleosídico modificado" se define como se entiende generalmente por el experto como enlaces distintos de enlaces fosfodiéster (PO) o enlaces de fosfato natural que acoplan covalentemente dos nucleósidos entre sí. Los nucleótidos con enlace internucleosídico modificado también se denominan "nucleótidos modificados". En algunas modalidades, el enlace internucleosídico modificado aumenta la resistencia a la nucleasa del oligonucleótido en comparación con un enlace fosfodiéster. Para los oligonucleótidos de origen natural, el enlace internucleosídico incluye grupos fosfato que crean un enlace fosfodiéster entre nucleósidos adyacentes. Los enlaces internucleosídicos modificados son particularmente útiles en la estabilización de oligonucleótidos para su uso *in vivo*, y pueden servir para proteger contra la escisión por nucleasa en regiones de nucleósidos de ADN o ARN en el oligonucleótido descrito en la presente descripción, por ejemplo, dentro de la región de separación de un oligonucleótido gapmero, así como también en regiones de nucleósidos modificados.

En algunas modalidades, el oligonucleótido comprende uno o más enlaces internucleosídicos modificados a partir del fosfodiéster natural a un enlace que es, por ejemplo, más resistente al ataque

de nucleasa. La resistencia a la nucleasa puede determinarse al incubar el oligonucleótido en suero sanguíneo o mediante el uso de un ensayo de resistencia a la nucleasa [por ejemplo, fosfodiesterasa de veneno de serpiente (SVPD)], ambos se conocen bien en la técnica. Los enlaces internucleosídicos que son capaces de mejorar la resistencia a la nucleasa de un oligonucleótido se denominan enlaces internucleosídicos resistentes a nucleasa.

En algunas modalidades, al menos el 50 % de los enlaces internucleosídicos en el oligonucleótido, o la secuencia de nucleótidos contigua de este, se modifican, tal como al menos el 60 %, tal como al menos el 70 %, tal como al menos el 80 % o tal como al menos el 90 % de los enlaces internucleosídicos en el oligonucleótido, o la secuencia de nucleótidos contigua de este, se modifican. En algunas modalidades, todos los enlaces internucleosídicos del oligonucleótido, o la secuencia contigua de nucleótidos de este, se modifican.

Se reconocerá que, en algunas modalidades, los enlaces internucleosídicos que unen el oligonucleótido a un grupo funcional no nucleótido, tal como un conjugado, pueden ser fosfodiéster. En algunas modalidades, se modifican los enlaces internucleosídicos que unen el oligonucleótido a un grupo funcional no nucleótido.

En algunas modalidades, todos los enlaces internucleosídicos del oligonucleótido, o la secuencia contigua de nucleótidos de este, son enlaces internucleosídicos resistentes a nucleasa.

Los enlaces internucleosídicos modificados pueden, por ejemplo, seleccionarse del grupo que comprende fosforotioato, difosforotioato y boranofosfato. En algunas modalidades, los enlaces internucleosídicos modificados son compatibles con el reclutamiento de ARNasa H del oligonucleótido descrito en la presente descripción, por ejemplo, fosforotioato, difosforotioato o boranofosfato.

En algunas modalidades, el enlace internucleosídico comprende azufre (S), tal como un enlace internucleosídico fosforotioato.

Un enlace internucleosídico fosforotioato es particularmente útil debido a la resistencia a la nucleasa, la farmacocinética beneficiosa y la facilidad de fabricación. En modalidades preferidas, al menos el 50 % de los enlaces internucleosídicos en el oligonucleótido, o la secuencia contigua de nucleótidos de este, son fosforotioato, tal como al menos el 60 %, tal como al menos el 70 %, tal como al menos el 80 %, o tal como al menos el 90 % de los enlaces internucleosídicos en el oligonucleótido, o la secuencia contigua de nucleótidos de este, son fosforotioato. En algunas modalidades, todos los enlaces internucleosídicos del oligonucleótido, o la secuencia contigua de nucleótidos de este, son fosforotioato.

En algunas modalidades, el oligonucleótido comprende uno o más enlaces internucleosídicos neutros, particularmente un enlace internucleosídico seleccionado entre fosfotriéster, metilfosfonato, MMI, amida-3, formacetal o tioformacetal. Se describen enlaces internucleosídicos adicionales en el documento WO2009/124238 (incorporado en la presente descripción como referencia). En una modalidad, el enlace internucleosídico se selecciona a partir de los enlazadores descritos en el documento WO2007/031091 (incorporado en la presente descripción como referencia).

Los enlaces resistentes a la nucleasa, tales como los enlaces fosforotioato, son particularmente útiles en regiones de oligonucleótidos capaces de reclutar nucleasa cuando se forma un dúplex con el ácido nucleico objetivo, tal como la región G para los gapmeros, o la región de nucleósidos no modificados de los headmeros y tailmeros. Sin embargo, los enlaces fosforotioato también pueden ser útiles en regiones que no reclutan nucleasas y/o regiones que mejoran la afinidad, tales como las regiones F y F' para gapmeros, o la región de nucleósidos modificada de headmeros y tailmeros.

Sin embargo, cada una de las regiones designadas puede comprender enlaces internucleosídicos distintos de fosforotioato, tales como enlaces fosfodiéster, en particular en regiones donde los nucleósidos modificados, tal como LNA, protegen el enlace contra la degradación por la nucleasa. La inclusión de enlaces fosfodiéster, tal como uno o dos enlaces, particularmente entre o adyacentes a unidades de nucleósidos modificados (típicamente en las regiones que no reclutan nucleasas) puede modificar la biodisponibilidad y/o biodistribución de un oligonucleótido. El documento WO2008/113832 se incorpora en la presente descripción como referencia para la enseñanza de oligonucleótidos que tienen enlaces fosfodiéster.

En algunas modalidades, todos los enlaces internucleosídicos en el oligonucleótido son enlaces fosforotioato y/o boranofosfato. En algunas modalidades, todos los enlaces internucleosídicos en el oligonucleótido son enlaces fosforotioato.

El término nucleobase incluye el resto purina (por ejemplo, adenina y guanina) y pirimidina (por ejemplo, uracilo, timina y citosina) presentes en nucleósidos y nucleótidos que forman enlaces de hidrógeno en la hibridación de ácidos nucleicos. El término nucleobase abarca, además, nucleobases modificadas que pueden diferir de las nucleobases de origen natural pero que son funcionales durante la hibridación de ácido nucleico. En este contexto, “nucleobase” se refiere tanto a nucleobases de origen natural, tales como adenina, guanina, citosina, timidina, uracilo, xantina e hipoxantina, así como también a variantes que no son de origen natural.

En algunas modalidades, el resto nucleobase se modifica al cambiar la purina o pirimidina en una purina o pirimidina modificada, tal como purina sustituida o pirimidina sustituida, tal como una

nucleobase seleccionada de isocitosina, pseudoisocitosina, 5-metil-citosina, 5-tiozolo-citosina, 5-propinil-citosina, 5-propinil-uracilo, 5-bromouracilo, 5-tiazolo-uracilo, 2-tio-uracilo, 2′tio-timina, inosina, diaminopurina, 6-aminopurina, 2-aminopurina, 2,6-diaminopurina y 2-cloro-6-aminopurina.

Los restos de nucleobase pueden indicarse mediante el código de letra para cada nucleobase correspondiente, por ejemplo, A, T, G, C o U, en donde cada letra puede incluir, opcionalmente, nucleobases modificadas de función equivalente. Por ejemplo, en los oligonucleótidos ejemplificados, los restos de nucleobase se seleccionan de A, T, G, C y 5-metil citosina (5 mC). Además, pueden usarse combinaciones de estas modificaciones. Por ejemplo, pueden usarse nucleósidos LNA 5 mC. Igualmente, puede usarse 2´-hidroximetil (2′-OMe) 5mC.

El término “complementariedad” describe la capacidad para el emparejamiento de bases de Watson-Crick de nucleósidos/nucleótidos. Los pares de bases de Watson-Crick son guanina (G)-citosina (C) y adenina (A)-timina (T)/uracilo (U). Debe entenderse que los oligonucleótidos pueden comprender nucleósidos con nucleobases modificadas, por ejemplo, a menudo se usa 5-metil citosina en lugar de citosina, y como tal el término complementariedad abarca el emparejamiento de bases de Watson Crick entre nucleobases no modificadas y modificadas.

El término “% complementario”, como se usa en la presente, se refiere al número de nucleótidos en por ciento de una secuencia de nucleótidos contigua en una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, oligonucleótido) que, en una posición dada, son complementarios con (es decir, forman pares de bases de Watson Crick con) una secuencia de nucleótidos contigua, en una posición dada de una molécula de ácido nucleico separada (por ejemplo, el ácido nucleico objetivo). El porcentaje se calcula al contar el número de bases alineadas que forman pares entre las dos secuencias, dividir por el número total de nucleótidos en el oligonucleótido y multiplicar por 100. En dicha comparación, una nucleobase/nucleótido que no se alinea (forma un par de bases) se denomina un error de emparejamiento.

El término “que hibrida” o “hibrida”, como se usa en la presente, debe entenderse como dos cadenas de ácido nucleico (por ejemplo, un oligonucleótido y un ácido nucleico objetivo) que forman enlaces de hidrógeno entre pares de bases en cadenas opuestas lo que forma de esta manera un dúplex. La afinidad de la unión entre dos cadenas de ácido nucleico es la fuerza de la hibridación. A menudo se describe en términos de la temperatura de fusión (Tm) definida como la temperatura a la que la mitad de los oligonucleótidos forman un dúplex con el ácido nucleico objetivo. En condiciones fisiológicas, la Tm no es estrictamente proporcional a la afinidad (Mergny y Lacroix, 2003,

Oligonucleotides 13:515-537). La energía libre de Gibbs en estado estándar ΔG° es una representación más precisa de la afinidad de unión y se relaciona con la constante de disociación (Kd) de la reacción por ΔG°=−RTln(Kd), donde R es la constante de gas y T es la temperatura absoluta. Por lo tanto, una ΔG° muy baja de la reacción entre un oligonucleótido y el ácido nucleico objetivo refleja una fuerte hibridación entre el oligonucleótido y el ácido nucleico objetivo. ΔG° es la energía asociada con una reacción en la que las concentraciones acuosas son 1 M, el pH es 7 y la temperatura es 37 °C. La hibridación de oligonucleótidos a un ácido nucleico objetivo es una reacción espontánea y para reacciones espontáneas ΔG° es menor que cero. ΔG° puede medirse experimentalmente, por ejemplo, mediante el uso del método de calorimetría de titulación isotérmica (ITC) como se describe en Hansen y otros, 1965, Chem. Comm. 36-38 y Holdgate y otros, 2005, Drug Discov Today. El experto conocerá que se dispone de equipo comercial para mediciones de la ΔG°. Además, la ΔG° puede estimarse numéricamente mediante el uso del modelo del vecino más cercano como lo describe SantaLucia, 1998, Proc Natl Acad Sci EE.UU. 95: 1460-1465 mediante el uso de parámetros termodinámicos derivados adecuadamente descritos por Sugimoto y otros, 1995, Biochemistry 34:11211-11216 y McTigue y otros, 2004, Biochemistry 43:5388-5405. Para tener la posibilidad de modular su pretendido ácido nucleico objetivo por hibridación, los oligonucleótidos descritos en la presente descripción hibridan con un ácido nucleico objetivo con valores de ΔG° estimados por debajo de −10 kcal para oligonucleótidos que tienen una longitud de 10-30 nucleótidos. En algunas modalidades, el grado o la fuerza de la hibridación se mide por la energía libre de Gibbs en estado estándar ΔG°. Los oligonucleótidos pueden hibridarse con un ácido nucleico objetivo con valores de ΔG° estimados por debajo del intervalo de −10 kcal, tal como por debajo de −15 kcal, tal como por debajo de −20 kcal y tal como por debajo de −25 kcal para oligonucleótidos que tienen una longitud de 8-30 nucleótidos. En algunas modalidades, los oligonucleótidos se hibridan con un ácido nucleico objetivo con un valor de ΔG° estimado de −10 a −60 kcal, tal como −12 a −40, tal como de −15 a −30 kcal o −16 a −27 kcal tal como −18 a −25 kcal.

En algunas modalidades, el oligonucleótido descrito comprende una secuencia de nucleótidos contigua de al menos 8 nucleótidos que es complementaria o se hibrida con una secuencia objetivo presente en la molécula de ácido nucleico objetivo. La secuencia de nucleótidos contigua (y, por lo tanto, la secuencia objetivo) comprende al menos 8 nucleótidos contiguos, tal como 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos contiguos, tal como de 12-25, tal como de 14-18 nucleótidos contiguos.

En algunas modalidades, el oligonucleótido descrito es un ácido nucleico funcional, tal como un ARNip, ARNhp o ARNg de nucleasa, que inhibe, muta o elimina la secuencia de ácido nucleico objetivo.

El término “modulación de la expresión”, como se usa en la presente, debe entenderse como un término global para la capacidad de un oligonucleótido de alterar la cantidad de ARN/proteína UBE3A en comparación con la cantidad de UBE3A antes de la administración del oligonucleótido. Alternativamente, la modulación de la expresión puede determinarse por referencia a un experimento control donde el oligonucleótido descrito no se administra. La modulación efectuada por el oligonucleótido se relaciona con su capacidad para reducir, eliminar, prevenir, aminorar, disminuir o terminar la supresión del transcrito del *UBE3A-AS* paterno, es decir, al dirigirse al extremo 5' de *UBE3A-AS*, que está aguas abajo del ARNpn *SNORD115-45*. La modulación también puede verse como la capacidad del oligonucleótido para restaurar, aumentar o mejorar la expresión del *UBE3A* paterno, por ejemplo, mediante la eliminación o el bloqueo de los mecanismos inhibitorios afectados por *UBE3A-AS*.

El oligonucleótido descrito puede comprender uno o más nucleósidos que tienen un resto de azúcar modificado, es decir, una modificación del resto de azúcar en comparación con el resto de azúcar ribosa que se encuentra en el ADN y el ARN. Se han fabricado numerosos nucleósidos con modificación del resto de azúcar ribosa, principalmente con el objetivo de mejorar ciertas propiedades de los oligonucleótidos, tales como afinidad y/o resistencia a la nucleasa. Dichas modificaciones incluyen aquellas en las que la estructura del anillo de ribosa se modifica, por ejemplo, mediante el reemplazo con un anillo de hexosa (HNA) o un anillo bicíclico, que tiene típicamente un puente birradical entre los carbonos C2 y C4 en el anillo de ribosa (LNA), o un anillo de ribosa no unido que carece típicamente de un enlace entre los carbonos C2 y C3 (por ejemplo, UNA). Otros nucleósidos modificados en el azúcar incluyen, por ejemplo, nucleósidos de biciclohexosa (documento WO2011/017521) o nucleósidos tricíclicos (documento WO2013/154798). Los nucleósidos modificados incluyen, además, nucleósidos donde el resto de azúcar se reemplaza con un resto que no es azúcar, por ejemplo, en el caso de ácidos nucleicos peptídicos (PNA) o ácidos nucleicos morfolinos.

Las modificaciones de azúcar incluyen, además, modificaciones realizadas mediante la alteración de los grupos sustituyentes en el anillo de ribosa a grupos distintos de hidrógeno, o el grupo 2'-OH que se encuentra naturalmente en los nucleósidos de ADN y ARN. Los sustituyentes pueden, por ejemplo, introducirse en las posiciones 2', 3', 4' o 5'. Los nucleósidos con restos de azúcar

modificados también incluyen nucleósidos modificados en 2', tales como nucleósidos sustituidos en 2'. De hecho, se ha prestado mucha atención al desarrollo de nucleósidos sustituidos en 2', y se ha descubierto que numerosos nucleósidos sustituidos en 2' tienen propiedades beneficiosas cuando se incorporan en oligonucleótidos, tales como una mayor resistencia de los nucleósidos y una mayor afinidad.

Un nucleósido con azúcar modificado en 2' es un nucleósido que tiene un sustituyente distinto de H o —OH en la posición 2' (nucleósido sustituido en 2') o comprende un birradical unido en 2' e incluye nucleósidos sustituidos en 2' y nucleósidos LNA (con puente birradical 2'-4'). Por ejemplo, el azúcar modificado en 2' puede proporcionar una afinidad de unión mejorada y/o una mayor resistencia a la nucleasa al oligonucleótido. Ejemplos de nucleósidos modificados sustituidos en 2' son 2'-O-alquil-ARN, 2'-O-metil-ARN (O-Me), 2'-alcoxi-ARN, 2'-O-metoxietil-ARN (MOE), 2′-amino-ADN, 2′-fluoro-ARN y 2′-fluoro-ANA (F-ANA). Para más ejemplos, ver por favor Freier y Altmann; Nucl. Acid Res., 1997, 25, 4429-4443 y Uhlmann; Curr. Opinion in Drug Development, 2000, 3(2), 293-213; y Deleavey y Damha, Química y Biología 2012, 19, 937.

Los nucleósidos de ácido nucleico bloqueado (LNA) son nucleósidos modificados que comprenden un grupo enlazador (denominado como un birradical o un puente) entre el C2' y C4' del anillo de azúcar ribosa de un nucleótido. Estos nucleósidos también se denominan en la literatura ácido nucleico puenteado o ácido nucleico bicíclico (BNA).

La degradación mediada por nucleasa se refiere a un oligonucleótido capaz de mediar la degradación de una secuencia de nucleótidos complementaria cuando forma un dúplex con dicha secuencia.

En algunas modalidades, el oligonucleótido puede funcionar a través de la degradación mediada por nucleasas del ácido nucleico objetivo, donde los oligonucleótidos descritos son capaces de reclutar una nucleasa, particularmente una endonucleasa, preferentemente, una endoribonucleasa (ARNasa), tal como ARNasa H. Ejemplos de diseños de oligonucleótidos que operan a través de mecanismos mediados por nucleasas son oligonucleótidos que comprenden típicamente una región de al menos 5 o 6 nucleósidos de ADN y se flanquean en un lado o en ambos lados por nucleósidos que aumentan la afinidad, por ejemplo, gapmeros, headmeros y tailmeros.

El término “gapmero”, como se usa en la presente, se refiere a un oligonucleótido antisentido que comprende una región de ARNasa H que recluta oligonucleótidos (separación) que se flanquea 5' y 3' por uno o más nucleósidos modificados que aumentan la afinidad (flancos). En la presente descripción se describen diversos diseños de gapmero. Headmeros y tailmeros son oligonucleótidos capaces de reclutar ARNasa H donde falta uno de los flancos, es decir, solo uno de los extremos del

oligonucleótido comprende nucleósidos modificados que mejoran la afinidad. En los headmeros falta el flanco 3' (es decir, el flanco 5' comprende nucleósidos modificados que mejoran la afinidad) y en los tailmeros falta el flanco 5' (es decir, el flanco 3' comprende nucleósidos modificados que mejoran la afinidad).

La conjugación del oligonucleótido descrito con uno o más restos no nucleotido puede mejorar la farmacología del oligonucleótido, por ejemplo, al afectar la actividad, la distribución celular, la captación celular o la estabilidad del oligonucleótido. En algunas modalidades, el resto conjugado modifica o mejora las propiedades farmacocinéticas del oligonucleótido al mejorar la distribución celular, la biodisponibilidad, el metabolismo, la excreción, la permeabilidad y/o la captación celular del oligonucleótido. En particular, el conjugado puede dirigir el oligonucleótido a un órgano, tejido o tipo de célula específico y, de esta manera, mejorar la eficacia del oligonucleótido en ese órgano, tejido o tipo de célula. Al mismo tiempo, el conjugado puede servir para reducir la actividad del oligonucleótido en tipos de células, tejidos u órganos no objetivo, por ejemplo, actividad fuera del objetivo o actividad en tipos de células, tejidos u órganos no objetivo. Los documentos WO 93/07883 y WO 2013/033230 proporcionan restos conjugados adecuados, que se incorporan en la presente como referencia. El documento WO 2012/143379 proporciona un método para administrar un fármaco a través de la barrera hematoencefálica mediante la conjugación a un fragmento de anticuerpo con afinidad al receptor de transferrina, que se incorpora en la presente descripción como referencia.

En algunas modalidades, el resto no nucleótido (resto conjugado) se selecciona del grupo que consiste en carbohidratos, ligandos del receptor de la superficie celular, sustancias farmacológicas, hormonas, sustancias lipófilas, polímeros, proteínas, péptidos, toxinas (por ejemplo, toxinas bacterianas), vitaminas, proteínas virales (por ejemplo, cápsidas) o sus combinaciones. En algunas modalidades, el resto no nucleótido es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, tal como un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que facilita el suministro a través de la barrera hematoencefálica, en particular un anticuerpo o fragmento de anticuerpo dirigido al receptor de transferrina.

El término “sujeto” se refiere a cualquier individuo que es el objetivo de la administración o tratamiento. El sujeto puede ser un vertebrado, por ejemplo, un mamífero. Por lo tanto, el sujeto puede ser un paciente humano o veterinario. El término “paciente” se refiere a un sujeto bajo el tratamiento de un clínico, por ejemplo, un médico.

El término “terapéuticamente eficaz” se refiere a la cantidad de la composición usada que es la cantidad suficiente para mejorar una o más causas o síntomas de una enfermedad o trastorno. Dicha mejora solo requiere una reducción o alteración, no necesariamente una eliminación.

El término “farmacéuticamente aceptable” se refiere a los compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación, que están dentro del alcance del buen juicio médico, adecuados para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin toxicidad excesiva, irritación, respuesta alérgica u otros problemas o complicaciones, proporcional con una relación beneficio/riesgo razonable.

El término “tratamiento” se refiere al manejo médico de un paciente con la intención de curar, mejorar, estabilizar o prevenir una enfermedad, condición patológica o trastorno. Este término incluye el tratamiento activo, es decir, el tratamiento dirigido específicamente a la mejora de una enfermedad, condición patológica o trastorno, y también incluye el tratamiento causal, es decir, el tratamiento dirigido a la eliminación de la causa de la enfermedad, condición patológica o trastorno asociado. Además, este término incluye el tratamiento paliativo, es decir, el tratamiento diseñado para el alivio de los síntomas en lugar de la curación de la enfermedad, condición patológica o trastorno; tratamiento preventivo, es decir, tratamiento dirigido a minimizar o inhibir parcial o completamente el desarrollo de la enfermedad, condición patológica o trastorno asociado; y tratamiento de soporte, es decir, tratamiento empleado para complementar otra terapia específica dirigida hacia la mejora de la enfermedad, condición patológica o trastorno asociado.

El término “inhibir” se refiere a una disminución en una actividad, respuesta, afección, enfermedad u otro parámetro biológico, que los expertos en la técnica apreciarán que puede evaluarse en un punto particular en el tiempo, de manera que en algunas modalidades, la inhibición puede ser o comprender un retraso en la aparición o reducción en la frecuencia. En algunas modalidades, la inhibición puede incluir, pero no se limita a, la ablación completa de la actividad, respuesta, afección o enfermedad. Esto también puede incluir, por ejemplo, una reducción del 10 % en la actividad, respuesta, afección o enfermedad en comparación con el nivel nativo o de control. Por lo tanto, la reducción puede ser un 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 % o cualquier cantidad de reducción entre estas en comparación con los niveles nativos o de control.

Los oligonucleótidos antisentido (ASO) se diseñaron para dirigirse a los exones en el extremo 5' del transcrito del gen huésped de *SNORD115* (AF400500), que abarca los ARNpn *SNORD115-46*, *SNORD115-47*, *SNORD115-48* y *SNORD109B* y se cree que representa el extremo 5' del transcrito antisentido de *UBE3A* (*UBE3A-AS*). En particular, el ácido nucleico objetivo puede ser el extremo

5' de *UBE3A-AS*, que corresponde a las posiciones 25,511,577 a 25,516,681 en el ensamble del genoma humano del cromosoma 15 humano hg19. En algunas modalidades, el ácido nucleico objetivo es uno de los cinco exones ubicados en el extremo 5' de *UBE3A-AS*, que pueden corresponder a las posiciones 25,511,577 a 25,511,761 (exón 1), 25,512,059 a 25,512,191 (exón 2), 25,513,476 a 25,513,600 (exón 3), 25,514,752 a 25,514,880 (exón 4) y 25,516,565 a 25,516,681 (exón 5).

Por lo tanto, en algunas modalidades, el ácido nucleico objetivo es ATGATGATATGGAAGAAAAGCACTCTTTGGCCTGTTGTGACTGGGACAGTTGACAGCACCCAGGTGTCCTTTAATGAAAATGCTCTTGACACCAATGCATCCTAGCATCACAGCTTCAGGAAGCCTTCTCAAGTGTGCATGGGGAGTACTATGTCTTTCATCAATAATGAAATCTTCTGATTTG (Exón 1, SEQ ID NO:1).

En algunas modalidades, el ácido nucleico objetivo es TAAGACATGCTGCCAAGAGATGTGCCATTCTATTATAAAAGATCAGTAGCTTCCTTTACCGACGTGTATATTCTATCTAGAACATTGAGCTATGGAAGACTCCCACCTAAGGGAATTAGTTTTACACCTTCAG (Exón 2, SEQ: NO:2).

En algunas modalidades, el ácido nucleico objetivo es ATAAAGACTGCTGAGAAGAGCACCCTCTGGTGTTGTCACAGAGGCAAGTGCTACCGCACAGGCATGCTGCAGTGAATTTAACTGATCCTCTGTCCCTGCAACCGTTGTTTAAGGATGCTATTCTG (Exón 3, SEQ ID NO:3).

En algunas modalidades, el ácido nucleico objetivo es AAAAGACTGTGGAGGAAGAAAACCCTTTACCCTGTTGTTCAGGGAGAAACTGACACCACTCAACTGCCTGGCACTGAAAATGTGGCATCCAGTCCACTTTACCATCAGTGTTTAAGGAAACCATCTCTG (Exón 4, SEQ ID NO:4).

En algunas modalidades, el ácido nucleico objetivo es ATAAGGATGACTGAGGAAGAGTACTCTTTGGCTTGTTGACACCAGCACAGCTGACACACCCAGATATCTGTTTGGTCTCCTGTGAACTTTCAACCAGGATTTAAGGATGCCACTCTG (Exón 5, SEQ ID NO:5).

En algunas modalidades, el ASO descrito tiene la secuencia de ácido nucleico TAGAGGTGAAGGCCAGGCAC (ASO-1, SEQ ID NO:6).

En algunas modalidades, el ASO tiene la secuencia de ácido nucleico GTACTCTTCCTCAGTCATCC (ASO-2, SEQ ID NO:7).

En algunas modalidades, el ASO descrito tiene la secuencia de ácido nucleico TGTCAGTTTCTCCCTGAACA (ASO-3, SEQ ID NO:8).

En algunas modalidades, el ASO descrito tiene la secuencia de ácido nucleico TAGAATGGCACATCTCTTGG (ASO-4, SEQ ID NO:9).

En algunas modalidades, el ASO descrito tiene la secuencia de ácido nucleico GTTTTCTTCCTCCACAGTCT (ASO-6, SEQ ID NO:10).

En algunas modalidades, el ASO descrito tiene la secuencia de ácido nucleico CTGGTGTCAACAAGCCAAAG (ASO-7, SEQ ID NO:11).

ASO adicionales que pueden dirigirse al exón 1 del extremo 3' de la región SNORD115 se proporcionan más abajo en la Tabla 1. Ejemplos de ASO que pueden dirigirse al exón 2 del extremo 3' del SNORD115 se proporcionan más abajo en la Tabla 2. Ejemplos de ASO que pueden dirigirse al exón 3 del extremo 3' del SNORD115 se proporcionan más abajo en la Tabla 3. Ejemplos de ASO que pueden dirigirse al exón 4 del extremo 3' del SNORD115 se proporcionan más abajo en la Tabla 4. Ejemplos de ASO que pueden dirigirse al exón 5 del extremo 3' del SNORD115 se proporcionan más abajo en la Tabla 5.

