

OLIGONUCLEÓTIDOS MEJORADOS QUE ACTÚAN SOBRE SITIOS DE PROTEÍNA DE UNIÓN A ARN

La presente invención se refiere a oligonucleótidos antisentido que son complementarios, tal como totalmente complementarios, de sitios diana de proteína de unión a ARN en múltiples ARN, tales como sitios de unión a TDP-43 en múltiples transcritos de ARN, y que son capaces de restablecer la funcionalidad de proteína de unión a ARN al transcrito de ARN múltiple, tal como para su uso en afecciones e indicaciones médicas en las que la proteína de unión a ARN está funcionalmente disminuida. La secuencia de nucleótidos contiguos de los oligonucleótidos antisentido comprende uno o más nucleósidos de 2'-O-metoxietil-ARN (2'-MOE) y los oligonucleótidos antisentido se unen a al menos un resto de colesterol.

ANTECEDENTES

La proteína de unión a ADN TAR 43 (TDP-43) es una proteína de unión a ARN/ADN versátil implicada en el metabolismo relacionado con ARN. La desregulación de depósitos de TDP-43 actúa como cuerpos de inclusión en el cerebro y la médula espinal de pacientes con las enfermedades de neuronas motoras: esclerosis lateral amiotrófica (ALS) y degeneración lobular frontotemporal (FTLD) (Prasad *et al.*, Front. Mol. Neurosci., 2019).

TDP-43 se ubica predominantemente en el núcleo pero también se transporta al citoplasma para algunas de sus funciones (Ayala *et al.*, 2008). En una enfermedad, tal como en ALS y FTLD, hay un aumento en la concentración citoplásmica de TDP-43, lo que produce la formación de inclusión citoplásmica (Neumann *et al.*, 2006; Winton *et al.*, 2008a). El error de ubicación citoplásmica puede asociarse a una disminución nuclear, lo que da como resultado una reducción o pérdida de función de TDP-43. Hay mutaciones de TDP-43 que dan como resultado empalme anómalo de ARN diana de TDP-43, lo que produce una anomalía de empalme expandido (ver por ejemplo Arnold *et al.*, PNAS 2013 110 E736–745 y Yang *et al.*, PNAS. U.S.A. 111, E1121–E1129).

Klim *et al.* informan que la pérdida de STMN2 tras una función reducida de TDP-43 se debe al empalme alterado de STMN2, y sugiere el restablecimiento de STMN2 como una estrategia terapéutica para ALS.

La disminución de TDP-43 se indica en un rango de enfermedades, denominadas patologías de TDP-43, e incluye, por ejemplo, enfermedades tales como esclerosis lateral amiotrófica (ALS), degeneración lobular frontotemporal (FTLD), parálisis

supranuclear progresiva (PSP), esclerosis lateral primaria, atrofia muscular progresiva, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, autismo, demencia por esclerosis del hipocampo, síndrome de Down, enfermedad de Huntington, enfermedades de poliglutamina, tales como ataxia espinocerebelosa 3, miopatías y encefalopatía traumática crónica.

Tollervey *et al.*, Nature Neuroscience 2010, 452-458 informan sobre la caracterización de dianas de ARN y regulación de empalme dependiente de la posición de TDP-43 en tejido cerebral sano y tejido cerebral de pacientes con FTLD. La mayoría de los sitios de unión a TDP-43 se mapearon en intrones, ARN no codificantes largos (lncARN) y transcritos intergénicos, que se enriquecieron para motivos ricos en UG. Los segmentos de RNP conservados en TDP-43 participan de la unión a secuencias de ADN de TAR y secuencias de ARN con repeticiones de UG (Ayala *et al.*, J. Mol. Biol. 2005;348:575–588). La disminución de TDP-43 en células, tal como en patologías de TDP se correlaciona con la pérdida de unión a ARN de TDP-43 a dianas de ARN de TDP-43.

Los sitios de unión a TDP-43 en ARN humano están disponibles en línea de la A daTabase of RNA binding proteins and associated moTifs – ver <https://attract.cnisc.es/results/e9f29380-8921-406e-84a8-27ce9b9398b4#>.

Determinados sitios de unión a TDP-43 de ARN humano caracterizados divulgados incluyen las siguientes secuencias de ARN: GUGAAUGA, GUUGUGC, UGUGUGUGUGUG (SEQ ID NO 85), GAAUGG, UGUGUGUG, GAAUGA, UGUGUG, GUUGUUC y GUUUUGC.

Melamed *et al.* informan sobre la pérdida prematura mediada por poliadenilación de STMN2 como una característica distintiva de la neurodegeneración de TDP-43. El documento WO2019/241648 divulga ASO de 2'O-metoxietilo para aumentar la expresión de STMN2.

Los inventores de la presente identificaron oligonucleótidos antisentido que son complementarios, tal como totalmente complementarios, de sitios de unión de ácidos nucleicos de TDP-43 y son capaces de restablecer el procesamiento o la regulación de dianas de transcritos de ARN de TDP-43, por ejemplo, la expresión y el empalme de transcritos de ARN, que se desregulan en células que muestran pérdida de función de TDP-43 y, por lo tanto, proporcionan un enfoque novedoso para restablecer la funcionalidad de TDP-43 en células con disminución de TDP-43 (es decir, células con una pérdida de función de TDP-43), así como un enfoque terapéutico novedoso para el tratamiento de patologías de TDP-43.

Los inventores determinaron que es posible, mediante modificaciones, reducir la toxicidad de los oligonucleótidos antisentido mientras se mantiene o mejora la potencia.

OBJETO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a oligonucleótidos antisentido que son complementarios a sitios de unión a TDP-43 conservados en transcritos de pre-ARNm, que son capaces de restablecer la función de proteína de unión a ARN en el procesamiento de múltiples ARNm independientes en células con TDP-43 disminuida. La secuencia de nucleótidos contiguos de los oligonucleótidos antisentido comprende uno o más nucleósidos de 2'-O-metoxietil-ARN (2'-MOE) y los oligonucleótidos antisentido se unen a al menos un resto de colesterol.

La presente invención proporciona oligonucleótidos antisentido para restablecer la funcionalidad de proteína de unión a ARN, tal como la funcionalidad de TDP-43, o funcionalidad tipo TDP-43, en células que tienen un nivel reducido de TDP-43 en funcionamiento.

La presente invención proporciona oligonucleótidos que son capaces de restablecer la función nuclear de TDP-43 en el procesamiento de ARN o la expresión de uno o más ARN diana de TDP-43, y por lo tanto, restablecen, al menos parcialmente, o potencian, el fenotipo funcional del(de los) ARN diana de TDP-43. Dichos compuestos de oligonucleótido se denominan en el presente documento imitación de proteína de unión a ARN, tal como imitación de TDP-43.

La presente invención proporciona oligonucleótidos antisentido que son complementarios de sitios de unión a TDP-43, y su uso en tratamientos, tal como para el tratamiento de patologías de TDP-43.

La presente invención proporciona, además, oligonucleótidos antisentido que son complementarios de sitios de unión a TDP-43 en múltiples transcritos de ARN, es decir, transcritos de ARN que se transcriben de distintos locus genéticos. Los múltiples transcritos de ARN pueden, por ejemplo, seleccionarse de manera independiente del grupo que consiste en pre-ARNm, ARNm e lncARN.

SUMARIO DE LA INVENCION

La invención proporciona un oligonucleótido antisentido de 8 a 40 nucleótidos de longitud, que comprende una secuencia de nucleótidos contiguos de al menos 8 nucleótidos de longitud que es complementaria a una secuencia seleccionada del

grupo que consiste en (5'–3') (UG)_n, (GU)_n, en donde n es 4–20, UGUGUGUG, UGUGUGUGU, UGUGUGUGUG (SEQ ID NO 95), UGUGUGUGUGU (SEQ ID NO 84), UGUGUGUGUGUG (SEQ ID NO 85), UGUGUGUGUGUGU (SEQ ID NO 86), GUGUGUGU, GUGUGUGUG, GUGUGUGUGU (SEQ ID NO 87), GUGUGUGUGUG (SEQ ID NO 88), GUGUGUGUGUGU (SEQ ID NO 89), GUGUGUGUGUGUG (SEQ ID NO 90), y GUGAAUGA, en que la secuencia de nucleótidos contiguos comprende uno o más nucleósidos de 2'-O-metoxietil-ARN (2'-MOE) y en donde el oligonucleótido antisentido se une a al menos un resto de colesterol.

En algunos modos de realización el oligonucleótido antisentido, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, puede comprender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 o 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 nucleósidos 2'-O-metoxietil-ARN (2'-MOE).

En algunos modos de realización el oligonucleótido antisentido, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, puede comprender al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 % o 100 % de nucleósidos de 2'-O-metoxietil-ARN (2'-MOE).

En algunos modos de realización todos los nucleósidos de la secuencia de nucleótidos contiguos, o la secuencia contigua de estos, pueden ser nucleósidos 2'-O-metoxietil-ARN (2'-MOE).

En algunos modos de realización el oligonucleótido antisentido puede unirse a dos o más o tres o más restos de colesterol. En algunos modos de realización el oligonucleótido antisentido puede unirse a un resto de colesterol. En algunos modos de realización el oligonucleótido antisentido puede unirse a dos restos de colesterol. En algunos modos de realización el oligonucleótido antisentido puede unirse a tres restos de colesterol.

En algunos modos de realización el resto de colesterol o los restos de colesterol pueden unirse covalentemente al oligonucleótido antisentido.

En algunos modos de realización el resto de colesterol puede seleccionarse del grupo que comprende: fosforamidita de 5'-colesterol-TEG-CE, fosforamidita de 5'-colesterol-CE o fosforamidita de colesteril-TEG-CE. En algunos modos de realización los restos de colesterol pueden ser una combinación seleccionada del grupo que comprende: fosforamidita de 5'-colesterol-TEG-CE, fosforamidita de 5'-colesterol-CE o fosforamidita de colesteril-TEG-CE. En algunos modos de realización el resto de

colesterol es fosforamidita de 5'-colesterol-TEG-CE. En algunos modos de realización todos los restos de colesterol son fosforamidita de 5'-colesterol-TEG-CE.

En los modos de realización en las que está presente más de un resto de colesterol, cada resto de colesterol se selecciona independientemente de manera tal que los restos de colesterol dentro de un oligonucleótido antisentido pueden o no ser iguales.

En algunos modos de realización un conector puede ubicarse entre el oligonucleótido antisentido y el resto de colesterol. En algunos modos de realización puede ubicarse un conector entre el oligonucleótido antisentido y cada una de los restos de colesterol. En algunos modos de realización puede ubicarse un conector entre cada una de los restos de colesterol.

En algunos modos de realización el conector puede ser un conector escindible.

En algunos modos de realización el conector puede ser un conector fisiológicamente lábil, tal como un conector susceptible a la nucleasa S1.

En algunos modos de realización se ubica un conector de grupo alquilo entre el oligonucleótido antisentido y el resto de colesterol o restos de colesterol.

En algunos modos de realización el conector fisiológicamente lábil es un dinucleótido de citidina-adenosina enlazado con fosfodiéster con tres enlaces fosfodiéster consecutivos.

En algunos modos de realización un grupo alquilo C3 es un conector situado entre el oligonucleótido antisentido y el resto de colesterol o restos de colesterol. En algunos modos de realización un grupo alquilo C3 se ubica entre el oligonucleótido antisentido y otro conector.

En algunos modos de realización un grupo alquilo C6 es un conector situado entre el oligonucleótido antisentido y el resto de colesterol o restos de colesterol. En algunos modos de realización un grupo alquilo C6 se ubica entre el oligonucleótido antisentido y otro conector.

En algunos modos de realización un grupo alquilo C12 es un conector situado entre el oligonucleótido antisentido y el resto de colesterol o restos de colesterol. En algunos modos de realización un grupo alquilo C12 se ubica entre el oligonucleótido antisentido y otro conector.

En algunos modos de realización un grupo TEG es un conector colocado entre el oligonucleótido antisentido y el resto de colesterol o restos de colesterol. En algunos modos de realización otro grupo TEG se ubica entre el oligonucleótido antisentido y otro conector.

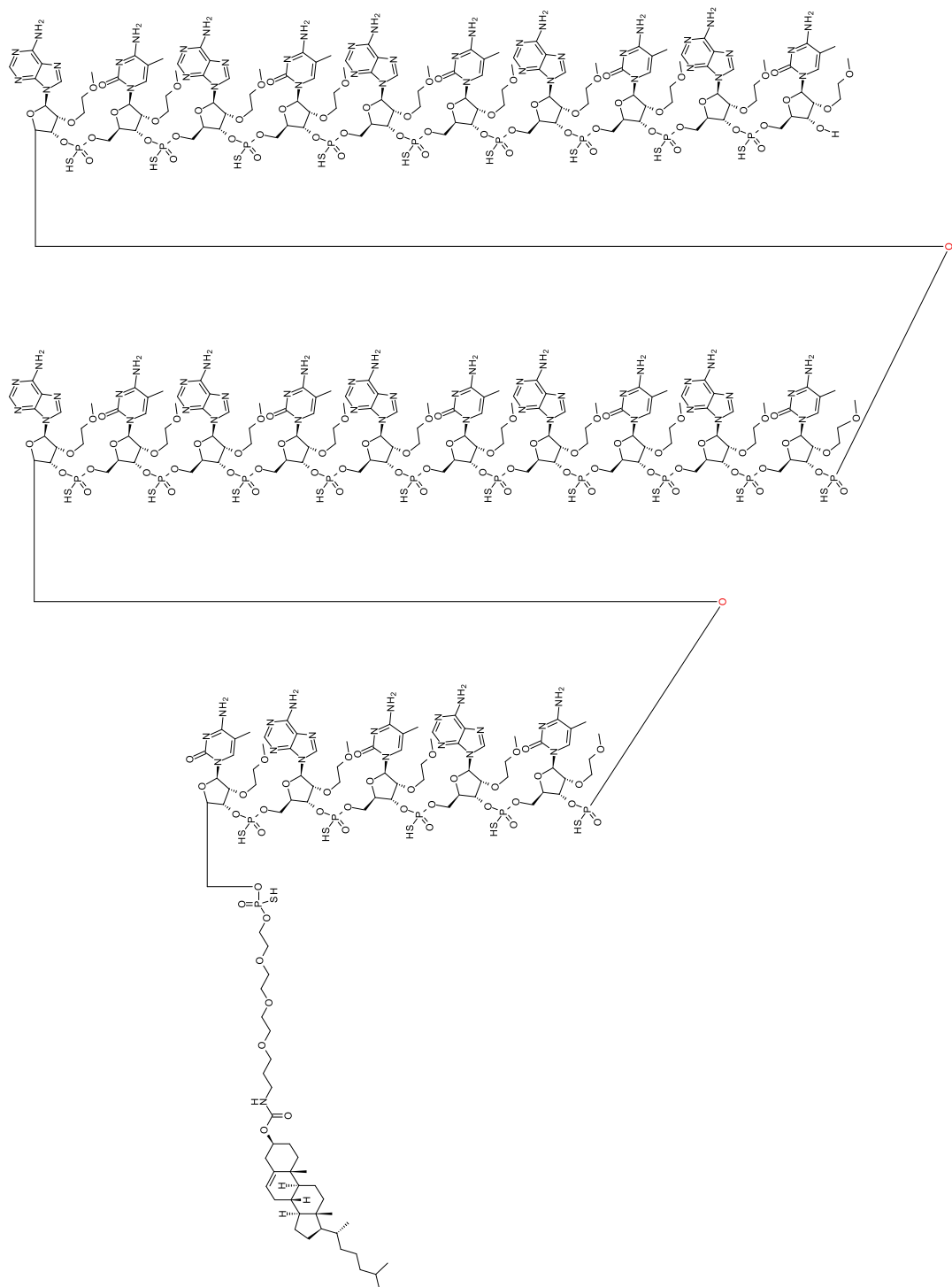
En algunos modos de realización un grupo HEG es un conector situado entre el oligonucleótido antisentido y el resto de colesterol o los restos de colesterol. En algunos modos de realización un grupo HEG se ubica entre el oligonucleótido antisentido y otro conector.

En algunos modos de realización el oligonucleótido antisentido puede contener un enlace fosforotioato (PS) o fosfodiéster (PO) entre el resto de colesterol y el conector.

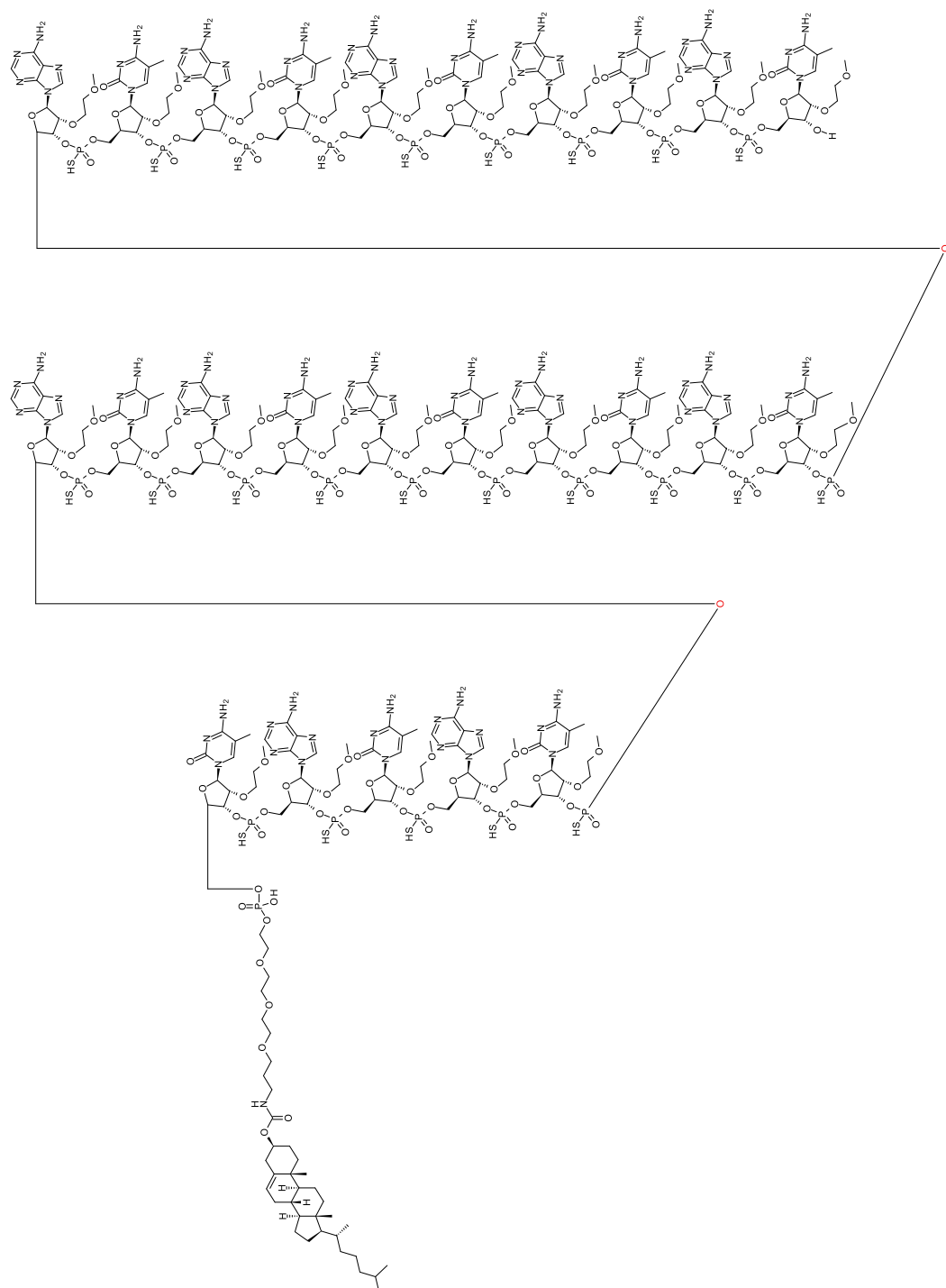
En otros modos de realización el oligonucleótido antisentido puede contener un enlace fosforotioato (PS) o fosfodiéster (PO) entre el conector y el oligonucleótido antisentido.

En otro modo de realización el oligonucleótido antisentido puede contener un enlace fosforotioato (PS) o fosfodiéster (PO) entre el resto de colesterol y el conector y un enlace fosforotioato (PS) o fosfodiéster (PO) entre el conector y el oligonucleótido antisentido. Por ejemplo, en algunos modos de realización el oligonucleótido antisentido puede tener la estructura: “colesterol-PO/PS-conector-PO/PS-oligonucleótido”, en donde un grupo PO/PS se ubica entre el conector y el resto de colesterol y otro grupo PO/PS se ubica entre el conector y el oligonucleótido antisentido. Aquí los enlaces fosforotioato (PS) o fosfodiéster (PO) pueden seleccionarse independientemente de modo que ambos sean enlaces fosforotioato (PS), ambos sean enlaces fosfodiéster (PO) o uno sea un enlace fosforotioato (PS) y el otro sea un enlace fosfodiéster (PO)

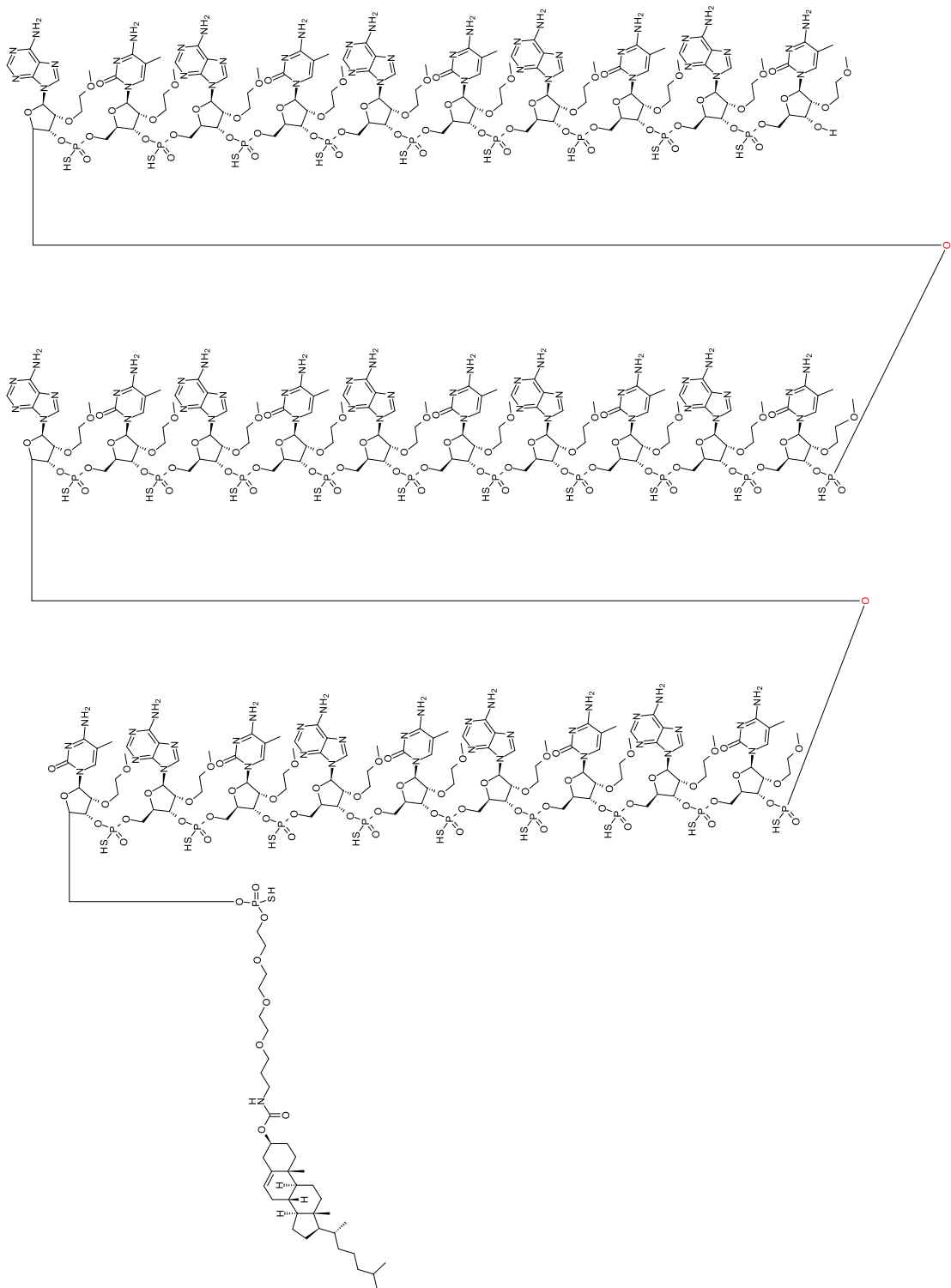
En algunos modos de realización el oligonucleótido antisentido puede tener la estructura que se muestra como:



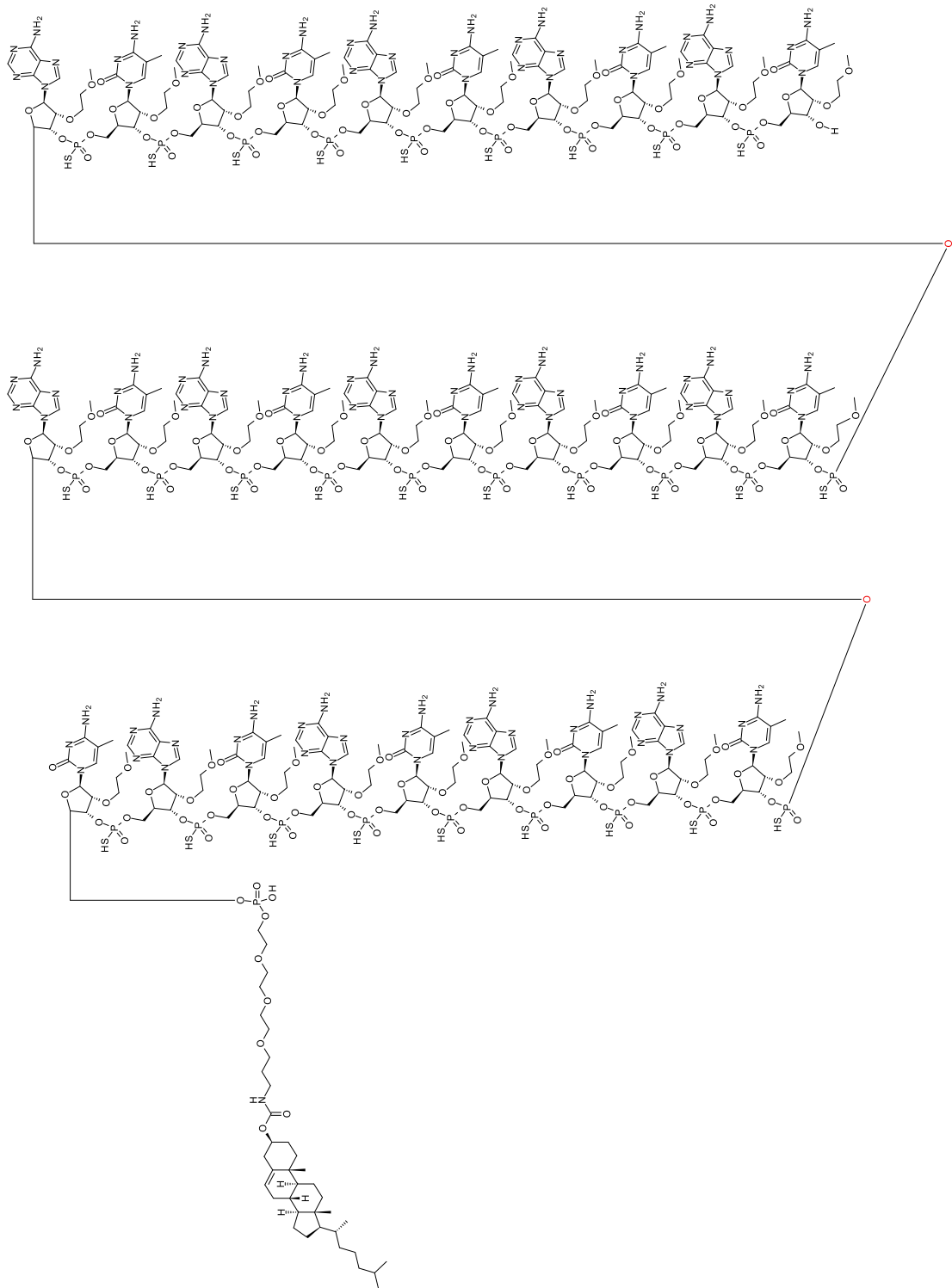
En algunos modos de realización el oligonucleótido antisentido puede tener la estructura que se muestra como:



En algunos modos de realización el oligonucleótido antisentido puede tener la estructura que se muestra como:



En algunos modos de realización el oligonucleótido antisentido puede tener la estructura que se muestra como:



Como se explica en la sección de antecedentes, TDP-43 funcional es principalmente una proteína ubicada en el núcleo, que puede existir en el citoplasma. Sin embargo, la adición de TDP-43 en el citoplasma, que se denomina inclusiones citoplásmicas (también denominada TDP-43 anómala), se asocia a TDP-43 no funcional, y esto se asocia a una pérdida de funcionalidad de TDP-43 nuclear, por ejemplo, en el

procesamiento de numerosos pre-ARNm. Las células que expresan TDP-43 en inclusiones citoplásmicas deben considerarse, por ende, con disminución de TDP-43.

El oligonucleótido antisentido puede ser un oligonucleótido antisentido aislado o un oligonucleótido purificado. El oligonucleótido antisentido de la invención es un oligonucleótido antisentido fabricado (artificial).

El fenotipo funcional puede ser, por ejemplo, eventos de procesamiento de ARN que son modulados por lo que dependen de TDP-43 funcional (es decir, TDP-43 no anómala, en general, TDP-43 nuclear), y/o cuya fidelidad depende de TDP-43 funcional. La potenciación de la funcionalidad de TDP-43 mediante el uso de los oligonucleótidos antisentido de la invención puede evaluarse, por ende, al analizar la fidelidad de eventos de procesamiento de ARN que son modulados por lo que dependen de TDP-43 funcional, como se ilustra, por ejemplo, en el presente documento, con referencia al procesamiento de ARN de STMN2, CAMK2B, ACTL6B y UNC13A.

De forma ventajosa, el oligonucleótido antisentido o la secuencia de nucleótidos contiguos de este comprende al menos 12 o al menos 13 nucleótidos contiguos, que son complementarios, tal como totalmente complementarios, a la secuencia UGUGUGUGUGUG (SEQ ID NO 85), o GUGUGUGUGUGU (SEQ ID NO 89), o UGUGUGUGUGUGU (SEQ ID NO 86) o GUGUGUGUGUGUG (SEQ ID NO 90).

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende al menos 14 nucleótidos contiguos que son complementarios, tal como totalmente complementarios, a la secuencia UGUGUGUGUGUGUG (SEQ ID NO 91) o GUGUGUGUGUGUGU (SEQ ID NO 92).

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende al menos 18 nucleótidos contiguos que son complementarios, tal como totalmente complementarios, a la secuencia (UG) $_n$ o (GU) $_n$, en donde n es un número entero 6-20, tal como 7-9.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende al menos 18 nucleótidos contiguos que son complementarios, tal como totalmente complementarios, a la secuencia UGUGUGUGUGUGUGUGUGUG (SEQ ID NO 93) o GUGUGUGUGUGUGUGUGUGU (SEQ ID NO 94).

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia

seleccionada de CACACAC, CACACACA, CACACACAC, ACACACAC o ACACACACA.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia SEQ ID NO 1.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia SEQ ID NO 2.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia SEQ ID NO 3.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia SEQ ID NO 4.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia SEQ ID NO 5.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia SEQ ID NO 6.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia SEQ ID NO 7.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia SEQ ID NO 8.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia SEQ ID NO 9.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia SEQ ID NO 10.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia SEQ ID NO 11.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia SEQ ID NO 12.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia SEQ ID NO 13.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia SEQ ID NO 14.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia SEQ ID NO 15.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia SEQ ID NO 16.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia SEQ ID NO 17.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia SEQ ID NO 18.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia SEQ ID NO 19.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia SEQ ID NO 20.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia SEQ ID NO 21.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia SEQ ID NO 22.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia SEQ ID NO 23.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia SEQ ID NO 24.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia SEQ ID NO 25.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia SEQ ID NO 26.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia SEQ ID NO 27.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia SEQ ID NO 28.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia SEQ ID NO 29.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia SEQ ID NO 30.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia SEQ ID NO 31.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia SEQ ID NO 32.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia SEQ ID NO 33.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia SEQ ID NO 34.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia SEQ ID NO 35.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia SEQ ID NO 36.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia SEQ ID NO 37.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia SEQ ID NO 38.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia SEQ ID NO 39.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia SEQ ID NO 40.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia SEQ ID NO 41.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia SEQ ID NO 42.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia SEQ ID NO 43.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia SEQ ID NO 44.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia SEQ ID NO 45.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia SEQ ID NO 46.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia SEQ ID NO 47.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia SEQ ID NO 48.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia SEQ ID NO 49.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia SEQ ID NO 50.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia SEQ ID NO 51.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia SEQ ID NO 52.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia SEQ ID NO 53.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia SEQ ID NO 54.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia SEQ ID NO 55.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia SEQ ID NO 56.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia SEQ ID NO 57.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia SEQ ID NO 58.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia SEQ ID NO 59.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia SEQ ID NO 60.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia SEQ ID NO 61.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia SEQ ID NO 62.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia SEQ ID NO 63.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia SEQ ID NO 64.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia SEQ ID NO 65.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia SEQ ID NO 66.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia SEQ ID NO 67.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia SEQ ID NO 68.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia SEQ ID NO 69.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia SEQ ID NO 70.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia SEQ ID NO 71.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia SEQ ID NO 72.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia SEQ ID NO 73.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia SEQ ID NO 74.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia SEQ ID NO 75.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia SEQ ID NO 76.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia SEQ ID NO 77.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia SEQ ID NO 78.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia SEQ ID NO 79.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia SEQ ID NO 80.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia SEQ ID NO 81.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia SEQ ID NO 82.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia SEQ ID NO 83.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende una secuencia o compuesto como se muestra en la Tabla 1.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende SEQ ID NO 118-126.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende SEQ ID NO 118.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende SEQ ID NO 119.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende SEQ ID NO 120.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende SEQ ID NO 121.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende SEQ ID NO 122.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende SEQ ID NO 123.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende SEQ ID NO 124.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende SEQ ID NO 125.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende SEQ ID NO 126.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia (CA) n o (AC) n , en donde n es un número entero 1-20, tal como 2-20, 3-20, 4-20, 5-20, 6-20, 7-20, 8-20, 9-20, 10-20, 11-20, 12-20, 13-20, 14-20, 15-20, 16-20, 17-20, 18-20, 19-20, 1-15, 1-10, 1-5, 5-15, 5-10 o 10-15.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende la secuencia (CA) n o (AC) n , en donde n es un número entero tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO 1-83 o SEQ ID NO 118-126.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO 1-83 o SEQ ID NO 118-126.