Tabla 1. ASO del exón 1	
Secuencia objetivo (5′→3′)	ASO (5′→3′)
GAAAAUGCUCUUGACACC (SEQ ID NO:12)	GGTGTCAAGAGCATTTTC (SEQ ID NO:15)
GAAAAUGCUCUUGACACCA (SEQ ID NO:13)	TGGTGTCAAGAGCATTTTC (SEQ ID NO:16)
GAAAAUGCUCUUGACACCAA (SEQ ID NO:14)	TTGGTGTCAAGAGCATTTTC (SEQ ID NO:17)

Tabla 2. ASO del exón 2	
Secuencia objetivo (5′→3′)	ASO (5′→3′)
CAUGCUGCCAAGAGAUGU (SEQ ID NO:18)	ACATCTCTTGGCAGCATG (SEQ ID NO:67)
CAUGCUGCCAAGAGAUGUG (SEQ ID NO:19)	CACATCTCTTGGCAGCATG (SEQ ID NO:68)
CAUGCUGCCAAGAGAUGUGC (SEQ ID NO:20)	GCACATCTCTTGGCAGCATG (SEQ ID NO:69)
AUGCUGCCAAGAGAUGUG (SEQ ID NO:21)	CACATCTCTTGGCAGCAT (SEQ ID NO:70)
AUGCUGCCAAGAGAUGUGC (SEQ ID NO:22)	GCACATCTCTTGGCAGCAT (SEQ ID NO:71)
AUGCUGCCAAGAGAUGUGCC (SEQ ID NO:23)	GGCACATCTCTTGGCAGCAT (SEQ ID NO:72)
UGCUGCCAAGAGAUGUGCC (SEQ ID NO:24)	GGCACATCTCTTGGCAGCA (SEQ ID NO:73)
UGCUGCCAAGAGAUGUGCCA (SEQ ID NO:25)	TGGCACATCTCTTGGCAGCA (SEQ ID NO:74)
GCUGCCAAGAGAUGUGCCA (SEQ ID NO:26)	TGGCACATCTCTTGGCAGC (SEQ ID NO:75)
GCUGCCAAGAGAUGUGCCAU (SEQ ID NO:27)	ATGGCACATCTCTTGGCAGC (SEQ ID NO:76)
CUGCCAAGAGAUGUGCCA (SEQ ID NO:28)	TGGCACATCTCTTGGCAG (SEQ ID NO:77)
CUGCCAAGAGAUGUGCCAU (SEQ ID NO:29)	ATGGCACATCTCTTGGCAG (SEQ ID NO:78)
CUGCCAAGAGAUGUGCCAUU (SEQ ID NO:30)	AATGGCACATCTCTTGGCAG (SEQ ID NO:79)
UGCCAAGAGAUGUGCCAU (SEQ ID NO:31)	ATGGCACATCTCTTGGCA (SEQ ID NO:80)

CUAUGGAAGACUCCCACCUA (SEQ ID NO:54)	TAGGTGGGAGTCTTCCATAG (SEQ ID NO:103)
UAUGGAAGACUCCCACCUA (SEQ ID NO:55)	TAGGTGGGAGTCTTCCATA (SEQ ID NO:104)
UAUGGAAGACUCCCACCUAA (SEQ ID NO:56)	TTAGGTGGGAGTCTTCCATA (SEQ ID NO:105)
AUGGAAGACUCCCACCUA (SEQ ID NO:57)	TAGGTGGGAGTCTTCCAT (SEQ ID NO:106)
AUGGAAGACUCCCACCUAA (SEQ ID NO:58)	TTAGGTGGGAGTCTTCCAT (SEQ ID NO:107)
UGGAAGACUCCCACCUAA (SEQ ID NO:59)	TTAGGTGGGAGTCTTCCA (SEQ ID NO:108)
GACUCCCACCUAAGGGAAUU (SEQ ID NO:60)	AATTCCCTTAGGTGGGAGTC (SEQ ID NO:109)
ACUCCCACCUAAGGGAAU (SEQ ID NO:61)	ATTCCCTTAGGTGGGAGT (SEQ ID NO:110)
ACUCCCACCUAAGGGAAUU (SEQ ID NO:62)	AATTCCCTTAGGTGGGAGT (SEQ ID NO:111)
ACUCCCACCUAAGGGAAUUA (SEQ ID NO:63)	TAATTCCCTTAGGTGGGAGT (SEQ ID NO:112)
CUCCCACCUAAGGGAAUU (SEQ ID NO:64)	AATTCCCTTAGGTGGGAG (SEQ ID NO:113)
CUCCCACCUAAGGGAAUUA (SEQ ID NO:65)	TAATTCCCTTAGGTGGGAG (SEQ ID NO:114)
UCCCACCUAAGGGAAUUA (SEQ ID NO:66)	TAATTCCCTTAGGTGGGA (SEQ ID NO:115)

Tabla 3. ASO del exón 3	
Secuencia objetivo (5′→3′)	ASO (5′→3′)
GAUAAAGACUGCUGAGAAGA (SEQ ID NO:116)	TCTTCTCAGCAGTCTTTATC (SEQ ID NO:139)
AUAAAGACUGCUGAGAAGAG (SEQ ID NO:117)	CTCTTCTCAGCAGTCTTTAT (SEQ ID NO:140)
UAAAGACUGCUGAGAAGAGC (SEQ ID NO:118)	GCTCTTCTCAGCAGTCTTTA (SEQ ID NO:141)
AAAGACUGCUGAGAAGAGCA (SEQ ID NO:119)	TGCTCTTCTCAGCAGTCTTT (SEQ ID NO:142)
AAGACUGCUGAGAAGAGCAC (SEQ ID NO:120)	GTGCTCTTCTCAGCAGTCTT (SEQ ID NO:143)
AGACUGCUGAGAAGAGCACC (SEQ ID NO:121)	GGTGCTCTTCTCAGCAGTCT (SEQ ID NO:144)
GACUGCUGAGAAGAGCACCC (SEQ ID NO:122)	GGGTGCTCTTCTCAGCAGTC (SEQ ID NO:145)
CAAGUGCUACCGCACAGGCA (SEQ ID NO:123)	TGCCTGTGCGGTAGCACTTG (SEQ ID NO:146)
AAGUGCUACCGCACAGGCAU (SEQ ID NO:124)	ATGCCTGTGCGGTAGCACTT (SEQ ID NO:147)
AGUGCUACCGCACAGGCAUG (SEQ ID NO:125)	CATGCCTGTGCGGTAGCACT (SEQ ID NO:148)
UGCUACCGCACAGGCAUGCU (SEQ ID NO:126)	AGCATGCCTGTGCGGTAGCA (SEQ ID NO:149)
UACCGCACAGGCAUGCUGCA (SEQ ID NO:127)	TGCAGCATGCCTGTGCGGTA (SEQ ID NO:150)
GCACAGGCAUGCUGCAGUGA (SEQ ID NO:128)	TCACTGCAGCATGCCTGTGC (SEQ ID NO:151)
CACAGGCAUGCUGCAGUGAA (SEQ ID NO:129)	TTCACTGCAGCATGCCTGTG (SEQ ID NO:152)
ACAGGCAUGCUGCAGUGAAU (SEQ ID NO:130)	ATTCACTGCAGCATGCCTGT (SEQ ID NO:153)
CAGGCAUGCUGCAGUGAAUU (SEQ ID NO:131)	AATTCACTGCAGCATGCCTG (SEQ ID NO:154)
AGGCAUGCUGCAGUGAAUUU (SEQ ID NO:132)	AAATTCACTGCAGCATGCCT (SEQ ID NO:155)
GGCAUGCUGCAGUGAAUUUA (SEQ ID NO:133)	TAAATTCACTGCAGCATGCC (SEQ ID NO:156)
GCAUGCUGCAGUGAAUUUAA (SEQ ID NO:134)	TTAAATTCACTGCAGCATGC (SEQ ID NO:157)
CAUGCUGCAGUGAAUUUAAC (SEQ ID NO:135)	GTTAAATTCACTGCAGCATG (SEQ ID NO:158)

GCAGUGAAUUUAACUGAUCC (SEQ ID NO:136)	GGATCAGTTAAATTCACTGC (SEQ ID NO:159)
UCCCUGCAACCGUUGUUUAA (SEQ ID NO:137)	TTAAACAACGGTTGCAGGGA (SEQ ID NO:160)
CCCUGCAACCGUUGUUUAAG (SEQ ID NO:138)	CTTAAACAACGGTTGCAGGG (SEQ ID NO:161)

Tabla 4. ASO del exón 4	
Secuencia objetivo (5′→3′)	ASO (5′→3′)
AAAAGACUGUGGAGGAAGA (SEQ ID NO:162)	TCTTCCTCCACAGTCTTTT (SEQ ID NO:237)
AAAAGACUGUGGAGGAAGAA (SEQ ID NO:163)	TTCTTCCTCCACAGTCTTTT (SEQ ID NO:238)
AAAGACUGUGGAGGAAGAA (SEQ ID NO:164)	TTCTTCCTCCACAGTCTTT (SEQ ID NO:239)
AAAGACUGUGGAGGAAGAAA (SEQ ID NO:165)	TTTCTTCCTCCACAGTCTTT (SEQ ID NO:240)
AAGACUGUGGAGGAAGAAAA (SEQ ID NO:166)	TTTTCTTCCTCCACAGTCTT (SEQ ID NO:241)
AGACUGUGGAGGAAGAAAAC (SEQ ID NO:167)	GTTTTCTTCCTCCACAGTCT (SEQ ID NO:242)
ACUGUGGAGGAAGAAAAC (SEQ ID NO:168)	GTTTTCTTCCTCCACAGT (SEQ ID NO:243)
ACUGUGGAGGAAGAAAACC (SEQ ID NO:169)	GGTTTTCTTCCTCCACAGT (SEQ ID NO:244)
ACUGUGGAGGAAGAAAACCC (SEQ ID NO:170)	GGGTTTTCTTCCTCCACAGT (SEQ ID NO:245)
CUGUGGAGGAAGAAAACC (SEQ ID NO:171)	GGTTTTCTTCCTCCACAG (SEQ ID NO:246)
CUGUGGAGGAAGAAAACCC (SEQ ID NO:172)	GGGTTTTCTTCCTCCACAG (SEQ ID NO:247)
AAAACCCUUUACCCUGUUG (SEQ ID NO:173)	CAACAGGGTAAAGGGTTTT (SEQ ID NO:248)
AAAACCCUUUACCCUGUUGU (SEQ ID NO:174)	ACAACAGGGTAAAGGGTTTT (SEQ ID NO:249)
AAACCCUUUACCCUGUUGUU (SEQ ID NO:175)	AACAACAGGGTAAAGGGTTT (SEQ ID NO:250)
UUGUUCAGGGAGAAACUG (SEQ ID NO:176)	CAGTTTCTCCCTGAACAA (SEQ ID NO:251)
UUGUUCAGGGAGAAACUGAC (SEQ ID NO:177)	GTCAGTTTCTCCCTGAACAA (SEQ ID NO:252)

UGUUCAGGGAGAAACUGA (SEQ ID NO:178)	TCAGTTTCTCCCTGAACA (SEQ ID NO:253)
UGUUCAGGGAGAAACUGAC (SEQ ID NO:179)	GTCAGTTTCTCCCTGAACA (SEQ ID NO:254)
UGUUCAGGGAGAAACUGACA (SEQ ID NO:180)	TGTCAGTTTCTCCCTGAACA (SEQ ID NO:255)
GUUCAGGGAGAAACUGACA (SEQ ID NO:181)	TGTCAGTTTCTCCCTGAAC (SEQ ID NO:256)
UCAGGGAGAAACUGACACCA (SEQ ID NO:182)	TGGTGTCAGTTTCTCCCTGA (SEQ ID NO:257)
CAGGGAGAAACUGACACCA (SEQ ID NO:183)	TGGTGTCAGTTTCTCCCTG (SEQ ID NO:258)
AGGGAGAAACUGACACCA (SEQ ID NO:184)	TGGTGTCAGTTTCTCCCT (SEQ ID NO:259)
AGGGAGAAACUGACACCAC (SEQ ID NO:185)	GTGGTGTCAGTTTCTCCCT (SEQ ID NO:260)
AGGGAGAAACUGACACCACU (SEQ ID NO:186)	AGTGGTGTCAGTTTCTCCCT (SEQ ID NO:261)
GGGAGAAACUGACACCAC (SEQ ID NO:187)	GTGGTGTCAGTTTCTCCC (SEQ ID NO:262)
GGGAGAAACUGACACCACU (SEQ ID NO:188)	AGTGGTGTCAGTTTCTCCC (SEQ ID NO:263)
GGGAGAAACUGACACCACUC (SEQ ID NO:189)	GAGTGGTGTCAGTTTCTCCC (SEQ ID NO:264)
GGAGAAACUGACACCACU (SEQ ID NO:190)	AGTGGTGTCAGTTTCTCC (SEQ ID NO:265)
GGAGAAACUGACACCACUC (SEQ ID NO:191)	GAGTGGTGTCAGTTTCTCC (SEQ ID NO:266)
GGAGAAACUGACACCACUCA (SEQ ID NO:192)	TGAGTGGTGTCAGTTTCTCC (SEQ ID NO:267)
GAGAAACUGACACCACUC (SEQ ID NO:193)	GAGTGGTGTCAGTTTCTC (SEQ ID NO:268)
GAGAAACUGACACCACUCA (SEQ ID NO:194)	TGAGTGGTGTCAGTTTCTC (SEQ ID NO:269)
GAGAAACUGACACCACUCAA (SEQ ID NO:195)	TTGAGTGGTGTCAGTTTCTC (SEQ ID NO:270)
AGAAACUGACACCACUCA (SEQ ID NO:196)	TGAGTGGTGTCAGTTTCT (SEQ ID NO:271)
AGAAACUGACACCACUCAA (SEQ ID NO:197)	TTGAGTGGTGTCAGTTTCT (SEQ ID NO:272)
AGAAACUGACACCACUCAAC (SEQ ID NO:198)	GTTGAGTGGTGTCAGTTTCT (SEQ ID NO:273)
GAAACUGACACCACUCAA (SEQ ID NO:199)	TTGAGTGGTGTCAGTTTC (SEQ ID NO:274)

GAAACUGACACCACUCAAC (SEQ ID NO:200)	GTTGAGTGGTGTCAGTTTC (SEQ ID NO:275)
GAAACUGACACCACUCAACU (SEQ ID NO:201)	AGTTGAGTGGTGTCAGTTTC (SEQ ID NO:276)
AAACUGACACCACUCAAC (SEQ ID NO:202)	GTTGAGTGGTGTCAGTTT (SEQ ID NO:277)
AAACUGACACCACUCAACU (SEQ ID NO:203)	AGTTGAGTGGTGTCAGTTT (SEQ ID NO:278)
AAACUGACACCACUCAACUG (SEQ ID NO:204)	CAGTTGAGTGGTGTCAGTTT (SEQ ID NO:279)
AACUGACACCACUCAACU (SEQ ID NO:205)	AGTTGAGTGGTGTCAGTT (SEQ ID NO:280)
AACUGACACCACUCAACUG (SEQ ID NO:206)	CAGTTGAGTGGTGTCAGTT (SEQ ID NO:281)
AACUGACACCACUCAACUGC (SEQ ID NO:207)	GCAGTTGAGTGGTGTCAGTT (SEQ ID NO:282)
ACUGACACCACUCAACUG (SEQ ID NO:208)	CAGTTGAGTGGTGTCAGT (SEQ ID NO:283)
ACUGACACCACUCAACUGC (SEQ ID NO:209)	GCAGTTGAGTGGTGTCAGT (SEQ ID NO:284)
ACUGACACCACUCAACUGCC (SEQ ID NO:210)	GGCAGTTGAGTGGTGTCAGT (SEQ ID NO:285)
CUGACACCACUCAACUGC (SEQ ID NO:211)	GCAGTTGAGTGGTGTCAG (SEQ ID NO:286)
CUGACACCACUCAACUGCC (SEQ ID NO:212)	GGCAGTTGAGTGGTGTCAG (SEQ ID NO:287)
CUGACACCACUCAACUGCCU (SEQ ID NO:213)	AGGCAGTTGAGTGGTGTCAG (SEQ ID NO:288)
UGACACCACUCAACUGCC (SEQ ID NO:214)	GGCAGTTGAGTGGTGTCA (SEQ ID NO:289)
UGACACCACUCAACUGCCU (SEQ ID NO:215)	AGGCAGTTGAGTGGTGTCA (SEQ ID NO:290)
UGACACCACUCAACUGCCUG (SEQ ID NO:216)	CAGGCAGTTGAGTGGTGTCA (SEQ ID NO:291)
GACACCACUCAACUGCCU (SEQ ID NO:217)	AGGCAGTTGAGTGGTGTC (SEQ ID NO:292)
GACACCACUCAACUGCCUG (SEQ ID NO:218)	CAGGCAGTTGAGTGGTGTC (SEQ ID NO:293)
GACACCACUCAACUGCCUGG (SEQ ID NO:219)	CCAGGCAGTTGAGTGGTGTC (SEQ ID NO:294)
ACACCACUCAACUGCCUG (SEQ ID NO:220)	CAGGCAGTTGAGTGGTGT (SEQ ID NO:295)
ACACCACUCAACUGCCUGG (SEQ ID NO:221)	CCAGGCAGTTGAGTGGTGT (SEQ ID NO:296)

ACACCACUCAACUGCCUGGC (SEQ ID NO:222)	GCCAGGCAGTTGAGTGGTGT (SEQ ID NO:297)
CACCACUCAACUGCCUGGCA (SEQ ID NO:223)	TGCCAGGCAGTTGAGTGGTG (SEQ ID NO:298)
GAAAAUGUGGCAUCCAGU (SEQ ID NO:224)	ACTGGATGCCACATTTTC (SEQ ID NO:299)
AAAAUGUGGCAUCCAGUC (SEQ ID NO:225)	GACTGGATGCCACATTTT (SEQ ID NO:300)
GCAUCCAGUCCACUUUACCA (SEQ ID NO:226)	TGGTAAAGTGGACTGGATGC (SEQ ID NO:301)
CAUCCAGUCCACUUUACC (SEQ ID NO:227)	GGTAAAGTGGACTGGATG (SEQ ID NO:302)
CAUCCAGUCCACUUUACCA (SEQ ID NO:228)	TGGTAAAGTGGACTGGATG (SEQ ID NO:303)
CAUCCAGUCCACUUUACCAU (SEQ ID NO:229)	ATGGTAAAGTGGACTGGATG (SEQ ID NO:304)
AUCCAGUCCACUUUACCA (SEQ ID NO:230)	TGGTAAAGTGGACTGGAT (SEQ ID NO:305)
AUCCAGUCCACUUUACCAU (SEQ ID NO:231)	ATGGTAAAGTGGACTGGAT (SEQ ID NO:306)
AUCCAGUCCACUUUACCAUC (SEQ ID NO:232)	GATGGTAAAGTGGACTGGAT (SEQ ID NO:307)
GUUUAAGGAAACCAUCUCUG (SEQ ID NO:233)	CAGAGATGGTTTCCTTAAAC (SEQ ID NO:308)
UUUAAGGAAACCAUCUCUGG (SEQ ID NO:234)	CCAGAGATGGTTTCCTTAAA (SEQ ID NO:309)
UUAAGGAAACCAUCUCUGG (SEQ ID NO:235)	CCAGAGATGGTTTCCTTAA (SEQ ID NO:310)
UAAGGAAACCAUCUCUGG (SEQ ID NO:236)	CCAGAGATGGTTTCCTTA (SEQ ID NO:311)

Tabla 5. ASO del exón 5	
Secuencia objetivo (5′→3′)	ASO (5′→3′)
AUAAGGAUGACUGAGGAAG (SEQ ID NO:312)	CTTCCTCAGTCATCCTTAT (SEQ ID NO:335)
AUAAGGAUGACUGAGGAAGA (SEQ ID NO:313)	TCTTCCTCAGTCATCCTTAT (SEQ ID NO:336)
UAAGGAUGACUGAGGAAG (SEQ ID NO:314)	CTTCCTCAGTCATCCTTA (SEQ ID NO:337)
UAAGGAUGACUGAGGAAGA (SEQ ID NO:315)	TCTTCCTCAGTCATCCTTA (SEQ ID NO:338)
UAAGGAUGACUGAGGAAGAG (SEQ ID NO:316)	CTCTTCCTCAGTCATCCTTA (SEQ ID NO:339)
AAGGAUGACUGAGGAAGA (SEQ ID NO:317)	TCTTCCTCAGTCATCCTT (SEQ ID NO:340)
AAGGAUGACUGAGGAAGAG (SEQ ID NO:318)	CTCTTCCTCAGTCATCCTT (SEQ ID NO:341)
AAGGAUGACUGAGGAAGAGU (SEQ ID NO:319)	ACTCTTCCTCAGTCATCCTT (SEQ ID NO:342)
AGGAUGACUGAGGAAGAG (SEQ ID NO:320)	CTCTTCCTCAGTCATCCT (SEQ ID NO:343)
AGGAUGACUGAGGAAGAGU (SEQ ID NO:321)	ACTCTTCCTCAGTCATCCT (SEQ ID NO:344)
AGGAUGACUGAGGAAGAGUA (SEQ ID NO:322)	TACTCTTCCTCAGTCATCCT (SEQ ID NO:345)
GGAUGACUGAGGAAGAGU (SEQ ID NO:323)	ACTCTTCCTCAGTCATCC (SEQ ID NO:346)
GGAUGACUGAGGAAGAGUA (SEQ ID NO:324)	TACTCTTCCTCAGTCATCC (SEQ ID NO:347)
GGAUGACUGAGGAAGAGUAC (SEQ ID NO:325)	GTACTCTTCCTCAGTCATCC (SEQ ID NO:348)
GAUGACUGAGGAAGAGUA (SEQ ID NO:326)	TACTCTTCCTCAGTCATC (SEQ ID NO:349)
GAUGACUGAGGAAGAGUAC (SEQ ID NO:327)	GTACTCTTCCTCAGTCATC (SEQ ID NO:350)
GAUGACUGAGGAAGAGUACU (SEQ ID NO:328)	AGTACTCTTCCTCAGTCATC (SEQ ID NO:351)
AUGACUGAGGAAGAGUAC (SEQ ID NO:329)	GTACTCTTCCTCAGTCAT (SEQ ID NO:352)
AUGACUGAGGAAGAGUACU (SEQ ID NO:330)	AGTACTCTTCCTCAGTCAT (SEQ ID NO:353)
AUGACUGAGGAAGAGUACUC (SEQ ID NO:331)	GAGTACTCTTCCTCAGTCAT (SEQ ID NO:354)

UGACUGAGGAAGAGUACU (SEQ ID NO:332)	AGTACTCTTCCTCAGTCA (SEQ ID NO:355)
UGACUGAGGAAGAGUACUC (SEQ ID NO:333)	GAGTACTCTTCCTCAGTCA (SEQ ID NO:356)
UGACUGAGGAAGAGUACUCU (SEQ ID NO:334)	AGAGTACTCTTCCTCAGTCA (SEQ ID NO:357)

El oligonucleótido descrito es capaz de modular la expresión del *UBE3A* paterno, en particular la inducción o regulación positiva del UBE3A expresado por vía paterna en células neuronales. La modulación se logra al hibridar con el extremo 5' de *UBE3A-AS*. En ciertas modalidades, el oligonucleótido descrito en la presente descripción se hibrida con una subsecuencia del ácido nucleico objetivo de SEQ ID NO:1 con una ΔG° inferior a −10 kcal, tal como con una ΔG° entre −10 a −60 kcal, tal como −12 a −40, tal como de −15 a −30 kcal o −16 a −27 kcal tal como −18 a −25 kcal.

En algunas modalidades, los oligonucleótidos descritos son capaces de aumentar la expresión de *UBE3A* en al menos un 20 % en comparación con el nivel de expresión de *UBE3A* en una célula neuronal tratada con solución salina o un oligonucleótido no dirigido, con mayor preferencia, al menos 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 80 %, 100 %, 120 %, 150 %, 160 %, 170 %, 180 %, 190 %, 200 %, 210 %, 220 %, 230 %, 240 % o 250 % en comparación con el nivel de expresión de *UBE3A* en una célula neuronal tratada con solución salina o un oligonucleótido no dirigido. En algunas modalidades, los oligonucleótidos descritos son capaces de disminuir el nivel del transcrito de *SNHG14* aguas abajo de *SNORD115-45* en al menos un 20 % en comparación con el nivel del transcrito de *SNHG14* aguas abajo de *SNORD1115-45* en una célula neuronal tratada con solución salina o un oligonucleótido no dirigido, con mayor preferencia, en al menos 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 95 % en comparación con el nivel del transcrito de *SNHG14* aguas abajo de *SNORD115-45* en una célula neuronal tratada con solución salina o un oligonucleótido no dirigido.

La modulación del objetivo por el oligonucleótido descrito se desencadena por hibridación entre una secuencia de nucleótidos contigua del oligonucleótido y el ácido nucleico objetivo. En algunas modalidades, el oligonucleótido descrito comprende errores de emparejamiento entre el oligonucleótido y el ácido nucleico objetivo. A pesar de los errores de emparejamiento, la hibridación con el ácido nucleico objetivo puede ser suficiente para mostrar una modulación deseada de la expresión de UBE3A. La afinidad de unión reducida resultante de los errores de emparejamiento puede compensarse ventajosamente por un mayor número de nucleótidos en el oligonucleótido y/o un mayor número de nucleósidos modificados capaces de aumentar la afinidad de unión al objetivo, tal como los nucleósidos modificados en 2', lo que incluye el LNA, presente dentro de la secuencia de oligonucleótidos.

El oligonucleótido antisentido descrito puede tener una secuencia de nucleótidos contigua de 10 a 30 nucleótidos de longitud con al menos 90 % de complementariedad, tal como al menos 91 %, tal

como al menos 92 %, tal como al menos 93 %, tal como al menos 94 %, tal como al menos el 95 %, tal como al menos el 96 %, tal como al menos el 97 %, tal como al menos el 98 %, o el 100 % de complementariedad con uno de los cinco exones ubicados en el extremo 5' de *UBE3A-AS* descrito en la presente descripción.

El diseño de oligonucleótidos se refiere al patrón de modificaciones de azúcares de nucleósidos en la secuencia de oligonucleótidos. El oligonucleótido antisentido descrito comprende nucleósidos modificados en el azúcar y puede comprender, además, nucleósidos de ADN, ARN o ácido arabinonucleico (ANA). En algunas modalidades, el oligonucleótido comprende nucleósidos modificados en el azúcar y nucleósidos de ADN. En algunas modalidades, el oligonucleótido comprende nucleósidos modificados en el azúcar y nucleósidos de ARN. En algunas modalidades, el oligonucleótido comprende nucleósidos modificados en el azúcar y nucleósidos ANA.

En algunas modalidades, el oligonucleótido comprende al menos 1 nucleósido modificado, tal como al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15 o al menos 16 nucleósidos modificados. En una modalidad, el oligonucleótido comprende de 1 a 10 nucleósidos modificados, tal como de 2 a 9 nucleósidos modificados, tal como de 3 a 8 nucleósidos modificados, tal como de 4 a 7 nucleósidos modificados, tal como 6 o 7 nucleósidos modificados.

En algunas modalidades, el oligonucleótido comprende al menos un enlace internucleosídico modificado. En algunas modalidades, los enlaces internucleosídicos dentro de la secuencia de nucleótidos contigua son enlaces internucleosídicos fosforotioato o boranofosfato.

En algunas modalidades, el oligonucleótido antisentido descrito comprende uno o más nucleósidos modificados en el azúcar, tales como nucleósidos modificados en el azúcar en 2'. Preferentemente, los oligonucleótidos antisentido descritos comprenden uno o más nucleósidos LNA o nucleósido modificado en el azúcar 2' en donde la posición 2' se reemplaza por un sustituyente seleccionado independientemente del grupo que consiste en –F; $–CF_3$, –CN, $–N_3$, –NO, NO_2, –O–(alquilo C_1–C_{10}), –S–(alquilo C_1–C_{10}), –NH–(alquilo C_1-C_{10}) o –N(alquilo C_1-C_{10})$_2$; –O–(alquenilo C_2-C_{10}), –S–(alquenilo C_2-C_{10}), –NH–(alquenilo C_2-C_{10}) o –N(alquenilo C_2-C_{10})$_2$; –O–(alquinilo C_2-C_{10}), –S–(alquinilo C_2-C_{10}), –NH–(alquinilo C_2-C_{10}), –N(alquinilo C_2-C_{10})$_2$, –O—(alquileno C_1-C_{10})–O —(alquilo C_1-C_{10}), –O–(alquileno C_1-C_{10})–NH–(alquilo C_1-C_{10}), –O–(alquileno C_1-C_{10})–NH (alquilo C_1-C_{10})$_2$, –NH–(alquileno C_1-C_{10})–O–(alquilo C_1-C_{10}) y –N(alquilo C_1-C_{10})-(alquileno C_1-C_{10})–O–(alquilo C_1–C_{10}).

En algunas modalidades, los oligonucleótidos descritos comprenden al menos una unidad de LNA, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 unidades de LNA, tal como de 2 a 6 unidades de LNA, tal como de 3 a 7 unidades de LNA, 4 a 8 unidades de LNA o 3, 4, 5, 6 o 7 unidades de LNA. En algunas modalidades, todos los nucleósidos modificados son nucleósidos LNA. En algunas modalidades, LNA comprende un puente birradical 2'-4' de −L−, en donde −L− es $-O-CH_2-$, en donde $-CH_2-$ se sustituye opcionalmente. En algunas modalidades, LNA comprende un puente birradical 2'-4' de −L−, en donde −L− es $-O-CH_2$-. En algunas modalidades, LNA comprende un puente birradical 2'-4' de −L−, en donde −L− es −O−CH(Et)−. En una modalidad adicional, el oligonucleótido puede comprender tanto beta-D-oxi-LNA como una o más de las siguientes unidades de LNA: tio-LNA, amino-LNA, oxi-LNA y/o ENA ya sea en las configuraciones beta-D o alfa-L o sus combinaciones. En una modalidad adicional, todas las unidades de citosina de LNA son 5-metil-citosina. En algunas modalidades, el oligonucleótido o la secuencia de nucleótidos contigua tiene al menos 1 unidad de LNA en el extremo 5' y al menos 2 unidades de LNA en el extremo 3' de la secuencia de nucleótidos. En algunas modalidades, el oligonucleótido descrito es capaz de reclutar ARNasa H. En algunas modalidades, el oligonucleótido tiene un diseño o estructura de gapmero también denominada en la presente descripción simplemente como "gapmero". En una estructura gapmero, el oligonucleótido comprende al menos tres regiones estructurales distintas, un flanco 5', una separación y un flanco 3', F-G-F' en orientación 5′->3′. En este diseño, las regiones flanqueantes F y F' (también denominadas regiones ala) comprenden un tramo contiguo de nucleósidos modificados, que son complementarios al ácido nucleico objetivo de *UBE3A-AS*, mientras que la región de separación, G, comprende un tramo contiguo de nucleótidos que son capaces de reclutar una nucleasa, preferentemente, una endonucleasa tal como ARNasa, por ejemplo, ARNasa H, cuando el oligonucleótido forma un dúplex con el ácido nucleico objetivo. Los nucleósidos que son capaces de reclutar una nucleasa, en particular la ARNasa H, pueden seleccionarse del grupo que consiste en ADN, alfa-L-oxi-LNA, 2'-Fluoro-ANA y UNA. Las regiones F y F', que flanquean los extremos 5' y 3' de la región G, comprenden, preferentemente, nucleósidos que no reclutan nucleasas (nucleósidos con una estructura endo 3'), con mayor preferencia, uno o más nucleósidos modificados que aumentan la afinidad. En algunas modalidades, el flanco 3' comprende al menos un nucleósido LNA, preferentemente, al menos 2 nucleósidos LNA. En algunas modalidades, el flanco 5' comprende al menos un nucleósido LNA. En algunas modalidades, las regiones flanqueantes 5' y 3' comprenden un nucleósido LNA. En algunas modalidades, todos los nucleósidos en las regiones flanqueantes son nucleósidos LNA. En otras modalidades, las regiones flanqueantes pueden comprender tanto

nucleósidos LNA como otros nucleósidos (flancos mixtos), tales como nucleósidos de ADN y/o nucleósidos no modificados con LNA, tales como nucleósidos sustituidos en 2'. En este caso, la separación se define como una secuencia contigua de al menos 5 nucleósidos de reclutamiento de ARNasa H (nucleósidos con una estructura endo 2', preferentemente, ADN) flanqueados en el extremo 5' y 3' por un nucleósido modificado que mejora la afinidad, preferentemente, LNA, tal como beta-D-oxi-LNA. En consecuencia, los nucleósidos de la región flanqueante 5' y la región flanqueante 3' que son adyacentes a la región de separación son nucleósidos modificados, preferentemente, nucleósidos que no reclutan nucleasas. En oligonucleótidos con flancos mixtos donde los flancos comprenden ADN, los nucleósidos 5' y 3' son nucleósidos modificados.

Se conocen métodos para fabricar los oligonucleótidos descritos. En algunos casos, el método usa la química de la fosforamidita (ver, por ejemplo, Caruthers y otros, 1987, Methods in Enzymology vol. 154, páginas 287-313). En una modalidad adicional, el método comprende, además, hacer reaccionar la secuencia de nucleótidos contigua con un resto conjugado (ligando).

En algunas modalidades, se usan metodologías de síntesis de oligonucleótidos que proporcionan control de la estereoquímica en uno o más enlaces internucleosídicos modificados que incluyen uno o más átomos quirales. Ver, por ejemplo, los documentos WO2010/064146, WO2014/012081, WO2015/107425, WO2016/079183, WO2016/079181, WO2016/096938, WO2017/194498 y WO2018/177825, que se incorporan como referencia para estas metodologías.

Los expertos en la técnica apreciarán que los ácidos nucleicos útiles proporcionados por la presente descripción incluyen aquellos que almacenan y/o expresan secuencias de oligonucleótidos descritos en la presente descripción. En algunas modalidades, dichos ácidos nucleicos pueden ser o comprender vectores apropiados para la administración y/o replicación y/o expresión en una célula (por ejemplo, una célula microbiana, por ejemplo, para producción y/o una célula de mamífero, por ejemplo, para tratamiento). Los expertos en la técnica conocen una variedad de tecnologías (por ejemplo, tecnologías de ácido nucleico recombinante tales como, por ejemplo, que usan una o más de amplificación, tal como por reacción en cadena de la polimerasa, escisión, tal como por digestión con restricción, enlace, tal como por unión – ya sea *in vitro* o *in vivo*, por ejemplo, por reparación de separaciones, etcétera).

Se describe, además, una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los oligonucleótidos mencionados anteriormente y/o conjugados de oligonucleótidos y un diluyente, portador, sal y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable. Un diluyente farmacéuticamente aceptable incluye solución salina tamponada con fosfato (PBS) y las sales farmacéuticamente aceptables

incluyen, pero no se limitan a, sales de sodio y potasio. En algunas modalidades, el diluyente es líquido cefalorraquídeo artificial (aCSF).

Los oligonucleótidos descritos pueden mezclarse con sustancias activas o inertes farmacéuticamente aceptables para la preparación de composiciones o formulaciones farmacéuticas. Las composiciones y los métodos para la formulación de composiciones farmacéuticas dependen de una serie de criterios, lo que incluye, pero no se limita a, la vía de administración, el grado de enfermedad o la dosis a administrar.

Los expertos en la técnica conocen una variedad de estrategias de formulación útiles para el almacenamiento y/o administración de productos terapéuticos de ácido nucleico tales como productos terapéuticos de oligonucleótidos. *Ver,* por ejemplo, Pushpendra y otros, "Nucleic Acids as Therapeutics" en *From Nucleic Acid Sequences to Molecular Medicines,* ed. Erdmann y Barciszewski, Springer-Verlag, 2012; Juliano "The Delivery of Therapeutic Oligonucleotides" *Nuc. Acids. Res.* 44:6518, 2016; etcétera.

En algunas modalidades, el oligonucleótido se formula como un profármaco. En particular, con respecto a los conjugados de oligonucleótidos, el resto conjugado puede escindirse del oligonucleótido una vez que el profármaco se suministra al sitio de acción, por ejemplo, la célula objetivo.

Además, se describen métodos para tratar o prevenir una enfermedad, que comprenden administrar una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de un oligonucleótido, un conjugado de oligonucleótidos o una composición farmacéutica descrita en la presente descripción a un sujeto que padece o es susceptible a la enfermedad.

Además, se describe el uso de los oligonucleótidos descritos para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno como se menciona en la presente descripción, o para un método del tratamiento de un trastorno como se menciona en la presente descripción.

Las composiciones farmacéuticas descritas pueden administrarse por administración tópica (tal como, a la piel, inhalación, oftálmica u ótica) o enteral (tal como, oralmente o a través del tracto gastrointestinal) o parenteral (tal como, intravenosa, subcutánea, intramuscular, intracerebral, intracerebroventricular o intratecal). En algunas modalidades, las composiciones farmacéuticas descritas se administran por una vía parenteral lo que incluye inyección o infusión intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular, intratecal o intracraneal, por ejemplo, administración intracerebral o intraventricular. En algunas modalidades, el oligonucleótido se administra mediante inyección intracerebral o intracerebroventricular. En otra modalidad, el

oligonucleótido activo o el conjugado de oligonucleótido se administra por vía intratecal. En algunas modalidades, la composición farmacéutica se administra por inyección en la cisterna magna.

En algunas modalidades, la terapia del AS con las composiciones farmacéuticas descritas en la presente descripción se administra a sujetos que padecen o son susceptibles al AS. En algunas modalidades, se ha determinado que un sujeto tiene características genéticas asociadas con un defecto en un gen *UBE3A* materno. En algunas modalidades, una característica genética asociada al AS es o comprende una deleción materna. En algunas modalidades, una característica genética asociada al AS es o comprende disomía uniparental. En algunas modalidades, una característica genética asociada al AS es o comprende una mutación de *UBE3A*. En algunas modalidades, una característica genética asociada al AS es o comprende un defecto de impronta.

En algunas modalidades, se ha determinado que un sujeto tiene una o más características de antecedentes de desarrollo y/o de hallazgos de laboratorio que se han asociado con el AS tal como, por ejemplo, uno o más de:

(i) antecedentes prenatales y de nacimiento normales con circunferencia normal de la cabeza y ausencia de defectos congénitos importantes;

(ii) dificultades de alimentación como un recién nacido y/o como un lactante;

(iii) retraso en el desarrollo evidente a los 6-12 meses de edad, a veces asociado con hipotonía troncal;

(iv) movimientos inestables de las extremidades y/o aumento de la sonrisa;

(v) progresión del desarrollo retrasada pero progresiva (sin pérdida de habilidades);

(vi) perfiles metabólicos, hematológicos y de laboratorio químico normales;

(vii) cerebro estructuralmente normal cuando se evalúa mediante el uso de RMN o CT (puede tener atrofia cortical leve o desmielinización).

Alternativa o adicionalmente, en algunas modalidades, se ha determinado que un sujeto muestra uno o más elementos clínicos que se asocian consistentemente con el AS tales como, por ejemplo, uno o más de:

(i) retraso del desarrollo, funcionalmente grave

(ii) trastorno del movimiento o el equilibrio, generalmente ataxia de la marcha y/o movimiento trémulo de las extremidades. En algunas modalidades, dicho trastorno del movimiento puede ser leve. En algunas modalidades, dicho trastorno del movimiento puede no aparecer como una ataxia evidente, pero puede ser o implicar, por ejemplo, sacudidas hacia adelante, inestabilidad, torpeza o movimientos rápidos y espasmódicos;

(iii) singularidad del comportamiento: cualquier combinación de risas/sonrisas frecuentes; conducta aparente feliz; personalidad fácilmente excitable, a menudo con movimientos de aleteo de mano o de agitación; comportamiento hipermotriz

(iv) discapacidad del habla, tal como, por ejemplo, ausencia o uso mínimo de palabras; alternativa o adicionalmente, las habilidades de comunicación receptiva y no verbal son mayores que las verbales.

Alternativa o adicionalmente, en algunas modalidades, se ha determinado que un sujeto muestra uno o más elementos clínicos que se asocian frecuentemente (por ejemplo, aproximadamente el 80 % del tiempo) con el AS tales como, por ejemplo, uno o más de:

(i) crecimiento retrasado y desproporcionado en la circunferencia de la cabeza, que resulta generalmente en microcefalia (≤2 S.D. de OFC normal) a la edad de 2 años. En algunas modalidades, la microcefalia es más pronunciada en aquellos con deleciones 15q11.2-q13;

(ii) convulsiones, con inicio generalmente a <3 años de edad. En algunas modalidades, la gravedad de las convulsiones puede disminuir con la edad, pero independientemente, en algunas modalidades, el trastorno convulsivo dura toda la edad adulta.

(iv) EEG anormal, con un patrón característico, como se conoce en la técnica. En algunas modalidades, las anormalidades del EEG pueden producirse en los primeros 2 años de vida y pueden preceder a las características clínicas, y pueden no correlacionarse con eventos de convulsiones clínicas.

Alternativa o adicionalmente, en algunas modalidades, se ha determinado que un sujeto muestra uno o más elementos clínicos que a veces (por ejemplo, aproximadamente el 20-80 % del tiempo) se asocian con el AS tales como, por ejemplo, uno o más de:

(i) occipucio plano

(ii) surco occipital

(iii) lengua sobresaliente

(iv) protrusión lingual; trastornos de la succión/deglución

(v) problemas de alimentación y/o hipotonía troncal durante la infancia

(vi) prognatia

(vii) boca ancha, dientes muy separados

(viii) babeo frecuente

(ix) comportamientos de masticación excesiva/llevar objetos a la boca

(x) estrabismo

(xi) piel hipopigmentada, cabello y color de ojos claros, en algunas modalidades determinadas en comparación con la familia, y vistas típicamente solo en casos de deleción

(xii) reflejos tendinosos profundos de las extremidades inferiores hiperactivas

(xiii) posición del brazo elevada y flexionada, especialmente durante la deambulación

(xiv) marcha con pasos amplios con tobillos en posición pronunciada o posicionados en valgo

(xv) sensibilidad al calor aumentada

(xvi) ciclos anormales de vigilia/sueño y disminución de la necesidad de dormir

(xvii) atracción/fascinación por el agua; fascinación con elementos arrugados tales como ciertos papeles y plásticos

(xviii) comportamientos anormales relacionados con alimentos

(xix) obesidad (en el niño mayor)

(xx) escoliosis

(xxi) estreñimiento

En algunas modalidades, un régimen terapéutico para el tratamiento del AS con un ácido nucleico terapéutico (por ejemplo, un oligonucleótido terapéutico tal como un ASO) como se describe en la presente descripción es o comprende la administración de una o más dosis de una composición farmacéutica que comprende y/o suministra un oligonucleótido como se describe en la presente descripción.

En algunas modalidades, un sujeto al que se administra un régimen terapéutico proporcionado recibe o ha recibido una o más otras terapias para el AS lo que incluye, por ejemplo, uno o más otros productos terapéuticos de ácido nucleico (por ejemplo, uno o más otros oligonucleótidos que se dirigen a *UBE3A-AS*). Ver, por ejemplo, los documentos WO2014004572A3, US9617539B2, US20170362592A1 y EP2864479B1.

En algunas modalidades, un sujeto al que se administra un régimen terapéutico proporcionado ha padecido o padece una o más convulsiones y/o recibe o ha recibido terapia anticonvulsiva. Por ejemplo. En algunas modalidades, un sujeto puede haber recibido o recibe uno o más de ácido valproico, clonazepam, fenobarbital, topiramato, carbamazepina, lamotrigina, leveltiracetam, fenitoína, zonisamida, etosuxaminde, gabapentina, felbatame, oxcarbazepina, tranxene, ACTS, nitrazepam, pregabalina, misolina, vigabatrin, etcétera. En algunas modalidades particulares, un sujeto puede haber recibido o recibir uno o más de ácido valproico, clonazepam, fenobarbital, topiramato, carbamazepina, lamotrigina y/o levetiracetam.

Alternativa o adicionalmente, en algunas modalidades, un sujeto puede haber recibido o recibe terapia dietética tal como, por ejemplo, una dieta cetogénica, terapia de bajo índice glucémico, etcétera.

Aún más alternativa o adicionalmente, en algunas modalidades, un sujeto puede haber recibido o recibir tratamiento con un estimulador del nervio vago.

Como será evidente para los expertos en la técnica que leen la presente descripción, los métodos de tratamiento proporcionados implican administrar uno o ambos de un oligonucleótido como se describe en la presente descripción y una terapia adicional (por ejemplo, un oligonucleótido alternativo y/o terapia antiepiléptica y/o una o más otras intervenciones terapéuticas), de manera que el sujeto reciba terapia combinada (por ejemplo, se exponga simultáneamente a la misma, por ejemplo, a través de una dosificación superpuesta, etcétera). Además, se describe el uso de un oligonucleótido descrito en la presente descripción para la fabricación de un medicamento en donde el medicamento está en una forma de dosificación para la administración intratecal.

Además, se describe el uso de un oligonucleótido descrito en la presente descripción para la fabricación de un medicamento en donde el medicamento está en una forma de dosificación para la administración intracerebral o intraventricular.

Además, se describe el uso de un oligonucleótido descrito en la presente descripción para la fabricación de un medicamento en donde el medicamento está en una forma de dosificación para la administración intracerebroventricular.

En algunas modalidades, el oligonucleótido descrito en la presente descripción es para su uso en un tratamiento combinado con otro agente terapéutico. El agente terapéutico puede ser, por ejemplo, un medicamento anticonvulsivo.

Se ha descrito un número de modalidades de la invención. No obstante, se entiende que pueden realizarse varias modificaciones sin apartarse del espíritu y alcance de la invención. En consecuencia, otras modalidades están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

EJEMPLOS

Ejemplo 1:

<u>Resultados</u>

El análisis de secuenciación de ARN del SNC humano y de ratón identificó una región que se cree que es importante para la estabilidad y/o transcripción de *UBE3A-AS*. Un análisis adicional de la región mostró bajos niveles de conservación de secuencia entre el ratón y el ser humano (Figuras 1A-1D).

En base a estos hallazgos, se diseñaron ASO específicos de ratón para dirigirse a una región específica en el transcrito *Ube3a-AS* (Tabla 6 y Figura 2A). Para probar si los ASO que se dirigen a esta región reactivan la expresión del alelo *Ube3a* paterno, se generaron cultivos neuronales primarios del hipocampo a partir del modelo de ratón indicador Ube3aYFP (Ube3a+/YFP; Figura 2B) y se trataron a los 7 días in vitro (DIV) con un ASO control [ASO-C (10 uM, n = 3)], tres ASO dirigidos a *Ube3a-AS* [ASO-1.1, ASO-1.2, ASO-3.1 (1 μM, 5 μM y 15 μM, n = 3)] y ASO-B (1 μM, 5 μM y 15 μM, n = 3)]. Como un control positivo, las neuronas también se trataron con Topotecán [Topo (300 nM, n = 3)] y un control negativo con vehículo [Veh (1 %, n = 3); Figura 2 C]. Tres días después del tratamiento (10 DIV), se usó obtención de imágenes inmunofluorescentes para cuantificar los niveles de proteína paterna Ube3aYFP en células individuales. En comparación con los controles (ASO-C y Veh), cada tratamiento aumentó sustancialmente los niveles de proteína Ube3aYFP paterna, con niveles similares alcanzados en los tratamientos con ASO-1.1 (15 μM), ASO-3.1 (15 μM) y Topotecán (Figuras 2D y 2E).

A continuación, se diseñaron ASO específicos de humanos para dirigirse a esta región, que incluyeron cuatro ASO dirigidos a regiones no polimórficas en humanos y regiones conservadas (100 %) con macacos (Rhesus y Cynomolgus) (Tabla 7 y Figura 3A). Las células precursoras neurales de células madre pluripotentes inducidas humanas (iPSC) se diferenciaron en neuronas GABAérgicas durante 14 DIV y después se trataron con un ASO control [ASO-C (10 μM, n = 3)], Topotecán [Topo (1 μM, n = 2)] y seis ASO dirigidos a *UBE3A-AS* [ASO-1, ASO-2, ASO-3, ASO-4, ASO-5 y ASO-6 (10 μM, n = 3)]. Adicionalmente, se incluyó un ASO dirigido a una región intrónica aguas abajo de *SNORD109B* (ASO-7). Seis días después del tratamiento (20 DIV), se aisló el ARN de las neuronas y los niveles de ARN de estado estacionario de *UBE3A-AS* y *UBE3A* se estimaron con relación al tratamiento de control (Figura 3B). Con la excepción de ASO-7, cada ASO disminuyó significativamente los niveles de ARN de *UBE3A-AS*, donde ASO-2 y ASO-4 tuvieron el mayor efecto (Tabla 8 y Figura 3C). *Los niveles de ARN de UBE3A* también aumentaron después del tratamiento con cada ASO (Figura 3D).

La potencia de ASO-4 se examinó más a fondo dado su efecto sobre los niveles de ARN de *UBE3A-AS*. Las neuronas derivadas de iPSC GABAérgicas se trataron a los 14 DIV con una curva de 10 puntos ½ log de respuesta a la dosis de ASO-4 y Topotecán, como un control positivo y para comparaciones entre tratamientos [1 nM, 3 nM, 10 nM, 30 nM, 100 nM, 300 nM, 1 μM, 3 μM, 10 μM y 30 μM (ASO-4, n = 6; Topotecán, n = 2)]. A los 20 DIV, los niveles de ARN de estado estacionario de *UBE3A-AS* se midieron y se ajustaron curvas de respuesta a la dosis para estimar la

IC_{50} y $E_{máx}$ (es decir, inhibición de *UBE3A-AS* máxima) (Tabla 9 y Figura 4A). Las curvas de respuesta a la dosis de ASO-4 y Topotecán fueron significativamente diferentes (Prueba de paralelismo: $F_{(3.145)} = 11.2$, $p < 0.0001$), por lo tanto, no se estimaron las potencias relativas. Una prueba de equivalencia indicó que la IC_{50} y $E_{máx}$ de ASO-4 y Topotecán no fueron equivalentes [relación de IC_{50} ASO-4/Topotecán: = 1.2 (límite de confianza inferior = 1.1; límite de confianza superior = 1.3); relación de Emáx = -4.1 (límite de confianza inferior = -12.9; límite de confianza superior = 4.8)].

Los efectos de ASO-4 y Topotecán se examinaron después en los ARN de *SNORD116*, *IPW*, *SNORD115* y *SNORD109A*, que se ubican aguas arriba de la región objetivo ASO-4 (ver la Figura 1A). Con la excepción de *SNORD116*, ASO-4 tuvo un efecto significativo en los niveles de ARN de *IPW*, *SNORD115*y *SNORD109A/B* pero no de una manera dependiente de la dosis. Por el contrario, el Topotecán tuvo un efecto significativo en los niveles de ARN de *SNORD116*, *IPW*, *SNORD115* y *SNORD109A/B* que fueron dependientes de la dosis (Tabla 10 y Figuras 4B-4E). Tanto ASO-4 como Topotecán aumentaron los niveles de ARN totales de *UBE3A* de una manera dependiente de la dosis, a excepción del Topotecán a concentraciones más altas (3 μM, 10 μM y 30 μM; Figura 4F).

La potencia de ASO-4 se examinó más a fondo en las neuronas derivadas de iPSC en un punto temporal posterior en la diferenciación. Las neuronas derivadas de iPSC GABAérgicas se trataron a 59 DIV con un ASO control [ASO-C, 10 μM (n = 3)] y ASO-4 [1 uM, 5 μM y 10 μM (n = 3)], y se midieron los niveles de ARN de estado estacionario de *UBE3A-AS* y *UBE3A* como se describió anteriormente (Figura 4G). A diferencia de las neuronas tratadas con ASO-4 en un punto temporal anterior, los niveles de ARN de *UBE3A* y *UBE3A-AS* se correlacionaron inversamente de manera elevada (Figuras 4H y 4I). Por ejemplo, el efecto de ASO-4 (10 μM) en los niveles de ARN de *UBE3A-AS* fue similar entre las neuronas tratadas a 14 y 59 DIV [20 DIV: *UBE3A-AS*: ↓87 % (intervalos de confianza (CI) del 95 %: 80 a 95 %); 65 DIV: ↓81 % (CI 95 %: 74 a 88 %)], mientras que el efecto de ASO-4 en los niveles de ARN de *UBE3A* fueron sustancialmente mayores en las neuronas tratadas a 59 DIV [20 DIV: ↑30 % (CI 95 %: 16 a 44 %); 65 DIV: ↑86 % (CI 95 %: 59 % a 113 %)].

Se diseñaron a continuación ASO adicionales dirigidos al extremo 5' de *UBE3A-AS* para optimizar las secuencias objetivo de ASO-4 (ASO-4.1, ASO-4.2, ASO-4.3 y ASO-4.4), así como también otras dos regiones objetivo, ASO-3 (ASO-3.1 y ASO-3.2) y ASO-6 (ASO-6.1) (Tabla 11). Adicionalmente, se fabricó ASO-4 en dos proveedores diferentes con fines comparativos (ASO-4.S,

Sigma; ASO-4.I, Integrated DNA Technologies). Las neuronas derivadas de iPSC humanas (GABAérgicas) se trataron a 14 DIV con una curva de 5 puntos ½ log de dosis de ASO-3.1, ASO-3.2, ASO-4.S, ASO-4.I, ASO-4.1, ASO-4.2, ASO-4.3, ASO-4.4 y ASO-6.1 [30 nM, 100 nM, 300 nM, 1 μM (n = 6)]. A los 20 DIV, la IC_{50} y $E_{máx}$ de cada ASO se estimó como se describió anteriormente (Figura 5 A - B y Tabla 12). Las curvas de respuesta a la dosis fueron similares entre los ASO (prueba de paralelismo: $F_{(16.513)} = 1.6$, $p = 0.06$), donde ASO-4 y ASO-6.1 tuvieron la potencia relativa más alta (Tabla 13). No se observaron diferencias significativas entre ASO-4.S y ASO-4.I.

La potencia de ASO-4 y ASO-6.1 se examinó más a fondo en neuronas derivadas de iPSC en un punto temporal posterior en la diferenciación. Las neuronas derivadas de iPSC GABAérgicas se trataron a los 29 DIV con una curva de 10 puntos ½ log de respuesta de dosis de ASO-4 y ASO-6.1 [1 nM, 3 nM, 10 nM, 30 nM, 100 nM, 300 nM, 1 μM, 3 μM, 10 μM y 30 μM (n = 3)]. A los 35 DIV, la IC_{50} y $E_{máx}$ de cada ASO se estimó como se describió anteriormente (Figura 5 C-D y Tabla 14). Las curvas de respuesta a la dosis de ASO-4 y ASO-6.1 no fueron similares (prueba de paralelismo: $F_{(3.172)} = 22.7$, $p < 0.0001$). Una prueba de equivalencia indicó que ASO-4 y ASO-6.1 tenían potencias equivalentes pero diferentes valores de $E_{máx}$ [relación de IC50 ASO-6.1/ASO-4: = 1.03 (límite de confianza inferior = 1.0; límite de confianza superior = 1.1); $E_{máx}$ = -1.3 (límite de confianza inferior = -2.6; límite de confianza superior = -0.08)], donde ASO-6.1 tiene la mayor inhibición de niveles de *UBE3A-AS*. El efecto de ASO-4 y ASO-6.1 en los niveles de ARN de *UBE3A* fueron similares, donde cada tratamiento aumentó los niveles de ARN de manera dependiente de la dosis (Figura 5D). ASO-4 y ASO-6.1 también se examinaron en neuronas derivadas de iPSC glutamatérgicas. Las neuronas derivadas de iPSC glutamatérgicas se trataron a 14 DIV con una curva de 10 puntos ½ log de respuesta de dosis de ASO-4 y ASO-6.1 [1 nM, 3 nM, 10 nM, 30 nM, 100 nM, 300 nM, 1 μM, 3 μM, 10 μM y 30 μM (n = 3)]. A las 20 DIV, la IC_{50} y $E_{máx}$ de cada ASO se estimó como se describió anteriormente (Figura 5E-F y Tabla 15). Las curvas de respuesta a la dosis de ASO-4 y ASO-6.1 fueron similares y no significativamente diferentes (prueba de paralelismo: $F_{(3.165)} = 1.9$, $p = 0.1$), donde ASO-6.1 tiene la potencia relativa más alta (Tabla 16). Como se esperaba, ASO-4 y ASO-6.1 aumentaron los niveles de ARN de *UBE3A* de una manera dependiente de la dosis (Figura 5F); sin embargo, hubo un alto grado de variación para cada concentración que no fue atribuible al tratamiento ($R^2 = 0.17$).

<u>Conclusiones</u>

Hacia el desarrollo de una terapia para el AS, se realizaron experimentos para determinar si los ASO dirigidos a una región específica inhiben *Ube3a-AS*/*UBE3A-AS* y reactivan la expresión del alelo paterno de *Ube3a*/*UBE3A* en neuronas humanas y de ratón. En conjunto, los resultados muestran que los ASO que se dirigen a esta región en las neuronas de ratones y humanos tienen una potente actividad antisentido y una impronta inversa de *Ube3a/UBE3A*.

Dos de los tres ASO (ASO-1.1 y ASO-3.1) dirigidos a *Ube3a-AS* reactivan la expresión del alelo paterno de *Ube3a* en neuronas de ratón a un nivel similar al alcanzado por la concentración óptima de Topotecán (300 nM).

Igualmente, cada uno de los ASO específicos de humanos redujo significativamente los niveles de ARN de estado estacionario de *UBE3A-AS* en neuronas humanas derivadas de iPSC, donde las concentraciones más altas de ASO-4 y ASO-6.1 abolieron casi completamente la expresión de *UBE3A-AS*. Dado que las regiones objetivo de ASO-4 y ASO-6.1 se conservan al 100 % entre humanos y macacos, puede examinarse la eficacia de estos ASO *in vivo* ya sea en macaco Cynomolgus o Rhesus. A diferencia de Topotecán, ASO-4 tiene un pequeño efecto, si lo hay, en los ARN aguas arriba de *SNORD116*, *IPW*, *SNORD115* o *SNORD109A/B*, consistente con la noción de que el ASO interrumpe la transcripción en o aguas abajo de la región objetivo.

Las bajas concentraciones (3 nM) de ASO-4 y ASO-6.1 redujeron significativamente los niveles de ARN de *UBE3A-AS*; sin embargo, se necesitaron concentraciones más altas (≥100 nM) de ASO para aumentar los niveles de ARN de *UBE3A*. Esto puede reflejar un cierto umbral requerido para que *UBE3A-AS* inhiba la transcripción de *UBE3A*, o un retraso entre el momento en que la inactivación de *UBE3A-AS* conduce a la reactivación del *UBE3A* paterno, o la sensibilidad del ensayo usado para cuantificar los niveles de ARN de *UBE3A*.

Colectivamente, los resultados sugieren que los ASO que se dirigen a una región candidata en *UBE3A-AS* eliminan casi por completo la impronta de *UBE3A* en neuronas y revela al menos dos ASO para un futuro desarrollo clínico.

Además, se han diseñado derivados de ASO-4 y ASO-6.1 que comprenden diferentes modificaciones de ARN [2′-hidroximetilo (2′-OMe), 2′-metoxietil 2′-MOE y ácido nucleico bloqueado (LNA)] y cadenas principales [fosforotioato (PS) y fosfodiéster (PO)] (Tabla 17).

Tabla 6. Oligonucleótidos *Ube3a-AS* de ratón

ASO	ARN Modificación	ARN Cadena principal	ADN Cadena principal	Diseño (5′-3′)	Secuencia	SEQ ID
ASO-B	2′-OMe	PS	PS	5-10-5	$C^{O}*C^{O}*A^{O}*G^{O}*C^{O}*c*t*t*g*t*t*g*g*a*t*A^{O}*U^{O}*C^{O}*A^{O}*U^{O}$	SEQ ID NO:358
ASO-1.1	2′-OMe	PS	PS	5-10-5	$C^{O}*C^{O}*A^{O}*C^{O}*A^{O}*t*t*t*c*c*t*c*t*c*a*U^{O}*G^{O}*G^{O}*A^{O}*A^{O}$	SEQ ID NO:359
ASO-1.2	2′-OMe	PS	PS	5-10-5	$G^{O}*A^{O}*G^{O}*U^{O}*G^{O}*t*t*t*g*c*a*a*a*c*c*A^{O}*A^{O}*U^{O}*G^{O}*U^{O}$	SEQ ID NO:360
ASO-3.1	2′-OMe	PS	PS	5-10-5	$U^{O}*G^{O}*U^{O}*U^{O}*U^{O}*c*t*t*t*g*g*t*g*a*t*U^{O}*C^{O}*U^{O}*G^{O}*C^{O}$	SEQ ID NO:361

Letra mayúscula, ARN; letra minúscula, ADN; O, 2′-OMe; PS y *, fosforotioato

Tabla 7. Oligonucleótidos *UBE3A-AS* de humano

ASO	ARN Modificación	ARN Cadena principal	ADN Cadena principal	Diseño (5′-3′)	Secuencia	SEQ ID
ASO-1	2′-OMe	PS	PS	5-10-5	$U^{O}*A^{O}*G^{O}*A^{O}*G^{O}*g*t*g*a*a*g*g*c*c*a*G^{O}*G^{O}*C^{O}*A^{O}*C^{O}$	SEQ ID NO:362
ASO-2	2′-OMe	PS	PS	5-10-5	$G^{O}*U^{O}*A^{O}*C^{O}*U^{O}*c*t*t*c*c*t*c*a*g*t*C^{O}*A^{O}*U^{O}*C^{O}*C^{O}$	SEQ ID NO:363
ASO-3[C]	2′-OMe	PS	PS	5-10-5	$U^{O}*G^{O}*U^{O}*C^{O}*A^{O}*g*t*t*t*c*t*c*c*c*t*G^{O}*A^{O}*A^{O}*C^{O}*A^{O}$	SEQ ID NO:364
ASO-4[C]	2′-OMe	PS	PS	5-10-5	$U^{O}*A^{O}*G^{O}*A^{O}*A^{O}*t*g*g*c*a*c*a*t*c*t*C^{O}*U^{O}*U^{O}*G^{O}*G^{O}$	SEQ ID NO:365
ASO-5[C]	2′-OMe	PS	PS	5-10-5	$G^{O}*U^{O}*U^{O}*U^{O}*U^{O}*c*t*t*c*c*t*c*c*a*c*A^{O}*G^{O}*U^{O}*C^{O}*U^{O}$	SEQ ID NO:366
ASO-6[C]	2′-OMe	PS	PS	5-10-5	$C^{O}*U^{O}*G^{O}*G^{O}*U^{O}*g*t*c*a*a*c*a*a*g*c*C^{O}*A^{O}*A^{O}*A^{O}*G^{O}$	SEQ ID NO:367

Abreviaturas: [C], conservado con macaco y no polimórfico; letra mayúscula, nucleótido de ARN; letra minúscula, nucleótido de ADN; [O], 2′-OMe; PS y *, fosforotioato

Tabla 8. Análisis de ASO humanos en los niveles de ARN de *UBE3A-AS* y *UBE3A*					
UBE3A-AS					
ASO 1	ASO 2	Diferencia	CI inferior	CI superior	P Adj.
ASO-C	ASO-2	0.89	0.82	0.97	<0.0001
ASO-R	ASO-2	0.87	0.80	0.95	<0.0001
ASO-C	ASO-4	0.87	0.80	0.95	<0.0001
ASO-R	ASO-4	0.85	0.78	0.93	<0.0001
ASO-C	ASO-6	0.83	0.75	0.90	<0.0001
ASO-R	ASO-6	0.81	0.74	0.89	<0.0001
ASO-C	ASO-3	0.79	0.71	0.86	<0.0001
ASO-R	ASO-3	0.77	0.70	0.85	<0.0001
ASO-C	ASO-5	0.71	0.63	0.78	<0.0001
ASO-R	ASO-5	0.69	0.62	0.77	<0.0001
ASO-C	Topo	0.66	0.59	0.73	<0.0001
ASO-R	Topo	0.64	0.57	0.72	<0.0001
ASO-C	ASO-1	0.51	0.43	0.58	<0.0001
ASO-R	ASO-1	0.49	0.41	0.56	<0.0001
ASO-1	ASO-2	0.38	0.31	0.46	<0.0001
ASO-1	ASO-4	0.36	0.29	0.44	<0.0001
ASO-1	ASO-6	0.32	0.25	0.40	<0.0001
ASO-1	ASO-3	0.28	0.21	0.36	<0.0001
Topo	ASO-2	0.23	0.16	0.31	<0.0001

Topo	ASO-4	0.21	0.14	0.29	<0.0001
ASO-1	ASO-5	0.20	0.13	0.28	<0.0001
ASO-5	ASO-2	0.18	0.11	0.26	<0.0001
Topo	ASO-6	0.17	0.10	0.24	0.0002
ASO-5	ASO-4	0.16	0.09	0.24	0.0003
ASO-1	Topo	0.15	0.08	0.23	0.0004
Topo	ASO-3	0.13	0.06	0.20	0.0018
ASO-5	ASO-6	0.12	0.04	0.20	0.0035
ASO-3	ASO-2	0.10	0.03	0.18	0.0111
ASO-3	ASO-4	0.08	0.01	0.16	0.0360
ASO-5	ASO-3	0.08	0.00	0.15	0.0381
ASO-6	ASO-2	0.06	-0.01	0.14	0.11
Topo	ASO-5	0.05	-0.02	0.13	0.18
ASO-6	ASO-4	0.04	-0.03	0.12	0.27
ASO-3	ASO-6	0.04	-0.03	0.12	0.28
ASO-4	ASO-2	0.02	-0.06	0.09	0.58
ASO-C	ASO-R	0.02	-0.06	0.09	0.64
UBE3A					
ASO 1	ASO 2	Diferencia	CI inferior	CI superior	P Adj.
ASO-4	ASO-C	0.30	0.16	0.44	0.0004
ASO-4	ASO-R	0.29	0.14	0.45	0.001
ASO-2	ASO-C	0.21	0.09	0.34	0.002

ASO-2	ASO-R	0.21	0.07	0.35	0.006
ASO-1	ASO-C	0.18	0.06	0.31	0.007
Topo	ASO-C	0.18	0.04	0.32	0.01
ASO-1	ASO-R	0.18	0.04	0.32	0.02
Topo	ASO-R	0.18	0.03	0.33	0.02
ASO-4	ASO-3	0.17	0.03	0.31	0.02
ASO-5	ASO-C	0.16	0.04	0.29	0.01
ASO-6	ASO-C	0.16	0.04	0.29	0.01
ASO-5	ASO-R	0.16	0.02	0.30	0.03
ASO-6	ASO-R	0.16	0.02	0.30	0.03
ASO-4	ASO-6	0.13	-0.007	0.27	0.06
ASO-4	ASO-5	0.13	-0.007	0.27	0.06
ASO-3	ASO-C	0.13	0.00	0.26	0.04
ASO-3	ASO-R	0.13	-0.015	0.27	0.08
ASO-4	Topo	0.11	-0.04	0.27	0.1
ASO-4	ASO-1	0.11	-0.03	0.25	0.1
ASO-2	ASO-3	0.08	-0.04	0.21	0.2
ASO-4	ASO-2	0.08	-0.06	0.22	0.2
ASO-1	ASO-3	0.05	-0.07	0.18	0.4
Topo	ASO-3	0.05	-0.09	0.19	0.4
ASO-2	ASO-6	0.05	-0.08	0.18	0.4
ASO-2	ASO-5	0.05	-0.08	0.17	0.4

ASO-5	ASO-3	0.03	-0.09	0.16	0.6
ASO-6	ASO-3	0.03	-0.09	0.16	0.6
ASO-2	Topo	0.03	-0.1	0.17	0.7
ASO-2	ASO-1	0.03	-0.01	0.16	0.6
ASO-1	ASO-6	0.02	-0.1	0.15	0.7
Topo	ASO-6	0.02	-0.1	0.16	0.8
ASO-1	ASO-5	0.02	-0.1	0.15	0.7
Topo	ASO-5	0.02	-0.1	0.16	0.8
ASO-R	ASO-C	0.00	-0.1	0.14	0.9
ASO-5	ASO-6	0.00	-0.1	0.13	0.9
ASO-1	Topo	0.00	-0.1	0.14	1.00

Abreviaturas: ASO-C, ASO-control; Topo, Topotecán; Adj., Ajustado; CI, intervalo de confianza del 95 %

Tabla 9. IC50 y Emáx de ASO-4 y Topotecán

Tratamiento	IC50 Estimada (M)	IC50 CI 95 % (M)		Emáx Estimada	Emáx CI 95 %		30 µM (media)
ASO-4	6.13E-07	3.47E-07	1.08E-06	-0.06	-0.23	0.10	0.09
Topo	3.37E-08	1.85E-08	6.14E-08	0.26	0.20	0.32	0.21

Estimaciones de parámetros del modelo completo a partir del modelo de regresión logística de 4 parámetros (Hill). La IC50 y los intervalos de confianza representan la concentración molar. La Emáx y los valores de 30 uM representan los niveles de ARN de UBE3A-AS normalizados con relación al vehículo.