La secuencia de nucleótidos contiguos puede comprender un fragmento de 8 o más nucleótidos contiguos de cualquiera de SEQ ID NO 1-83 o SEQ ID NO 118-126.

La secuencia de nucleótidos contiguos puede consistir en un fragmento de 8 o más nucleótidos contiguos de cualquiera de SEQ ID NO 1-83 o SEQ ID NO 118-126.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido o la secuencia de nucleótidos contiguos de este de acuerdo con cualquier aspecto de la invención tiene una longitud de al menos 8 nucleótidos contiguos.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido o la secuencia de nucleótidos contiguos de este de acuerdo con cualquier aspecto de la invención tiene una longitud de al menos 9 nucleótidos contiguos.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido o la secuencia de nucleótidos contiguos de este de acuerdo con cualquier aspecto de la invención tiene una longitud de al menos 10 nucleótidos contiguos.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido o la secuencia de nucleótidos contiguos de este de acuerdo con cualquier aspecto de la invención tiene una longitud de al menos 11 nucleótidos contiguos.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido o la secuencia de nucleótidos contiguos de este de acuerdo con cualquier aspecto de la invención tiene una longitud de al menos 12 nucleótidos contiguos.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido o la secuencia de nucleótidos contiguos de este de acuerdo con cualquier aspecto de la invención tiene una longitud de al menos 13 nucleótidos contiguos.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido o la secuencia de nucleótidos contiguos de este de acuerdo con cualquier aspecto de la invención tiene una longitud de al menos 14 nucleótidos contiguos.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido o la secuencia de nucleótidos contiguos de este de acuerdo con cualquier aspecto de la invención tiene una longitud de al menos 15 nucleótidos contiguos.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido o la secuencia de nucleótidos contiguos de este de acuerdo con cualquier aspecto de la invención tiene una longitud de al menos 16 nucleótidos contiguos.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido o la secuencia de nucleótidos contiguos de este de acuerdo con cualquier aspecto de la invención tiene una longitud de al menos 17 nucleótidos contiguos.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido o la secuencia de nucleótidos contiguos de este de acuerdo con cualquier aspecto de la invención tiene una longitud de al menos 18 nucleótidos contiguos.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido o la secuencia de nucleótidos contiguos de este de acuerdo con cualquier aspecto de la invención tiene una longitud de al menos 19 nucleótidos contiguos.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido o la secuencia de nucleótidos contiguos de este de acuerdo con cualquier aspecto de la invención tiene una longitud de al menos 20 nucleótidos contiguos.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido o la secuencia de nucleótidos contiguos de este de acuerdo con cualquier aspecto de la invención tiene una longitud de al menos 21 nucleótidos contiguos.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido o la secuencia de nucleótidos contiguos de este de acuerdo con cualquier aspecto de la invención tiene una longitud de al menos 22 nucleótidos contiguos.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido o la secuencia de nucleótidos contiguos de este de acuerdo con cualquier aspecto de la invención tiene una longitud de al menos 23 nucleótidos contiguos.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido o la secuencia de nucleótidos contiguos de este de acuerdo con cualquier aspecto de la invención tiene una longitud de al menos 24 nucleótidos contiguos.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido o la secuencia de nucleótidos contiguos de este de acuerdo con cualquier aspecto de la invención tiene una longitud de al menos 25 nucleótidos contiguos.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido o la secuencia de nucleótidos contiguos de este de acuerdo con cualquier aspecto de la invención tiene una longitud de al menos 26 nucleótidos contiguos.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido o la secuencia de nucleótidos contiguos de este de acuerdo con cualquier aspecto de la invención tiene una longitud de al menos 27 nucleótidos contiguos.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido o la secuencia de nucleótidos contiguos de este de acuerdo con cualquier aspecto de la invención tiene una longitud de al menos 28 nucleótidos contiguos.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido o la secuencia de nucleótidos contiguos de este de acuerdo con cualquier aspecto de la invención tiene una longitud de al menos 29 nucleótidos contiguos.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido o la secuencia de nucleótidos contiguos de este de acuerdo con cualquier aspecto de la invención tiene una longitud de al menos 30 nucleótidos contiguos.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido o la secuencia de nucleótidos contiguos de este de acuerdo con cualquier aspecto de la invención tiene una longitud de al menos 31 nucleótidos contiguos.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido o la secuencia de nucleótidos contiguos de este de acuerdo con cualquier aspecto de la invención tiene una longitud de al menos 32 nucleótidos contiguos.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido o la secuencia de nucleótidos contiguos de este de acuerdo con cualquier aspecto de la invención tiene una longitud de al menos 33 nucleótidos contiguos.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido o la secuencia de nucleótidos contiguos de este de acuerdo con cualquier aspecto de la invención tiene una longitud de al menos 34 nucleótidos contiguos.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido o la secuencia de nucleótidos contiguos de este de acuerdo con cualquier aspecto de la invención tiene una longitud de al menos 35 nucleótidos contiguos.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido o la secuencia de nucleótidos contiguos de este de acuerdo con cualquier aspecto de la invención tiene una longitud de al menos 36 nucleótidos contiguos.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido o la secuencia de nucleótidos contiguos de este de acuerdo con cualquier aspecto de la invención tiene una longitud de al menos 37 nucleótidos contiguos.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido o la secuencia de nucleótidos contiguos de este de acuerdo con cualquier aspecto de la invención tiene una longitud de al menos 38 nucleótidos contiguos.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido o la secuencia de nucleótidos contiguos de este de acuerdo con cualquier aspecto de la invención tiene una longitud de al menos 39 nucleótidos contiguos.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido o la secuencia de nucleótidos contiguos de este de acuerdo con cualquier aspecto de la invención tiene una longitud de al menos 40 nucleótidos contiguos.

En algunos modos de realización el oligonucleótido antisentido puede consistir en la secuencia de nucleótidos contiguos.

En algunos modos de realización el oligonucleótido antisentido puede ser la secuencia de nucleótidos contiguos.

En algunos modos de realización, la secuencia de nucleótidos contiguos puede ser al menos 75 % complementaria a la secuencia diana.

En algunos modos de realización, la secuencia de nucleótidos contiguos puede ser al menos 80 %, al menos 81 %, al menos 82 %, al menos 83 %, al menos 84 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % complementaria a la secuencia diana.

En algunos modos de realización, la secuencia de nucleótidos contiguos puede comprender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más desapareamientos con la secuencia diana.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención tiene una energía libre de Gibbs del oligonucleótido antisentido a un ARN diana complementario, menor de aproximadamente $-10 \Delta G$, tal como menor de aproximadamente $-15 \Delta G$, tal como menor de aproximadamente $-17 \Delta G$.

El oligonucleótido antisentido puede ser capaz de restablecer el fenotipo funcional de uno o más ARN diana de TDP-43 en una célula que tiene disminuida TDP-43 o que expresa proteína TDP-43 anómala.

Ventajosamente, el oligonucleótido antisentido de la invención, que comprende una secuencia de nucleótidos contiguos que comprende uno o más nucleósidos de 2'-O-metoxietil-ARN (2'-MOE), puede comprender, además, uno o más nucleósidos modificados adicional o alternativamente. En otras palabras, el oligonucleótido antisentido de la invención comprende uno o más nucleósidos 2'-MOE y puede comprender, además, uno o más nucleósidos modificados adicional o alternativamente.

De forma ventajosa, el oligonucleótido antisentido de la invención puede comprender nucleósidos de LNA. Los nucleótidos de LNA dentro de la secuencia de nucleótidos contiguos son adicionalmente ventajosos. En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de la invención puede comprender nucleósidos de LNA y nucleósidos que no son de LNA, tal como nucleósidos de ADN. En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, puede comprender nucleósidos de LNA y ADN. En algunos modos de realización, todos los nucleósidos del oligonucleótido antisentido, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, se seleccionan independientemente de nucleósidos de

LNA y ADN. De forma ventajosa, la longitud de nucleósidos de ADN contiguos presentes dentro del oligonucleótido antisentido, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, es limitada a fin de evitar el reclutamiento de RNasaH que da como resultado la degradación de ARN diana. De manera adecuada, el oligonucleótido antisentido o la secuencia de nucleótidos contiguos de este no comprende más de cuatro nucleósidos de ADN contiguos, de manera más ventajosa, no comprende más de 3 nucleósidos de ADN contiguos.

Cuando se usa, de forma ventajosa, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención es capaz de modular el empalme de dos o más pre-ARNm diana de TDP-43 (ARN diana). A modo de ejemplo, los dos o más ARN diana de TDP-43 pueden seleccionarse independientemente del grupo que consiste en pre-ARNm de STMN2, pre-ARNm de CAMK2B, pre-ARNm de KALRN, pre-ARNm de ACTL6B y pre-ARNm de UNC13A.

En algunos modos de realización el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención es capaz de modular el empalme de dos o más pre-ARNm diana de TDP-43 (ARN diana).

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención es capaz de modular el empalme de dos o más pre-ARNm diana de TDP-43 (ARN diana).

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención es capaz de modular el empalme de tres o más pre-ARNm diana de TDP-43 (ARN diana).

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención es capaz de modular el empalme de cuatro o más pre-ARNm diana de TDP-43 (ARN diana).

En algunos modos de realización el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención es capaz de modular el empalme de dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más pre-ARNm diana de TDP-43 (ARN diana).

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido es capaz de potenciar la fidelidad de empalme de pre-ARNm de al menos uno, tal como dos o más pre-ARNm seleccionados del grupo que consiste en pre-ARNm de STMN2, pre-ARNm de CAMK2B, pre-ARNm de KALRN, pre-ARNm de ACTL6B y pre-ARNm de UNC13A, cuando se administra a una célula con TDP-43 disminuida. En algunos modos de realización, los dos o más pre-ARNm seleccionados se seleccionan de los grupos que

consisten en STMN2 y CAMK2B; STMN2 y KALRN; STMN2 y ACTL6B; y STMN2 y UNC13A.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido es capaz de potenciar la fidelidad de empalme de pre-ARNm de dos o más pre-ARNm seleccionados del grupo que consiste en pre-ARNm de STMN2, pre-ARNm de CAMK2B, pre-ARNm de KALRN, pre-ARNm de ACTL6B y pre-ARNm de UNC13A, cuando se administra a una célula con TDP-43 disminuida. En algunos modos de realización, los dos o más pre-ARNm seleccionados se seleccionan de los grupos que consisten en STMN2 y CAMK2B; STMN2 y KALRN; STMN2 y ACTL6B; STMN2 y UNC13A.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido es capaz de potenciar la fidelidad de empalme de pre-ARNm de tres o más pre-ARNm seleccionados del grupo que consiste en pre-ARNm de STMN2, pre-ARNm de CAMK2B, pre-ARNm de KALRN, pre-ARNm de ACTL6B y pre-ARNm de UNC13A, cuando se administra a una célula con TDP-43 disminuida.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido es capaz de potenciar la fidelidad de empalme de pre-ARNm de pre-ARNm de STMN2, pre-ARNm de CAMK2B, pre-ARNm de KALRN, pre-ARNm de ACTL6B y pre-ARNm de UNC13A, cuando se administra a una célula con TDP-43 disminuida.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido es capaz de disminuir la proporción de ARNm maduros de STMN2 que comprenden un exón críptico (ce1) entre exón 1 y exón 2, en comparación con ARNm maduro de STMN2 de tipo silvestre con una unión de exón1/exón2 contiguos, cuando se administra a una célula con TDP-43 disminuida que expresa pre-ARNm de STMN2.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido es capaz de disminuir el nivel de inclusión de exón anómalo en transcrito de ARNm de CAMK2B, cuando se administra a una célula con TDP-43 disminuida que expresa pre-ARNm de CAMK2B.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido es capaz de disminuir el nivel de inclusión de exón anómalo en transcrito de ARNm de KALRN, cuando se administra a una célula con TDP-43 disminuida que expresa pre-ARNm de KALRN.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido es capaz de disminuir el nivel de inclusión de exón anómalo en transcrito de ARNm de ACTL6B, cuando se administra a una célula con TDP-43 disminuida que expresa pre-ARNm de ACTL6B.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido es capaz de disminuir el nivel de inclusión de exón anómalo en transcrito de ARNm de UNC13A, cuando se administra a una célula con TDP-43 disminuida que expresa pre-ARNm de UNC13A.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido es capaz de corregir el empalme anómalo de dos o más de pre-ARNm de STMN2, CAMK2B, KALRN, ACTL6B y UNC13A en una célula con TDP-43 disminuida.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido no comprende una región de más de 3, o más de 4, nucleósidos de ADN contiguos.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido no es capaz de mediar la escisión por RNAsaH.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido es un oligonucleótido antisentido de morfolino.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este que comprende uno o más nucleósidos 2'-MOE, puede comprender, además, uno o más nucleósidos potenciadores de la afinidad, tal como nucleósidos modificados en azúcar 2' que potencian la afinidad de unión entre el oligonucleótido antisentido y una molécula de ARN complementaria, por ejemplo, y de forma ventajosa, para proporcionar una energía libre de Gibbs menor, tal como una energía libre de Gibbs menor de -10, tal como menor de -15.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido o la secuencia de nucleótidos contiguos de este que comprende uno o más nucleósidos 2'-MOE, puede comprender, además, uno o más nucleósidos modificados, tal como un nucleósido modificado en azúcar 2' seleccionado independientemente del grupo que consiste en: 2'-O-alkil-ARN; 2'-O-metil ARN (2'-OMe); 2'-alcoxi-ARN; 2'-amino-ADN; 2'-fluoro-ARN; 2'-fluoro-ADN; ácido arabino nucleico (ANA); 2'-fluoro-ANA; ácido nucleico bloqueado (LNA), o una combinación de estos.

En algunos modos de realización, el nucleósido modificado con azúcar 2' puede ser un nucleósido modificado con azúcar 2' potenciador de la afinidad.

En algunos modos de realización, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 o 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 nucleósidos en el oligonucleótido antisentido, o secuencia de nucleótidos contiguos de este, son nucleósidos 2'-O -metoxietil-ARN (2'-MOE), opcionalmente unidos por uno o más enlaces internucleosídicos de fosforotioato.

En algunos modos de realización, al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 % o 100 % de los nucleósidos en el oligonucleótido antisentido, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, son nucleósidos de 2'-O-metoxietil-ARN

(2'-MOE), unidos opcionalmente por uno o más enlaces internucleosídicos de fosforotioato.

En algunos modos de realización, todos los nucleósidos en el oligonucleótido antisentido, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, son nucleósidos de 2'-O-metoxietil-ARN (2'-MOE), unidos opcionalmente por uno o más enlaces internucleosídicos de fosforotioato.

En algunos modos de realización el oligonucleótido antisentido, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este que comprende uno o más nucleósidos 2'-MOE, puede comprender, además, nucleósidos 2'-O-metil.

En algunos modos de realización, uno o más de los nucleósidos modificados adicionales dentro del oligonucleótido antisentido, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, son un nucleósido de ácido nucleico bloqueado (LNA), tal como un nucleósido de LNA seleccionado del grupo que consiste en nucleósido de etilo restringido (cEt), o β -D-oxi-LNA.