Tabla 10. Análisis de ASO-4 y Topotecán en los niveles de *ARN* de *UBE3A*, *SNORD116*, *SNORD115, SNORD109A/B* e IPW

Tratamiento	ARN	DF	DFDen	Relación F	FDR
ASO-4	UBE3A	9	108	16.5	< 0.0001
	SNORD109A/B	9	104.9	2.6	0.01
	SNORD115	9	108	4.0	0.0002
	SNORD116	9	108	1.74	0.09
	IPW	9	108	4.1	0.0002
Topotecán	UBE3A	9	29	5.6	0.0002
	SNORD109A/B	9	29	28.2	< 0.0001
	SNORD115	9	29	4.60	0.001
	SNORD116	9	29	7.12	< 0.0001
	IPW	9	29	49.8	< 0.0001

Regresión lineal de mínimos cuadrados. Abreviaturas: DF, grados de libertad; DFDen, densidad de grados de libertad

Tabla 11. Oligonucleótidos antisentido *UBE3A-AS* humanos optimizados

ASO	ARN Modificación	ARN Cadena principal	ADN Cadena principal	Diseño (5′-3′)	Secuencia	SEQ ID
ASO-3.1^{C}	2′-OMe	PS	PS	4-10-5	$G^{O}*U^{O}*U^{O}*G^{O}*a*g*t*g*g*t*g*t*c*a*G^{O}*U^{O}*U^{O}*U^{O}*C^{O}$	SEQ ID NO:368
ASO-3.2^{C}	2′-OMe	PS	PS	4-10-4	$U^{O}*U^{O}*G^{O}*A^{O}*g*t*g*g*t*g*t*c*a*g*U^{O}*U^{O}*U^{O}*C^{O}$	SEQ ID NO:369
ASO-6.1^{C}	2′-OMe	PS	PS	4-10-4	$C^{O}*U^{O}*G^{O}*G^{O}*t*g*t*c*a*a*c*a*a*g*C^{O}*C^{O}*A^{O}*A^{O}$	SEQ ID NO:370
ASO-4.1^{C}	2′-OMe	PS	PS	5-10-5	$A^{O}*U^{O}*A^{O}*G^{O}*A^{O}*a*t*g*g*c*a*c*a*t*c*U^{O}*C^{O}*U^{O}*U^{O}*G^{O}$	SEQ ID NO:371

ASO-4.2[C]	2′-OMe	PS	PS	4-10-5	$A^{O}*G^{O}*A^{O}*A^{O}*t*g*g*c*a*c*a*t*c*t*C^{O}*U^{O}*U^{O}*G^{O}*G^{O}$	SEQ ID NO:372
ASO-4.3[C]	2′-OMe	PS	PS	4-10-5	$U^{O}*A^{O}*G^{O}*A^{O}*a*t*g*g*c*a*c*a*t*c*U^{O}*C^{O}*U^{O}*U^{O}*G^{O}$	SEQ ID NO:373
ASO-4.4[C]	2′-OMe	PS	PS	4-10-4	$A^{O}*G^{O}*A^{O}*A^{O}*t*g*g*c*a*c*a*t*c*t*C^{O}*U^{O}*U^{O}*G^{O}$	SEQ ID NO:374

[C], conservado con macaco y no polimórfico; letra mayúscula, nucleótido de ARN; letra minúscula, nucleótido de ADN; O, 2′-OMe; PS y *, fosforotioato

Tabla 12. IC_{50} y $E_{máx}$ de secuencias objetivo de ASO optimizados

Grupo	IC_{50} Estimada	IC_{50} CI 95 % (M)		3 µM (media)
6.1	5.20E-07	3.33E-07	8.11E-07	0.23
4.0	1.06E-06	9.31E-07	1.21E-06	0.29
4.2	1.08E-06	8.62E-07	1.35E-06	0.31
3.2	1.88E-06	1.39E-06	2.56E-06	0.44
4.3	2.03E-06	1.67E-06	2.47E-06	0.40
4.4	2.11E-06	1.73E-06	2.59E-06	0.44
4.1	2.27E-06	1.92E-06	2.68E-06	0.42
3.1	2.98E-06	2.45E-06	3.62E-06	0.51

Estimaciones de parámetros del modelo completo a partir del modelo de regresión logística de 3 parámetros. La IC_{50} y los intervalos de confianza representan la concentración molar. Los valores de $E_{máx}$ (3 uM) representan los niveles de ARN de *UBE3A-AS* normalizados con relación al vehículo.

Tabla 13. Potencia relativa de los ASO optimizados

ASO	IC_{50} (M)	Potencia relativa	Error Estándar
ASO 3.1	2.81E-06	0.53	0.059
ASO 3.2	1.85E-06	0.81	0.086
ASO 4.1	2.25E-06	0.66	0.072
ASO 4.2	1.24E-06	1.21	0.13
ASO 4.3	1.96E-06	0.76	0.081
ASO 4.4	2.04E-06	0.73	0.079
ASO 6.1	7.20E-07	2.07	0.21
ASO 4.I	8.28E-07	1.80	0.19
ASO 4.S	1.49E-06	1	0

Estimaciones de parámetros del modelo paralelo a partir del modelo de regresión logística de 3 parámetros. La potencia representa la concentración molar. Abreviaturas: M, molar; Std. Error, error estándar de la media.

Tabla 14. IC_{50} y $E_{máx}$ de ASO-4 y ASO-6.1 en neuronas iPSC GABAérgicas

ASO	IC_{50} Estimada	IC_{50} CI 95 % (M)		$E_{máx}$ Estimada	$E_{máx}$ CI 95 %		30 µM (media)
ASO-4	7.77E-07	6.86E-07	8.79E-07	0.08	0.05	0.11	0.11
ASO-6.1	5.17E-07	3.41E-07	7.82E-07	-0.11	-0.22	0.01	0.06

Estimaciones de parámetros del modelo completo a partir del modelo de regresión logística de 4 parámetros (Hill). La IC_{50} y los intervalos de confianza representan la concentración molar. $E_{máx}$ y los valores de 30 uM representan los niveles de ARN de *UBE3A-AS* normalizados con relación al vehículo.

Tabla 15. IC_{50} y $E_{máx}$ de ASO-4 y ASO-6.1 en neuronas iPSC glutamatérgicas

ASO	IC_{50} Estimada	IC_{50} CI 95 % (M)		$E_{máx}$ Estimada	$E_{máx}$ CI 95 %		30 µM (media)
ASO-4	1.21E-04	1.12E-13	1.32E+05	-1.45	-9.01	6.12	0.17
ASO-6.1	2.44E-07	2.39E-08	2.50E-06	-0.27	-1.24	0.70	0.04

Estimaciones de parámetros del modelo completo a partir del modelo de regresión logística de 4 parámetros (Hill). La IC_{50} y los intervalos de confianza representan la concentración molar. $E_{máx}$ y los valores de 30 uM representan los niveles de ARN de *UBE3A-AS* normalizados con relación al vehículo.

Tabla 16. Potencia relativa de ASO-4 y ASO-6.1 en neuronas glutamatérgicas

ASO	IC_{50} (M)	Potencia relativa	Error Estándar
ASO-4	3.06E-06	1	0
ASO-6.1	7.8E-07	3.89	0.72

Estimaciones de parámetros del modelo paralelo a partir del modelo de regresión logística de 4 parámetros. Abreviaturas: M, molar

Tabla 17. Derivados de ASO-4 y ASO-6.1

ASO	ARN Mod.	Cadena principal	Enlaces PO	Diseño (5'-3')	Secuencia (5´-3´)	SEQ ID
ASO-4.0.PS.O	OMe	PS	0	5-10-5	$U^{O}*A^{O}*G^{O}*A^{O}*A^{O}*t*g*g*c*a*c*a*t*c*t*C^{O}*U^{O}*U^{O}*G^{O}*G^{O}$	SEQ ID NO:375
ASO-4.0.PO-1.O	OMe	PS/PO	2	5-10-5	$U^{O}*A^{O}*G^{O}*A^{O}*A^{O}$-t*g*g*c*a*c*a*t*c*t-$C^{O}*U^{O}*U^{O}*G^{O}*G^{O}$	SEQ ID NO:376
ASO-4.0.PO-2.O	OMe	PS/PO	0	5-10-5	$U^{O}*A^{O}$-$G^{O}*A^{O}$-A^{O}*t-g*g-c*a-c*a-t*c-t*C^{O}-$U^{O}*U^{O}$-$G^{O}*G^{O}$	SEQ ID NO:377
ASO-4.0.PS.M	MOE	PS	0	5-10-5	$T^{M}*A^{M}*G^{M}*A^{M}*A^{M}*t*g*g*c*a*c*a*t*c*t*5mC^{M}*T^{M}*T^{M}*G^{M}*G^{M}$	SEQ ID NO:378

ASO-4.0.PO-1.M	MOE	PS/PO	2	5-10-5	$T^{M}*A^{M}*G^{M}*A^{M}*A^{M}$-t*g*g*c*a*c*a*t*c*t-5mC$^{M}*T^{M}*T^{M}*G^{M}*G^{M}$	SEQ ID NO:379
ASO-4.0.PO-2.M	MOE	PS/PO	9	5-10-5	$T^{M}*A^{M}$-$G^{M}*A^{M}$-A^{M}*t-g*g-c*a-c*a-t*c-t*5mC^{M}-$T^{M}*T^{M}$-$G^{M}*G^{M}$	SEQ ID NO:380
ASO-4.4.PS.L	LNA	PS	0	3-11-4	$A^{L}*G^{L}*A^{L}$*a*t*g*g*c*a*c*a*t*c*t*5mC$^{L}*T^{L}*T^{L}*G^{L}$	SEQ ID NO:381
ASO-4.4.PO-1.L	LNA	PS/PO	2	3-11-4	$A^{L}*G^{L}*A^{L}$-a*t*g*g*c*a*c*a*t*c*t-5mC$^{L}*T^{L}*T^{L}*G^{L}$	SEQ ID NO:382
ASO-4.4.PO-2.L	LNA	PS/PO	8	3-11-4	$A^{L}*G^{L}$-A^{L}*a-t*g-g*c-a*c-a*t-c*t-5mC$^{L}*T^{L}$-$T^{L}*G^{L}$	SEQ ID NO:383
ASO-6.1.PS.O	OMe	PS	0	4-10-4	$C^{O}*U^{O}*G^{O}*G^{O}$*t*g*t*c*a*a*c*a*a*g*$C^{O}*C^{O}*A^{O}*A^{O}$	SEQ ID NO:384
ASO-6.1.PO-1.O	OMe	PS/PO	2	4-10-4	$C^{O}*U^{O}*G^{O}*G^{O}$-t*g*t*c*a*a*c*a*a*g-$C^{O}*C^{O}*A^{O}*A^{O}$	SEQ ID NO:385
ASO-6.1.PO-2.O	OMe	PS/PO	8	4-10-4	$C^{O}*U^{O}$-$G^{O}*G^{O}$-t*g-t*c-a*a-c*a-a*g-$C^{O}*C^{O}$-$A^{O}*A^{O}$	SEQ ID NO:386
ASO-6.1.PS.M	MOE	PS	0	4-10-4	5mC$^{M}*T^{M}*G^{M}*G^{M}$*t*g*t*c*a*a*c*a*a*g*5mC^{M}*5mC$^{M}*A^{M}*A^{M}$	SEQ ID NO:387
ASO-6.1.PO-1.M	MOE	PS/PO	2	4-10-4	5mC$^{M}*T^{M}*G^{M}*G^{M}$-t*g*t*c*a*a*c*a*a*g-5mC^{M}*5mC$^{M}*A^{M}*A^{M}$	SEQ ID NO:388
ASO-6.1.PO-2.M	MOE	PS/PO	8	4-10-4	5mC$^{M}*T^{M}$-$G^{M}*G^{M}$-t*g-t*c-a*a-c*a-a*g-5mC^{M}*5mC^{M}-$A^{M}*A^{M}$	SEQ ID NO:389
ASO-6.1.PS.L	LNA	PS	0	3-10-4	$T^{L}*G^{L}*G^{L}$*t*g*t*c*a*a*c*a*a*g*5mC^{L}*5mC$^{L}*A^{L}*A^{L}$	SEQ ID NO:390
ASO-6.1.PO-1.L	LNA	PS/PO	2	3-10-4	$T^{L}*G^{L}*G^{L}$-t*g*t*c*a*a*c*a*a*g-5mC^{L}*5mC$^{L}*A^{L}*A^{L}$	SEQ ID NO:391
ASO-6.1.PO-2.L	LNA	PS/PO	8	3-10-4	$T^{L}*G^{L}$-G^{L}*t-g*t-c*a-a*c-a*a-g*5mC^{L}-5mC^{L}-$A^{L}*A^{L}$	SEQ ID NO:392

Letra mayúscula, ARN; letra minúscula, ADN. 5mC, 5-metilcitosina. Sobrescrito: O, 2′-OMe; M, 2′-MOE; L, LNA. PS y *, fosforotioato; PO y -, fosfodiéster

Materiales y Métodos

Diseño de oligonucleótidos antisentido

Los oligonucleótidos antisentido (ASO) se diseñaron mediante el uso de *S*oligo (Programa informático para el plegamiento estadístico de ácidos nucleicos y estudios de ARN reguladores). Brevemente, los ASO candidatos (20-18 mer) con la energía de interrupción del sitio de unión más baja y la energía de unión libre se identificaron para cada secuencia objetivo y después se inspeccionaron para determinar los motivos con mayor eficacia. Los ASO se filtraron posteriormente en función de la accesibilidad dentro de la estructura secundaria centroide de energía libre más baja predicha de la secuencia objetivo generada por *S*oligo. En algunos casos, los modelos de estructura secundaria se compararon mediante el uso de las estructuras de energía libre más bajas generadas por RNAfold y Mfold.

Los ASO humanos se filtraron mediante el uso de los siguientes criterios: 1) la secuencia objetivo era polimórfica [dbSNP138, dbSNP150 y llamado de variantes integrado de 1000 Genomas Fase 3 (SNV, INDEL y SV)]; 2) la secuencia objetivo no estaba 100 % conservada con macaco Rhesus y Cynomolgus; 3) la secuencia objetivo se localizó aguas arriba del ARNpn de *Snord115/SNORD115* retenido (por exón). Los ASO restantes se clasificaron por energía libre (<= -8 kcal/mol), probabilidad promedio no apareada para nucleótidos del sitio objetivo, energía de interrupción del sitio de unión (baja>alta), ubicación dentro de la estructura secundaria (Ensembl Centroid) y presencia/ausencia de motivos de secuencia asociados con alta/baja eficacia.

Neuronas primarias de hipocampo de ratón

Se generaron cultivos primarios de neuronas de hipocampo a partir de crías P0-P1 ($Ube3a^{m\ +/p\ +}$ y $Ube3a^{m\ +/pYFP}$) al cruzar machos $Ube3a^{m\ +/pYFP}$ con hembras C57BL/6J de tipo salvaje. Los genotipos se determinaron mediante el uso de los métodos descritos anteriormente. En resumen, las neuronas de hipocampo se cultivaron en medio Neurobasal A (Invitrogen, San Diego, CA) suplementado con B27 (Invitrogen) y penicilina/estreptomicina (Invitrogen) en placas de fondo óptico de 96 pocillos recubiertas con poli-D-Lisina (152028, Thermo Fisher Scientific) y laminina (23017-01, Thermo Fisher Scientific). Los cultivos se mantuvieron a 37 °C en 5 % de CO_2 hasta su uso.

Obtención de imágenes de neuronas de ratón

Las neuronas primarias de hipocampo de ratón se fijaron a 10 DIV (3 días después del tratamiento) con paraformaldehído al 4 %. Los cultivos se lavaron dos veces con PBS 1X, se fijaron en paraformaldehído al 4 % en PBS durante 15 min y después se lavaron tres veces en PBS 1X. Las células se bloquearon en Triton-X100 al 0.3 % en PBS (T-PBS) más suero de cabra o burro al 5 %

durante 1-2 h a temperatura ambiente con agitación suave. Las células se incubaron con anticuerpos anti-GFP [Novus Biologicals, NB 600-308 (conejo)] y anti-NeuN (Millipore, 05-557 (ratón)] durante 24 horas a 4 °C con agitación suave. Las células se lavaron 3 veces en Tween 20 1X PBS al 0.1 % durante 15 min cada una y después se incubaron con anticuerpos secundarios anti-conejo 488 (Jackson ImmunoResearch, 111-545-144) y anti-ratón Cy3 (Jackson ImmunoResearch, 115-165-166) durante 24 h a 4 °C en la oscuridad. A continuación, las células se lavaron 4 veces en Tween 20 1X PBS al 0.1 % durante 15 min cada una. Los núcleos se marcaron mediante el uso de tinción Hoechst (Thermo Fisher Scientific) a una dilución de 1:1000 en el tercer lavado.

Las placas se fotografiaron mediante el uso del programa informático Cytation 5 y Gen5 Image + (BioTek, Winooski, VT). Brevemente, se usó un objetivo invertido 4X para generar imágenes montadas de cada pocillo mediante la adquisición de imágenes de enfoque automático de 5x4 con mosaicos solapados para el hilvanado automático de imágenes. Los filtros usados fueron DAPI (377, 477), GFP (469, 525) y RFP (531, 593). El tiempo de exposición y la ganancia se ajustaron para cada placa mediante el uso de los controles negativos y positivos. El enfoque automático se realizó en núcleos (tinción Hoechst, DAPI) para cada pocillo, con la misma altura focal usada para los filtros GFP y RFP. Las imágenes se hilvanaron mediante el programa informático Gen5 Image+.

El análisis de imagen de una sola célula se realizó mediante el uso del IN Cell Developer 6.0 (GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA). En resumen, se generaron máscaras de seguimiento individuales ya sea para núcleos (tinción de Hoechst, DAPI) o neuronas maduras (NeuN, RFP) mediante la optimización de los parámetros de inclusión y exclusión basados en el tamaño y la intensidad de las células seleccionadas al azar en las imágenes adquiridas. Los valores de intensidad media y media de GFP se adquirieron después dentro de los límites de la máscara seleccionada, lo que generó valores de intensidad para Ube3aYFP dentro de cada célula.

Neuronas derivadas de células madre pluripotentes inducidas humanas

Las células precursoras neurales derivadas de células madre pluripotentes inducidas (iPSC) GABAérgicas y glutamatérgicas (NRC-100-010-001 y GNC-301-030-001, Cellular Dynamics International, Madison WI) se diferenciaron en neuronas de acuerdo con el protocolo del fabricante. En resumen, las células precursoras neurales se descongelaron y se resuspendieron en medio químicamente definido y se añadieron a placas de cultivo estériles recubiertas con poli-D-lisina y laminina. El medio se reemplazó 24 h después de la colocación en placas y después se reemplazó la mitad del medio cada 3-5 días después.

Aislamiento de ARN

Para las neuronas derivadas de iPSC cultivadas, el aislamiento de ARN y la síntesis de ADNc se realizaron mediante el uso del kit Cell-to-CT (Thermo Fisher Scientific) en un volumen de lisado de 55 µl.

Análisis de niveles de ARN

Los niveles de ARN de estado estacionario de los transcritos objetivo se midieron mediante el uso de ensayos de PCR cuantitativa de transcripción inversa TaqMan (qRT-PCR). El volumen total de reacción fue de 10 µl, lo que incluye 2 µl de ADNc, mezcla maestra de expresión génica 1X (4369016, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) y ensayo de cebador TaqMan 1X (Thermo Fisher Scientific). Las condiciones de ciclo fueron 2 minutos a 50 °C, 10 minutos a 95 °C y 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C y 1 minuto a 60 °C, con lecturas tomadas en la etapa de 60 °C de cada ciclo. Las reacciones se realizaron en un termociclador BIO-RAD T1000 CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Hercules CA), donde las reacciones con control interno (*PPIA*, Hs99999904_m1, Thermo Fisher Scientific) y objetivo [*UBE3A-AS*, Hs01372957_m1; SNORD116-11, Hs04275268_gH; SNORD115, Hs04275288_gH; IPW, Hs03455409_s1; SNORD109A/B, AP47WVR (Thermo Fisher Scientific); *UBE3A*: directa ATATGTGGAAGCCGGAATCT (SEQ ID NO:500); inversa: CCCAGAACTCCCTAATCAGAA (SEQ ID NO:501); y, sonda: ATGACGGTGGCTATACCAGG (SEQ ID NO:502)] se realizaron juntas. Los datos se recuperaron y analizaron con el programa informático BIORAD CFX Maestro (Bio-Rad Laboratories). Se filtraron muestras con valores Cq de control interno ≥ 30. La calidad de los datos se inspeccionó visualmente para identificar discrepancias entre las réplicas técnicas y/o de placa. Las mediciones para estadísticas inferenciales y estadísticas descriptivas consisten en ΔΔvalores de Cq ($2^{-\Delta\Delta Cq} = 2^{-(Cq[objetivo] - Cq[control\ interno]) - (Cq[objetivo] - Cq[control\ interno])}$).

Ejemplo 2: Identificación de la región objetivo de ASO

El análisis de los datos de secuenciación de ARN generados a partir de tejidos y células de ratón reveló una región ubicada entre el extremo 3' del conglomerado *Snord115* y el extremo 5' del transcrito antisentido de *Ube3a* (*Ube3a-AS*) que contiene elementos genéticos que se consideran importantes para el procesamiento del transcrito del gen huésped de *Snord115* y la transcripción de *Ube3a-AS* (Figuras 6A - 6D). El análisis de los datos de secuenciación de ARN generados a partir de tejidos humanos reveló una región ubicada entre el extremo 3' del conglomerado *SNORD115* y *SNORD109B* (Figuras 7A - 7G) que contenían elementos similares a los observados en el ratón; sin embargo, el análisis comparativo de esta región indicó que había poca o ninguna conservación de secuencia entre humanos y roedores.

Materiales y Métodos

Secuenciación de ARN

El ARN se aisló mediante el uso de Qiagen RNAeasy Plus (74136, Qiagen, Hilden, Alemania). La concentración de ARN se determinó mediante el uso de la cuantificación fluorométrica Qubit (Thermo Fisher Scientific) y la calidad del ARN se evaluó mediante el uso de una 4200 Agilent TapeStation (Agilent, Santa Clara, CA). Se generaron bibliotecas de secuenciación de ARN mediante el uso del kit Illumina TruSeq Stranded Total RNA (20020597, Illumina, Inc., San Diego, CA) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se realizó una secuencia de extremo emparejado de 75 pares de bases mediante el uso de un NextSeq 500 (Illumina, San Diego, CA) en el centro de genómica del Texas A&M Institute for Genome Sciences and Society. Las lecturas de secuenciación primarias se procesaron mediante el uso de CASAVA. Las secuencias FASTQ resultantes se examinaron mediante el uso de FASTQC.

Las secuencias FASTQ se alinearon con el ensamble de referencia humano (hg19) mediante el uso de Hisat2 (versión 2.1.0), con las siguiente configuraciones: --fr. Las secuencias SAM alineadas se convirtieron a continuación en secuencias BAM binarias, se indexaron y se clasificaron mediante el uso de Samtools. Los archivos BAM de muestras individuales se fusionaron e indexaron mediante el uso de Samtools. Las secuencias alineadas se filtraron mediante el uso del comando vista en Samtools para eliminar lecturas no alineadas de forma única (calidad > 1).

Se generó un ensamble de transcrito para muestras fusionadas mediante el uso de Stringtie (versión 1.3.4.d), con las siguientes opciones: (trenzada) --rf -f 0 -j 2. Los transcritos de exón individuales se excluyeron de los transcritos ensamblados mediante el uso de gffread (GFF utilities, Universidad Johns Hopkins, Center for Computational Biology).

Ejemplo 3: Identificación de candidatos de ASO

Dieciocho ASO dirigidos a las secuencias objetivo de ASO-4 y ASO-6.1 y que consistían en diferentes diseños de cadena principal y modificaciones de ARN se diseñaron para identificar potenciales candidatos de ASO (Tabla 17). Las neuronas derivadas de iPSC normales (GABAérgicas) se trataron con una curva de 10 puntos ½ log de respuesta de dosis de cada ASO para comparar los valores de IC_{50} y $E_{máx}$. Las células precursoras neuronales se diferenciaron en neuronas a 18 DIV y después se trataron con una curva de 10 puntos ½ log de respuesta de dosis de ASO [1 nM, 3 nM, 10 nM, 30 nM, 100 nM, 300 nM, 1 μM, 3 μM, 10 μM y 30 μM (n = 2)]. A 24 DIV, los niveles de ARN de estado estacionario de *UBE3A-AS* se midieron y se ajustaron las curvas de respuesta a la dosis como se describió anteriormente (Figura 8A y Tabla 18). Las curvas de

respuesta a la dosis fueron significativamente diferentes (prueba de paralelismo: $F_{(51.606)} = 7.86$; $p < 0.0001$; $R^2 = 0.90$), por lo tanto no se estimaron las potencias relativas. La agrupación jerárquica de las curvas ajustadas reveló 3 conglomerados de ASO, donde el conglomerado 1 representa los 9 ASO más potentes (Figuras 8B y 8C). El análisis del conglomerado 1 indicó que los ASO tenían curvas similares (Prueba de paralelismo: $F_{(24.299)} = 1.01$; $p = 0.5$; $R^2 = 0.93$), y que ASO-4.4.PS.L era al menos 3 veces más potente que los otros ASO (Tabla 19). Sin embargo, un análisis adicional indicó que ASO-4.4.PS.L, ASO-6.1.PS.M y ASO-6.1.PO-1.M tenían valores de IC_{50} equivalentes, mientras que los otros ASO fueron ligeramente menos potentes (Tabla 20). Sobre la base de las potencias relativas y los criterios de selección interna, ASO-4.4.PS.L y ASO-6.1.PO-1.O se investigaron más a fondo.

Tabla 18. IC_{50} y $E_{máx}$ de candidatos a ASO

ASO	IC_{50} (M)	IC_{50} CI 95 % (M)		$E_{máx}$	$E_{máx}$ CI 95 %		30 µM (media)	Conglo-merado
ASO-4.4.PS.L	2.66E-08	3.66E-09	1.93E-07	0.0	-0.23	0.23	0.05	1
ASO-6.1.PS.M	1.47E-07	6.80E-08	3.19E-07	-0.05	-0.21	0.12	0.02	1
ASO-6.1.PO-1.M	1.66E-07	7.15E-08	3.84E-07	-0.02	-0.20	0.16	0.04	1
ASO-4.4.PO-1.L	2.26E-07	8.95E-08	5.71E-07	0.04	-0.17	0.25	0.1	1
ASO-4.0.PO-1.M	2.78E-07	1.52E-07	5.08E-07	0.02	-0.11	0.15	0.05	1
ASO-4.0.PS.M	3.00E-07	1.80E-07	5.00E-07	0.05	-0.06	0.15	0.05	1
ASO-6.1.PO-1.O	3.15E-07	7.98E-08	1.24E-06	-0.1	-0.50	0.26	0.04	1
ASO-6.1.PS.L	3.62E-07	1.37E-07	9.57E-07	-0.07	-0.32	0.18	0.04	1
ASO-6.1.PS.O	5.32E-07	1.20E-07	2.36E-06	-0.2	-0.67	0.29	0.05	1
ASO-6.1.PO-2.L	7.34E-07	5.35E-08	1.01E-05	0.3	-0.11	0.76	0.4	2
ASO-4.0.PO-1.O	7.66E-07	3.70E-07	1.59E-06	0.05	-0.12	0.23	0.1	2
ASO-4.0.PS.O	1.27E-06	5.13E-07	3.13E-06	0.06	-0.20	0.31	0.1	2

ASO-6.1.PO-1.L	1.89E-06	4.42E-07	8.06E-06	0.03	-0.34	0.39	0.2	2
ASO-4.0.PO-2.O	1.30E-04	1.65E-17	1.03E+09	-0.3	-9.51	8.94	0.6	2
ASO-6.1.PO-2.M	2.69E-04	9.85E-16	7.37E+07	-1.2	-13.16	10.77	0.3	2
ASO-4.4.PO-2.L	3.27E+01	0	Inf	-2.7	-577	571	0.6	3
ASO-4.0.PO-2.M	1.14E+05	0	Inf	-76	-74,958.	74,805	0.5	3
ASO-6.1.PO-2.O	1.93E+10	0	Inf	-5569	-85,963,650	85,952,510	0.3	3

Estimaciones de parámetros del modelo completo a partir del modelo de regresión logística de 4 parámetros (Hill). La IC50 y los intervalos de confianza representan la concentración molar. Emáx y los valores de 30 µM representan los niveles de ARN de UBE3A-AS normalizados con relación al vehículo.

Abreviaturas: Inf, infinito; CI del 95 %, intervalos de confianza del 95 %

Tabla 19. Potencia relativa de los ASO en el conglomerado 1

ASO	IC_{50} (M)	Potencia relativa	Error est
ASO-4.4.PS.L	5.03E-08	1	0
ASO-6.1.PS.M	1.53E-07	0.3	0.08
ASO-6.1.PO-1.M	1.77E-07	0.3	0.07

ASO-6.1.PO-1.O	1.99E-07	0.3	0.06
ASO-4.0.PS.M	2.62E-07	0.2	0.05
ASO-4.0.PO-1.M	2.78E-07	0.2	0.04
ASO-6.1.PS.L	2.81E-07	0.2	0.04
ASO-4.4.PO-1.L	3.22E-07	0.2	0.04
ASO-6.1.PS.O	4.32E-07	0.1	0.03

Estimaciones de parámetros del modelo paralelo a partir del modelo de regresión logística de 4 parámetros (Hill).

Abreviaturas: M, molar; Std, estándar

Tabla 20. Equivalencia de ASO en el conglomerado 1 con relación a ASO-4.4.PS.L

ASO	ASO	Relación de IC50	Límites de confianza inferior y superior		Límite excedido
ASO-4.4.PS.L	ASO-6.1.PO-1.M	0.90	0.81	0.98	Equivalente
	ASO-6.1.PS.M	0.90	0.82	0.98	Equivalente
	ASO-4.0.PO-1.M	0.87	0.79	0.94	Inferior
	ASO-4.0.PS.M	0.86	0.79	0.94	Inferior
	ASO-4.4.PO-1.L	0.88	0.79	0.96	Inferior
	ASO-6.1.PO-1.O	0.86	0.77	0.95	Inferior
	ASO-6.1.PS.L	0.85	0.77	0.93	Inferior
	ASO-6.1.PS.O	0.83	0.73	0.92	Inferior

Dos pruebas unilaterales

Materiales y Métodos

Los métodos fueron similares a los descritos en el Ejemplo 2 a menos que se indique de cualquier otra manera.

Ejemplo 4: Análisis farmacodinámico de ASO-6.1-PO-1.O y ASO-4.4.PS.L en neuronas iPSC con síndrome de Angelman

A continuación, se examinaron las potencias de ASO-6.1.PS.O y ASO-4.4.PS.L en neuronas derivadas de iPSC de un paciente con síndrome de Angelman con una deleción derivada materna de la región 15q11-q13. Las células madre pluripotentes inducidas se diferenciaron en neuronas y después se trataron con una curva de 10 puntos medio ½ log de respuesta de dosis de ASO-6.1.PO-1.O y ASO-4.4.PS.L [1 nM, 3 nM, 10 nM, 30 nM, 100 nM, 300 nM, 1 μM, 3 μM, 10 μM y 30 μM (n = 3)]. Seis días después del tratamiento, los niveles de ARN de estado estacionario de *UBE3A-AS* se midieron y las curvas de respuesta a la dosis se ajustaron como se describió anteriormente (Figura 9A). Las curvas de respuesta a la dosis fueron similares entre los ASO (prueba de paralelismo: $F_{(3.132)}$ = 1.07, p = 0.4, R^2 = 0.82), donde ASO-4.4.PS.L (437 nM) es aproximadamente 2.7 veces más potente que ASO-6.1.PO-1.O (1.22 uM). Los valores de IC_{50} fueron equivalentes [relación de IC_{50} ASO-6.1.PO-1.O /ASO-4.4.PS.L: = 0.96 (límite de confianza inferior = 0.9; límite de confianza superior = 1.0)]. Los valores de $E_{máx}$ fueron similares (30 μM: ASO-4.4.PS.L = 0.01 ± 0.0007; ASO-6.1.PO-1.O = 0.05 ± 0.004)

pero no se consideró equivalente debido a los intervalos de confianza [ASO-6.1.PO-1.O /ASO-4.4.PS.L relación de $E_{máx}$: = -9.1 (Límite de confianza inferior = -224; Límite de confianza superior = 205)].

Materiales y Métodos

Los métodos fueron similares a los descritos en el Ejemplo 2 a menos que se indique de cualquier otra manera.

Neuronas derivadas de células madre pluripotentes inducidas con síndrome de Angelman

Las células iPS con síndrome de Angelman (iPSCs AG1-0) (ECN001, Kerafast, Boston, MA) se cultivaron conjuntamente en fibroblastos embrionarios murinos irradiados en medio con células madre embrionarias humanas [DMEM/F12 (11330-057, Gibco Biosciences, Dublín, Irlanda), reemplazo de suero con genes inactivados al 20 % (10828-028, Thermo Fisher Scientific), aminoácidos no esenciales 1X, L-glutamina 2 mM, 2-mercaptoetanol 7 μl/ml y de factor básico de crecimiento de fibroblastos 4 μg/ml]. Para el primer pase, las células AG1-0 se pasaron de acuerdo con el manual del producto para PluriSTEM Human ES/iPS Medium (SCM130, Millipore Sigma,

Burlington, MA), que es libre de almentadores y usa Dispase II (SCM133, Millipore Sigma) para disociar las células. Se usó una matriz Matrigel™ calificada para hESC (354277, Corning BD Biosciences, Corning, NY) como matriz extracelular. En el segundo pase, la matriz se cambió a vitronectina (CC130, Millipore Sigma). Durante los pases subsecuentes, las áreas de diferenciación se eliminaron manualmente hasta que las células diferenciadas representaron aproximadamente <5 % de las colonias. Después de cuatro pases subsecuentes, las células AG1-0 se diferenciaron mediante el uso del kit de neurogénesis ES/iPS Millipore (SCR603, SCM110 y SCM111) pero carecían de vitronectina como matriz extracelular. El pase inicial se realizó con EZ-LiFT (SCM139, Millipore Sigma) para obtener células iPS de alta calidad. Las células progenitoras neuronales se congelaron en la etapa cero (P_0) y subsecuentemente se descongelaron para su diferenciación. La diferenciación se realizó en placas de cultivo estériles recubiertas con poli-D-lisina (10 μg/ml) y laminina [10 μg/ml (23017-015, Gibco) en medio de diferenciación (SCM111) durante 10 días de diferenciación. En algunos casos, las células se diferenciaron en medio de mantenimiento de Cellular Dynamics (NRM-100-121-001, Cellular Dynamics International, Madison, WI).

Ejemplo 5: Análisis de expresión del transcrito policistrónico PWS en neuronas iPSC con síndrome de Angelman tratadas con ASO-6.1-PO-1.O y ASO-4.4.PS.L

Para determinar si ASO-4.4.PS.L y ASO-6.1.PO-1.O afectan los niveles de transcritos de ARN codificados por el transcrito policistrónico PWS, se realizó la secuenciación de ARN en células iPS con AS tratadas con cada ASO y se cuantificaron los niveles de ARN de estado estacionario de *SNURF*, *SNRPN*, el transcrito del gen huésped de *SNORD116* (*SNHG116*), los ARNpn de *SNORD116*, *IPW*, el transcrito del gen huésped de *SNORD115* (*SNHG115*), los ARNnp de *SNORD115* y *UBE3A-AS*. *Además, se midieron los niveles de ARN de estado estacionario de UBE3A*. Las células iPS con síndrome de Angelman se diferenciaron en neuronas como se describió anteriormente y después se trataron con vehículo (1 % H2O, n = 3), ASO-4.4.PS.L (30 μM, n = 3) y ASO-6.1.PO-1.O (30 μM, n = 3). Seis días después del tratamiento, la secuenciación de ARN de ARN se realizó en ARN total (agotado de ARNr) aislado a partir de los cultivos. Para generar anotaciones de los transcritos de *SNHG116*, *SNHG115*y *UBE3A-AS*, se ensambló un transcriptoma a partir de los datos de ARN-sec del vehículo y después se incorporó a la anotación del gen de referencia. Con relación al vehículo, los niveles de ARN de estado estacionario de *SNURF*, *SNRPN*, los ARNnp de *SNHG116*, los ARNnp de *SNORD116* y los ARNnp de *SNORD115* fueron similares y no significativamente diferentes. ASO-4.4.PS.L, pero no ASO-6.1.PO-1.O, redujeron los niveles de *IPW* (1.5 veces), pero el efecto no fue significativo. ASO-6.1.PO-1.O y ASO-4.4.PS.L redujeron

significativamente los niveles de ARN de *SNHG115* y *UBE3A-AS*. ASO-6.1.PO-1.O y ASO-4.4.PS.L tuvieron un efecto similar en los niveles de *SNHG115*; sin embargo, ASO-4.4.PS.L tuvo un efecto mucho mayor en los niveles de ARN de*UBE3A-AS* que ASO-6.1.PO-1.O (ASO-4.4.PS.L: -6.1 cambio en veces; ASO-6.1.PO-1.O: -2.8 cambio en veces). El tratamiento con ASO aumentó los niveles de ARN de *UBE3A* en aproximadamente 1.2 veces, pero el efecto no fue significativo (Figura 10 y Tabla 21).

Tabla 21. Efecto del tratamiento con ASO en los niveles de ARN de transcritos policistrónicos de PWS y *UBE3A*

Gen	Tratamiento	Diferencia	Error est	Relación t	P ajustado
SNURF	ASO-6.1.PO-1.O	-0.53	0.51	-1.02	0.5
	ASO-4.4.PS.L	0.49	0.51	0.96	0.6
SNRPN	ASO-6.1.PO-1.O	0.03	0.11	0.30	0.9
	ASO-4.4.PS.L	-0.02	0.11	-0.16	1.0
SNHG116	ASO-6.1.PO-1.O	-0.07	0.10	-0.75	0.7
	ASO-4.4.PS.L	-0.24	0.10	-2.49	0.08
SNORD116	ASO-6.1.PO-1.O	-0.04	0.46	-0.08	1.0
	ASO-4.4.PS.L	0.27	0.45	0.60	0.8
IPW	ASO-6.1.PO-1.O	0.18	0.37	0.49	0.8
	ASO-4.4.PS.L	-0.49	0.37	-1.33	0.4
SNH115G	ASO-6.1.PO-1.O	-0.55	0.09	-5.92	0.002
	ASO-4.4.PS.L	-0.58	0.09	-6.33	0.001
SNORD115	ASO-6.1.PO-1.O	0.24	0.52	0.45	0.8
	ASO-4.4.PS.L	-0.26	0.49	-0.54	0.8
UBE3A-AS	ASO-6.1.PO-1.O	-1.48	0.06	-24.17	< 0.0001
	ASO-4.4.PS.L	-1.94	0.06	-31.56	< 0.0001
UBE3A	ASO-6.1.PO-1.O	0.74	0.48	1.53	0.3
	ASO-4.4.PS.L	0.90	0.48	1.88	0.2

ANOVA de una vía con la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett con relación al vehículo.

Materiales y Métodos

Los métodos fueron similares a los descritos en el Ejemplo 4 a menos que se indique de cualquier otra manera.

Análisis de expresión diferencial de los ARN de PWS

Los valores normalizados de FPKM (fragmentos por mil por millón) de la anotación del gen RefSeq se estimarán mediante el uso de Cuffnorm con la configuración predeterminada y la siguiente opción: -u. Los valores de FPKM de cada anotación de gen se determinaron para cada muestra del archivo de salida y se usaron para estadísticas descriptivas e inferenciales.

Ejemplo 6: Análisis farmacodinámico de ASO-6.1-PO-1.O y ASO-4.4.PS.L en macacos Cynomolgus

Las regiones objetivo ASO-4 y ASO-6 se conservan a través de varias especies de primates no humanos (NHP), lo que permite de esta manera estudios de seguridad y eficacia en un modelo animal grande. Para examinar la eficacia de ASO-4.4.PS.L y ASO-6.1.PO-1.O en el sistema nervioso central (SNC), los ASO se suministraron a los macacos Cynomolgus por punción lumbar intratecal. A los animales se les administró una inyección por bolo simple de vehículo (solución salina al 0.9 %, n = 5), ASO-6.1.PO-1.O (10 mg, n = 3) y ASO.4.4.PS.L (10 mg, n = 3). Veintiocho días después del tratamiento, se recolectaron tejidos del sistema nervioso central (SNC) y se midieron los niveles de ARN de estado estacionario de *UBE3A-AS*. En general, ASO-4.4.PS.L tuvo un efecto mayor en los niveles de ARN de *UBE3A-AS* que ASO-6.1.PO-1.O (Tabla 22). ASO-4.4.PS.L redujo los ARN de *UBE3A-AS* en la mayoría de las regiones del SNC, con grandes efectos en el lóbulo temporal, la corteza motora primaria, la protuberancia anular, la médula, el hipocampo, el globo pálido, la corteza frontal (corona radiata), la corteza prefrontal y la médula espinal lumbar. De manera similar, ASO-6.1.PO-1.O redujo los niveles de ARN de *UBE3A-AS* en la mayoría de las regiones del SNC, con grandes efectos observados en protuberancias anulares, núcleo oculomotor y médula espinal lumbar (Figura 11 y Tabla 23).

Tabla 22. Tamaño del efecto del tratamiento con ASO en los niveles de ARN de *UBE3A-AS* en el SNC

Tratamiento	Tratamiento*	d de Cohen	Intervalos de confianza del 95 %		FDR
Vehículo	ASO-4.4.PS.L	1.4	1.0	1.8	2.3E-10
ASO-6.1.PO-1.O	ASO-4.4.PS.L	1.0	0.6	1.5	6.4E-06
Vehículo	ASO-6.1.PO-1.O	0.3	-0.06	0.7	0.09

Prueba t de Student con valores de P ajustados por FDR

Tamaños del efecto de d de Cohen: 0.2, pequeño; 0.5, medio; 0.8, grande; 1.2, muy grande

Abreviaturas: FDR, tasa de falso descubrimiento

Tabla 23. Efecto del tratamiento con ASO en los niveles de ARN de *UBE3A-AS* en regiones del SNC

Región del SNC	ASO	Diferencia	Error est	Relación t	P ajustado
Núcleo caudado	ASO-6.1.PO-1.O	0.10	0.22	0.46	0.9
	ASO-4.4.PS.L	-0.21	0.22	-0.94	0.6
Cerebelo	ASO-6.1.PO-1.O	-0.11	0.09	-1.15	0.5
	ASO-4.4.PS.L	-0.05	0.09	-0.53	0.8
Corteza frontal	ASO-6.1.PO-1.O	0.01	0.27	0.04	0.9
	ASO-4.4.PS.L	-0.71	0.27	-2.66	0.05
Corteza Frontal (Corona radiata)	ASO-6.1.PO-1.O	-0.08	0.22	-0.34	0.9
	ASO-4.4.PS.L	-0.62	0.22	-2.79	0.04
Globo Pálido	ASO-6.1.PO-1.O	0.10	0.24	0.40	0.9
	ASO-4.4.PS.L	-0.38	0.24	-1.54	0.3
Hipocampo	ASO-6.1.PO-1.O	-0.19	0.21	-0.91	0.6

	ASO-4.4.PS.L	-0.57	0.21	-2.66	0.05
Médula Espinal (Lumbar)	ASO-6.1.PO-1.O	-0.32	0.20	-1.63	0.2
	ASO-4.4.PS.L	-0.87	0.20	-4.46	0.004
Médula	ASO-6.1.PO-1.O	-0.24	0.20	-1.16	0.45
	ASO-4.4.PS.L	-0.32	0.20	-1.59	0.3
Núcleo Oculomotor	ASO-6.1.PO-1.O	-0.37	0.29	-1.27	0.4
	ASO-4.4.PS.L	-0.18	0.29	-0.62	0.8
Protuberancia anular	ASO-6.1.PO-1.O	-0.27	0.21	-1.30	0.4
	ASO-4.4.PS.L	-0.47	0.21	-2.25	0.1
Corteza motora	ASO-6.1.PO-1.O	-0.19	0.30	-0.65	0.8
	ASO-4.4.PS.L	-0.59	0.30	-1.99	0.1
Putamen	ASO-6.1.PO-1.O	0.07	0.15	0.44	0.9
	ASO-4.4.PS.L	-0.04	0.15	-0.25	0.9
Lóbulo temporal	ASO-6.1.PO-1.O	0.13	0.25	0.54	0.8
	ASO-4.4.PS.L	-0.59	0.25	-2.39	0.08
Tálamo	ASO-6.1.PO-1.O	-0.02	0.14	-0.14	0.9
	ASO-4.4.PS.L	-0.20	0.14	-1.46	0.3

ANOVA de una vía con la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett con relación al vehículo.

Materiales y Métodos

Administración de los ASO

Los estudios con NHP se realizaron en Northern Biomedical Research y Charles River Laboratories mediante el uso de protocolos aprobados por los respectivos Comités Institucionales de Cuidado y Uso de Animales. Se anestesiaron macacos Cynomolgus machos y hembras (Macaca fascicularis) con un peso de 2 a 4 kg y se administró una dosis única de 1 ml de ASO o vehículo mediante punción lumbar intratecal. La solución de dosificación se preparó por disolución de ASO liofilizado en el artículo de control con vehículo (cloruro de sodio al 0.9 %) y se filtró a través de un filtro de 0.2 µm. Se recogieron muestras del SNC y la médula espinal, y el SNC se seccionó en cortes coronales de 4 mm. Las muestras de tejido se congelaron rápidamente y se almacenaron a -80 °C hasta el aislamiento del ARN.

Aislamiento de ARN

Se tomó un ponche de tejido de 4 mm de cada región de interés, de las cuales aproximadamente la mitad se usó para el aislamiento del ARN. El aislamiento de ARN se realizó mediante el uso del kit Qiagen RNeasy Plus Mini (74136, Qiagen), la disrupción y lisis tisular se realizó con perlas de acero inoxidable de 5 mm en un TissueLyser II. El ARN se eluyó en dos volúmenes de 30 µl de agua, para un volumen de elución total de 60 µl. El ARN se cuantificó mediante el uso del Qubit con el ensayo XR de ARN (Q33224, Thermo Fisher Scientific). El ADNc se sintetizó a partir de 2 µg de ARN de entrada mediante el uso del kit High Capacity RNA-to-cDNA (4387406, Thermo Fisher Scientific) en un volumen de reacción total de 50 µl.

Análisis de los niveles de ARN de UBE3A-AS en tejidos

Se estimaron los niveles de ARN de *UBE3A-AS* en macacos Cynomolgus mediante el uso de PCR cuantitativa SYBR Green de transcripción inversa (qRT-PCR). El volumen de reacción total fue de 10 µl, lo que incluye 2 µl de ADNc, mezcla maestra PowerUp SYBR Green 1X (A25741, Thermo Fisher Scientific) y 500 nM de cada cebador (directo e inverso). Las condiciones de ciclo fueron 2 minutos a 50 °C, 2 minutos a 95 °C y 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C y 1 minuto a 60 °C, con lecturas tomadas en la etapa de 60 °C de cada ciclo. Las reacciones se realizaron en un termociclador BIO-RAD T1000 CFX96, con las reacciones de control interno realizadas por separado (*PPIA*, directo: GTCTCCTTCGAGCTGTTTGC (SEQ ID NO:503); inverso: CCTTTCTCTCCAGTGCTCAGA (SEQ ID NO:504)) y objetivo (*UBE3A-AS*, directo: CCTGTGAACTTTCAACCAGGA (SEQ ID NO:505); inverso: reacciones GGATCAGACTCCAGGCCTTC (SEQ ID NO:506). Se recuperaron los datos y el análisis inicial

se realizó con el programa informático BIORAD CFX Maestro, con los análisis estadísticos en profundidad realizados con Excel y JMP.

Ejemplo 7: ASO que se dirigen a límites exónicos de *transcritos de* UBE3A-AS empalmados

En algunas modalidades, la secuencia objetivo es un límite exónico que involucra exones 1-5 de *UBE3A-AS* y exones 1-2 de *SNORD109B*. Las secuencias objetivo consisten en 38 nucleótidos (19 nucleótidos de cada exón) centrados en el límite exónico de cada exón (19 nucleótidos que representan los extremos 5' y 3' de los exones adyacentes). Hubo 12 segmentos de secuencias, con límites exónicos que involucran los segmentos 1-2, 2-3, 3-4, 5-6, 7-8, 9-10 y 11-12. Las coordenadas cromosómicas se proporcionan en la Tabla 24. Se creó una única secuencia de unión fusionada que muestra los exones empalmados (|, unión exónica) y las secuencias exónicas intermedias ([]). Los ASO (20, 19 y 18 mer) dirigidos a las uniones exónicas se proporcionan en la Tabla 25.

Secuencia de unión fusionada

AATGAAATCTTCTGATTTG|TAAGACATGCTGCCAAGAG[]ATTAGTTTTACACCTTCAG|GATAAAGACTGCTGAGAAG[]GTTTAAGGATGCTATTCTG|AAAAGACTGTGGAGGAAGA[]TTAAGGAAACCATCTCTGG|GATAAGGATGACTGAGGAA[]ATTTAAGGATGCCACTCTG|GTTAAAAGCTGAAACAACT[]GAAACTTCAGGGAAAAGAG|AAGGCCTGGAATCTGATCC (SEQ ID NO:489).

| = Unión exónica 3'-5'

[] = secuencia exónica intermedia

Tabla 24. Coordenadas del cromosoma 15 de uniones exónicas tomadas como objetivo

Segmento	Inicio	Final	Region exónica
1	25,511,743	25,511,761	3′
2	25,512,059	25,512,079	5′
3	25,512,175	25,512,191	3′
4	25,513,475	25,513,493	5′
5	25,513,582	25,513,600	3′
6	25,514,752	25,514,770	5′
7	25,514,863	25,514,881	3′
8	25,516,564	25,516,582	5′
9	25,516,663	25,516,681	3′

10	25,522,514	25,522,532	5′
11	25,522,537	25,522,556	3′
12	25,523,994	25,524,012	5′
Coordenadas del cromosoma 15 humano (ensamble de referencia hg19)			

Tabla 25. Lista de ASO de unión y regiones objetivo correspondientes				
Tamaño del ASO	Secuencia objetivo (5′-3′)		Secuencia del ASO (5′-3′)	
20 mer	GAAACCAUCUCUGGGAUAAG	SEQ ID NO:393	CTTATCCCAGAGATGGTTTC	SEQ ID NO:441
	AAACCAUCUCUGGGAUAAGG	SEQ ID NO:394	CCTTATCCCAGAGATGGTTT	SEQ ID NO:442
	AACCAUCUCUGGGAUAAGGA	SEQ ID NO:395	TCCTTATCCCAGAGATGGTT	SEQ ID NO:443
	ACCAUCUCUGGGAUAAGGAU	SEQ ID NO:396	ATCCTTATCCCAGAGATGGT	SEQ ID NO:444
	CCAUCUCUGGGAUAAGGAUG	SEQ ID NO:397	CATCCTTATCCCAGAGATGG	SEQ ID NO:445
	CAUCUCUGGGAUAAGGAUGA	SEQ ID NO:398	TCATCCTTATCCCAGAGATG	SEQ ID NO:446
	AUCUCUGGGAUAAGGAUGAC	SEQ ID NO:399	GTCATCCTTATCCCAGAGAT	SEQ ID NO:447
	UCUCUGGGAUAAGGAUGACU	SEQ ID NO:400	AGTCATCCTTATCCCAGAGA	SEQ ID NO:448
	CUCUGGGAUAAGGAUGACUG	SEQ ID NO:401	CAGTCATCCTTATCCCAGAG	SEQ ID NO:449
	UCUGGGAUAAGGAUGACUGA	SEQ ID NO:402	TCAGTCATCCTTATCCCAGA	SEQ ID NO:450
	CUGGGAUAAGGAUGACUGAG	SEQ ID NO:403	CTCAGTCATCCTTATCCCAG	SEQ ID NO:451
	UGGGAUAAGGAUGACUGAGG	SEQ ID NO:404	CCTCAGTCATCCTTATCCCA	SEQ ID NO:452
	GGGAUAAGGAUGACUGAGGA	SEQ ID NO:405	TCCTCAGTCATCCTTATCCC	SEQ ID NO:453
	GGAUAAGGAUGACUGAGGAA	SEQ ID NO:406	TTCCTCAGTCATCCTTATCC	SEQ ID NO:454
	GCUGAAACAACUGAAACUUC	SEQ ID NO:407	GAAGTTTCAGTTGTTTCAGC	SEQ ID NO:455
	GAAACAACUGAAACUUCAGG	SEQ ID NO:408	CCTGAAGTTTCAGTTGTTTC	SEQ ID NO:456
	AAACAACUGAAACUUCAGGG	SEQ ID NO:409	CCCTGAAGTTTCAGTTGTTT	SEQ ID NO:457
	AACAACUGAAACUUCAGGGA	SEQ ID NO:410	TCCCTGAAGTTTCAGTTGTT	SEQ ID NO:458
	ACAACUGAAACUUCAGGGAA	SEQ ID NO:411	TTCCCTGAAGTTTCAGTTGT	SEQ ID NO:459
	CAACUGAAACUUCAGGGAAA	SEQ ID NO:412	TTTCCCTGAAGTTTCAGTTG	SEQ ID NO:460

	ACUGAAACUUCAGGGAAAAG	SEQ ID NO:413	CTTTTCCCTGAAGTTTCAGT	SEQ ID NO:461
19 mer	AACCAUCUCUGGGAUAAGG	SEQ ID NO:414	CCTTATCCCAGAGATGGTT	SEQ ID NO:462
	ACCAUCUCUGGGAUAAGGA	SEQ ID NO:415	TCCTTATCCCAGAGATGGT	SEQ ID NO:463
	CCAUCUCUGGGAUAAGGAU	SEQ ID NO:416	ATCCTTATCCCAGAGATGG	SEQ ID NO:464
	CAUCUCUGGGAUAAGGAUG	SEQ ID NO:417	CATCCTTATCCCAGAGATG	SEQ ID NO:465
	AUCUCUGGGAUAAGGAUGA	SEQ ID NO:418	TCATCCTTATCCCAGAGAT	SEQ ID NO:466
	UCUCUGGGAUAAGGAUGAC	SEQ ID NO:419	GTCATCCTTATCCCAGAGA	SEQ ID NO:467
	CUCUGGGAUAAGGAUGACU	SEQ ID NO:420	AGTCATCCTTATCCCAGAG	SEQ ID NO:468
	UCUGGGAUAAGGAUGACUG	SEQ ID NO:421	CAGTCATCCTTATCCCAGA	SEQ ID NO:469
	CUGGGAUAAGGAUGACUGA	SEQ ID NO:422	TCAGTCATCCTTATCCCAG	SEQ ID NO:470
	UGGGAUAAGGAUGACUGAG	SEQ ID NO:423	CTCAGTCATCCTTATCCCA	SEQ ID NO:471
	GGGAUAAGGAUGACUGAGG	SEQ ID NO:424	CCTCAGTCATCCTTATCCC	SEQ ID NO:472
	GGAUAAGGAUGACUGAGGA	SEQ ID NO:425	TCCTCAGTCATCCTTATCC	SEQ ID NO:473
	AACAACUGAAACUUCAGGG	SEQ ID NO:426	CCCTGAAGTTTCAGTTGTT	SEQ ID NO:474
	ACAACUGAAACUUCAGGGA	SEQ ID NO:427	TCCCTGAAGTTTCAGTTGT	SEQ ID NO:475
	CAACUGAAACUUCAGGGAA	SEQ ID NO:428	TTCCCTGAAGTTTCAGTTG	SEQ ID NO:476
	CAACUGAAACUUCAGGGAA	SEQ ID NO:429	TTCCCTGAAGTTTCAGTTG	SEQ ID NO:477
18 mer	CCAUCUCUGGGAUAAGGA	SEQ ID NO:430	TCCTTATCCCAGAGATGG	SEQ ID NO:478
	CAUCUCUGGGAUAAGGAU	SEQ ID NO:431	ATCCTTATCCCAGAGATG	SEQ ID NO:479
	AUCUCUGGGAUAAGGAUG	SEQ ID NO:432	CATCCTTATCCCAGAGAT	SEQ ID NO:480
	UCUCUGGGAUAAGGAUGA	SEQ ID NO:433	TCATCCTTATCCCAGAGA	SEQ ID NO:481
	CUCUGGGAUAAGGAUGAC	SEQ ID NO:434	GTCATCCTTATCCCAGAG	SEQ ID NO:482

	UCUGGGAUAAGGAUGACU	SEQ ID NO:435	AGTCATCCTTATCCCAGA	SEQ ID NO:483
	CUGGGAUAAGGAUGACUG	SEQ ID NO:436	CAGTCATCCTTATCCCAG	SEQ ID NO:484
	UGGGAUAAGGAUGACUGA	SEQ ID NO:437	TCAGTCATCCTTATCCCA	SEQ ID NO:485
	GGGAUAAGGAUGACUGAG	SEQ ID NO:438	CTCAGTCATCCTTATCCC	SEQ ID NO:486
	GGAUAAGGAUGACUGAGG	SEQ ID NO:439	CCTCAGTCATCCTTATCC	SEQ ID NO:487
	ACAACUGAAACUUCAGGG	SEQ ID NO:440	CCCTGAAGTTTCAGTTGT	SEQ ID NO:488

Ejemplo 8: ARNip, ARNhp y ARN guías de CRISPR dirigidos a los exones 1-5 de UBE3a-AS

Como se indicó anteriormente, en algunas modalidades, el oligonucleótido descrito es un ácido nucleico funcional, tal como un ARNip, ARNhp o nucleasa de ARNg, que inhibe, muta o elimina la secuencia de ácido nucleico objetivo.

En la Tabla 26 se proporcionan ejemplos de ARNip dirigidos a los exones 1-5 de UBE3a-AS. En la Tabla 27 se proporcionan ejemplos de ARNhp dirigidos a los exones 1-5 de UBE3a-AS. En la Tabla 28 se proporcionan ejemplos de ARNg dirigidos a los exones 1-5 de UBE3a-AS.

Tabla. 26 ARNip dirigidos a los exones 1-5 de UBE3a-AS			
Secuencia objetivo		ARNip	
CCCAGGUGUCCUUUAAUGAA	SEQ ID NO:507	TTCATTAAAGGACACCTGGG	SEQ ID NO:538
CCAGGUGUCCUUUAAUGAAA	SEQ ID NO:508	TTTCATTAAAGGACACCTGG	SEQ ID NO:539
UGAAAAUGCUCUUGACACCA	SEQ ID NO:509	TGGTGTCAAGAGCATTTTCA	SEQ ID NO:540
GAAAAUGCUCUUGACACCAA	SEQ ID NO:510	TTGGTGTCAAGAGCATTTTC	SEQ ID NO:541
AAAUGCUCUUGACACCAAUG	SEQ ID NO:511	CATTGGTGTCAAGAGCATTT	SEQ ID NO:542
AGAUCAGUAGCUUCCUUUAC	SEQ ID NO:512	GTAAAGGAAGCTACTGATCT	SEQ ID NO:543
UCAGUAGCUUCCUUUACCGA	SEQ ID NO:513	TCGGTAAAGGAAGCTACTGA	SEQ ID NO:544
UCUAGAACAUUGAGCUAUGG	SEQ ID NO:514	CCATAGCTCAATGTTCTAGA	SEQ ID NO:545
CUAGAACAUUGAGCUAUGGA	SEQ ID NO:515	TCCATAGCTCAATGTTCTAG	SEQ ID NO:546
AACAUUGAGCUAUGGAAGAC	SEQ ID NO:516	GTCTTCCATAGCTCAATGTT	SEQ ID NO:547
ACAUUGAGCUAUGGAAGACU	SEQ ID NO:517	AGTCTTCCATAGCTCAATGT	SEQ ID NO:548
CUAUGGAAGACUCCCACCUA	SEQ ID NO:518	TAGGTGGGAGTCTTCCATAG	SEQ ID NO:549
UAUGGAAGACUCCCACCUAA	SEQ ID NO:519	TTAGGTGGGAGTCTTCCATA	SEQ ID NO:550
CAAGUGCUACCGCACAGGCA	SEQ ID NO:520	TGCCTGTGCGGTAGCACTTG	SEQ ID NO:551
AAGUGCUACCGCACAGGCAU	SEQ ID NO:521	ATGCCTGTGCGGTAGCACTT	SEQ ID NO:552
UACCGCACAGGCAUGCUGCA	SEQ ID NO:522	TGCAGCATGCCTGTGCGGTA	SEQ ID NO:553
CAGGCAUGCUGCAGUGAAUU	SEQ ID NO:523	AATTCACTGCAGCATGCCTG	SEQ ID NO:554
AGGCAUGCUGCAGUGAAUUU	SEQ ID NO:524	AAATTCACTGCAGCATGCCT	SEQ ID NO:555
ACCGUUGUUUAAGGAUGCUA	SEQ ID NO:525	TAGCATCCTTAAACAACGGT	SEQ ID NO:556
CCGUUGUUUAAGGAUGCUAU	SEQ ID NO:526	ATAGCATCCTTAAACAACGG	SEQ ID NO:557

CUGUGGAGGAAGAAAACCCU	SEQ ID NO:527	AGGGTTTTCTTCCTCCACAG	SEQ ID NO:558
AAGAAAACCCUUUACCCUGU	SEQ ID NO:528	ACAGGGTAAAGGGTTTTCTT	SEQ ID NO:559
AGAAAACCCUUUACCCUGUU	SEQ ID NO:529	AACAGGGTAAAGGGTTTTCT	SEQ ID NO:560
CUCAACUGCCUGGCACUGAA	SEQ ID NO:530	TTCAGTGCCAGGCAGTTGAG	SEQ ID NO:561
AACUGCCUGGCACUGAAAAU	SEQ ID NO:531	ATTTTCAGTGCCAGGCAGTT	SEQ ID NO:562
ACUGCCUGGCACUGAAAAUG	SEQ ID NO:532	CATTTTCAGTGCCAGGCAGT	SEQ ID NO:563
GUGUUUAAGGAAACCAUCUC	SEQ ID NO:533	GAGATGGTTTCCTTAAACAC	SEQ ID NO:564
GUUUAAGGAAACCAUCUCUG	SEQ ID NO:534	CAGAGATGGTTTCCTTAAAC	SEQ ID NO:565
AGGAAACCAUCUCUGAUAAG	SEQ ID NO:535	CTTATCAGAGATGGTTTCCT	SEQ ID NO:566
UCUUUGGCUUGUUGACACCA	SEQ ID NO:536	TGGTGTCAACAAGCCAAAGA	SEQ ID NO:567
CUUUGGCUUGUUGACACCAG	SEQ ID NO:537	CTGGTGTCAACAAGCCAAAG	SEQ ID NO:568

Tabla 27. ARNhp dirigidos a los exones 1-5 de UBE3a-AS	
GGTGCCATTCTATTATAAAtaacctgacccattaTTTATAATAGAATGGCACCTTTTT	SEQ ID NO:569
GCTTTCATCAATAATGAAAtaacctgacccattaTTTCATTATTGATGAAAGCTTTTT	SEQ ID NO:570
GGTCTTTCATCAATAATGAtaacctgacccattaTCATTATTGATGAAAGACCTTTTT	SEQ ID NO:571
GAAATCTTCTGATTTGTAAtaacctgacccattaTTACAAATCAGAAGATTTCTTTTT	SEQ ID NO:572
GCACCTAAGGGAATTAGTAtaacctgacccattaTACTAATTCCCTTAGGTGCTTTTT	SEQ ID NO:573
GTTTCAACCAGGATTTAAAtaacctgacccattaTTTAAATCCTGGTTGAAACTTTTT	SEQ ID NO:574
GCTTTCAACCAGGATTTAAtaacctgacccattaTTAAATCCTGGTTGAAAGCTTTTT	SEQ ID NO:575
GGAGATGTGCCATTCTATAtaacctgacccattaTATAGAATGGCACATCTCCTTTTT	SEQ ID NO:576
GTCTTTCATCAATAATGAAtaacctgacccattaTTCATTATTGATGAAAGACTTTTT	SEQ ID NO:577

GATCAATAATGAAATCTTAtaacctgacccattaTAAGATTTCATTATTGATCTTTTT	SEQ ID NO:578
GTGTCTTTCATCAATAATAtaacctgacccattaTATTATTGATGAAAGACACTTTTT	SEQ ID NO:579
GCAATAATGAAATCTTCTAtaacctgacccattaTAGAAGATTTCATTATTGCTTTTT	SEQ ID NO:580
GCATGCTGCAGTGAATTTAtaacctgacccattaTAAATTCACTGCAGCATGCTTTTT	SEQ ID NO:581
GGAAATCTTCTGATTTGTAtaacctgacccattaTACAAATCAGAAGATTTCCTTTTT	SEQ ID NO:582
GGTATATTCTATCTAGAAAtaacctgacccattaTTTCTAGATAGAATATACCTTTTT	SEQ ID NO:583
GTGCTGCAGTGAATTTAAAtaacctgacccattaTTTAAATTCACTGCAGCACTTTTT	SEQ ID NO:584
GTGTGCCATTCTATTATAAtaacctgacccattaTTATAATAGAATGGCACACTTTTT	SEQ ID NO:585
GTTACCATCAGTGTTTAAAtaacctgacccattaTTTAAACACTGATGGTAACTTTTT	SEQ ID NO:586
GCCTGCAACCGTTGTTTAAtaacctgacccattaTTAAACAACGGTTGCAGGCTTTTT	SEQ ID NO:587
GTATGTCTTTCATCAATAAtaacctgacccattaTTATTGATGAAAGACATACTTTTT	SEQ ID NO:588

Tabla 28. ARN guías de CRISPR dirigidos a los exones 1-5 de UBE3a-AS

Cadena	Secuencia	SEQ ID	PAM
-	ACACTGATGGTAAAGTGGAC	SEQ ID NO:589	TGG
-	TAGAATATACACGTCGGTAA	SEQ ID NO:590	AGG
-	TCAACTGTCCCAGTCACAAC	SEQ ID NO:591	AGG
-	TCTAGATAGAATATACACGT	SEQ ID NO:592	CGG
-	TCTAGATAGAATATACACGT	SEQ ID NO:593	CGG
-	CTCCCCATGCACACTTGAGA	SEQ ID NO:594	AGG
-	CATCCTTAAACAACGGTTGC	SEQ ID NO:595	AGG
-	GGTGTAAAACTAATTCCCTT	SEQ ID NO:596	AGG

-	AACAACGGTTGCAGGGACAG	SEQ ID NO:597	AGG
+	TATGGAAGACTCCCACCTAA	SEQ ID NO:598	GGG
+	CTATGGAAGACTCCCACCTA	SEQ ID NO:599	AGG
+	AAGCCTTCTCAAGTGTGCAT	SEQ ID NO:600	GGG
+	CTATCTAGAACATTGAGCTA	SEQ ID NO:601	TGG
+	ACCCTCTGGTGTTGTCACAG	SEQ ID NO:602	AGG
+	AACCCTTTACCCTGTTGTTC	SEQ ID NO:603	AGG

A menos que se defina de cualquier otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente descripción tienen el mismo significado que el que se conoce comúnmente por el experto en la técnica a la que pertenece la invención descrita. Las publicaciones citadas en la presente descripción y los materiales por los que se citan se incorporan específicamente como referencia.