En algunos modos de realización, la secuencia de nucleótidos contiguos del oligonucleótido antisentido comprende los nucleósidos de LNA y nucleósidos de ADN, opcionalmente ligados mediante enlaces internucleosídicos fosforotioato.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido o la secuencia de nucleótidos contiguos de este es un mixmer o un totalmer.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido o secuencia de nucleótidos contiguos de este comprende una secuencia de nucleobases seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO 1-83 o SEQ ID NO 118-126 - o al menos 8 nucleótidos contiguos de esta.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido o secuencia de nucleótidos contiguos de este comprende una secuencia de nucleobases seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO 1-83 o SEQ ID NO 118-126 - o al menos 9 nucleótidos contiguos de esta.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido o secuencia de nucleótidos contiguos de este comprende una secuencia de nucleobases seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO 1-83 o SEQ ID NO 118-126 - o al menos 10 nucleótidos contiguos de esta.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido o secuencia de nucleótidos contiguos de este comprende una secuencia de nucleobases seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO 1-83 o SEQ ID NO 118-126 - o al menos 11 nucleótidos contiguos de esta.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido o secuencia de nucleótidos contiguos de este comprende una secuencia de nucleobases seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO 1-83 o SEQ ID NO 118-126 - o al menos 12 nucleótidos contiguos de esta.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido o secuencia de nucleótidos contiguos de este comprende una secuencia de nucleobases seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO 1-83 o SEQ ID NO 118-126 - o al menos 13 nucleótidos contiguos de esta.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido o secuencia de nucleótidos contiguos de este comprende una secuencia de nucleobases seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO 1-83 o SEQ ID NO 118-126 - o al menos 14 nucleótidos contiguos de esta.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido o secuencia de nucleótidos contiguos de este comprende una secuencia de nucleobases seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO 1-83 o SEQ ID NO 118-126 - o al menos 15 nucleótidos contiguos de esta.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido o secuencia de nucleótidos contiguos de este comprende una secuencia de nucleobases seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO 1-83 o SEQ ID NO 118-126 - o al menos 16 nucleótidos contiguos de esta.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido o secuencia de nucleótidos contiguos de este comprende una secuencia de nucleobases seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO 1-83 o SEQ ID NO 118-126 - o al menos 17 nucleótidos contiguos de esta.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido o secuencia de nucleótidos contiguos de este comprende una secuencia de nucleobases seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO 1-83 o SEQ ID NO 118-126 - o al menos 18 nucleótidos contiguos de esta.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido o secuencia de nucleótidos contiguos de este comprende una secuencia de nucleobases seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO 1-83 o SEQ ID NO 118-126 - o al menos 19 nucleótidos contiguos de esta.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido o secuencia de nucleótidos contiguos de este comprende una secuencia de nucleobases seleccionada

del grupo que consiste en SEQ ID NO 1–83 o SEQ ID NO 118-126 - o al menos 20 nucleótidos contiguos de esta.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido o secuencia de nucleótidos contiguos de este comprende una secuencia de nucleobases seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO 1–83 o SEQ ID NO 118-126 - o al menos 21 nucleótidos contiguos de esta.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido o secuencia de nucleótidos contiguos de este comprende una secuencia de nucleobases seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO 1–83 o SEQ ID NO 118-126 - o al menos 22 nucleótidos contiguos de esta.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido o secuencia de nucleótidos contiguos de este comprende una secuencia de nucleobases seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO 1–83 o SEQ ID NO 118-126 - o al menos 23 nucleótidos contiguos de esta.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido o secuencia de nucleótidos contiguos de este comprende una secuencia de nucleobases seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO 1–83 o SEQ ID NO 118-126 - o al menos 24 nucleótidos contiguos de esta.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido o secuencia de nucleótidos contiguos de este comprende una secuencia de nucleobases seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO 1–83 o SEQ ID NO 118-126 - o al menos 25 nucleótidos contiguos de esta.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido o secuencia de nucleótidos contiguos de este comprende una secuencia de nucleobases seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO 1–83 o SEQ ID NO 118-126 - o al menos 26 nucleótidos contiguos de esta.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido o secuencia de nucleótidos contiguos de este comprende una secuencia de nucleobases seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO 1–83 o SEQ ID NO 118-126 - o al menos 27 nucleótidos contiguos de esta.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido o secuencia de nucleótidos contiguos de este comprende una secuencia de nucleobases seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO 1–83 o SEQ ID NO 118-126 - o al menos 28 nucleótidos contiguos de esta.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido o secuencia de nucleótidos contiguos de este comprende una secuencia de nucleobases seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO 1-83 o SEQ ID NO 118-126 - o al menos 29 nucleótidos contiguos de esta.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido o secuencia de nucleótidos contiguos de este comprende una secuencia de nucleobases seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO 1-83 o SEQ ID NO 118-126 - o al menos 30 nucleótidos contiguos de esta.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido o secuencia de nucleótidos contiguos de este comprende una secuencia de nucleobases seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO 1-83 o SEQ ID NO 118-126 - o al menos 31 nucleótidos contiguos de esta.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido o secuencia de nucleótidos contiguos de este comprende una secuencia de nucleobases seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO 1-83 o SEQ ID NO 118-126 - o al menos 32 nucleótidos contiguos de esta.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido o secuencia de nucleótidos contiguos de este comprende una secuencia de nucleobases seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO 1-83 o SEQ ID NO 118-126 - o al menos 33 nucleótidos contiguos de esta.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido o secuencia de nucleótidos contiguos de este comprende una secuencia de nucleobases seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO 1-83 o SEQ ID NO 118-126 - o al menos 34 nucleótidos contiguos de esta.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido o secuencia de nucleótidos contiguos de este comprende una secuencia de nucleobases seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO 1-83 o SEQ ID NO 118-126 - o al menos 35 nucleótidos contiguos de esta.

En algunos modos de realización, las bases citosina presentes en el oligonucleótido antisentido o la secuencia de nucleótidos contiguos de este se seleccionan independientemente del grupo que consiste en citosina y 5-metil citosina.

En algunos modos de realización, las bases citosina presentes en el oligonucleótido antisentido o la secuencia de nucleótidos contiguos de este son 5-metil citosina.

En algunos modos de realización, las bases citosina de LNA presentes en el oligonucleótido antisentido o la secuencia de nucleótidos contiguos de este son 5-metil citosina de LNA.

En algunos modos de realización, las bases citosina de LNA presentes en el oligonucleótido antisentido o la secuencia de nucleótidos contiguos de este son 5-metil citosina de LNA, y las bases citosina de ADN son citosina.

De forma ventajosa, uno o más de los enlaces internucleosídicos ubicados entre los nucleósidos en la secuencia de nucleótidos contiguos se modifican. En algunos modos de realización, al menos alrededor de 75 %, al menos alrededor de 80 %, al menos alrededor de 85 %, al menos alrededor de 90 %, al menos alrededor de 95 % o alrededor de 100 % de los enlaces internucleosídicos ubicados entre los nucleósidos en la secuencia de nucleótidos contiguos se modifican.

En algunos modos de realización, uno o más o todos los enlaces internucleosídicos modificados son enlace fosforotioato. En algunos modos de realización, uno o más o todos los enlaces dentro de la secuencia de nucleótidos contiguos son enlaces fosforotioato.

En algunos modos de realización, todos los enlaces internucleosídicos presentes en la secuencia de nucleótidos contiguos son enlaces internucleosídicos fosforotioato.

En algunos modos de realización, todos los enlaces internucleosídicos presentes en el oligonucleótido antisentido son enlaces internucleosídicos fosforotioato.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de la invención, que se une a al menos un resto de colesterol, puede comprender, además, uno o más grupos conjugados. En otras palabras, el oligonucleótido antisentido de la invención se une a al menos un resto de colesterol y puede comprender, además, uno o más grupos conjugados adicionales que no son un resto de colesterol.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de la invención puede unirse covalentemente a al menos un resto conjugada.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de la invención puede estar en forma de una sal farmacéuticamente aceptable. En algunos modos de realización la sal puede ser una sal de sodio o una sal de potasio o una sal de amonio. La invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el oligonucleótido antisentido de la invención, y un diluyente, disolvente, portador, sal y/o adyuvante farmacéuticamente aceptables.

La invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el oligonucleótido antisentido de la invención y un diluyente o disolvente

farmacéuticamente aceptable, y un catión. El catión puede ser, por ejemplo, un catión de sodio o un catión de potasio. El diluyente/disolvente puede ser agua.

La invención proporciona un método, tal como un procedimiento in vivo o in vitro, para potenciar la funcionalidad de TDP-43 en una célula que expresa niveles anómalos o disminuidos de TDP-43, dicho procedimiento comprende administrar un oligonucleótido antisentido de la invención o composición de la invención, en una cantidad eficaz a dicha célula.

La invención proporciona un procedimiento para tratar o prevenir una patología de TDP-43 en un sujeto que comprende administrar una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de un oligonucleótido antisentido de la invención o una composición de la invención, a un sujeto que sufre de o que es susceptible a una patología de TDP-43.

La invención proporciona un oligonucleótido antisentido de la invención o una composición de la invención, para su uso como un medicamento.

La invención proporciona un oligonucleótido antisentido de la invención o una composición de la invención, para su uso en el tratamiento de una patología de TDP-43.

La invención proporciona el uso del oligonucleótido antisentido de la invención o composición de la invención, para la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de una patología de TDP-43.

La invención proporciona el procedimiento de la invención, el oligonucleótido antisentido o la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la invención o el uso de acuerdo con la invención, en donde la patología de TDP-43 es un trastorno neurológico seleccionado del grupo que consiste en esclerosis lateral amiotrófica (ALS), degeneración lobular frontotemporal (FTLD), parálisis supranuclear progresiva (PSP), esclerosis lateral primaria, atrofia muscular progresiva, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, autismo, demencia por esclerosis del hipocampo, síndrome de Down, enfermedad de Huntington, enfermedades de poliglutamina, tales como ataxia espinocerebelosa 3, miopatías y encefalopatía traumática crónica.

En algunos modos de realización, la patología de TDP-43 es un trastorno neurológico seleccionado del grupo que consiste en esclerosis lateral amiotrófica (ALS), degeneración lobular frontotemporal (FTLD).

La invención proporciona una solución farmacéutica que comprende el oligonucleótido antisentido de la invención y un disolvente farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina tamponada con fosfato.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido de la invención puede estar en forma de polvo sólido, tal como en forma de un polvo liofilizado.

En general, el oligonucleótido antisentido de la invención comprende una secuencia de nucleótidos contiguos de al menos 8 o al menos 10 nucleótidos de longitud, tal como 10-32, 15-32, 20-32, 21-32, 22-32, 23-32, 24-32, 25-32, 26-32, 27-32 o 10-20 nucleótidos de longitud, en donde la secuencia de nucleótidos contiguos es al menos 75 % complementaria, tal como al menos 90 % complementaria o totalmente complementaria, de una secuencia de unión a ARN de TDP-43. En algunos modos de realización, todos los nucleósidos del oligonucleótido antisentido forman la secuencia de nucleótidos contiguos.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de la invención es capaz de modular el empalme de los al menos dos pre-ARNm humanos. Por ejemplo, el empalme de pre-ARNm de STMN2, CAMK2B, KALRN, ACTL6B y UNC13A humanos depende de la unión a TDP-43, como se ilustra en los ejemplos.

En otro aspecto, la invención proporciona procedimientos para tratar o prevenir una enfermedad neurodegenerativa, tal como esclerosis lateral amiotrófica (ALS), que comprenden administrar una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz del oligonucleótido de la invención a un sujeto que tiene o es susceptible a la enfermedad. En otro aspecto, el oligonucleótido o la composición de la invención se usa para el tratamiento o la prevención de una enfermedad neurodegenerativa, como trastornos neurodegenerativos, caracterizada por patología de TDP-43 o error de ubicación de TDP-43 con respecto al núcleo, tal como esclerosis lateral amiotrófica (ALS).

LISTADO DE SECUENCIAS

El listado de secuencias presentado con esta solicitud se incorpora en el presente documento por referencia.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1 - Dibujo que ilustra la unión de colesterol al 5' de ASO.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Imitaciones de proteína de unión a ARN e imitaciones de TDP-43

TDP-43 es la proteína de unión a ARN/ADN TAR que, en seres humanos, se codifica en el cromosoma humano 1: 11,012,653-11,022,858 cadena directa (Gen ENSG00000120948, Cr 1: 11,012,344–11,025,739, ejemplo de un transcrito típico de TDP-43 = ENST00000439080.6), y está ampliamente implicada en el empalme, la estabilidad y el metabolismo de ARN. En las células sanas la proteína TDP-43 se encuentra en el núcleo, sin embargo, en varias enfermedades neurodegenerativas, se forman agregados disfuncionales de TDP-43 en el citoplasma (a menudo asociados con TDP-43 hiperfosforilada y ubiquitinada).

TDP-43 es un ejemplo de una proteína de unión a ARN que se une a repeticiones de GU en numerosos transcritos de ARN independientes. La interacción de proteínas de unión a ARN, tal como TDP-43 con la población de numerosos transcritos de ARN, tiene un profundo efecto sobre la biología de los transcritos de ARN, tal como el empalme en pre-ARNm, la estabilidad de ARN, la acumulación de ARN y, por ende, proporciona un mecanismo para efectuar la expresión de poblaciones de ARN independientes en una célula. Esto es de particular relevancia en el caso de disminución de TDP-43, en donde la pérdida de unión a ARN de TDP-43 funcional se asocia estrechamente a la neurodegeneración.

La presente invención proporciona oligonucleótidos antisentido que son complementarios de regiones ricas en GU en múltiples transcritos de ARN, tal como sitios de unión a TDP-43 conservados en una población de transcritos de pre-ARNm. Como se ilustra en los ejemplos, la administración de los oligonucleótidos antisentido de la invención puede restablecer el procesamiento funcional de múltiples transcritos de ARN independientes, que de otro modo se procesan de manera anómala en la disminución o ausencia de la proteína de unión a ARN, por ejemplo, TDP-43. Por lo tanto, los oligonucleótidos antisentido de la invención, de otro modo denominados compuestos de la invención, pueden denominarse imitaciones de proteína de unión a ARN, o imitaciones de TDP-43, puesto que restablecen la funcionalidad de la proteína de unión a ARN, tal como TDP-43, en la regulación de biología de ARN de múltiples transcritos de ARN.

A modo de ejemplo, la funcionalidad de proteína de unión a ARN, tal como la funcionalidad de TDP-43, que se restablece o potencia mediante el uso de los compuestos de la invención (por ejemplo, en células con TDP-43 disminuida), es la expresión, el procesamiento, por ejemplo, eventos de empalme de transcritos de pre-ARNm, que da como resultado el restablecimiento de expresión génica funcional que de otro modo se desregula en células con nivel reducido de TDP-43 funcional

(denominadas en el presente documento células con TDP-43 disminuida). Esto puede dar como resultado una expresión génica potenciada o calidad potenciada de expresión génica.

De forma ventajosa, los compuestos de la invención son capaces de imitar la TDP-43 funcional, y restablecer la función nuclear de TDP-43 en la expresión de uno o más ARN diana de TDP-43, y de este modo restablecer el fenotipo funcional del(de los) ARN diana de TDP-43.

Cabe destacar que otras proteínas de unión a ARN pueden unirse a los sitios de unión a TDP-43 y, como tales, las imitaciones de TDP-43 mencionadas en el presente documento son oligonucleótidos, que son complementarios de los sitios de unión a TDP-43 de una o más dianas de ARN, tal como múltiples dianas de ácido nucleico (es decir, dianas de ARN que se describen a partir de distinto locus genético), y que son capaces de restablecer la expresión de la normal (de tipo silvestre).

Como se informa en Arnold *et al.*, PNAS 2013, algunas patologías de TDP-43 se asocian a determinadas mutaciones de TDP-43, y estas pueden no estar necesariamente asociadas a disminución citoplásmica de TDP-43. En el contexto de la presente invención, la función normal de TDP-43 puede interrumpirse genéticamente y, por ende, esto también se considera una fuente potencial de TDP-43 normal o disminuida, un fenotipo que puede abordarse mediante el uso de imitaciones de TDP-43 de la presente invención.

Ejemplos de dianas de ARN de TDP-43

La disminución de TDP-43 en las células neuronales da como resultado una profunda alteración en el procesamiento de ARN de una gran población de transcritos de ARN en la célula.

Los ejemplos ilustran cinco de estos ARN diana de TDP-43: STMN2, KALRN, ACTL6B, UNC13A y CAMK2B, pero la invención no se limita en este respecto.

Arnold *et al.*, PNAS 2013 110 E736–745 identifican anomalías expandidas de empalme de pre-ARNm de ARN de unión a TDP-43 en células con TDP-43 disminuida (ratones con ASO de TDP-43 disminuidos), e ilustran la identificación de eventos de empalme regulados por TDP-43 indicadores mediante el uso de análisis de micromatriz. Los ARN identificados por Arnold *et al.*, cuyo empalme está regulado por TDP-43, incluyen *Eif4h*, *Taf1b*, *Kcnp2*, (dependiente de mutación de TDP-43), *Sort1*, *Kcnd3*, *Ahi1*, *Atxn2*, *Ctnnd* (dependiente de la dosis).

STMN2 (Klim *et al.*, Nat Neurosci. 2019 Feb;22(2):167-179) – La disminución de TDP-43 en células neuronales (por ejemplo, en ALS) da como resultado un error de

empalme del transcrito de STMN2. STMN2 codifica un regulador de microtúbulos, cuya expresión disminuye después de la atenuación de TDP-43 y el error de ubicación de TDP-43 así como en neuronas motoras específicas del paciente y médula espinal de cadáveres de pacientes.

La estabilización después de la traducción de STMN2 restableció el crecimiento de neuritas y las deficiencias de regeneración de axón inducida por disminución de TDP-43. La disminución de TDP-43 da como resultado la incorporación de un intrón críptico entre exón1 y 2 de STMN2. El documento WO2019/241648 divulga ASO de fosforotioato modificados en MOE completamente que se usan para reducir el error de empalme de STMN2.

Los transcritos mencionados anteriormente y los eventos de empalme de disminución de TDP-43 asociados pueden usarse para evaluar el restablecimiento de funcionalidad de TDP-43 mediante el uso de los compuestos de la invención.

Patologías de TDP-43

Una patología de TDP-43 es una enfermedad asociada a una expresión reducida o anómala de TDP-43, que se asocia, en general, a un aumento de TDP-43 citoplásmica, en particular, TDP-43 hiperfosforilada y ubiquitinada.

La disminución de TDP-43 se indica en un rango de enfermedades, denominadas patologías de TDP-43, e incluye, por ejemplo, esclerosis lateral amiotrófica (ALS), degeneración lobular frontotemporal (FTLD), parálisis supranuclear progresiva (PSP), esclerosis lateral primaria, atrofia muscular progresiva, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, autismo, demencia por esclerosis del hipocampo, síndrome de Down, enfermedad de Huntington, enfermedades de poliglutamina, tales como ataxia espinocerebelosa 3, miopatías y encefalopatía traumática crónica.