Los expertos en la técnica reconocerán, o podrán determinar con el uso de no más que la experimentación habitual, muchos equivalentes a las modalidades específicas de la invención descrita en la presente descripción. Se pretende que esos equivalentes se incluyan en las reivindicaciones siguientes.

REIVINDICACIONES

1. Un oligonucleótido antisentido que comprende una secuencia de nucleótidos contigua de 10 a 30 nucleótidos de longitud con al menos 98 % de complementariedad con una porción contigua de la secuencia de ácido nucleico SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:5.

2. El oligonucleótido de conformidad con la reivindicación 1, en donde el oligonucleótido comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9, 10 u 11.

3. El oligonucleótido de conformidad con la reivindicación 1 o 2, que comprende uno o más nucleósidos modificados.

4. El oligonucleótido de conformidad con la reivindicación 3, en donde el uno o más nucleósidos modificados es un nucleósido modificado en el azúcar 2'.

5. El oligonucleótido de conformidad con la reivindicación 4, en donde el uno o más nucleósidos modificados en el azúcar 2' se seleccionan independientemente del grupo que consiste en 2'-O-alquil-ARN, 2'-O-metil-ARN, 2'-alcoxi-ARN, 2′-O-metoxietil-ARN, 2′-amino-ADN, 2′-fluoro-ADN, ácido arabinonucleico (ANA), 2′-fluoro-ANA y nucleósidos LNA.

6. El oligonucleótido de conformidad con la reivindicación 5, en donde el uno o más nucleósidos modificados es un nucleósido LNA.

7. El oligonucleótido de conformidad con la reivindicación 1, en donde el oligonucleótido comprende al menos un enlace internucleosídico modificado.

8. El oligonucleótido de conformidad con la reivindicación 7, en donde los enlaces internucleosídicos dentro de la secuencia contigua de nucleótidos son enlaces internucleosídicos de fosforotioato.

9. El oligonucleótido de conformidad con la reivindicación 1, en donde el oligonucleótido es capaz de reclutar ARNasa H.

10. El oligonucleótido de conformidad con la reivindicación 9, en donde el oligonucleótido es un gapmero.

11. El oligonucleótido de conformidad con la reivindicación 10, en donde el oligonucleótido tiene una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:362 a 392.

12. Una composición farmacéutica que comprende uno o más de los oligonucleótidos de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 y un diluyente, solvente, portador, sal y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

13. Un método para tratar o prevenir el síndrome de Angelman en un sujeto que comprende administrar una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de la composición de conformidad con la reivindicación 12 a un sujeto que padece o es susceptible al síndrome de Angelman.

RESUMEN

En la presente descripción se describen oligonucleótidos antisentido que son capaces de inducir la expresión de la proteína ubiquitina ligasa E3A (*UBE3A*) a partir del alelo paterno en neuronas animales o humanas. Los oligonucleótidos se dirigen al supresor del alelo paterno de *UBE3A* por hibridación al ARN no codificante largo de *SNHG14* en el extremo 5' de *UBE3A-AS*, que está aguas abajo del ARNpn *SNORD115-45*. Además, se describen composiciones farmacéuticas y métodos para el tratamiento del síndrome de Angelman.

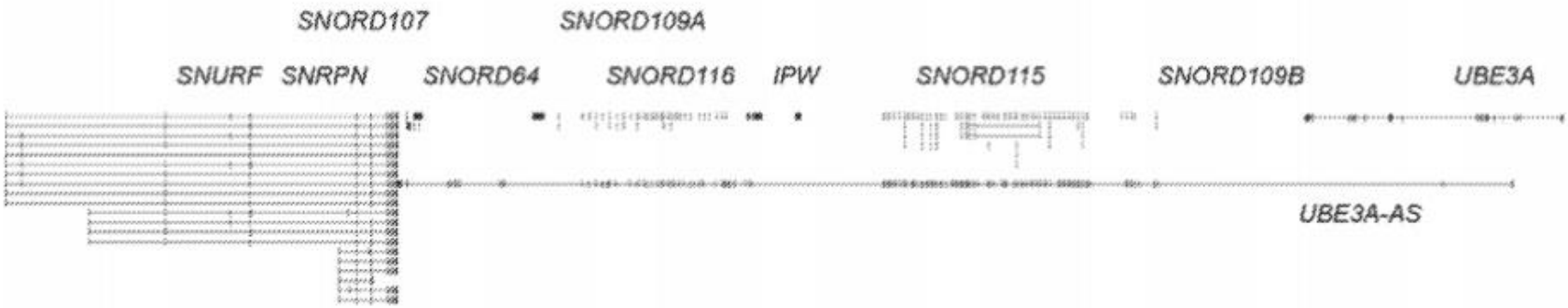


FIGURA 1A

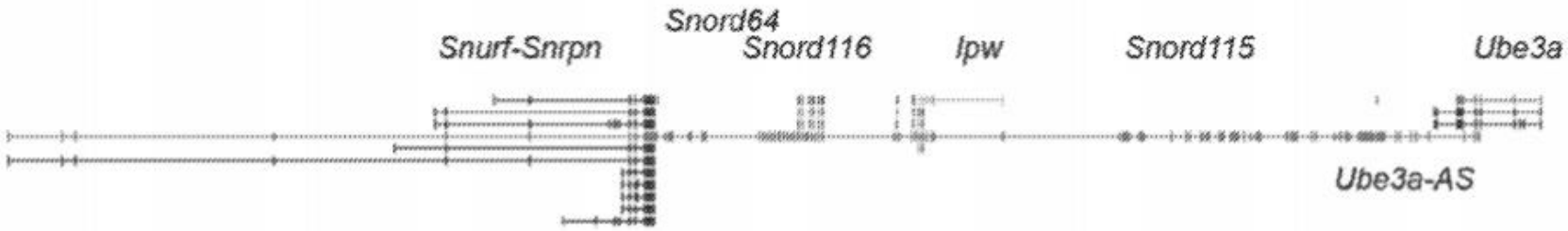


FIGURA 1B

FIGURA 1C

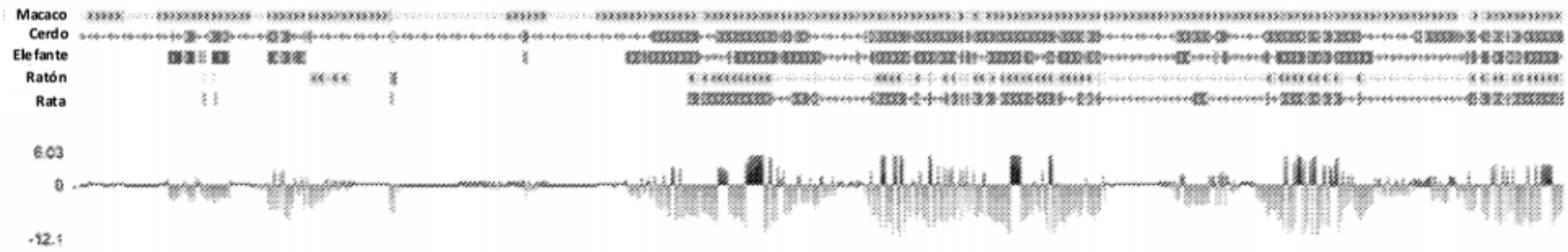


FIGURA 1D

***Ube3a-AS* de ratón**

FIGURA 2A

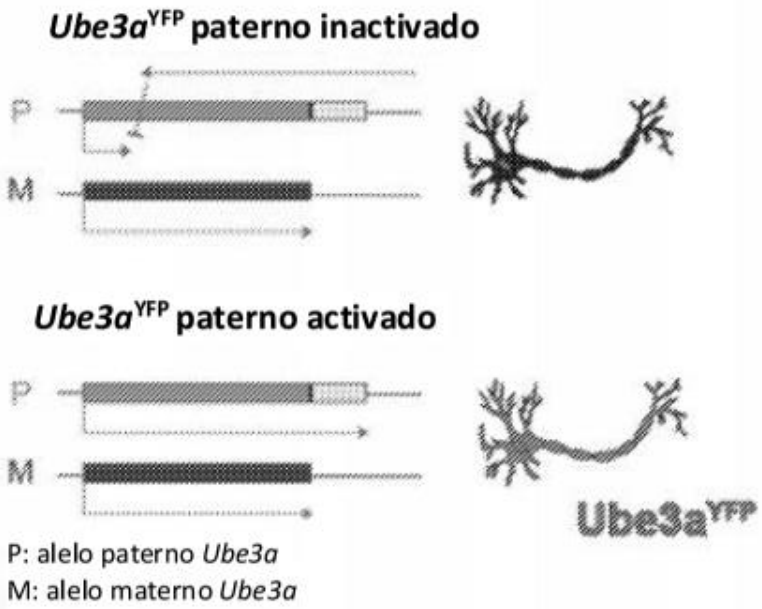


FIGURA 2B

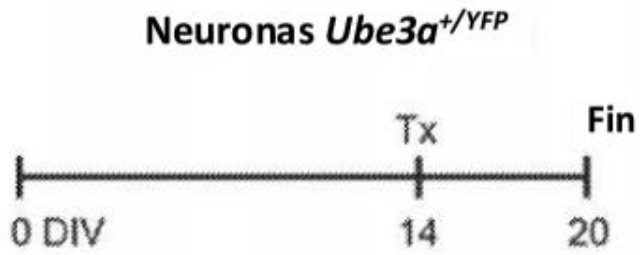


FIGURA 2C

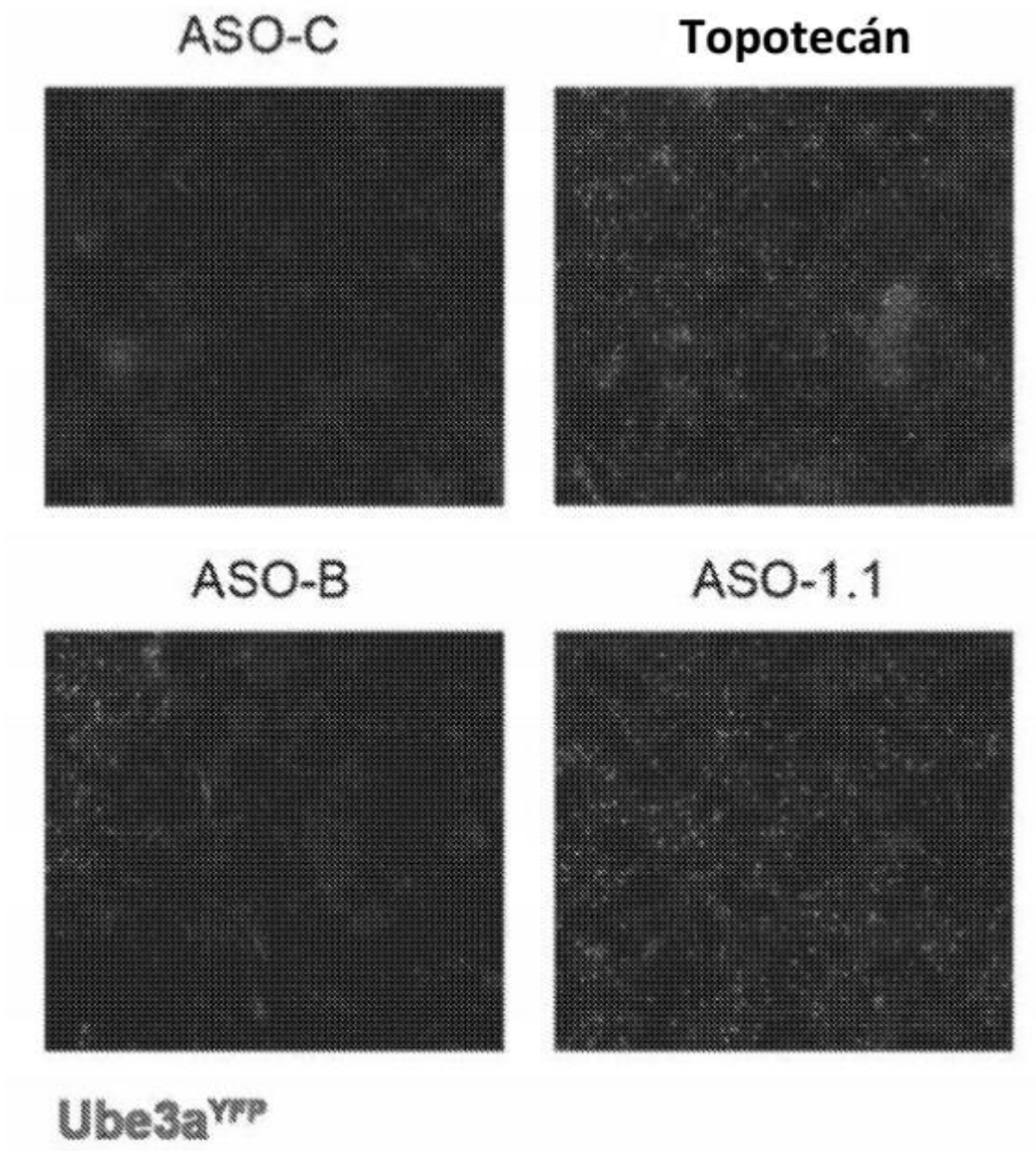


FIGURA 2D

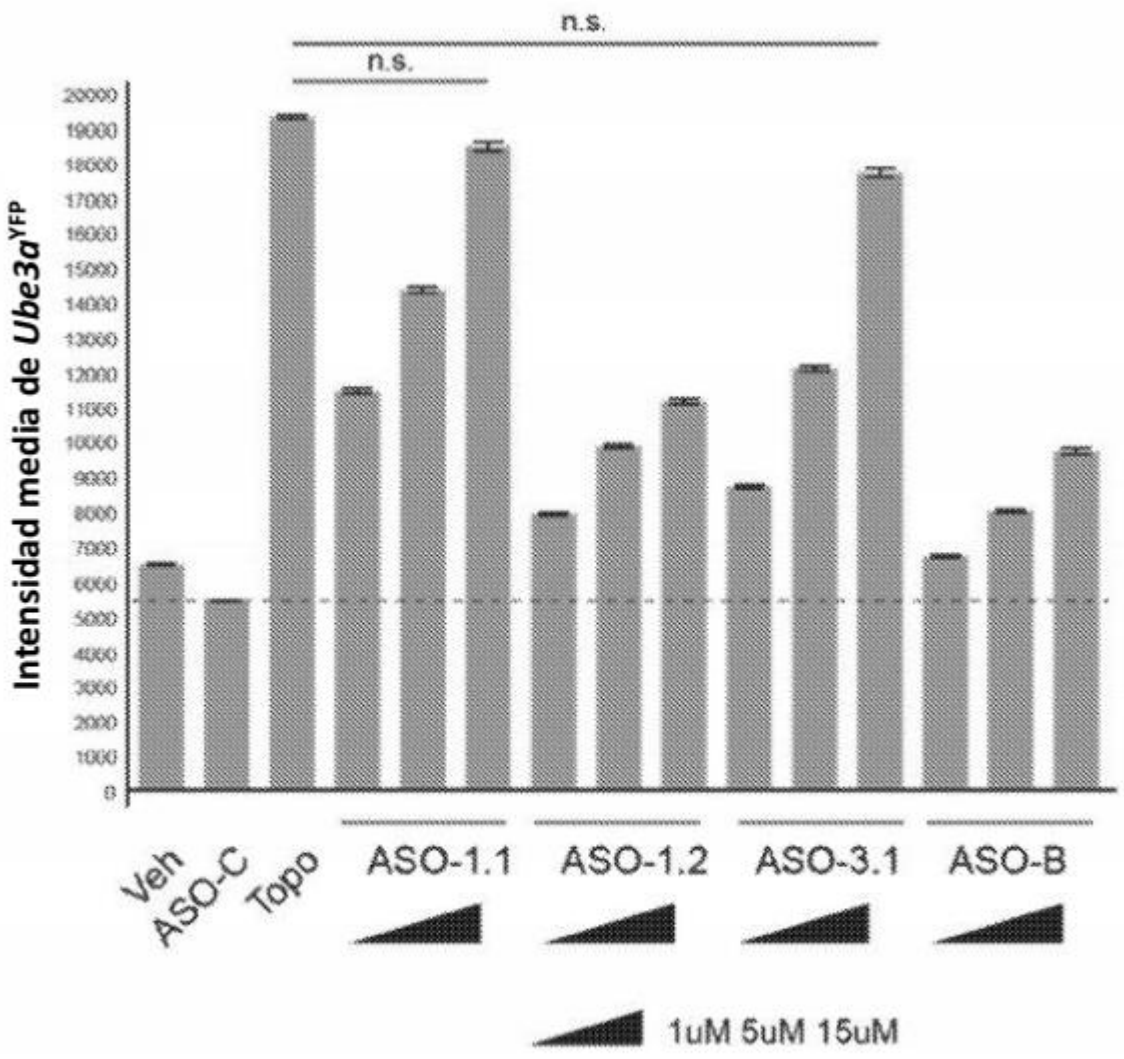

n.s.
n.s.
Intensidad media de Ube3a^YFP
20000
19000
18000
17000
16000
15000
14000
13000
12000
11000
10000
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
Veh
ASO-C
Topo
ASO-1.1
ASO-1.2
ASO-3.1
ASO-B
1uM 5uM 15uM

FIGURA 2E

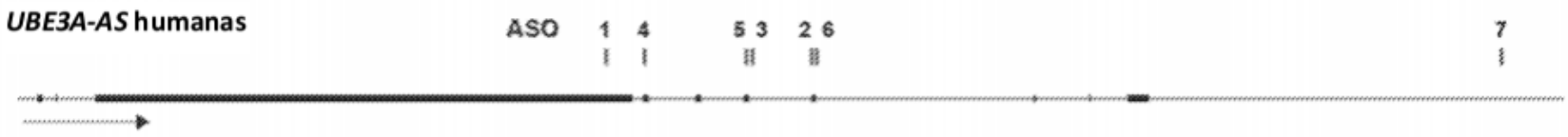


FIGURA 3A

Neuronas-iPSC GABAérgicas

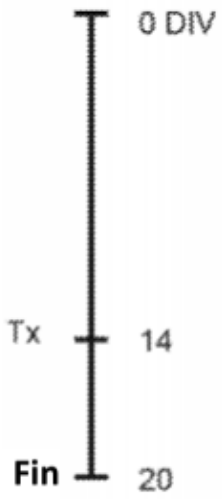


FIGURA 3B

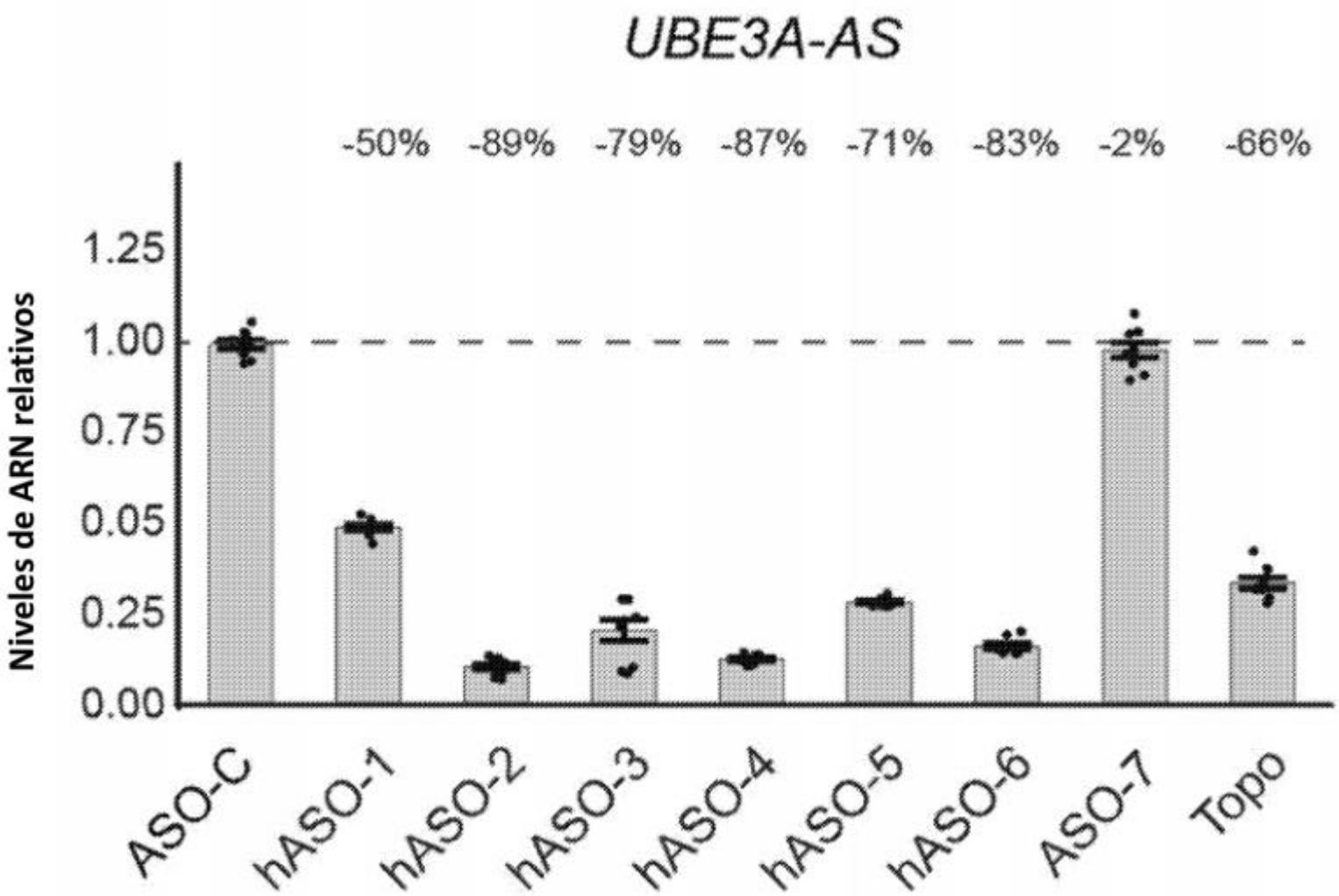

UBE3A-AS
-50%
-89%
-79%
-87%
-71%
-83%
-2%
-66%
Niveles de ARN relativos
1.25
1.00
0.75
0.05
0.25
0.00
ASO-C
hASO-1
hASO-2
hASO-3
hASO-4
hASO-5
hASO-6
ASO-7
Topo

FIGURA 3C

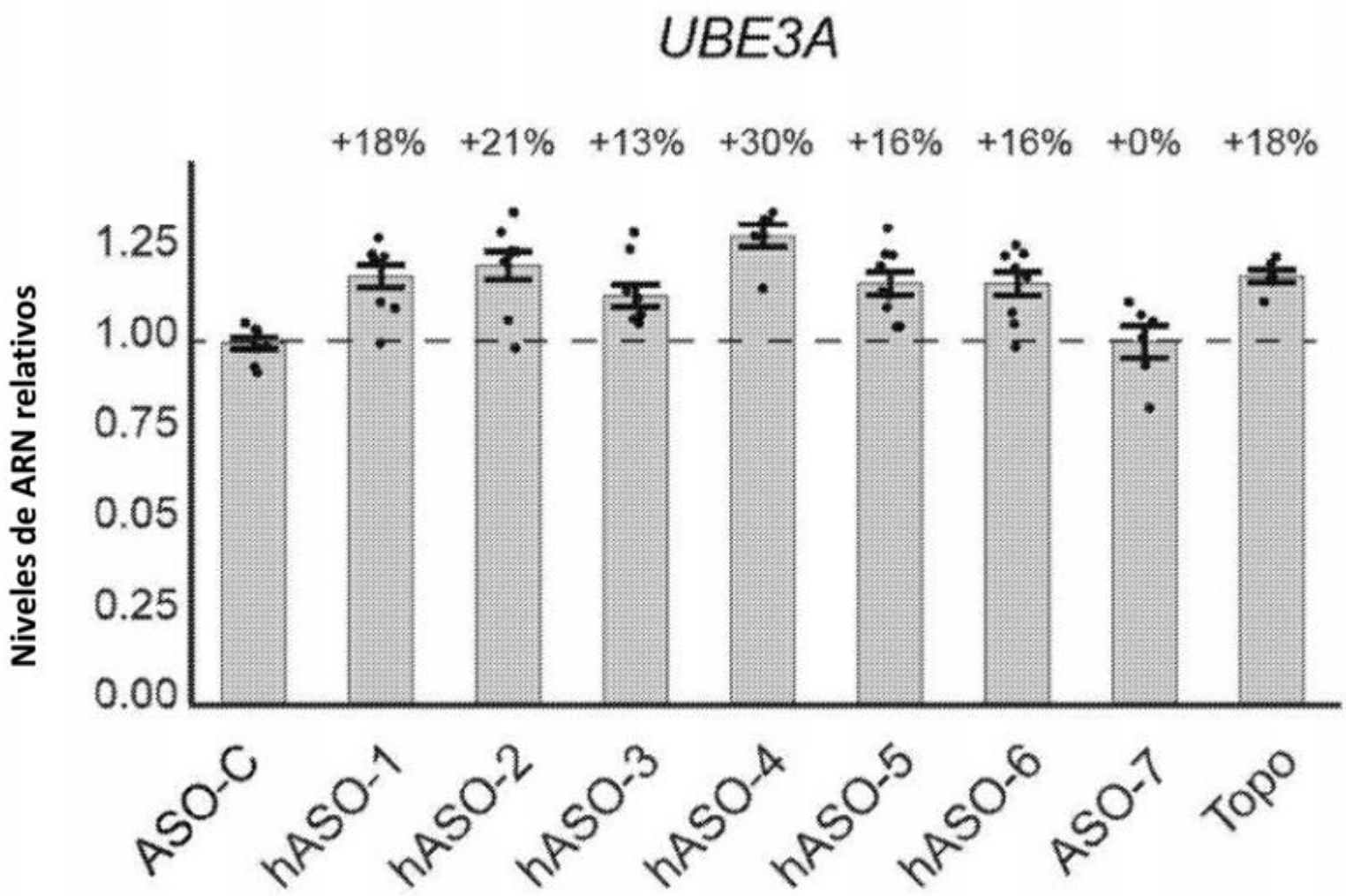

UBE3A
+18%
+21%
+13%
+30%
+16%
+16%
+0%
+18%
Niveles de ARN relativos
1.25
1.00
0.75
0.05
0.25
0.00
ASO-C
hASO-1
hASO-2
hASO-3
hASO-4
hASO-5
hASO-6
ASO-7
Topo

FIGURA 3D

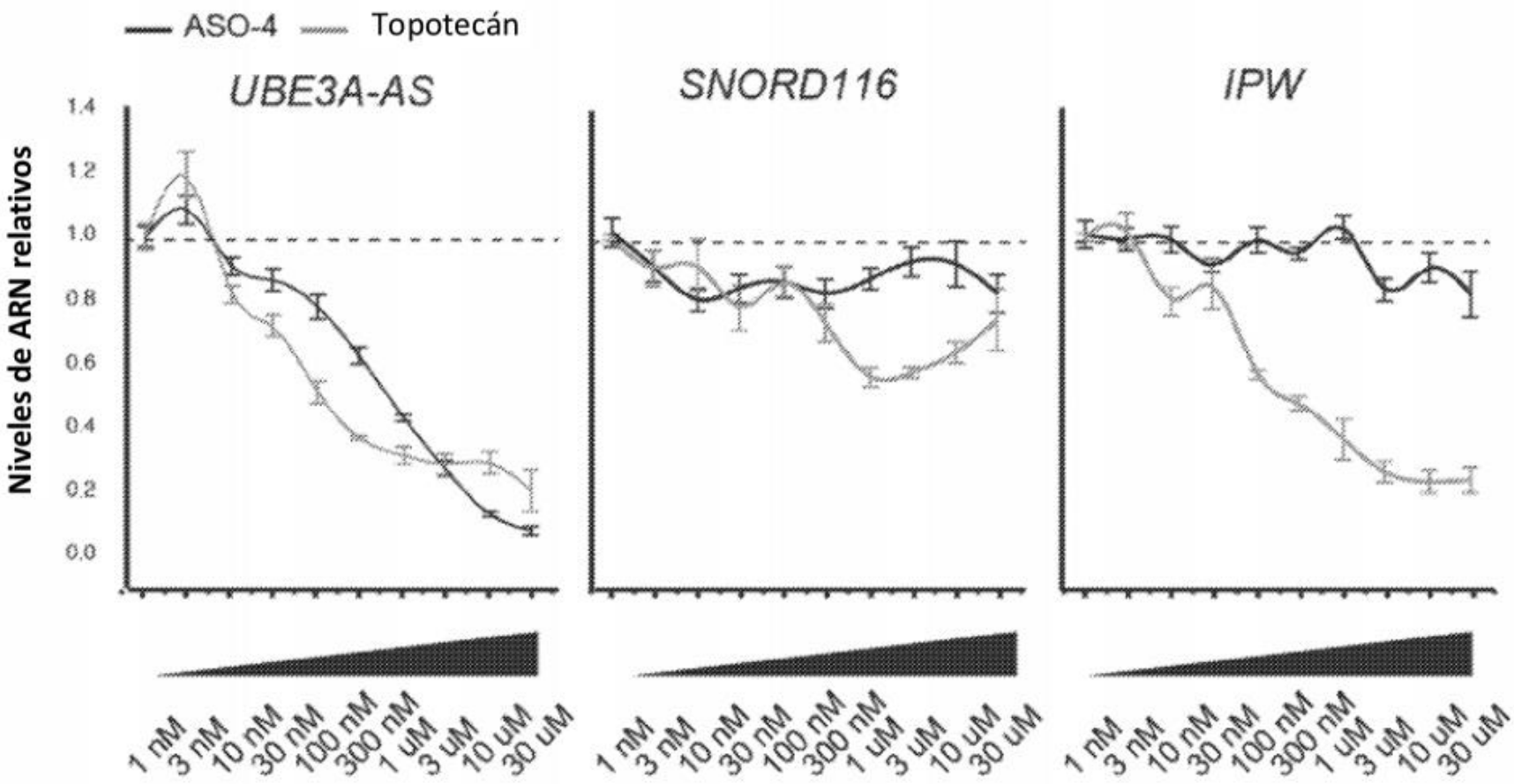


FIGURA 4A

FIGURA 4B

FIGURA 4C

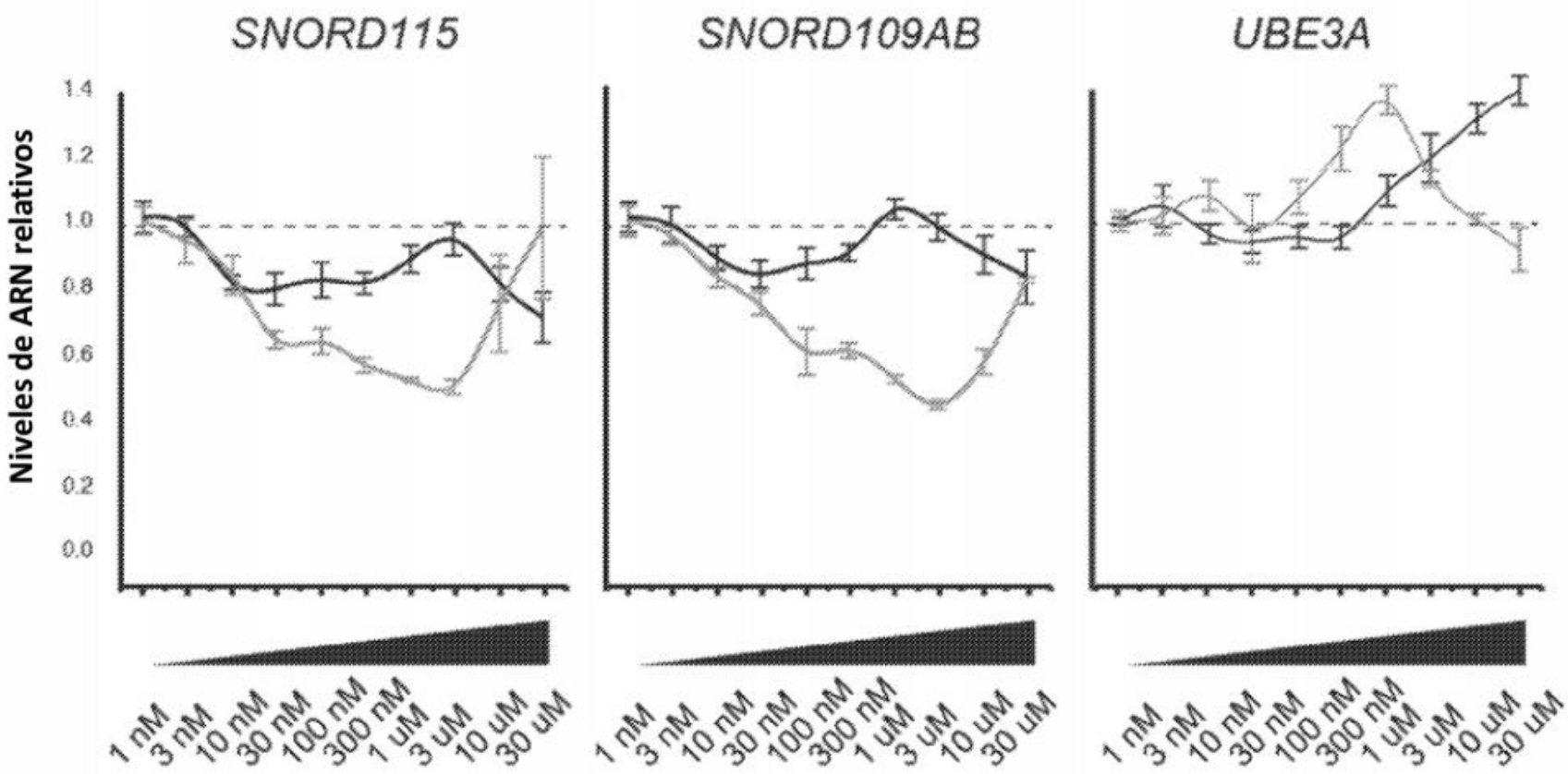


FIGURA 4D

FIGURA 4E

FIGURA 4F

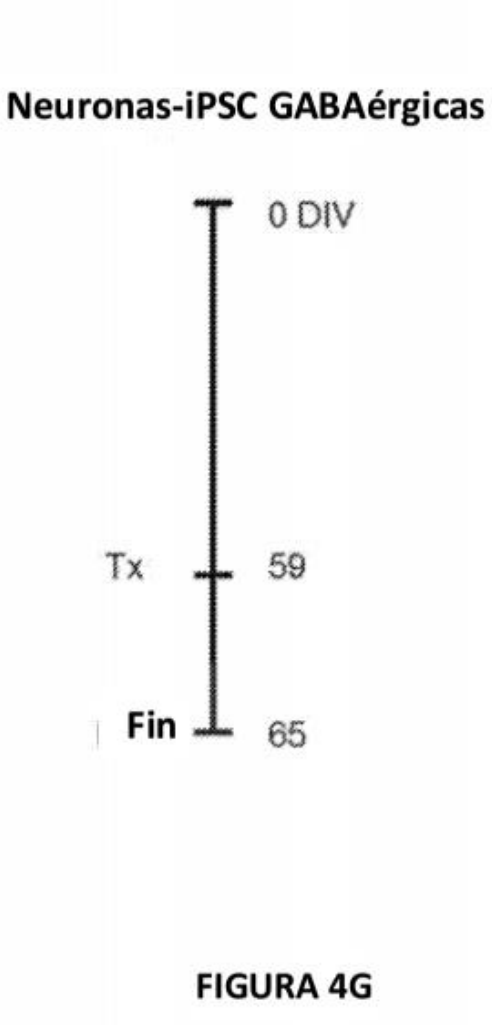


FIGURA 4G

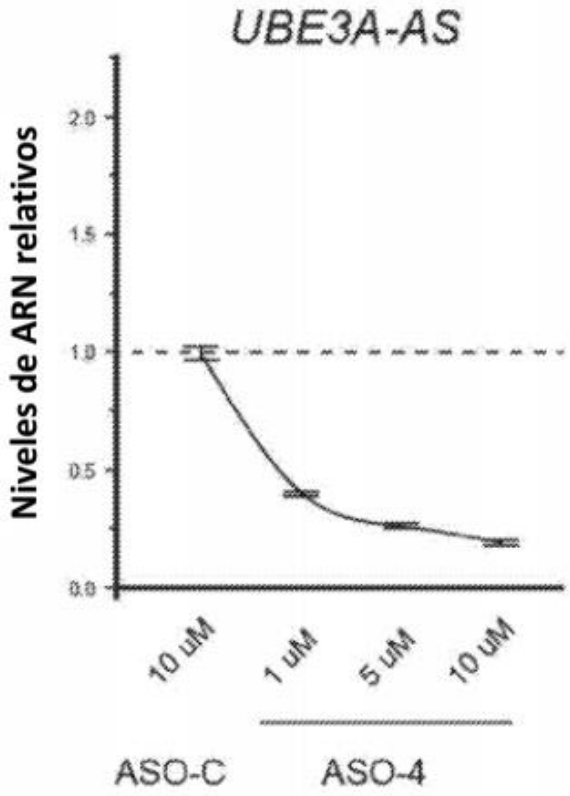


FIGURA 4H

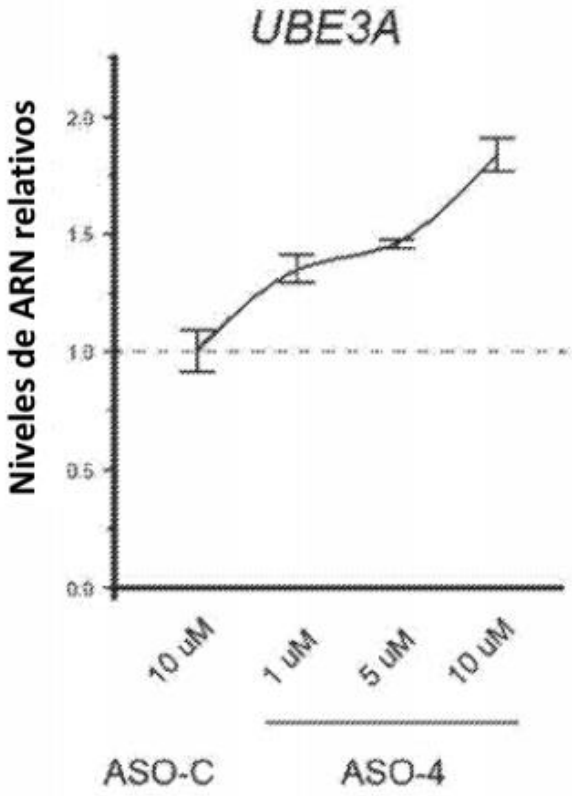


FIGURA 4I

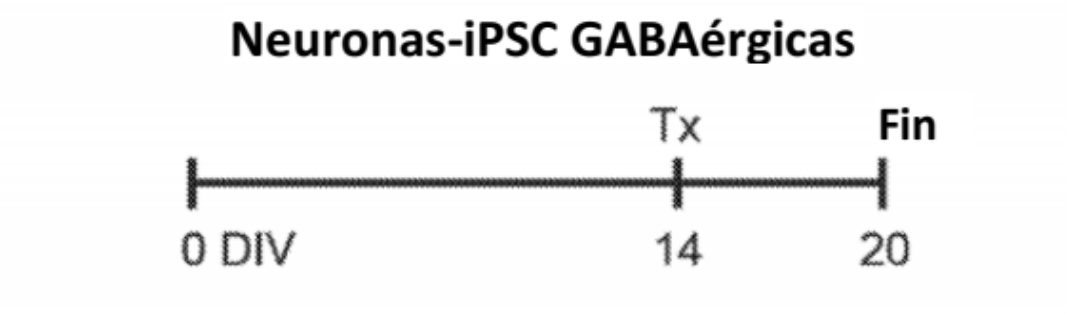


FIGURA 5A

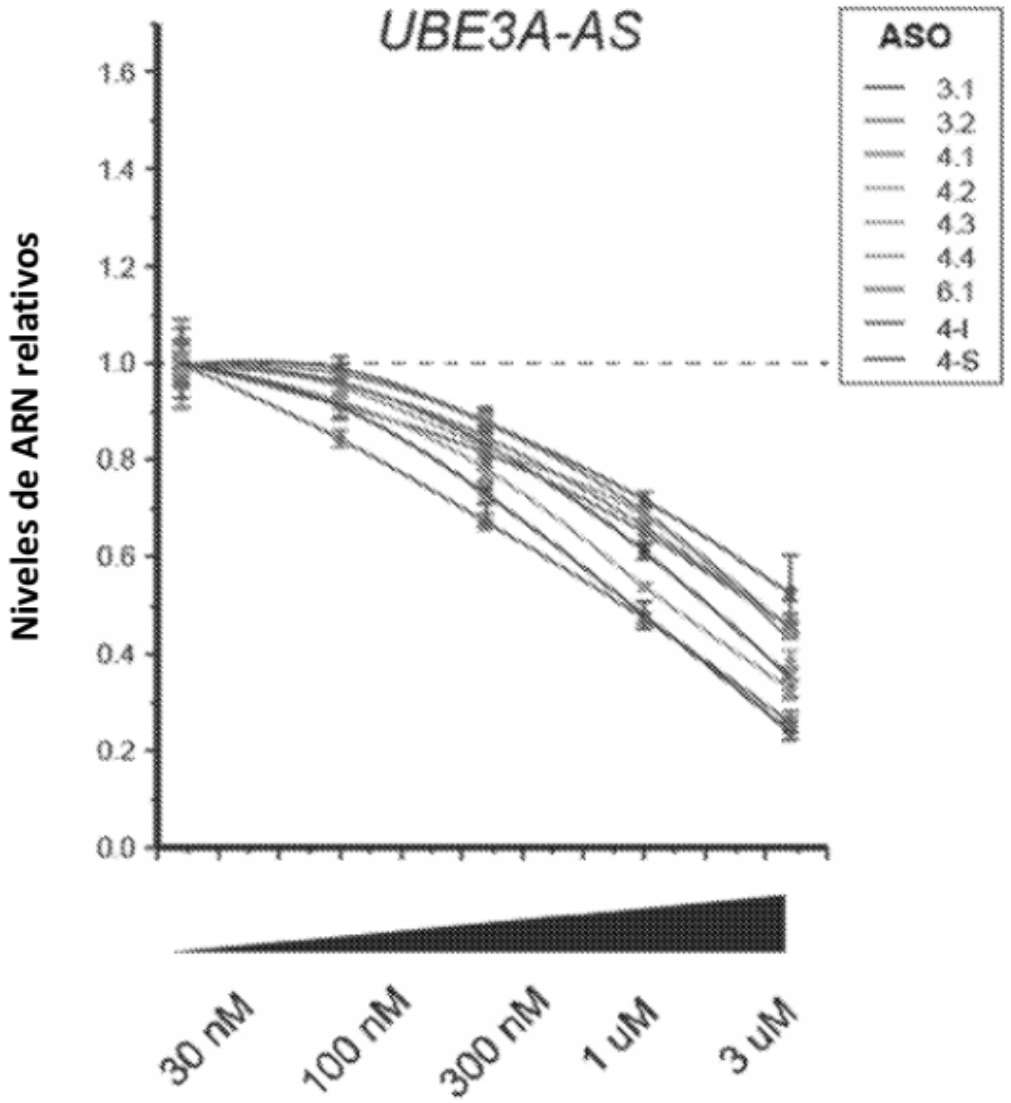


FIGURA 5B

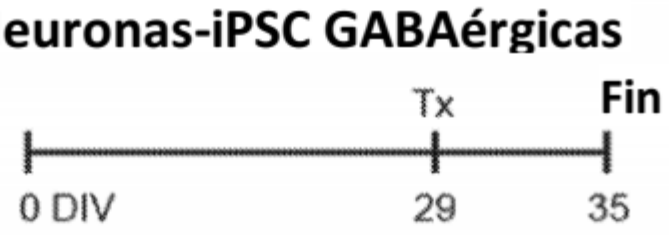


FIGURA 5C

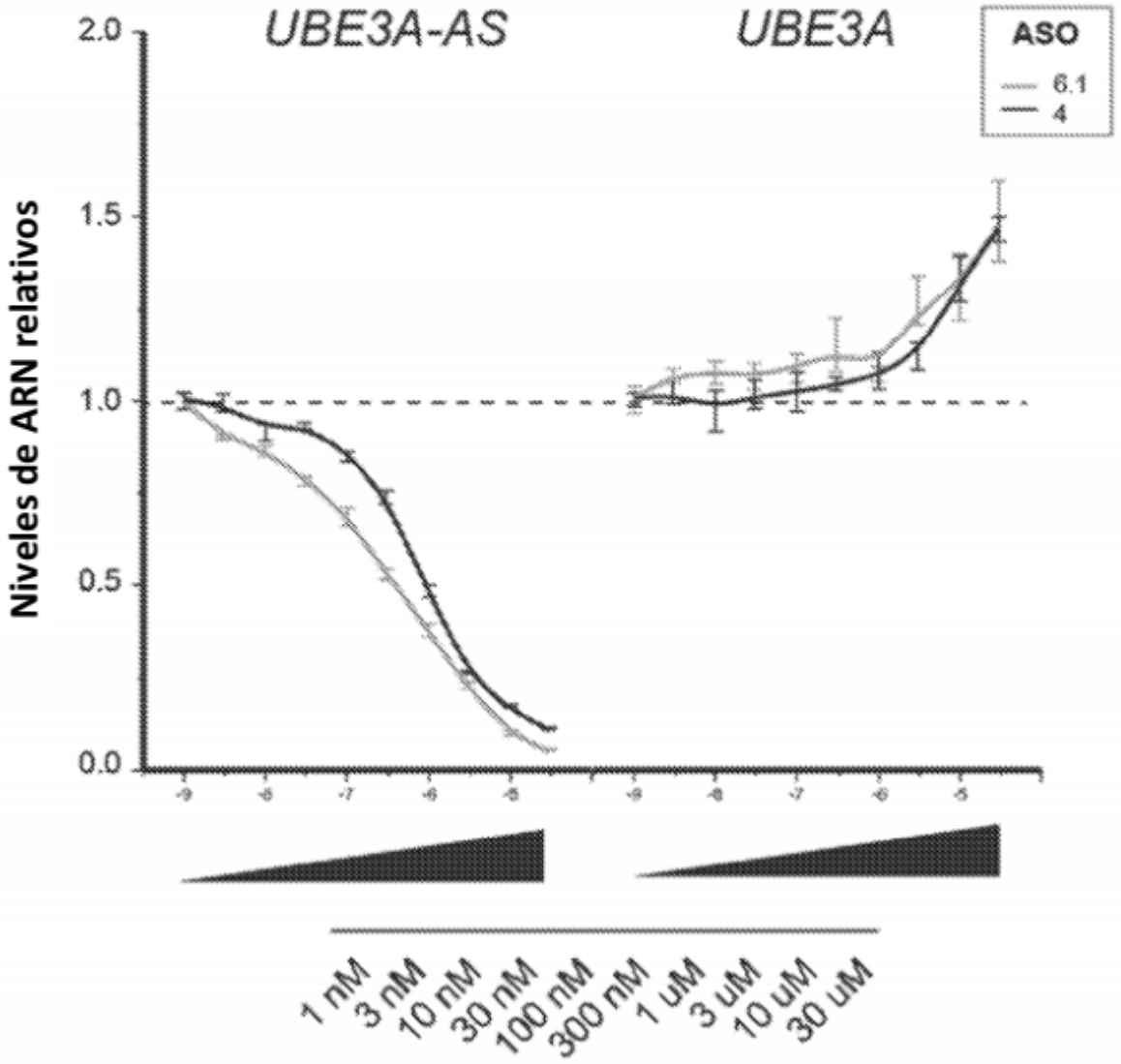


FIGURA 5D

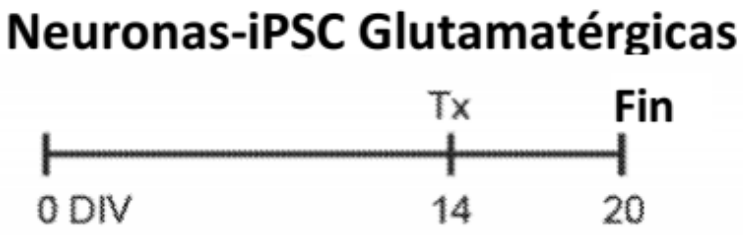


FIGURA 5E

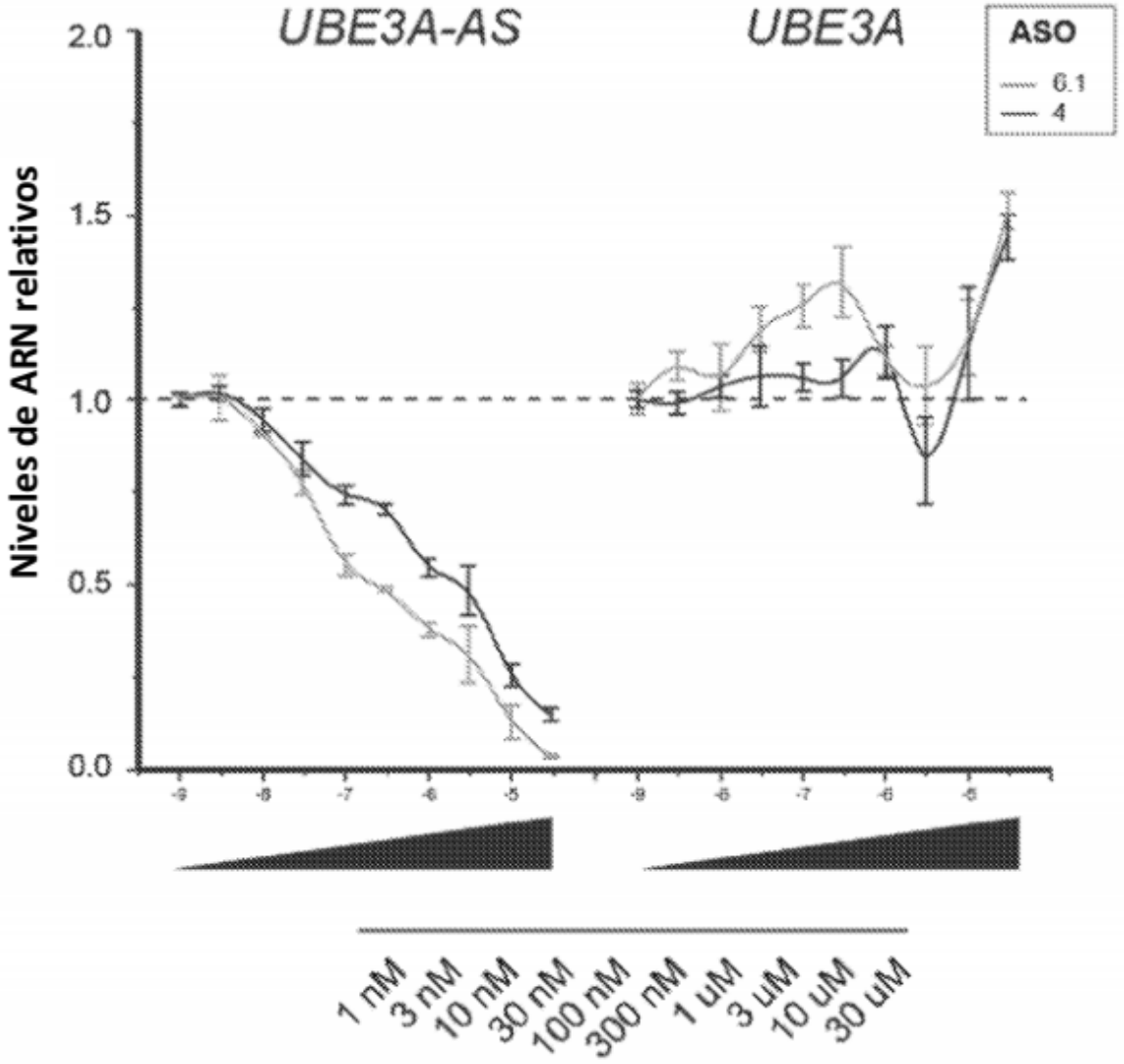


FIGURA 5F

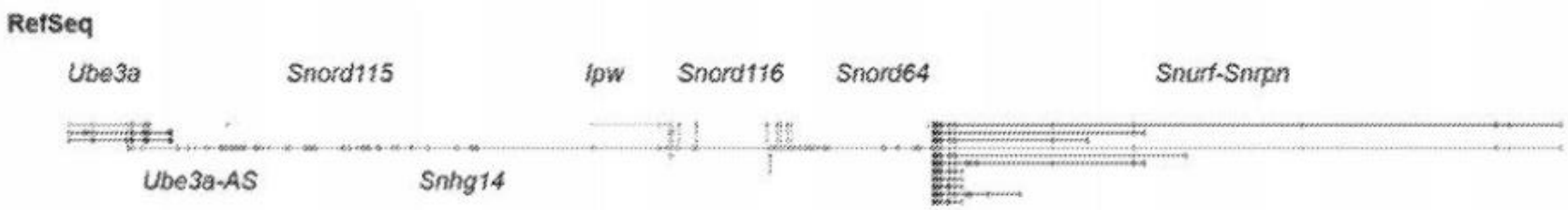


FIGURA 6A

FIGURA 6B

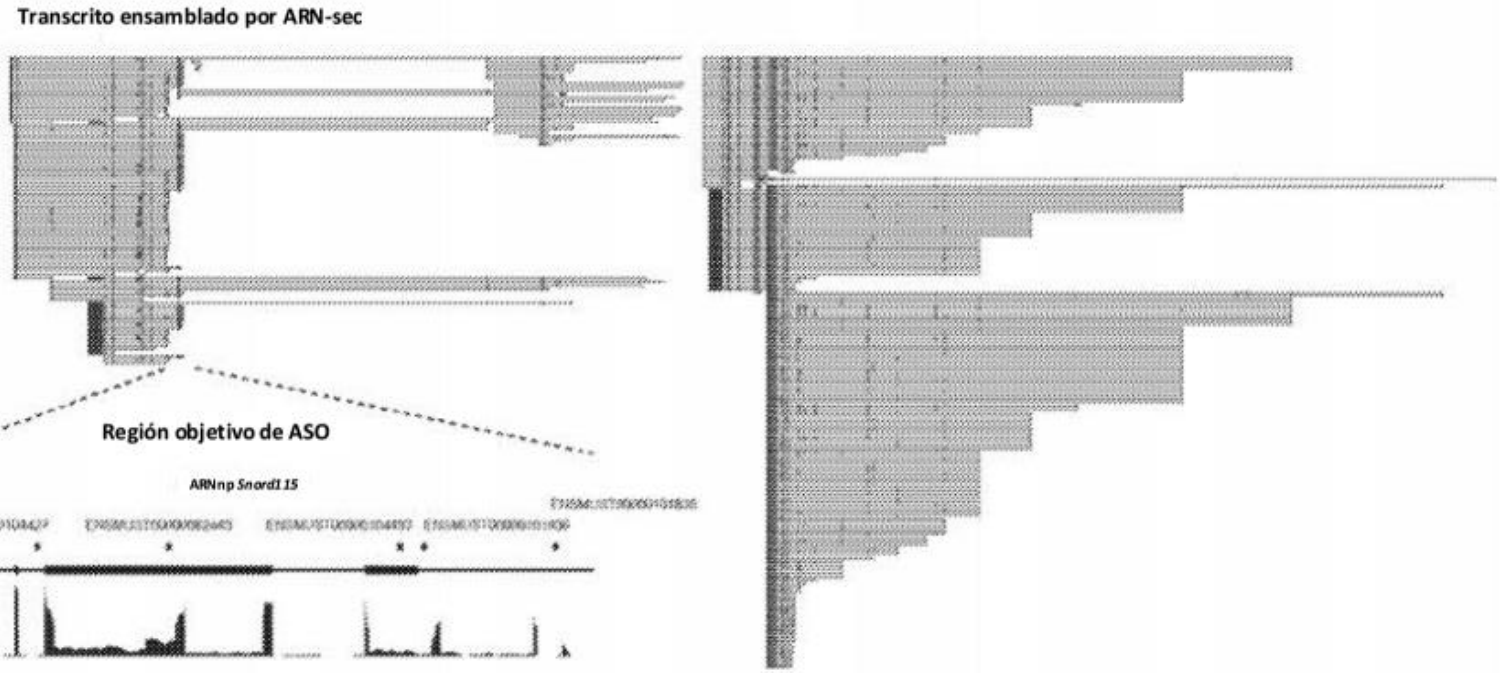


FIGURA 6C

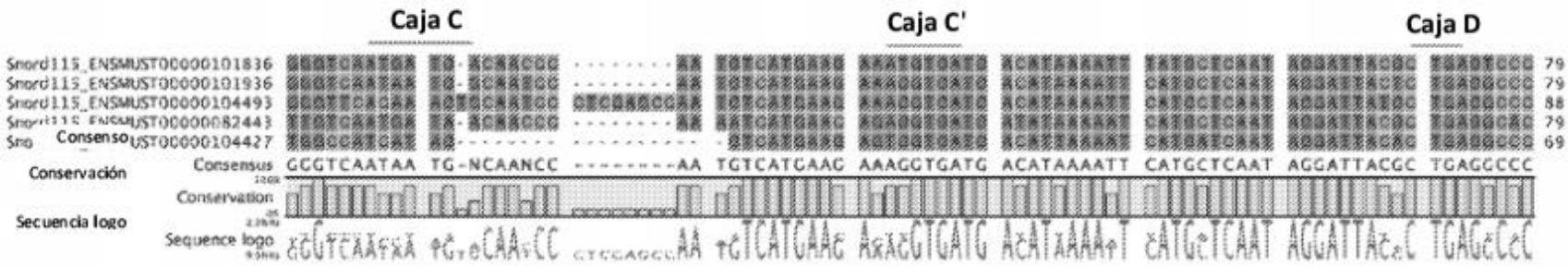


FIGURA 6D

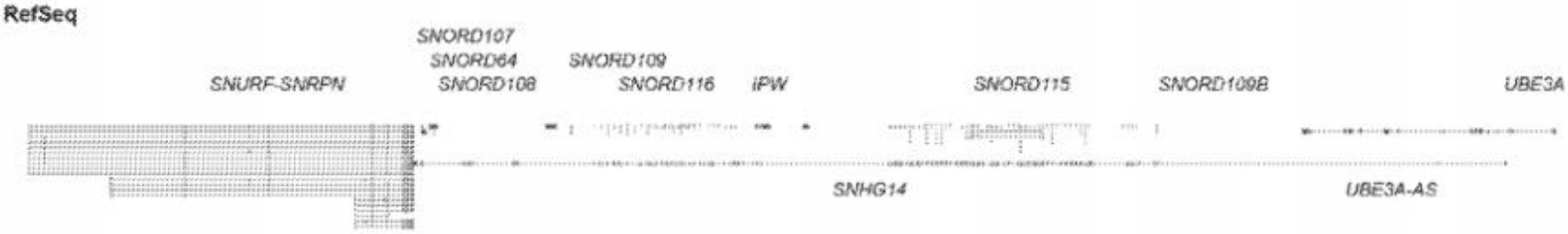


FIGURA 7A

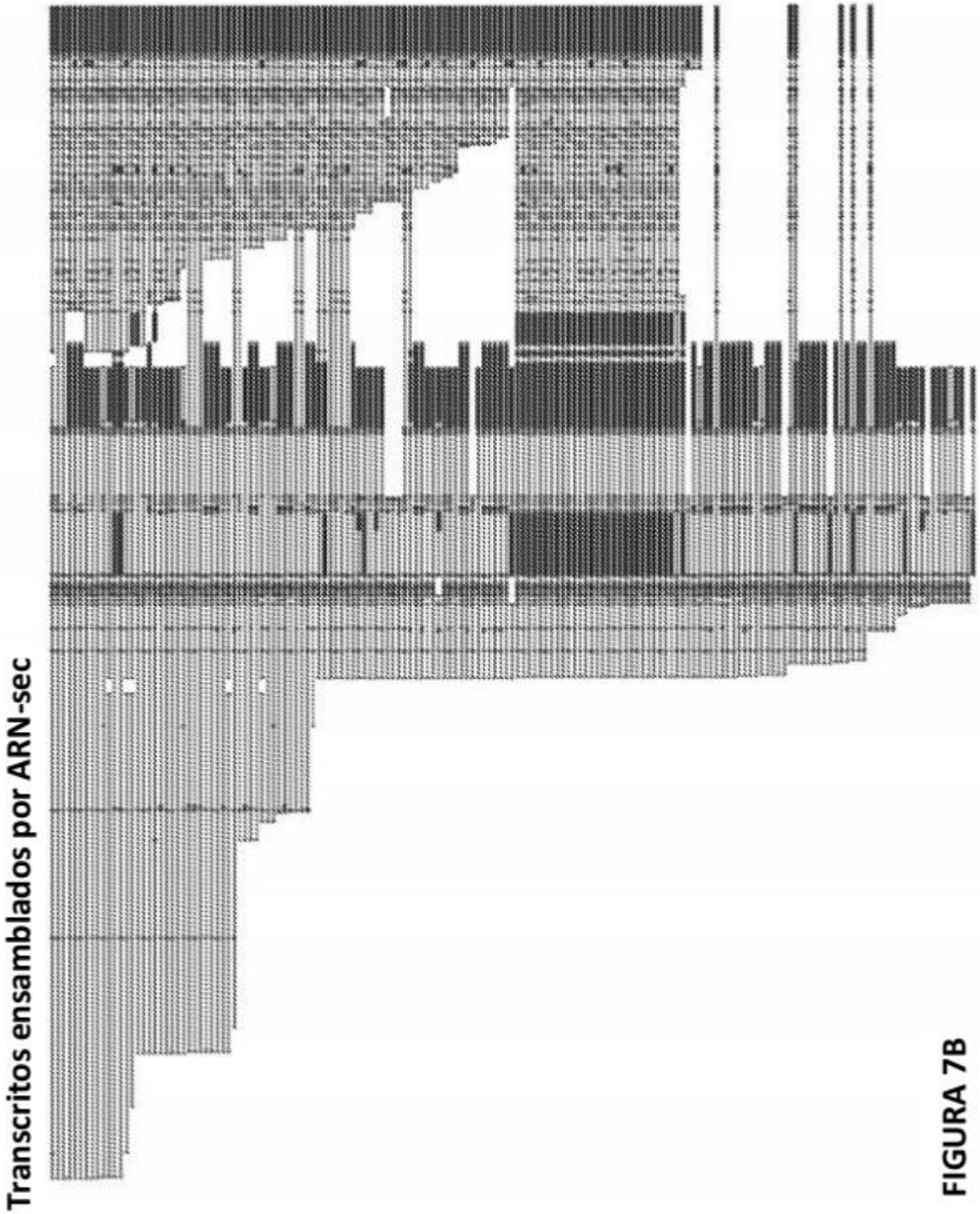


FIGURA 7B

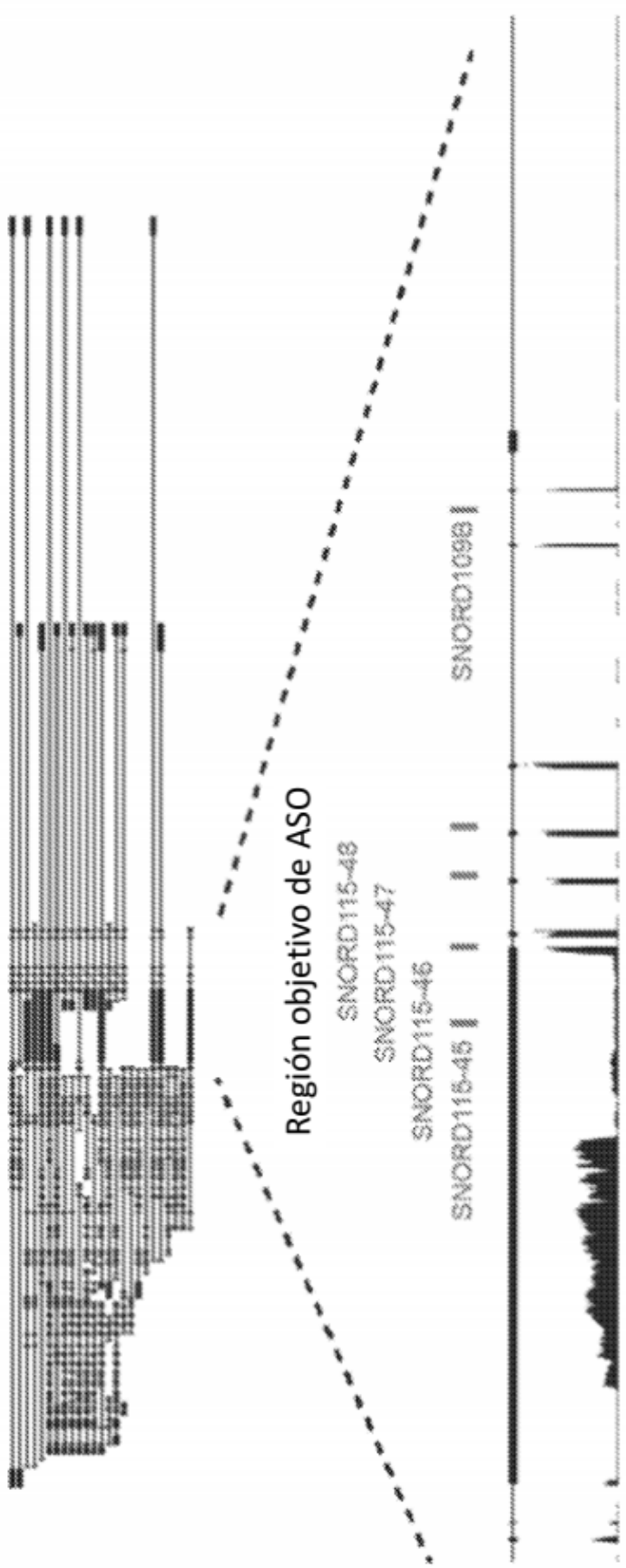
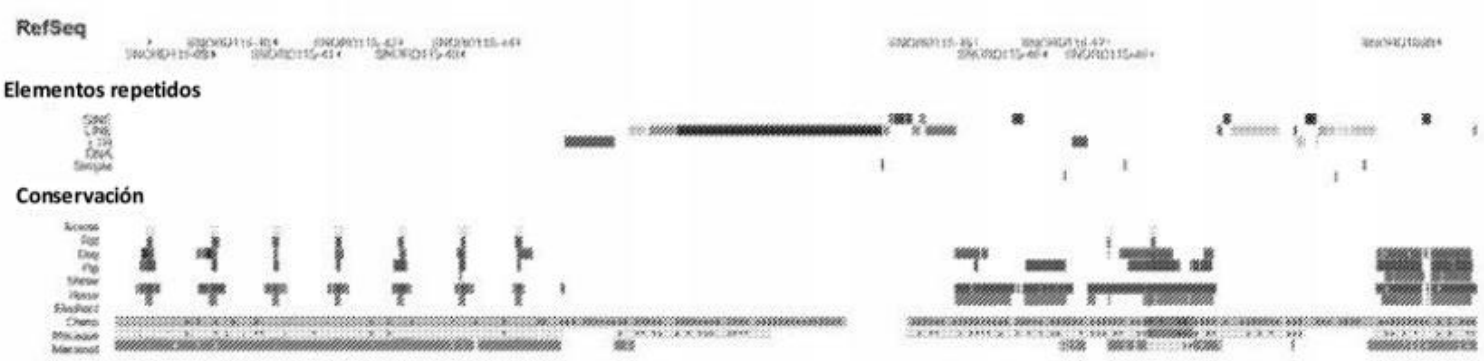

Región objetivo de ASO
SNORD115-48
SNORD115-47
SNORD115-46
SNORD115-45
SNORD109B

FIGURA 7C

FIGURA 7D

FIGURA 7E

FIGURA 7F



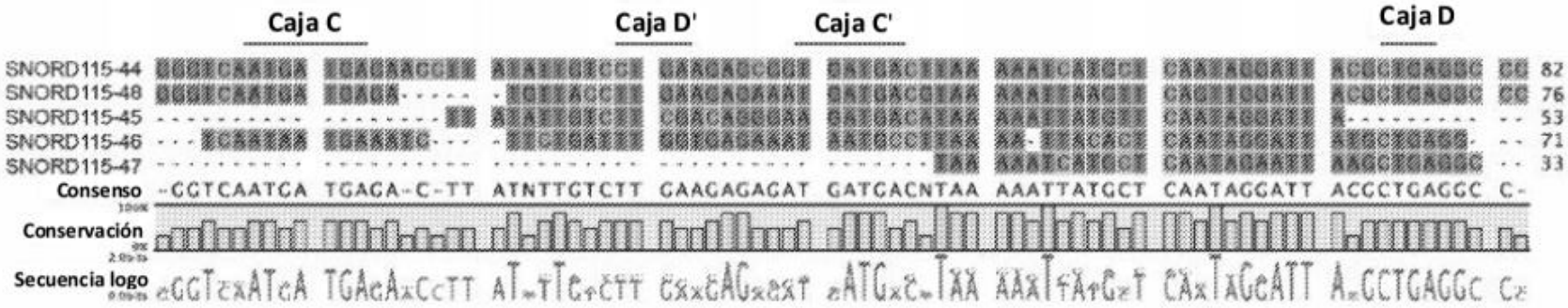


FIGURA 7G

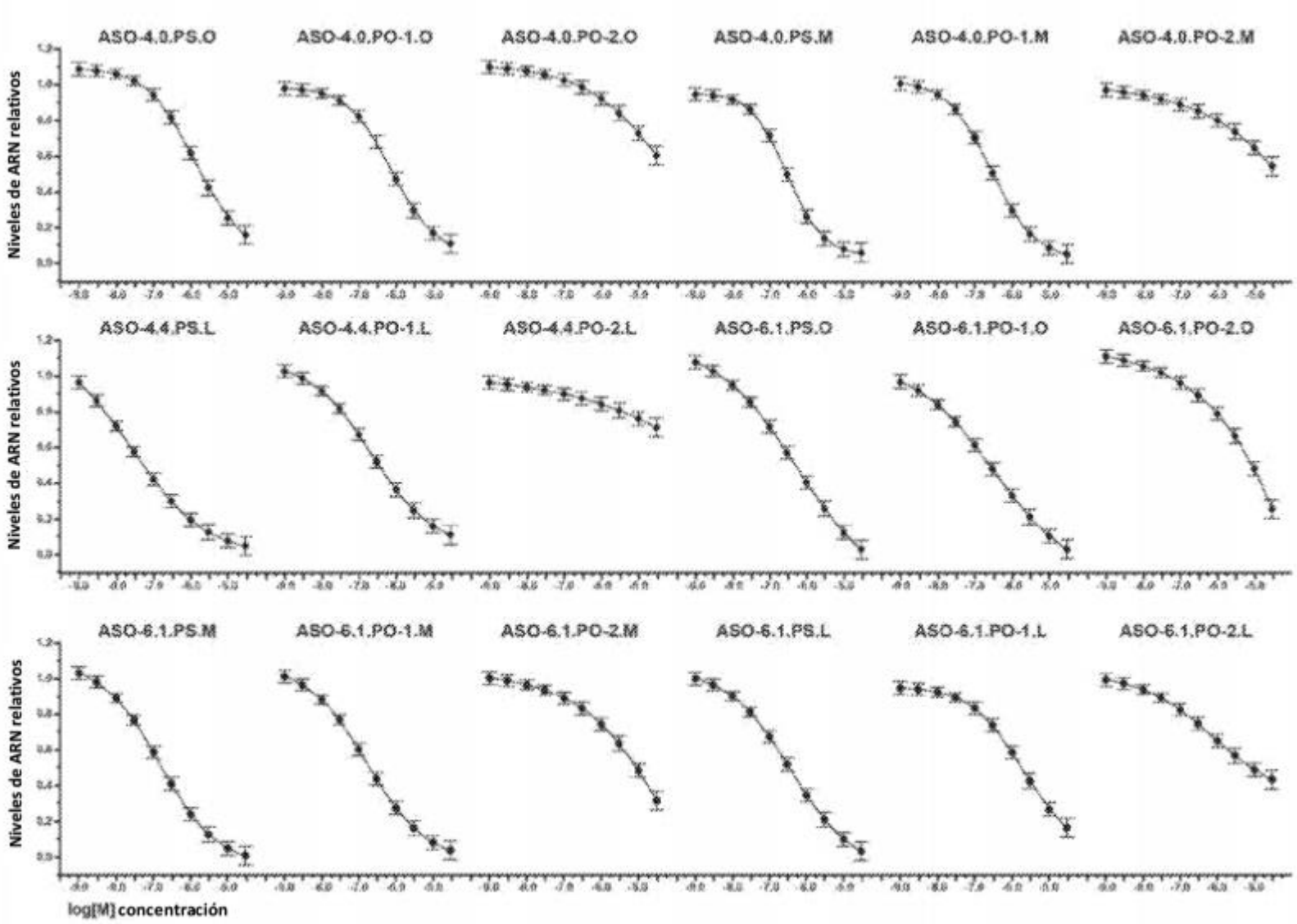

ASO-4.0.PS.O
ASO-4.0.PO-1.O
ASO-4.0.PO-2.O
ASO-4.0.PS.M
ASO-4.0.PO-1.M
ASO-4.0.PO-2.M
ASO-4.4.PS.L
ASO-4.4.PO-1.L
ASO-4.4.PO-2.L
ASO-6.1.PS.O
ASO-6.1.PO-1.O
ASO-6.1.PO-2.O
ASO-6.1.PS.M
ASO-6.1.PO-1.M
ASO-6.1.PO-2.M
ASO-6.1.PS.L
ASO-6.1.PO-1.L
ASO-6.1.PO-2.L
Niveles de ARN relativos
log[M] concentración

FIGURA 8A

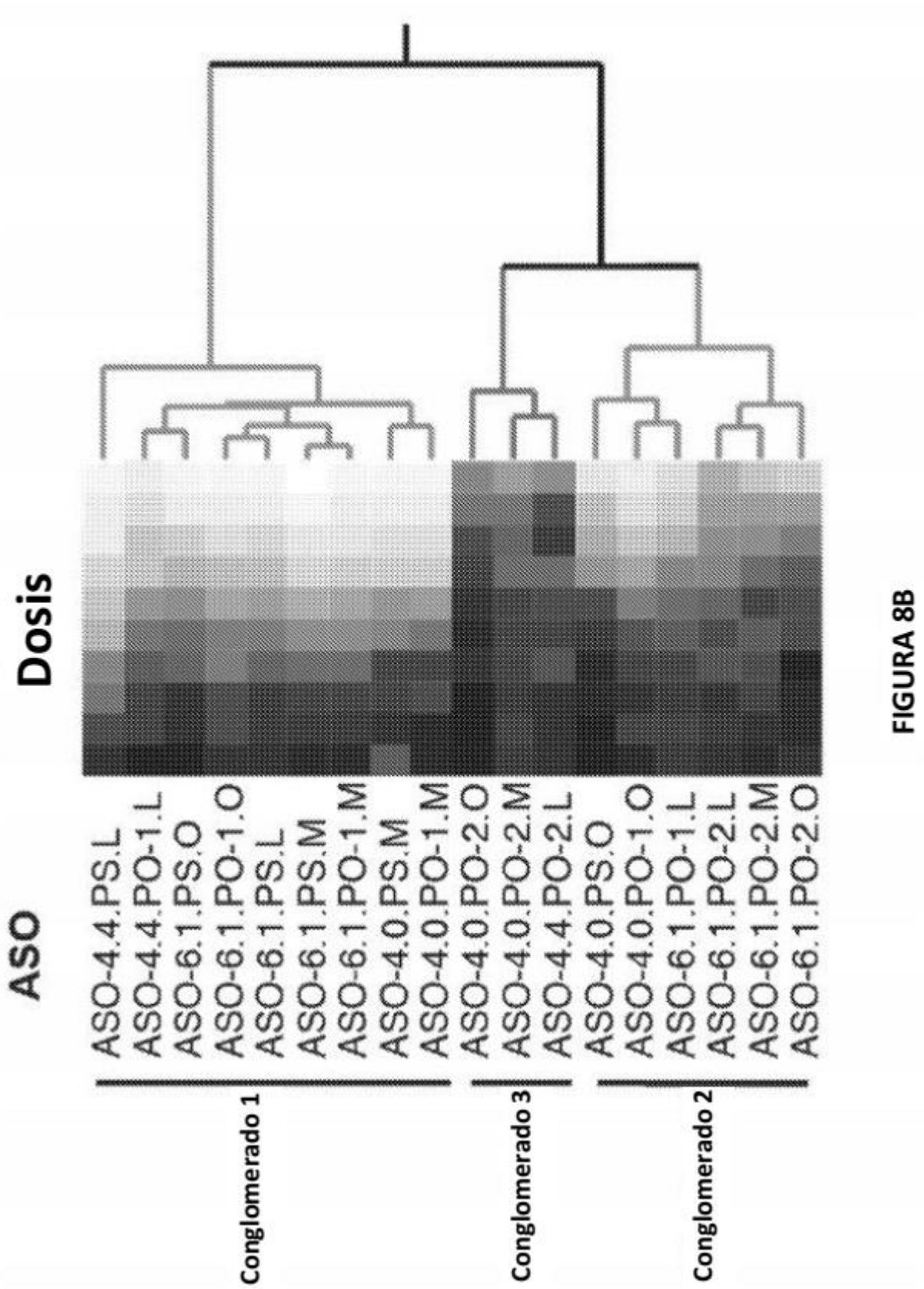