Células con TDP-43 disminuida

Las células con TDP-43 disminuida se refieren a células en donde el nivel funcional de TDP-43 se encuentra reducido. Se entenderá que en patologías de TDP-43, la expresión de TDP-43 anómala tiene como resultado la acumulación de TDP-43 citoplásmica disfuncional, y una reducción en el nivel de TDP-43 nuclear funcional – dado que tales células con TDP-43 disminuida pueden estar caracterizadas por una reducción en el nivel funcional de TDP-43 y, por lo tanto, pueden asociarse a un aumento en el nivel de TDP-43 disfuncional. Para la evaluación in vitro, la disminución de TDP-43 puede manipularse por ingeniería, por ejemplo, mediante enfoques de modificación por ingeniería genética (por ejemplo, CRISPR/CAS9), o como se ilustra en los ejemplos, mediante el uso de un inhibidor de oligonucleótido antisentido de

TDP-43 (ilustrado mediante un oligonucleótido gapmero que actúa sobre el transcrito de TDP-43 humana).

En algunos modos de realización, la célula con TDP-43 disminuida es una célula neuronal.

Secuencias complementarias de sitios de unión a TDP-43

Los sitios de unión a TDP-43 se caracterizan por motivos de poli GU (ver la A daTabase of RNA binding <https://attract.cnice.es/results/e9f29380-8921-406e-84a8-27ce9b9398b4#>), por ejemplo, y, de manera adecuada para la intervención de oligonucleótido antisentido, pueden comprender un motivo de (GU) n o (UG) n , en donde n es al menos 3 o, preferentemente, al menos 4. En algunos modos de realización, n es 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10.

En algunos modos de realización el sitio de unión a TDP-43 puede comprender una secuencia seleccionada del grupo que consiste en (UG) n , (GU) n , en donde n es 4–20, UGUGUGUG, UGUGUGUGU, UGUGUGUGUG (SEQ ID NO 95), UGUGUGUGUGU (SEQ ID NO 84), UGUGUGUGUGUG (SEQ ID NO 85), UGUGUGUGUGUGU (SEQ ID NO 86), GUGUGUGU, GUGUGUGUG, GUGUGUGUGU (SEQ ID NO 87), GUGUGUGUGUG (SEQ ID NO 88), GUGUGUGUGUGU (SEQ ID NO 89), GUGUGUGUGUGUG (SEQ ID NO 90) y GUGAAUGA.

En algunos modos de realización, el sitio de unión a TDP-43 puede comprender una secuencia seleccionada del grupo que consiste en GUGAAUGA, GUUGUGC, UGUGUGUGUGUG (SEQ ID NO 85), GAAUGG, UGUGUGUG, GAAUGA, UGUGUG, GUUGUUC y GUUUUGC. En algunos modos de realización, el sitio de unión a TDP-43 puede comprender la secuencia UGUGUGUGUGUGUG (SEQ ID NO 91).

En algunos modos de realización el oligonucleótido antisentido de la presente invención puede comprender una secuencia que es complementaria, tal como totalmente complementaria, a una o más secuencias seleccionadas del grupo que consiste en (UG) n , (GU) n , en donde n es 4–20, UGUGUGUG, UGUGUGUGU, UGUGUGUGUG (SEQ ID NO 95), UGUGUGUGUGU (SEQ ID NO 84), UGUGUGUGUGUG (SEQ ID NO 85), UGUGUGUGUGUGU (SEQ ID NO 86), GUGUGUGU, GUGUGUGUG, GUGUGUGUGU (SEQ ID NO 87), GUGUGUGUGUG (SEQ ID NO 88), GUGUGUGUGUGU (SEQ ID NO 89), GUGUGUGUGUGUG (SEQ ID NO 90) y GUGAAUGA.

El oligonucleótido antisentido de la presente invención puede comprender una secuencia que es complementaria, tal como totalmente complementaria, a la secuencia de sitio de unión a TDP-43, tal como una o más secuencias, seleccionada

del grupo que consiste en (GU)_n, (UG)_n, GUGAAUGA, GUUGUGC, GAAUGG, UGUGUGUG, GAAUGA, UGUGUG, UGUGUGUGUGUG (SEQ ID NO 85), GUUGUUC y GUUUUGC.

Oligonucleótido

Como se usa en el presente documento, el término "oligonucleótido" se define, como lo entiende habitualmente la persona del oficio de nivel medio, como una molécula que comprende dos o más nucleósidos ligados covalentemente. Tales nucleósidos unidos covalentemente también pueden denominarse moléculas u oligómeros de ácido nucleico. Los oligonucleótidos se elaboran habitualmente en el laboratorio mediante síntesis química en fase sólida y posterior purificación y aislamiento. Cuando se hace referencia a una secuencia del oligonucleótido, se hace referencia a la secuencia o el orden de porciones nucleobase, modificaciones de estos, de los nucleótidos o nucleósidos ligados covalentemente. Los oligonucleótidos antisentido de la invención son artificiales y se sintetizan químicamente y típicamente se purifican o aíslan.

Los oligonucleótidos antisentido de la invención, que comprenden secuencias de nucleótidos contiguos comprenden uno o más nucleósidos 2'-MOE, pueden comprender, además, uno o más nucleósidos adicionales o modificados adicionalmente tales como nucleósidos modificados en azúcar 2'. Los oligonucleótidos antisentido de la invención pueden comprender uno o más enlaces internucleosídicos modificados, tal como uno o más enlaces internucleosídicos de fosforotioato.

Oligonucleótidos antisentido

Como se usa en el presente documento, el término "oligonucleótido antisentido" se define como un oligonucleótido capaz de modular la expresión de un gen diana mediante la hibridación con un ácido nucleico diana, en particular con una secuencia contigua en un ácido nucleico diana. Los oligonucleótidos antisentido no son esencialmente bicatenarios y, por lo tanto, no son siARN ni shARN. Los oligonucleótidos antisentido de la presente invención pueden ser monocatenarios. Cabe destacar que los oligonucleótidos monocatenarios de la presente invención pueden formar horquillas o estructuras en dúplex intermoleculares (dúplex entre dos moléculas del mismo oligonucleótido), siempre que el grado de intra o interautocomplementariedad sea menor de aproximadamente 50 % a lo largo de toda la longitud del oligonucleótido.

En algunos modos de realización, los oligonucleótidos antisentido monocatenarios de la invención pueden no contener nucleósidos de ARN.

Ventajosamente, los oligonucleótidos antisentido de la invención, que comprenden secuencias de nucleótidos contiguos que comprenden uno o más nucleósidos 2'-MOE, pueden comprender, además, uno o más nucleósidos o nucleótidos adicionales o modificados adicionalmente, tales como nucleósidos modificados en azúcar 2'. Además, en algunos oligonucleótidos antisentido de la invención, puede ser ventajoso que los nucleósidos que no están modificados sean nucleósidos de ADN.

Secuencia de nucleótidos contiguos

El término “secuencia de nucleótidos contiguos” se refiere a la región del oligonucleótido que es complementaria del ácido nucleico diana. El término se usa de manera intercambiable en el presente documento con la expresión “secuencia de nucleobases contiguas” y el término “secuencia de motivo de oligonucleótido”. En algunos modos de realización, todos los nucleósidos del oligonucleótido antisentido constituyen la secuencia de nucleótidos contiguos. La secuencia de nucleótidos contiguos es la secuencia de nucleótidos en el oligonucleótido de la invención que son complementarios, y en algunos casos totalmente complementarios, del ácido nucleico diana o la secuencia diana.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido comprende la secuencia de nucleótidos contiguos, y puede comprender opcionalmente otro(s) nucleótido(s), por ejemplo, una región conectora de nucleótidos que puede usarse para unir un grupo funcional (por ejemplo, un grupo conjugado) con la secuencia de nucleótidos contiguos. La región conectora de nucleótidos puede ser complementaria o no del ácido nucleico diana. Se entiende que la secuencia de nucleótidos contiguos del oligonucleótido no puede ser más larga que el oligonucleótido como tal, y que el oligonucleótido no puede ser más corto que la secuencia de nucleótidos contiguos.

Nucleótidos y nucleósidos

Los nucleótidos y nucleósidos son los bloques de construcción de los oligonucleótidos y polinucleótidos, y a los fines de la presente invención, incluyen nucleótidos y nucleósidos naturales y no naturales. En la naturaleza, los nucleótidos, tales como nucleótidos de ADN y ARN, comprenden un resto azúcar de ribosa, un resto nucleobase y uno o más grupos fosfato (que está ausente en los nucleósidos). Los nucleósidos y nucleótidos también pueden denominarse “unidades” o “monómeros” de manera intercambiable.

Nucleósido modificado

Como se usa en el presente documento, el término “nucleósido modificado” o “modificación de nucleósido” se refieren a nucleósidos modificados en comparación

con el nucleósido de ADN o ARN equivalente mediante la introducción de una o más modificaciones del resto azúcar o el resto de (núcleo)base. Ventajosamente, los oligonucleótidos antisentido de la invención, que comprenden secuencias de nucleótidos contiguos que comprenden uno o más nucleósidos 2'-MOE, pueden comprender, además, uno o más nucleósidos adicionales o modificados adicionalmente que comprenden un resto de azúcar modificada. El término "nucleósido modificado" también puede usarse en el presente documento de manera intercambiable con el término "análogo de nucleósido" o "unidades" modificadas o "monómeros" modificados. Los nucleósidos con un resto azúcar de ADN o ARN no modificada se denominan nucleósidos de ADN o ARN en el presente documento. Los nucleósidos con modificaciones en la región base del nucleósido de ADN o ARN aún se denominan generalmente ADN o ARN si permiten emparejamiento de bases de Watson Crick. Los nucleósidos modificados de ejemplo que pueden usarse en los compuestos de la invención incluyen LNA, 2'-O-MOE y análogos de nucleósidos de morfolino.

Enlace internucleosídico modificado

Como entienden generalmente los expertos en la técnica, el término "enlace internucleosídico modificado" se define como enlaces distintos de enlaces fosfodiéster (PO) que acoplan covalentemente dos nucleósidos entre sí. Por lo tanto, los oligonucleótidos antisentidos de la invención pueden comprender uno o más enlaces internucleosídicos modificados tal como uno o más enlaces internucleosídicos de fosforotioato.

En algunos modos de realización al menos 50 % de los enlaces internucleosídicos en el oligonucleótido antisentido, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, son fosforotioato, tal como al menos 60 %, tal como al menos 70 %, tal como al menos 75 %, tal como al menos 80%, o tal como al menos 90 % o más de los enlaces internucleosídicos en el oligonucleótido antisentido, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, son fosforotioato. En algunos modos de realización, todos los enlaces internucleosídicos del oligonucleótido antisentido, o la secuencia de nucleótidos contiguos de este, son fosforotioato.

De forma ventajosa, todos los enlaces internucleosídicos de la secuencia de nucleótidos contiguos del oligonucleótido antisentido son fosforotioato, o todos los enlaces internucleosídicos del oligonucleótido antisentido son enlaces fosforotioato.

Nucleobase

El término nucleobase incluye el resto purina (por ejemplo, adenina y guanina) y pirimidina (por ejemplo, uracilo, timina y citosina) presente en nucleósidos y nucleótidos que forman enlaces hidrógeno en la hibridación de ácidos nucleicos. En el contexto de la presente invención, el término nucleobase también abarca nucleobases modificadas que pueden diferir de las nucleobases naturales, pero que son funcionales durante la hibridación de ácidos nucleicos. En este contexto, "nucleobase" se refiere tanto a nucleobases naturales, tales como adenina, guanina, citosina, timidina, uracilo, xantina e hipoxantina, como a variantes no naturales. Tales variantes se describen, por ejemplo, en Hirao et al (2012) *Accounts of Chemical Research*, vol 45, página 2055 y Bergstrom (2009) *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry Suppl.* 37 1.4.1. En algunos modos de realización el resto nucleobase se modifica mediante el cambio de la purina o pirimidina por 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-bromouracil 5-tiazolo-uracilo, 2-tio-uracilo, 2'tio-timina, inosina, diaminopurina, 6-aminopurina, 2-aminopurina, 2,6-diaminopurina y 2-cloro-6-aminopurina, 5' nitroindol.

Las porciones nucleobase pueden indicarse mediante el código de letras 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 antisentido ejemplificados, las porciones nucleobase se seleccionan de A, T, G, C y 5-metil citosina. Opcionalmente, para gapmeros de LNA, pueden usarse nucleósidos de LNA 5-metil citosina.

Oligonucleótido modificado

El término "oligonucleótido modificado" describe un oligonucleótido antisentido que comprende uno o más nucleósidos modificados en azúcar y/o enlaces internucleosídicos modificados. El término "oligonucleótido quimérico" se usa en la literatura para describir oligonucleótidos que comprenden nucleósidos modificados en azúcar y nucleósidos de ADN. En algunos modos de realización, puede ser ventajoso que el oligonucleótido antisentido de la invención sea un oligonucleótido quimérico.

Complementariedad

El término "complementariedad" describe la capacidad para el apareamiento de bases Watson-Crick de nucleósidos/nucleótidos. Los pares de bases Watson-Crick son guanina (G)-citosina (C) y adenina (A)-timina (T)/uracilo (U). Se entiende que los oligonucleótidos pueden comprender nucleósidos con nucleobases modificadas, por

ejemplo, se suele usar 5-metil citosina en lugar de citosina, y como tal, el término “complementariedad” abarca el emparejamiento de bases Watson-Crick entre nucleobases no modificadas y modificadas (ver, por ejemplo, Hirao et al (2012) *Accounts of Chemical Research*, vol 45, página 2055 y Bergstrom (2009) *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry Suppl.* 37 1.4.1).

Como se usa en el presente documento, el término “% complementario” se refiere a la proporción de nucleótidos (en porcentaje) de una secuencia de nucleótidos contiguos en una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, oligonucleótido) que, a lo largo de la secuencia de nucleótidos contiguos, son complementarios de una secuencia de referencia (por ejemplo, una secuencia diana o un motivo de secuencia). Por lo tanto, el porcentaje de complementariedad se calcula al contar la cantidad de nucleobases alineadas que son complementarias (de los pares de bases Watson-Crick) entre las dos secuencias (cuando se alinean con la secuencia diana 5'-3' y la secuencia de oligonucleótido de 3'-5'), dividir dicha cantidad por la cantidad total de nucleótidos en el oligonucleótido y multiplicar por 100. En dicha comparación, una nucleobase/un nucleótido que no se alinea (no forma un par de bases) se denomina error de emparejamiento. Las inserciones y eliminaciones no se permiten en el cálculo de % de complementariedad de una secuencia de nucleótidos contiguos. Cabe destacar que, para determinar la complementariedad, las modificaciones químicas de las nucleobases se desestiman siempre que se retenga la capacidad funcional de la nucleobase para formar emparejamiento de bases Watson-Crick (por ejemplo, 5'-metil citosina se considera idéntica a una citosina a fin de calcular el % de identidad).

En la presente invención, el nivel de complementariedad entre la secuencia de nucleótidos contiguos del oligonucleótido antisentido y el sitio de unión a TDP-43, o la secuencia diana, puede ser al menos alrededor de 75 %.

En la presente invención, el nivel de complementariedad entre la secuencia de nucleótidos contiguos del oligonucleótido antisentido y el sitio de unión a TDP-43 diana, o la secuencia diana, puede ser al menos alrededor de 80 %.

En la presente invención, el nivel de complementariedad entre la secuencia de nucleótidos contiguos del oligonucleótido antisentido y el sitio de unión a TDP-43, o la secuencia diana, puede ser al menos alrededor de 85%.

En la presente invención, el nivel de complementariedad entre la secuencia de nucleótidos contiguos del oligonucleótido antisentido y el sitio de unión a TDP-43, o la secuencia diana, puede ser al menos alrededor de 90%.

En la presente invención, el nivel de complementariedad entre la secuencia de nucleótidos contiguos del oligonucleótido antisentido y el sitio de unión a TDP-43, o la secuencia diana, puede ser al menos alrededor de 95%.

En algunos modos de realización, la secuencia de nucleótidos contiguos puede ser totalmente complementaria del sitio de unión a TDP-43, o la secuencia diana. El término "totalmente complementario" se refiere a 100 % de complementariedad.

Los compuestos de la invención son complementarios de sitios de unión a TDP-43 en ARN diana de TDP-43.

La complementariedad completa puede no ser necesaria y, en algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido puede comprender uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o más emparejamientos erróneos a un sitio de unión a ARN de TDP-43 de ARN diana de TDP-43 al que se une eficazmente. En este aspecto, pueden diseñarse oligonucleótidos antisentido que sean suficientemente complementarios de múltiples, aunque no idénticos, sitios de unión a TDP-43 en diferentes ARN diana de TDP-43. En algunos modos de realización, una base universal tal como inosina puede usarse en posiciones complementarias en el oligonucleótido antisentido en donde estas no son identidad perfecta de secuencia de sitio de unión a TDP-43 en las múltiples dianas de ARN de TDP-43.

En algunos modos de realización, la secuencia de nucleótidos contiguos puede incluir uno o más emparejamientos erróneos a un sitio de unión a TDP-43, o una secuencia diana.

En algunos modos de realización, la secuencia de nucleótidos contiguos puede incluir dos o más emparejamientos erróneos a un sitio de unión a TDP-43, o una secuencia diana.

En algunos modos de realización, la secuencia de nucleótidos contiguos puede incluir tres o más emparejamientos erróneos a un sitio de unión a TDP-43, o una secuencia diana.

En algunos modos de realización, la secuencia de nucleótidos contiguos puede incluir cuatro o más emparejamientos erróneos a un sitio de unión a TDP-43, o una secuencia diana.