ASO
Dosis
ASO-4.4.PS.L
ASO-4.4.PO-1.L
ASO-6.1.PS.O
ASO-6.1.PO-1.O
ASO-6.1.PS.L
ASO-6.1.PS.M
ASO-6.1.PO-1.M
ASO-4.0.PS.M
ASO-4.0.PO-1.M
ASO-4.0.PO-2.O
ASO-4.0.PO-2.M
ASO-4.4.PO-2.L
ASO-4.0.PS.O
ASO-4.0.PO-1.O
ASO-6.1.PO-1.L
ASO-6.1.PO-2.L
ASO-6.1.PO-2.M
ASO-6.1.PO-2.O
Conglomerado 1
Conglomerado 3
Conglomerado 2

FIGURA 8B

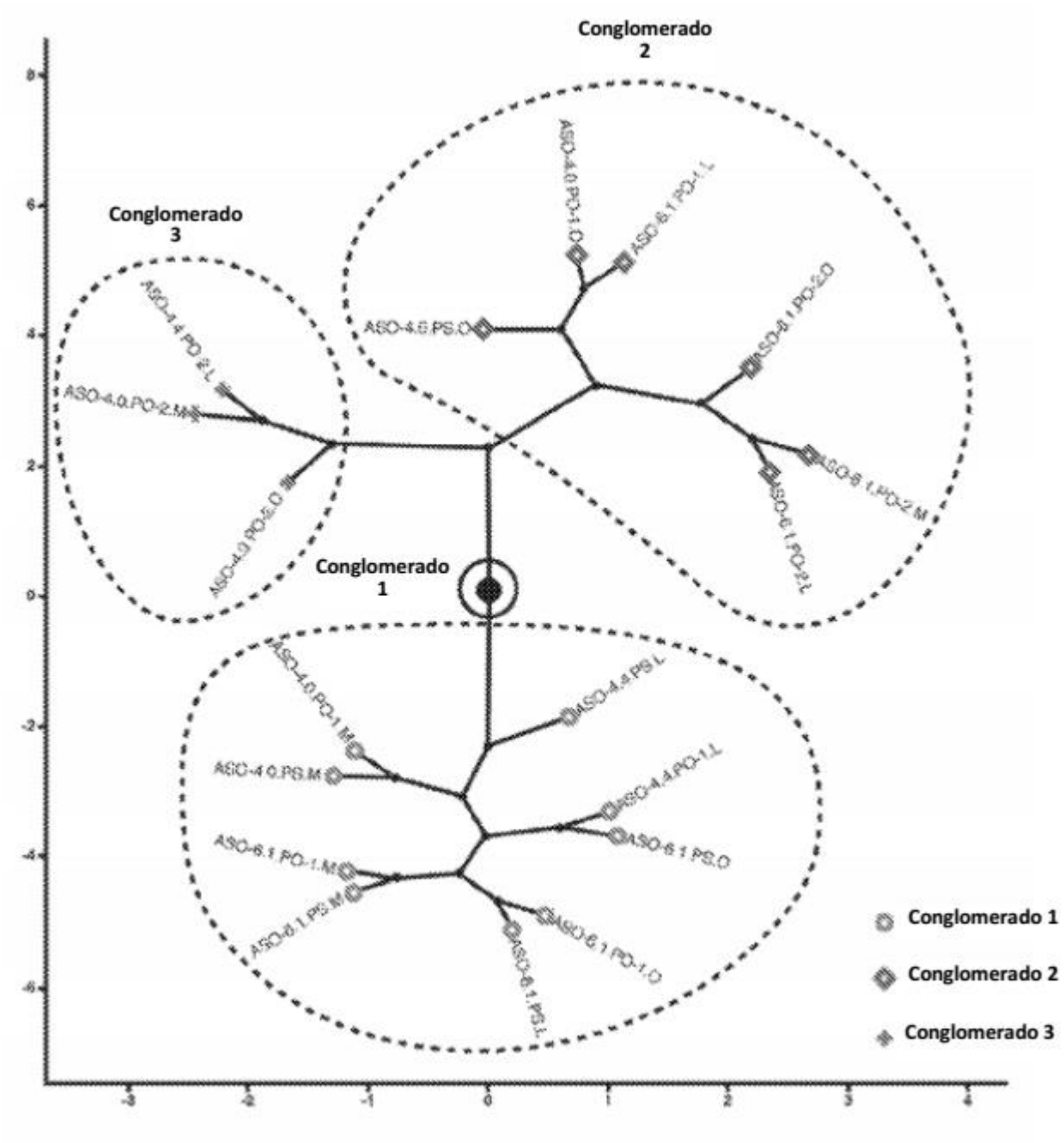

Conglomerado 2
Conglomerado 3
Conglomerado 1
ASO-4.0.PO-1.O
ASO-6.1.PO-1.L
ASO-4.6.PS.O
ASO-6.1.PO-2.O
ASO-6.1.PO-2.M
ASO-6.1.PO-2.L
ASO-4.4.PO-2.L
ASO-4.0.PO-2.M
ASO-4.0.PO-2.O
ASO-4.0.PO-1.M
ASO-4.4.PS.L
ASO-4.0.PS.M
ASO-4.4.PO-1.L
ASO-6.1.PS.O
ASO-6.1.PO-1.M
ASO-6.1.PS.M
ASO-6.1.PO-1.O
ASO-6.1.PS.L
Conglomerado 1
Conglomerado 2
Conglomerado 3

FIGURA 8C

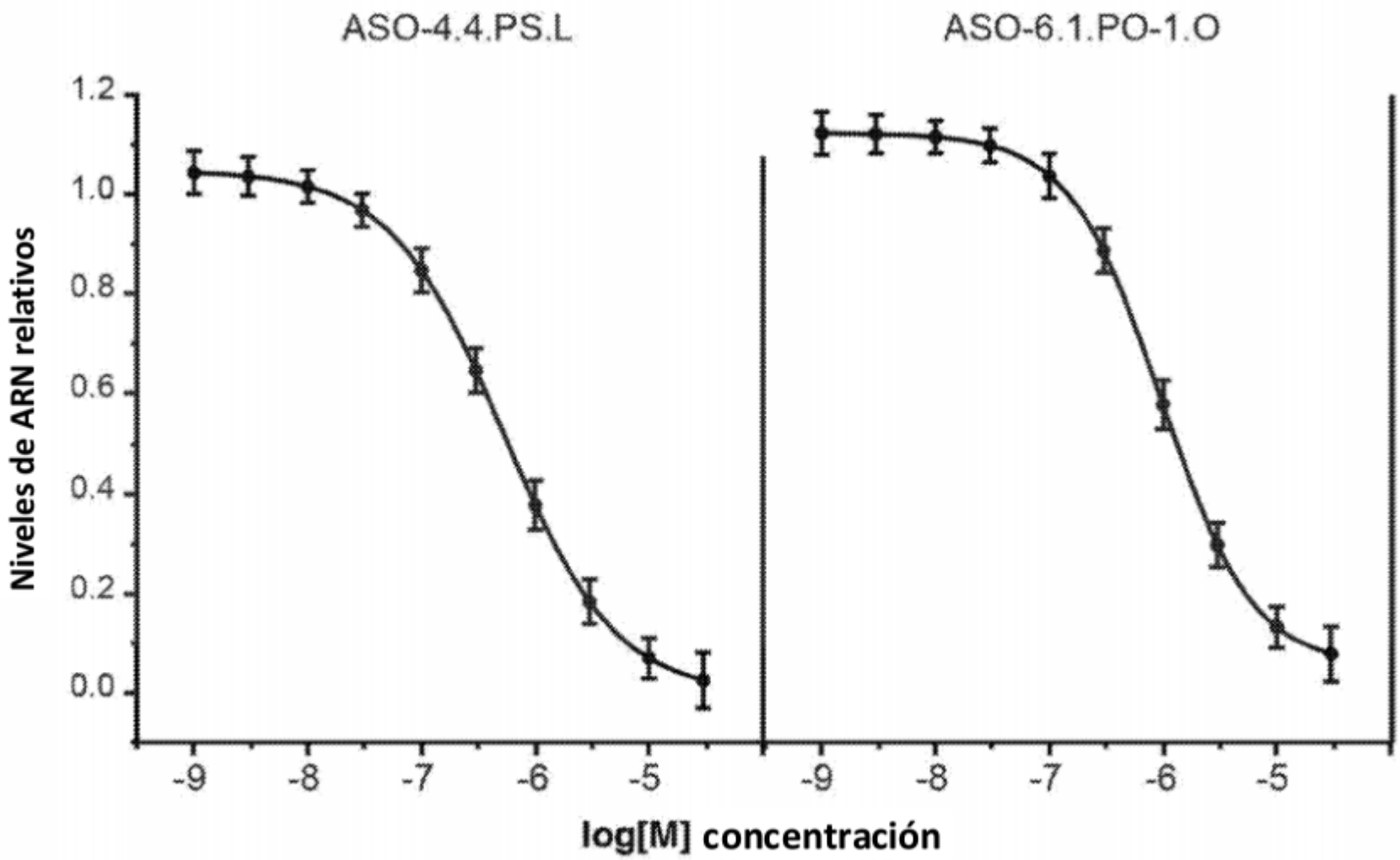

ASO-4.4.PS.L
ASO-6.1.PO-1.O
Niveles de ARN relativos
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
-9
-8
-7
-6
-5
log[M] concentración

FIGURA 9

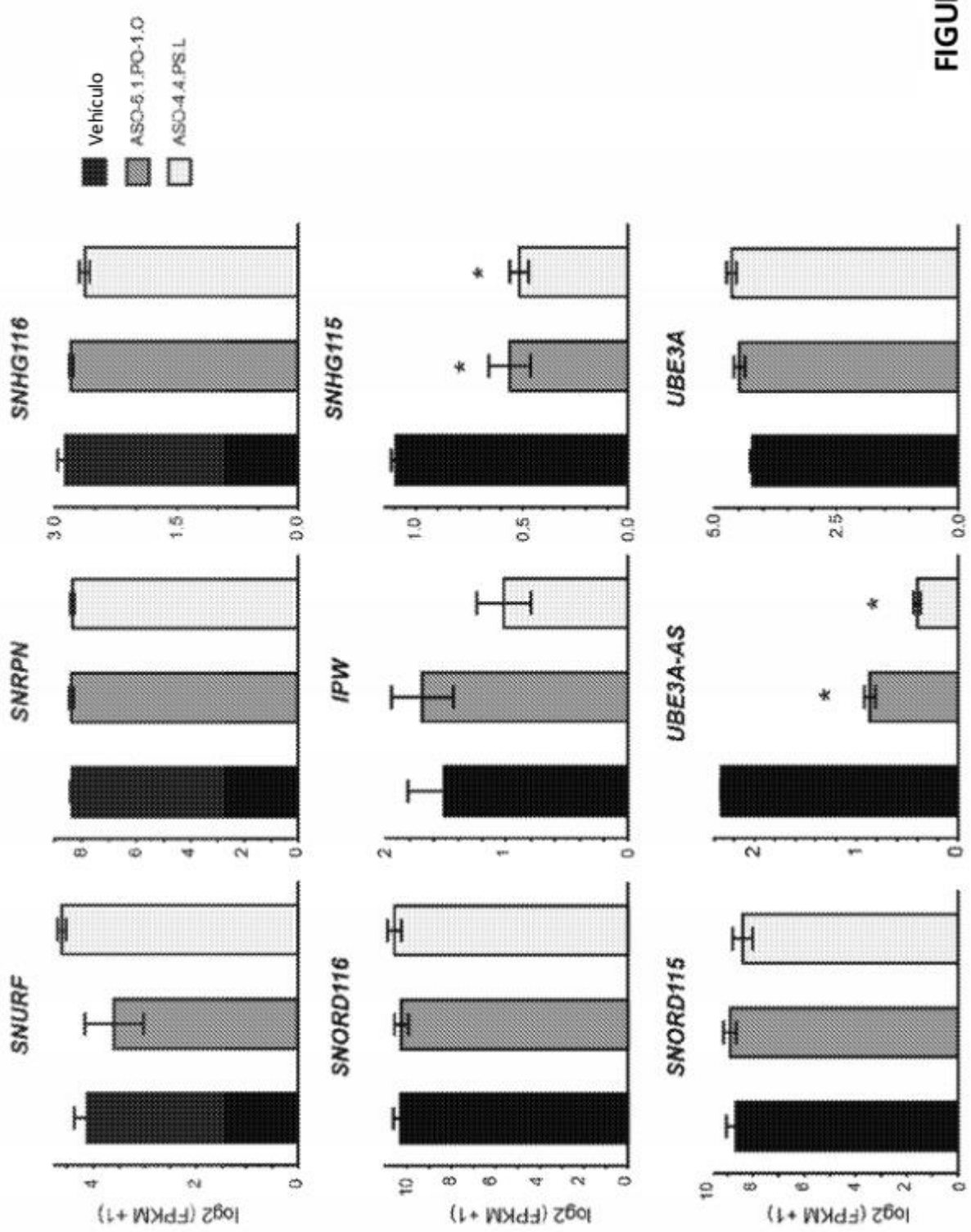

Vehículo
ASO-6.1.PO-1.O
ASO-4.4.PS.L
SNURF
SNRPN
SNHG116
SNORD116
IPW
SNHG115
SNORD115
UBE3A-AS
UBE3A
log2 (FPKM +1)
log2 (FPKM +1)
log2 (FPKM +1)

FIGURA 10

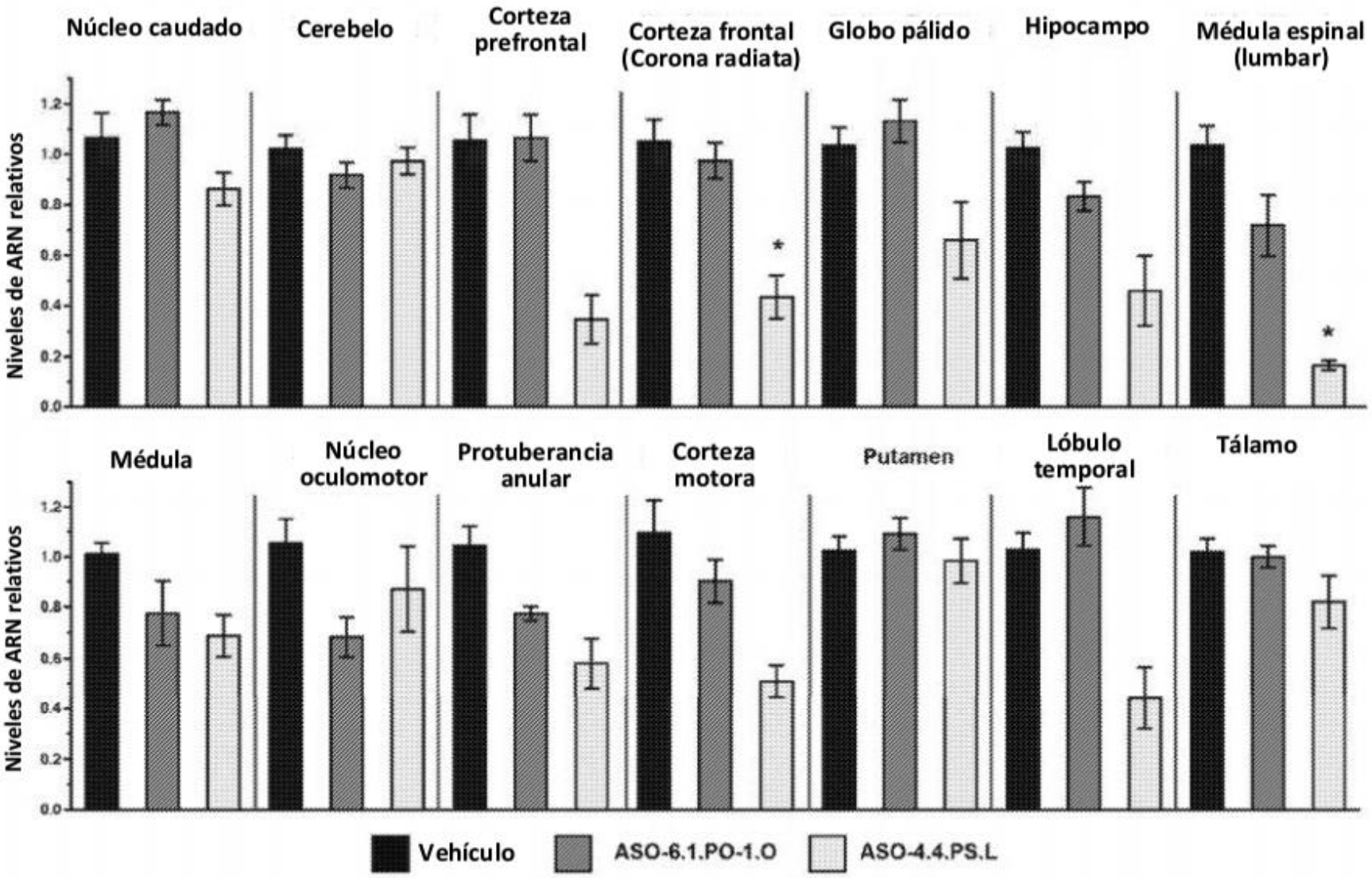

Núcleo caudado
Cerebelo
Corteza prefrontal
Corteza frontal (Corona radiata)
Globo pálido
Hipocampo
Médula espinal (lumbar)
Niveles de ARN relativos
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
*
*
Médula
Núcleo oculomotor
Protuberancia anular
Corteza motora
Putamen
Lóbulo temporal
Tálamo
Niveles de ARN relativos
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
Vehículo
ASO-6.1.PO-1.O
ASO-4.4.PS.L

FIGURA 11