En algunos modos de realización, la secuencia de nucleótidos contiguos puede incluir cinco o más emparejamientos erróneos a un sitio de unión a TDP-43, o una secuencia diana.

En algunos modos de realización, la secuencia de nucleótidos contiguos puede incluir seis o más emparejamientos erróneos a un sitio de unión a TDP-43, o una secuencia diana.

En algunos modos de realización, la secuencia de nucleótidos contiguos puede incluir siete o más emparejamientos erróneos a un sitio de unión a TDP-43, o una secuencia diana.

En algunos modos de realización, la secuencia de nucleótidos contiguos puede incluir ocho o más emparejamientos erróneos a un sitio de unión a TDP-43, o una secuencia diana.

En algunos modos de realización, los oligonucleótidos antisentido de la presente invención, que contienen uno más, tal como dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, siete o más, u ocho o más emparejamientos erróneos, pueden hibridarse con un ácido nucleico diana con valores de ΔG° estimados por debajo de -10 kcal para oligonucleótidos que tienen 10-32 nucleótidos de longitud.

En algunos modos de realización, los oligonucleótidos antisentido de la presente invención, que contienen uno más, tal como dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, siete o más, u ocho o más emparejamientos erróneos, pueden hibridarse con un ácido nucleico diana con valores de ΔG° estimados por debajo de -12 kcal, -15 kcal, -17 kcal, -20 kcal, -30 kcal, -40 kcal, -50 kcal o -60 kcal para oligonucleótidos que tienen 10-32 nucleótidos de longitud.

El cálculo de valores de ΔG° se analiza más adelante.

Identidad

Como se usa en el presente documento, el término “identidad” se refiere a la proporción de nucleótidos (en porcentaje) de una secuencia de nucleótidos contiguos en una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, oligonucleótido) que a lo largo de la secuencia de nucleótidos contiguos, son idénticos a una secuencia de referencia (por ejemplo, un motivo de secuencia). El porcentaje de identidad se calcula, por lo tanto, mediante el conteo de la cantidad de nucleobases alineadas que son idénticas (una coincidencia) entre dos secuencias (en la secuencia de nucleótidos contiguos del compuesto de la invención y en la secuencia de referencia), dividir esa cantidad por la cantidad total de nucleótidos en el oligonucleótido y multiplicar por 100. Por lo tanto, el porcentaje de identidad = (coincidencias x 100)/longitud de región alineada (por ejemplo, la secuencia de nucleótidos contiguos). Las inserciones y eliminaciones no se permiten en el cálculo del porcentaje de identidad de una secuencia de nucleótidos contiguos. Cabe destacar que, para determinar la identidad, las modificaciones

químicas de las nucleobases se desestiman siempre que se retenga la capacidad funcional de la nucleobase para formar emparejamiento de bases Watson-Crick (por ejemplo, 5-metil citosina se considera idéntica a una citosina a fin de calcular el % de identidad).

Hibridación

Como se usa en el presente documento, el término “hibridar” o “hibrida” se refieren a dos cadenas de ácido nucleico (por ejemplo, un oligonucleótido y un ácido nucleico diana) que forman enlaces hidrógeno entre los pares de bases en cadenas opuestas, y así forman un dúplex. La afinidad de la unión entre dos cadenas de ácido nucleico es la fuerza de la hibridación. Con frecuencia, se describe en términos de temperatura de fusión (T_m) que se define como la temperatura en que la mitad de los oligonucleótidos forman un dúplex con el ácido nucleico diana. En condiciones fisiológicas, T_m no es estrictamente proporcional a la afinidad (Mergny y Lacroix, 2003, *Oligonucleotides* 13:515–537). La energía libre de Gibbs de estado estándar ΔG° es una representación más precisa de la afinidad de unión y se relaciona con la constante de disociación (K_d) de la reacción mediante $\Delta G^\circ = -RT \ln(K_d)$, en 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 diana refleja una hibridación fuerte entre el oligonucleótido y el ácido nucleico diana. ΔG° es la energía asociada a una reacción en donde las concentraciones acuosas son 1 M, el pH es 7, y la temperatura es 37 °C. La hibridación de oligonucleótidos con un ácido nucleico diana es una reacción espontánea, y para reacciones espontáneas, ΔG° es menor de cero. ΔG° puede medirse de manera experimental, por ejemplo, mediante el uso del procedimiento de calorimetría de titulación isotérmica (ITC) como se describe en Hansen *et al.*, 1965, *Chem. Comm.* 36–38 y Holdgate *et al.*, 2005, *Drug Discov Today*. La persona del oficio de nivel medio sabrá que puede adquirirse equipamiento disponible en el comercio para mediciones de ΔG° . ΔG° también puede estimarse en forma numérica mediante el uso del modelo de vecinos más cercanos como describe SantaLucia, 1998, *Proc Natl Acad Sci USA*. 95: 1460-1465 mediante el uso de parámetros termodinámicos adecuadamente derivados descritos en Sugimoto *et al.*, 1995, *Biochemistry* 34:11211-11216 y McTigue *et al.*, 2004, *Biochemistry* 43:5388-5405. En algunos modos de realización, los oligonucleótidos antisentido de la presente invención se hibridan con un ácido nucleico diana con valores de ΔG° estimados por debajo de -10 kcal para oligonucleótidos que tienen 10-30 nucleótidos de longitud. En algunos modos de realización, el grado o la fuerza de hibridación se mide mediante la

energía libre de Gibbs de estado estándar ΔG° . Los oligonucleótidos antisentido pueden hibridarse con un ácido nucleico diana con valores ΔG° estimados por debajo del rango 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 8-30 nucleótidos de longitud. En algunos modos de realización, los oligonucleótidos se hibridan con un ácido nucleico diana 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.

Dianas de ARN de TDP-43 de ejemplo

En algunos modos de realización, un ARN diana de TDP-43 es la proteína de mamífero conocida como estatmina 2, o SCG10, SCGN10, por ejemplo, la STMN2 humana como se divulgó en Gen: ENSG00000104435 (ensemble.org), codificada en Cromosoma 8 humano: 79,610,814-79,666,175 cadena directa (GRCh38:CM000670.2).

En algunos modos de realización, un ARN diana de TDP-43 es CAMK2B.

En algunos modos de realización, un ARN diana de TDP-43 es KALRN.

En algunos modos de realización, un ARN diana de TDP-43 es UNC13A.

En algunos modos de realización, un ARN diana de TDP-43 es ACTL6B.

Célula diana

El término “célula diana” como se usa en el presente documento se refiere a una célula que expresa las dianas de ARN de TDP-43 dirigidas cuya expresión debe corregirse mediante la administración del compuesto de la invención. De manera adecuada, la célula diana es, además, una célula con TDP-43 disminuida. Para uso experimental, la disminución de TDP-43 puede manipularse por ingeniería en la célula, por ejemplo, mediante modificación por ingeniería genética (por ejemplo, CRISPR/CAS9) o mediante el uso de inhibidores ASO de TDP-43.

En algunos modos de realización, la célula diana puede ser *in vivo* o *in vitro*. En algunos modos de realización, la célula diana es una célula de mamífero, tal como una célula de roedor, tal como una célula de ratón o una célula de rata, o una célula de primate, tal como una célula de mono o una célula humana.

En algunos modos de realización, la célula diana es una célula neuronal.

Para evaluación *in vitro*, la célula diana puede ser una neurona glutamatérgica (también denominada en el presente documento célula Glutaneuron), tal como una neurona glutamatérgica humana, tal como una neurona glutamatérgica humana que tiene disminuida TDP-43. La neurona glutamatérgica humana está disponible de Cellular Dynamics (iCell GlutaNeurons). Para evaluación *in vitro*, la célula diana, tal

como la Glutaneuron, es in vitro. La disminución de TDP-43 de la célula diana, por ejemplo, para evaluación in vitro, puede lograrse, por ejemplo, mediante el uso de oligonucleótidos antisentido o reactivos siARN, o puede manipularse por ingeniería en las células, por ejemplo, mediante edición CRISPR/Cas9, o expresión del vector de shARN. Como se ilustra además en los ejemplos, la célula diana, por ejemplo, para su uso in vitro, puede ser una neurona derivada de célula madre pluripotente humana, por ejemplo, estas pueden obtenerse como un kit iCell GlutaNeurons, 01279 Cat. R1034 (Fujifilm Cellular Dynamics).

Modulación del empalme

La modulación de empalme puede usarse para corregir el empalme críptico, modular el empalme alternativo, restablecer la estructura de lectura abierta e inducir atenuación de proteínas.

La modulación de empalme puede evaluarse mediante secuenciación de ARN (ARNseq), lo que permite una evaluación cuantitativa de los diferentes productos de empalme de un pre-ARNm, o mediante PCR digital de gotas mediante el uso de ensayos de PCR diseñados para ser específicos para una o la otra forma de empalme. En algunos modos de realización de la invención, el oligonucleótido antisentido modula el empalme de pre-ARNm de STMN2, por ejemplo, reduce el nivel de ARNm de STMN2 maduro que comprende una secuencia de ARN ubicada entre el exón 1 y el exón 2 (como se ilustra en los ejemplos), por ejemplo, en la célula diana o células con TDP-43 disminuida. En algunos modos de realización de la invención, el oligonucleótido antisentido modula el empalme de pre-ARNm de STMN2, por ejemplo, potencia el nivel de ARNm de STMN2 correctamente empalmado maduro que no comprende una secuencia de ARN ubicada entre el exón 1 y el exón 2, denominado transcrito de STMN2 WT, por ejemplo, en la célula diana.

Nucleósidos modificados de alta afinidad

Un nucleósido modificado de alta afinidad es un nucleótido modificado que, cuando se incorpora en el oligonucleótido antisentido, potencia la afinidad del oligonucleótido antisentido a su diana de complementariedad, por ejemplo, según se mide de acuerdo con la temperatura de fusión (T^m). Un nucleósido modificado de alta afinidad de la presente invención produce, preferentemente, un aumento de la temperatura de fusión de +0,5 a +12 °C, con mayor preferencia, de +1,5 a +10 °C y, con máxima preferencia, de +3 a +8 °C por nucleósido modificado. En el estado de la técnica se conocen numerosos nucleósidos modificados de alta afinidad e incluyen, por ejemplo, muchos nucleósidos sustituidos 2' así como ácidos nucleicos bloqueados (LNA) (ver, por

ejemplo, Freier & Altmann; Nucl. Acid Res., 1997, 25, 4429-4443 y Uhlmann; Curr. Opinion in Drug Development, 2000, 3(2), 293-213).

Modificaciones de azúcar

El oligonucleótido antisentido de la invención, que comprende una secuencia de nucleótidos contiguos que comprende uno o más nucleósidos 2'-MOE, puede comprender, además, uno o más nucleósidos que tengan un resto azúcar modificado, es decir, una modificación del resto azúcar en comparación con el resto azúcar de ribosa que se encuentra en ADN y ARN.

Se han elaborado muchos nucleósidos con modificación del resto azúcar de ribosa, principalmente con el fin de mejorar determinadas propiedades de oligonucleótidos, tales como la afinidad y/o la resistencia a nucleasa.

Tales modificaciones incluyen aquellas en donde la estructura del anillo de ribosa se modifica, por ejemplo, mediante reemplazo con un anillo de hexosa (HNA), o un anillo bicíclico, que generalmente tienen un puente birradical entre los carbonos C2 y C4 en el anillo de ribosa (LNA), o un anillo de ribosa no ligado que en general no tiene un enlace entre los carbonos C2 y C3 (por ejemplo, UNA). Otros nucleósidos modificados en azúcar incluyen, por ejemplo, ácidos nucleicos de biciclohexosa (documento WO2011/017521) o ácidos nucleicos tricíclicos (documento WO2013/154798). Los nucleósidos modificados también incluyen nucleósidos en donde el resto azúcar se reemplaza por un resto no azúcar, por ejemplo, en el caso de ácidos nucleicos peptídicos (PNA) o ácidos morfolino nucleicos.

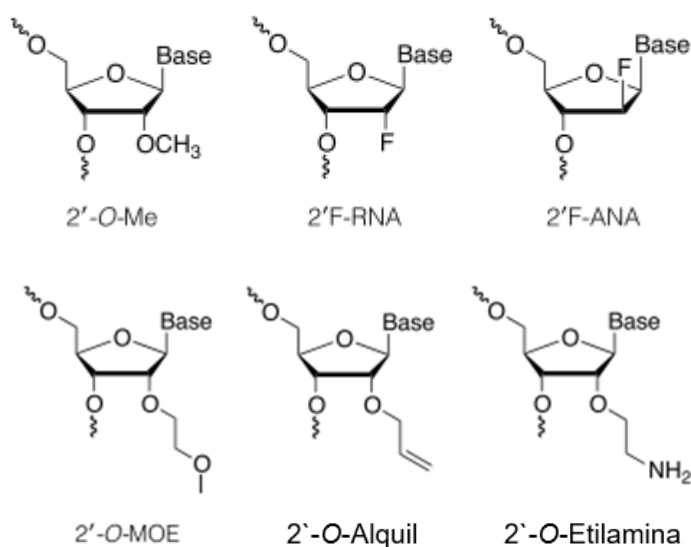
Las modificaciones de azúcar también incluyen modificaciones realizadas mediante la alteración de grupos sustituyentes en el anillo de ribosa en grupos diferentes de hidrógeno, o el grupo 2'-OH que se halla naturalmente en nucleósidos de ADN y ARN. Los sustituyentes pueden introducirse, por ejemplo,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

Nucleósidos modificados en azúcar 2'

Un nucleósido modificado en azúcar 2' es un nucleósido que tiene un sustituyente diferente de H o -OH en la posición 2' (nucleósido sustituido 2') o comprende un birradical ligado 2' capaz de formar un puente entre el carbono 2' y un segundo carbono en el anillo de ribosa, tal como nucleósidos de LNA (en puente birradical 2'-4').

De hecho, se hicieron grandes esfuerzos para desarrollar nucleósidos sustituidos en azúcar 2' y numerosos nucleósidos sustituidos 2' demostraron tener propiedades beneficiosas cuando se incorporaron en los oligonucleótidos. Por ejemplo, el azúcar modificado 2' puede proporcionar afinidad de unión potenciada y/o mayor resistencia

de nucleasa al oligonucleótido. Los ejemplos de nucleósidos modificados sustituidos 2' son nucleósidos de 2'-O-alquil-ARN, 2'-O-metil-ARN, 2'-alcoxi-ARN, 2'-O-metoxietil-ARN (MOE), 2'-amino-ADN, 2'-fluoro-ARN y 2'-F-ANA. Para más ejemplos, ver, por ejemplo, Freier & Altmann; Nucl. Acid Res., 1997, 25, 4429-4443 y Uhlmann; Curr. Opinion in Drug Development, 2000, 3(2), 293-213, y Deleavey y Damha, Chemistry and Biology 2012, 19, 937. A continuación se muestran ilustraciones de algunos nucleósidos modificados sustituidos 2'.



Con respecto a la presente invención, los nucleósidos modificados en azúcar 2' sustituidos no incluyen nucleósidos en puente 2' tipo LNA.

Nucleósidos de ácido nucleico bloqueado (nucleósido de LNA)

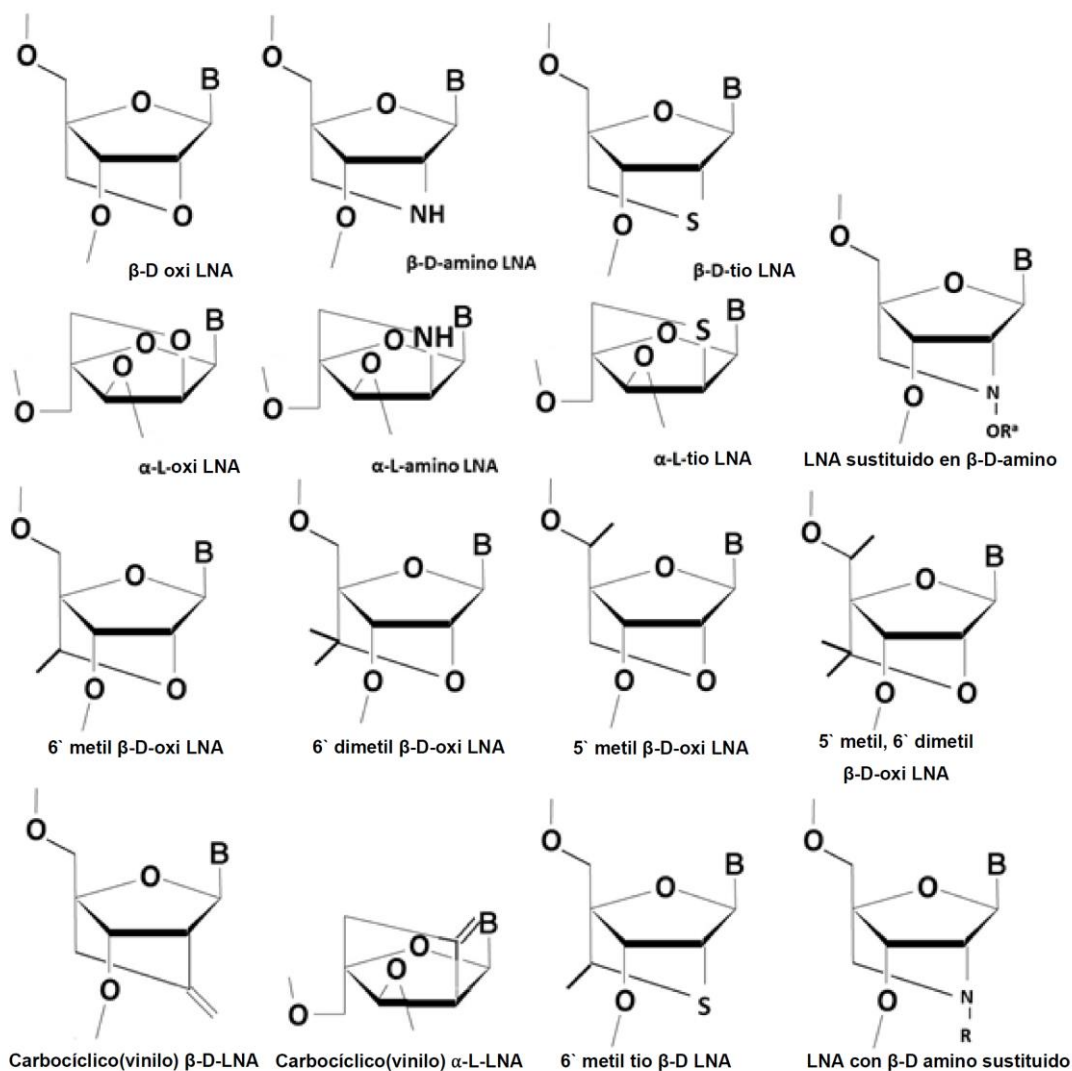
Un “nucleósido de LNA” es un nucleósido modificado en 2' que comprende un birradical que une C2' y C4' del anillo de azúcar ribosa de dicho nucleósido (también denominado “puente 2'- 4'”), que restringe o bloquea la conformación del anillo de ribosa. Estos nucleósidos también se denominan ácido nucleico en puente o ácido nucleico bicíclico (BNA) en la literatura. El bloqueo de la conformación de la ribosa está asociado a una afinidad potenciada de hibridación (estabilización de dúplex) cuando LNA se incorpora en un oligonucleótido para una molécula de ADN o ARN complementario. Esto puede definirse de manera habitual mediante la medición de la temperatura de fusión del dúplex oligonucleótido/complemento.

Se divulgan nucleósidos de LNA no limitativos de ejemplo en los documentos WO 99/014226, WO 00/66604, WO 98/039352, WO 2004/046160, WO 00/047599, WO 2007/134181, WO 2010/077578, WO 2010/036698, WO 2007/090071, WO 2009/006478, WO 2011/156202, WO 2008/154401, WO 2009/067647, WO 2008/150729, Morita *et al.*, Bioorganic & Med.Chem. Lett. 12, 73-76, Seth *et al.* J. Org.

Chem. 2010, Vol 75(5) pp. 1569-81, y Mitsuoka *et al.*, Nucleic Acids Research 2009, 37(4), 1225-1238, y Wan y Seth, J. Medical Chemistry 2016, 59, 9645–9667.

Otros nucleósidos de LNA de ejemplo no limitativos se divulgan en el Esquema 1.

Esquema 1:



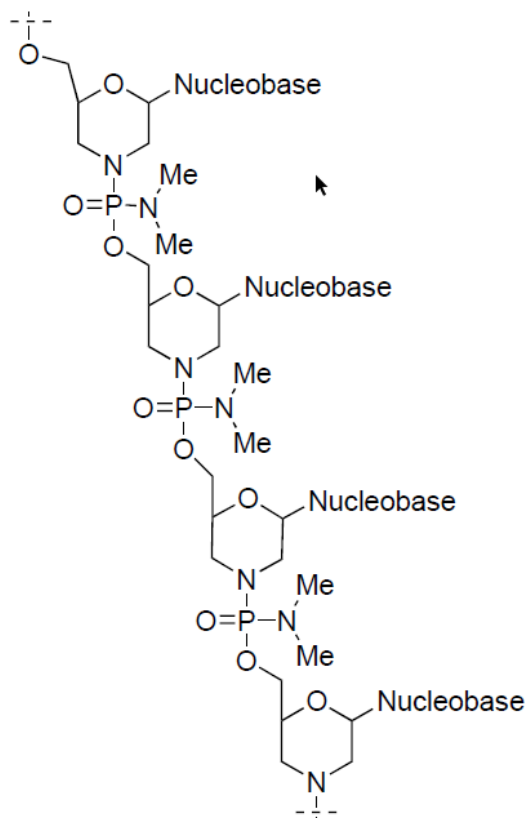
Los nucleósidos de LNA particulares son beta-D-oxi-LNA, 6'-metil-beta-D-oxi LNA, tal como (S)-6'-metil-beta-D-oxi-LNA (ScET) y ENA.

Un LNA particularmente ventajoso es beta-D-oxi-LNA.

Oligonucleótidos de morfolino

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de la invención comprende o consiste en nucleósidos de morfolino (es decir, como un oligómero de morfolino y como un oligómero de morfolino de fosfordiamidato (PMO)). Se aprobaron para su uso clínico los oligonucleótidos de morfolino de modulación de empalme –ver, por ejemplo, eteplirsén, un oligonucleótido de morfolino de 30 nt que

actúa sobre una mutación con desplazamiento de la estructura de lectura en DMD, que se usa para tratar distrofia muscular de Duchenne—. Los oligonucleótidos de morfolino tienen nucleobases unidas a anillos de morfolina de seis miembros en lugar de ribosa, tal como anillos metilenmorfolina ligados a través de grupos fosfordiamidato, por ejemplo, como se muestra en la siguiente ilustración de 4 nucleótidos de morfolino consecutivos:



En algunos modos de realización, los oligonucleótidos de morfolino de la invención pueden tener, por ejemplo, de 20–40 nucleótidos de morfolino de longitud, tal como 25–35 nucleótidos de morfolino de longitud.

Actividad y reclutamiento de RNasa H

La actividad de RNasa H de un oligonucleótido antisentido se refiere a su capacidad para reclutar RNasa H cuando forma un dúplex con una molécula de ARN complementario. El documento WO01/23613 proporciona procedimientos *in vitro* para determinar la actividad de RNasaH, que puede usarse para determinar la capacidad para reclutar RNasaH. En general, se considera que un oligonucleótido es capaz de reclutar RNasa H si, cuando se lo proporciona con una secuencia de ácido nucleico diana complementaria, tiene una velocidad inicial, medida en pmol//min, de al menos 5 %, tal como al menos 10 % o más de 20 % de la velocidad inicial determinada

mediante el uso de un oligonucleótido que tiene la misma secuencia base que el oligonucleótido modificado en evaluación, pero solo contiene monómeros de ADN con enlaces fosforotioato entre todos los monómeros en el oligonucleótido, y mediante el uso de la metodología que se proporciona en los Ejemplos 91 a 95 del documento WO01/23613 (que se incorpora en el presente documento por referencia). Para su uso en la determinación de la actividad de RHasa H, RNasa H1 recombinante se encuentra disponible de Lubio Science GmbH, Lucerna, Suiza.

Se sabe que los oligonucleótidos de ADN reclutan RNasaH eficazmente, así como los oligonucleótidos gapmeros que comprenden una región de nucleósidos de ADN (generalmente al menos 5 o 6 nucleósidos de ADN contiguos), que se flanquean en 5' y 3' por las regiones que comprenden nucleósidos modificados en azúcar 2', en general nucleósidos modificados en azúcar 2' de alta afinidad, tal como 2-O-MOE y/o LNA. Para una eficaz modulación de empalme, no es conveniente la degradación de pre-ARNm y, como tal, se prefiere evitar la degradación de RNasaH de la diana. Por lo tanto, el oligonucleótido antisentido de la invención, preferentemente, no es un oligonucleótido gapmero. El reclutamiento de RNasaH puede evitarse al limitar la cantidad de nucleótidos de ADN contiguos en el oligonucleótido antisentido –por ende, para modulación de empalme eficaz deben usarse diseños de mixmer y totalmer.

Mixmer y Totalmer

Para modulación de empalme, en general es ventajoso usar oligonucleótidos antisentido que no recluten RNasaH. Puesto que la actividad de RNasaH requiere una secuencia contigua de nucleótidos de ADN, la actividad de RNasaH de oligonucleótido antisentido puede lograrse al diseñar oligonucleótidos antisentido que no comprendan una región de más de 3 o más de 4 nucleósidos de ADN contiguos. Esto puede lograrse mediante el uso de oligonucleótidos antisentido o regiones de nucleósidos contiguos de estos con un diseño de mixmer, que comprende nucleósidos modificados en azúcar, tal como nucleósidos modificados en azúcar 2', y regiones cortas de nucleósidos de ADN, tal como 1, 2 o 3 nucleósidos de ADN. Los mixmer se ejemplifican en el presente documento por cada segundo diseño, en donde los nucleósidos alternan entre 1 LNA y 1 nucleósido de ADN, por ejemplo LDLDLDLDLDLDLL, con nucleósidos de LNA de extremos 5' y 3', y cada tercer diseño, tal como LDDLDDLDDLDDLDDL, en donde cada tercer nucleósido es un nucleósido de LNA.

Un totalmer es un oligonucleótido antisentido o una secuencia de nucleótidos contiguos de este que no comprende nucleósidos de ADN o ARN y puede

comprender, por ejemplo, solo nucleósidos de 2'-O-MOE, tal como un fosforotioato totalmente de MOE, por ejemplo, MMMMMMMMMMMMMMMMMMMM, en donde M = 2'-O-MOE, que se informó que son moduladores de empalme eficaces para uso terapéutico. De manera alternativa, un mixmer puede comprender una mezcla de nucleósidos modificados, tal como MLMLMLMLMLMLMLMLML, en donde L = LNA y M = un nucleósido modificado que no es LNA tal como un nucleósido de 2'-O-MOE. De manera alternativa, los nucleósidos internucleosídicos en mixmer y totalmer pueden ser fosforotioato, o una mayoría de enlaces nucleosídicos en mixmer pueden ser fosforotioato. A modo de ejemplo, los mixmer y totalmer pueden comprender otros enlaces internucleosídicos, tales como fosfodiéster o fosforoditioato.

Regiones D' o D'' en un oligonucleótido

La secuencia contigua de nucleobases del oligonucleótido de la invención es generalmente complementaria con respecto a múltiples sitios de unión a TDP-43 presentes en distintas dianas de ARN de TDP-43. La región del oligonucleótido antisentido que es complementaria, tal como totalmente complementaria, del sitio de unión a TDP-43 se denomina secuencia de nucleótidos contiguos. En algunos modos de realización, todos los nucleósidos del oligonucleótido antisentido están dentro de la secuencia de nucleótidos contiguos (es decir, el oligonucleótido antisentido y la secuencia de nucleótidos contiguos son de la misma longitud de nucleótidos). En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido comprende la secuencia de nucleótidos contiguos y, opcionalmente, una región conectora a base de nucleótidos que puede ligar el oligonucleótido a un grupo funcional opcional, tal como un conjugado, u otros nucleótidos terminales no complementarios (por ejemplo, región D' o D'').

En algunos modos de realización, el oligonucleótido de la invención puede comprender o consistir en la secuencia de nucleótidos contiguos del oligonucleótido que es complementaria del ácido nucleico diana, tal como una región de mixmer o totalmer y otros nucleósidos 5' y/o 3'. Los otros nucleósidos 5' y/o 3' pueden ser totalmente complementarios o no del ácido nucleico diana. Dichos otros nucleósidos 5' y/o 3' pueden denominarse regiones D' y D'' en el presente documento.

La adición de la región D' o D'' puede usarse a fin de unir la secuencia de nucleótidos contiguos, tal como el mixmer o totalmer, con un resto de conjugado u otro grupo funcional. Cuando se usa para unir la secuencia de nucleótidos contiguos con un resto de conjugado puede funcionar como conector bioescindible. De manera alternativa,

puede usarse para proporcionar protección de exonucleasa o para facilitar la síntesis o la fabricación.

La región D' o D'' puede, independientemente, comprender o consistir en 1, 2, 3, 4 o 5 nucleótidos adicionales, que pueden ser complementarios o no complementarios del ácido nucleico diana. El nucleótido adyacente a la región F o F' no es un nucleótido con modificación de azúcar, tal como un ADN o ARN o versiones con modificación de base de estos. La región D' o D'' puede servir como conector bioescindible susceptible a nucleasa (ver definición de conectores). En algunos modos de realización, los nucleótidos adicionales del extremo 5' y/o 3' se unen mediante enlaces fosfodiéster, y son ADN o ARN. Los conectores bioescindibles a base de nucleótidos adecuados para su uso como región D' o D'' se divulgan en el documento WO2014/076195, que incluyen, por ejemplo, un dinucleótido de ADN ligado a fosfodiéster. El uso de conectores bioescindibles en constructos de polioligonucleótidos se divulga en el documento WO2015/113922, en donde se usan para ligar múltiples constructos antisentido dentro de un solo oligonucleótido.

En un modo de realización, el oligonucleótido antisentido de la invención comprende una región D' y/o D'', además de la secuencia de nucleótidos contiguos que constituye un mixmer o un totalmer.

En algunos modos de realización, el enlace internucleosídico ubicado entre la región D' o D'' y la región de mixmer o totalmer es un enlace fosfodiéster.

Conectores

Un enlace o conector es una conexión entre dos átomos que une un grupo químico o segmento de interés con otro grupo químico o segmento de interés mediante uno o más enlaces covalentes. Las porciones conjugado pueden unirse al oligonucleótido directamente o mediante un resto conector (por ejemplo, conector o enlace). Los conectores sirven para conectar covalentemente una tercera región, por ejemplo, un resto de conjugado (región C), con una primera región, por ejemplo, un oligonucleótido o secuencia de nucleótidos contiguos complementaria del ácido nucleico diana (región A).

En algunos modos de realización de la invención el oligonucleótido antisentido de la invención puede comprender, opcionalmente, una región conectora (segunda región o región B y/o región Y) que se ubica entre el oligonucleótido antisentido o la secuencia de nucleótidos contiguos complementaria del ácido nucleico diana (región A o primera región) y el resto de conjugado (región C o tercera región).

La región B se refiere a conectores bioescindibles que comprenden o consisten en un enlace lábil fisiológicamente que es escindible en condiciones que normalmente se encuentran, o análogas a las que se encuentran, en un cuerpo de mamífero. Las condiciones en las que los conectores fisiológicamente lábiles se someten a transformación química (por ejemplo, escisión) incluyen condiciones químicas, tales como pH, temperatura, condiciones o agentes oxidativos o reductores, y concentración de sal que se encuentra en células de mamífero o análogas a estas. Las condiciones intracelulares de mamíferos también incluyen la presencia de la actividad enzimática presente normalmente en una célula de mamífero, tal como de enzimas proteolíticas o enzimas hidrolíticas o nucleasas. En un modo de realización, el conector bioescindible es susceptible a la escisión de nucleasa S1. En algunos modos de realización, el conector susceptible a nucleasa comprende entre 1 y 5 nucleósidos, tal como nucleósido(s) de ADN que comprende(n) al menos dos enlaces fosfodiéster consecutivos. Los conectores bioescindibles que contienen fosfodiéster se describen con mayor detalle en el documento WO 2014/076195.

La región Y se refiere a conectores que no son necesariamente bioescindibles, pero que sirven principalmente para conectar covalentemente un resto de conjugado (región C o tercera región) con un oligonucleótido (región A o primera región). Los conectores de la región Y pueden comprender una estructura en cadena o un oligómero de unidades de repetición, tales como etilenglicol, unidades de aminoácidos o grupos aminoalquilo. El oligonucleótido antisentido de la presente invención puede construirse a partir de los siguientes elementos regionales: A-C, A-B-C, A-B-Y-C, A-Y-B-C o A-Y-C. En algunos modos de realización, el conector (región Y) es un aminoalquilo, tal como un grupo C2–C36 aminoalquilo, que incluye, por ejemplo, grupos C6 a C12 aminoalquilo. En algunos modos de realización, el conector (región Y) es un grupo C6 aminoalquilo.

Tratamiento

Como se usa en el presente documento, el término “tratamiento” se refiere al tratamiento de una enfermedad existente (por ejemplo, una enfermedad o un trastorno que se indica en el presente documento), o a la prevención de una enfermedad, es decir, la profilaxis. Por lo tanto, se reconocerá que en algunos modos de realización, el tratamiento que se indica en el presente documento puede ser profiláctico. En algunos modos de realización, el tratamiento no es profiláctico, por ejemplo, el tratamiento es tratamiento de una afección de enfermedad existente que se diagnosticó en el paciente.

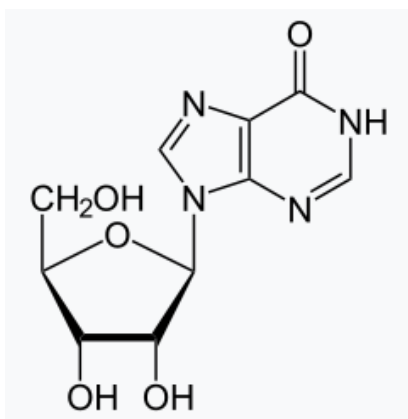
Los oligonucleótidos antisentido de la invención

El oligonucleótido antisentido de la invención es complementario de un sitio de unión a ARN en múltiples transcritos de pre-ARNm independientes, tales como a un sitio de unión a ARN de TDP-43 en múltiples transcritos de pre-ARNm. El oligonucleótido antisentido de la invención es capaz de o modular la expresión de los múltiples transcritos de pre-ARNm, por ejemplo, al modular (independientemente) el empalme de pre-ARNm, potenciar la estabilización de ARN, potenciar la expresión de la proteína codificada, reducir la expresión de proteínas truncadas codificadas por el(los) pre-ARN. Como se ilustró en los ejemplos, el oligonucleótido antisentido de la invención puede usarse, por lo tanto, para potenciar la fidelidad del procesamiento de pre-ARNm en ARNm maduro que codifica proteínas funcionales y correctamente expresadas. Los oligonucleótidos antisentido de la invención pueden ser útiles, por lo tanto, para su uso en el tratamiento de enfermedades que se asocian a una desregulación de la maduración de pre-ARNm.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de la invención puede comprender uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o más emparejamientos erróneos entre el oligonucleótido antisentido y la región de unión a TDP-43 del ácido nucleico diana. Pese a los emparejamientos erróneos, la hibridación con el ácido nucleico diana todavía puede ser suficiente para mostrar una modulación deseada del ARN diana de ARN de TDP-43. La afinidad de unión reducida que surge de emparejamientos erróneos puede compensarse de forma ventajosa mediante una mayor cantidad de nucleótidos en el oligonucleótido antisentido y/o una mayor cantidad de nucleósidos modificados capaces de aumentar la afinidad de unión a la diana, tal como nucleósidos modificados en azúcar 2', que incluyen LNA, presentes dentro de la secuencia de oligonucleótidos.

En algunos modos de realización, uno, dos, tres, cuatro, cinco seis, siete, ocho o más nucleósidos universales, tales como inosina, pueden usarse en posiciones de error de emparejamiento.

La inosina es un nucleósido que tiene la siguiente estructura:



Los nucleósidos universales son particularmente útiles cuando los oligonucleótidos antisentido se direccionan a diferentes ARN diana de TDP-43 que tienen regiones de unión a TDP-43 no idénticas.

En algunos modos de realización, la secuencia de nucleótidos contiguos puede incluir uno o más nucleótidos universales en posiciones que representan emparejamientos erróneos a un sitio de unión a TDP-43, o una secuencia diana.

En algunos modos de realización, la secuencia de nucleótidos contiguos puede incluir dos o más nucleótidos universales en posiciones que representan emparejamientos erróneos a un sitio de unión a TDP-43, o una secuencia diana.

En algunos modos de realización, la secuencia de nucleótidos contiguos puede incluir tres o más nucleótidos universales en posiciones que representan emparejamientos erróneos a un sitio de unión a TDP-43, o una secuencia diana.

En algunos modos de realización, la secuencia de nucleótidos contiguos puede incluir cuatro o más nucleótidos universales en posiciones que representan emparejamientos erróneos a un sitio de unión a TDP-43, o una secuencia diana.

En algunos modos de realización, la secuencia de nucleótidos contiguos puede incluir cinco o más nucleótidos universales en posiciones que representan emparejamientos erróneos a un sitio de unión a TDP-43, o una secuencia diana.

En algunos modos de realización, la secuencia de nucleótidos contiguos puede incluir seis o más nucleótidos universales en posiciones que representan emparejamientos erróneos a un sitio de unión a TDP-43, o una secuencia diana.

En algunos modos de realización, la secuencia de nucleótidos contiguos puede incluir siete o más nucleótidos universales en posiciones que representan emparejamientos erróneos a un sitio de unión a TDP-43, o una secuencia diana.

En algunos modos de realización, la secuencia de nucleótidos contiguos puede incluir ocho o más nucleótidos universales en posiciones que representan emparejamientos erróneos a un sitio de unión a TDP-43, o una secuencia diana.

En algunos modos de realización, los oligonucleótidos de la presente invención, que contienen uno más, tales como dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, siete o más, u ocho o más nucleótidos universales en posiciones que representan emparejamientos erróneos, pueden hibridarse con un ácido nucleico diana con valores de ΔG° estimados por debajo de -10 kcal para oligonucleótidos que tienen 10-32 nucleótidos de longitud.

En algunos modos de realización, los oligonucleótidos antisentido de la presente invención, que contienen uno más, tal como dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, siete o más, u ocho o más emparejamientos erróneos, pueden hibridarse con un ácido nucleico diana con valores de ΔG° estimados por debajo de -12 kcal, -15 kcal, -17 kcal, -20 kcal, -30 kcal, -40 kcal, -50 kcal o -60 kcal para oligonucleótidos que tienen 10-32 nucleótidos de longitud.

El cálculo de valores de ΔG° se analizó anteriormente.

En algunos modos de realización, los oligonucleótidos antisentido de la invención o la secuencia de nucleótidos contiguos de estos comprenden o consisten en 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 nucleótidos contiguos de longitud.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido o la secuencia de nucleótidos contiguos comprende o consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias SEQ ID NO 1-83 o SEQ ID NO 118-126. Cabe destacar que la secuencia que se muestra en SEQ ID NO 1-83 o SEQ ID NO 118-126 puede incluir nucleobases modificadas que funcionan como la nucleobase mostrada en el apareamiento de bases, por ejemplo, puede usarse 5-metil citosina en lugar de metil citosina. Puede usarse inosina como una base universal.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido o la secuencia de nucleótidos contiguos comprende o consiste en 8 a 30 u 8 a 40 nucleótidos de longitud con al menos 75 %, tal como al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 % de identidad, al menos 95 % de identidad o más de 95 % identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 a 83 o SEQ ID NO 118-126. En algunos modos de realización el oligonucleótido antisentido o la secuencia de nucleótidos contiguos comprende o consiste en 8 a 30 u 8 a 40 nucleótidos de longitud con 100 % de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO 1 a 83 o SEQ ID NO 118-126.

Se entiende que las secuencias de nucleobases contiguas (secuencia de motivo) pueden modificarse para, por ejemplo, aumentar la resistencia a nucleasa y/o la afinidad de fijación al ácido nucleico diana.

El patrón en donde los nucleósidos modificados (tal como nucleósidos modificados de alta afinidad) se incorporan en la secuencia de oligonucleótido se denomina, generalmente, diseño de oligonucleótido.

Los oligonucleótidos antisentido de la invención están diseñados con nucleósidos modificados y nucleósidos de ADN. De forma ventajosa, se usan nucleósidos modificados de alta afinidad.

En un modo de realización, el oligonucleótido antisentido, que comprende una secuencia de nucleótidos contiguos que comprende uno o más nucleósidos 2'-MOE, puede comprender, además, al menos 1 nucleósido adicional o adicionalmente 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, al menos 16 nucleósidos modificados, al menos 17 nucleósidos modificados, al menos 18 nucleósidos modificados, al menos 19 nucleósidos modificados, al menos 20 nucleósidos modificados, al menos 21 nucleósidos modificados, al menos 22 nucleósidos modificados, al menos 23 nucleósidos modificados, al menos 24 nucleósidos modificados, al menos 25 nucleósidos modificados, al menos 26 nucleósidos modificados, al menos 27 nucleósidos modificados, al menos 28 nucleósidos modificados, al menos 29 nucleósidos modificados, al menos 30 nucleósidos modificados, al menos 31 nucleósidos modificados, al menos 32 nucleósidos modificados, al menos 33 nucleósidos modificados nucleósidos, al menos 34 nucleósidos modificados, al menos 35 nucleósidos modificados, al menos 36 nucleósidos modificados, al menos 37 nucleósidos modificados, al menos 38 nucleósidos modificados, al menos 39 nucleósidos modificados o más. En un modo de realización el oligonucleótido antisentido, que comprende una secuencia de nucleótidos contiguos que comprende uno o más nucleósidos 2'-MOE, puede comprender, además, 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. Las modificaciones adecuadas se describen bajo “nucleósido modificado”, “nucleósidos modificados de alta afinidad”, “modificaciones en azúcar”, “modificaciones en azúcar 2'” y “ácidos nucleicos bloqueados (LNA)”.

En un modo de realización, el oligonucleótido antisentido, que comprende una secuencia de nucleótidos contiguos que comprende uno o más nucleósidos 2'-MOE, puede comprender, además, uno o más nucleósidos modificados en azúcar, tales como los nucleósidos modificados en azúcar 2'. Preferentemente, el oligonucleótido de la invención puede comprender, además, uno o más nucleósidos modificados en azúcar 2' seleccionados independientemente del grupo que consiste en 2'-O-alkil-ARN, 2'-O-metil-ARN, 2'-alcoxi-ARN, 2'-O-metoxietil-ARN, 2'-amino-ADN, 2'-fluoro-ADN, ácido arabino nucleico (ANA), 2'-fluoro-ANA y nucleósidos de LNA. Es ventajoso que uno o más de los nucleósidos modificados sean un ácido nucleico bloqueado (LNA).

En otro modo de realización, el oligonucleótido antisentido comprende al menos un enlace internucleosídico modificado. Las modificaciones internucleosídicas adecuadas se describen en "Enlace internucleosídico modificado". Resulta ventajoso si al menos 75 % de, tal como todos, los enlaces internucleosídicos dentro de la secuencia de nucleótidos contiguos son enlaces internucleosídicos fosforotioato o boranofosfato. En algunos modos de realización todos los enlaces internucleotídicos en la secuencia contigua del oligonucleótido antisentido son enlaces fosforotioato.

Sales aceptables desde el punto de vista farmacéutico

El término "sales", como se usa en el presente documento, se ajusta a su significado generalmente conocido, es decir, un ensamblaje iónico de aniones y cationes.

La invención contempla sales farmacéuticamente aceptables de los oligonucleótidos antisentido de la invención. Dicho de otro modo, la invención proporciona sales farmacéuticamente aceptables del oligonucleótido antisentido de la invención.

En algunos modos de realización, la sal farmacéuticamente aceptable es una sal de sodio, una sal de potasio o una sal de amonio.

La invención proporciona una sal de sodio farmacéuticamente aceptable del oligonucleótido antisentido de la invención.

La invención proporciona una sal de potasio farmacéuticamente aceptable del oligonucleótido antisentido de la invención.

La invención proporciona una sal de amonio farmacéuticamente aceptable del oligonucleótido antisentido de la invención.

Suministro de moduladores de empalme de oligonucleótidos antisentido

La invención proporciona el oligonucleótido antisentido de la invención en donde el oligonucleótido antisentido se encapsula en un vehículo de administración basado en

lípidos, unido covalentemente o encapsulado en un dendrímero, o conjugado con un aptámero.

Esto puede ser con el propósito de administrar el oligonucleótido antisentido de la invención a las células diana y/o para potenciar la farmacocinética del oligonucleótido antisentido.

Ejemplos de vehículos de administración a base de lípidos incluyen emulsiones de aceite en agua, micelas, liposomas y nanopartículas lipídicas.

Procedimiento de fabricación

En otro aspecto, la invención proporciona procedimientos para fabricar los oligonucleótidos antisentido de la invención que comprenden hacer reaccionar unidades de nucleótidos y así formar unidades de nucleótidos contiguos ligados covalentemente comprendidas en el oligonucleótido. Preferentemente, el procedimiento usa química de fosforamidita (ver, por ejemplo, Caruthers et al, 1987, *Methods in Enzymology* vol. 154, páginas 287-313). En otro modo de realización el procedimiento comprende, además, hacer reaccionar la secuencia de nucleótidos contiguos con un resto de conjugación (ligando) para unir covalentemente el resto de conjugado al oligonucleótido antisentido. En otro aspecto se proporciona un procedimiento para fabricar la composición de la invención, que comprende mezclar el oligonucleótido antisentido de la invención con un diluyente, disolvente, portador, sal y/o adyuvante farmacéuticamente aceptables.

Composición farmacéutica

En otro aspecto, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de los oligonucleótidos antisentido mencionados anteriormente y un diluyente, portador, sal y/o adyuvante farmacéuticamente aceptables. Un diluyente farmacéuticamente aceptable incluye solución salina tamponada con fosfato (PBS) y las sales farmacéuticamente aceptables incluyen, entre otros, sales de sodio y potasio. En algunos modos de realización el diluyente farmacéuticamente aceptable es solución salina tamponada con fosfato estéril. En algunos modos de realización el oligonucleótido antisentido se usa en el diluyente farmacéuticamente aceptable a una concentración de 50-300 μ M de solución.

Aplicaciones

Los oligonucleótidos antisentido de la invención pueden usarse como reactivos de investigación, por ejemplo, para diagnósticos, tratamientos y profilaxis.

En la investigación, tales oligonucleótidos antisentido pueden usarse para imitar la actividad de TDP-43 en células (por ejemplo, cultivos celulares *in vitro*, tales como en

células neuronales) y animales experimentales, lo que facilita el análisis funcional de la diana o una apreciación de su utilidad como diana para intervención terapéutica.

La presente invención proporciona un procedimiento, tal como un procedimiento *in vivo* o *in vitro*, para potenciar la funcionalidad de TDP-43 en una célula que expresa niveles anómalos o disminuidos de TDP-43, dicho procedimiento comprende administrar un oligonucleótido antisentido o la composición farmacéutica de acuerdo con la invención, en una cantidad eficaz a dicha célula. En algunos modos de realización, la célula diana, es una célula mamífera, en particular una célula humana. La célula diana puede ser un cultivo celular *in vitro* o una célula *in vivo* que forma parte de un tejido en un mamífero. En modos de realización preferidas, la célula diana es una célula neuronal, tal como una célula neuronal que se disminuye en actividad de TDP-43 normal. En algunos modos de realización, la célula diana puede expresar una variante de TDP-43 asociada a enfermedad y/o expresar TDP-43 disfuncional.

Para el tratamiento, los oligonucleótidos antisentido pueden administrarse a un animal o un ser humano, que se cree que tiene una enfermedad o trastorno, que puede tratarse mediante la imitación de TDP-43.

La invención proporciona procedimientos para tratar o prevenir una enfermedad, que comprenden administrar una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de un oligonucleótido antisentido o una composición farmacéutica de la invención a un sujeto que sufre de o que es susceptible a la enfermedad.

La invención también se refiere a un oligonucleótido antisentido o a una composición farmacéutica como se define en el presente documento para su uso como un medicamento.

El oligonucleótido antisentido o una composición farmacéutica de acuerdo con la invención se administra típicamente en una cantidad eficaz.

La invención también proporciona el uso del oligonucleótido antisentido de la invención como se describe para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno de acuerdo con la invención, o para un procedimiento para el tratamiento de un trastorno mencionado en el presente documento.

La invención se refiere, además, al uso de un oligonucleótido antisentido o una composición farmacéutica como se define en el presente documento para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno neurológico, como trastornos neurodegenerativos, caracterizado por patología de TDP-43 o error de ubicación de TDP-43 con respecto al núcleo, tal como ALS.

La invención también proporciona el oligonucleótido antisentido de la invención para su uso en un procedimiento para el tratamiento de una enfermedad o trastorno como se menciona en el presente documento.

En un modo de realización, la invención se refiere a oligonucleótidos antisentido o composiciones farmacéuticas para su uso en el tratamiento de un trastorno neurológico, como trastornos neurodegenerativos, caracterizado por patología de TDP-43 o error de ubicación de TDP-43 con respecto al núcleo, tal como ALS.

La enfermedad o trastorno puede seleccionarse del grupo que consiste en esclerosis lateral amiotrófica (ALS), degeneración lobular frontotemporal (FTLD), parálisis supranuclear progresiva (PSP), esclerosis lateral primaria, atrofia muscular progresiva, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, autismo, demencia por esclerosis del hipocampo, síndrome de Down, enfermedad de Huntington, enfermedades de poliglutamina, tales como ataxia espinocerebelosa 3, miopatías y encefalopatía traumática crónica.

Administración

Los oligonucleótidos antisentido o composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden, por ejemplo, administrarse, por ejemplo, mediante administración intracerebral, intracerebroventricular o intratecal.

En un modo de realización preferido el oligonucleótido antisentido o la composición farmacéutica de la invención se administran por vía parenteral que incluye inyección o infusión intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular, administración intratecal o intracraneal, por ejemplo, intracerebral o intraventricular, intravítrea. En un modo de realización el oligonucleótido antisentido activo o la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. En otro modo de realización el oligonucleótido antisentido activo o la composición farmacéutica se administra por vía subcutánea.

Tratamientos conjuntos

En algunos modos de realización, el oligonucleótido antisentido de la invención o la composición farmacéutica de la invención es para su uso en un tratamiento combinado con uno o más agentes terapéuticos.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Identificación de ARNm que se empalman erróneamente en ausencia de la proteína TDP43

Una característica distintiva de la enfermedad ALS es la presencia de proteína TDP43 agregada citoplásmica en una pequeña fracción de las células neuronales del

paciente. La consecuencia de la agregación citoplasmática de TDP43 es que disminuye en el núcleo celular y, por lo tanto, no puede realizar su función normal aquí.

TDP43 se demostró que afecta el empalme de ARNm. Con el fin de identificar nuevos genes cuyos ARNm se regulen por la presencia de TDP43, hicimos una atenuación de TDP43 en un modelo de células neuronales. Se realizó la secuenciación del ARN en las células y se realizó un análisis de transcripción *de novo* para identificar los genes afectados con nuevos patrones de empalme.

Se sembraron neuronas glutamatérgicas humanas (Fujifilms) en 60 000 células viables junto con 10 000 astrocitos viables (Fujifilms) en placas de 96 pocillos recubiertas con solución de laminina y poli(etilenimina) (Sigma Aldrich) en 200 µl de medio de cultivo (día -1).

Para atenuar TDP-43, se adicionó el compuesto A (ID NO: 1, SEQ ID 13) al medio de cultivo a 5 µM el día 0, en otros pocillos se adicionó PBS como control. La mitad del medio de cultivo celular se cambió 3 veces por semana durante todo el experimento (día 2, 5, 7, 10, 12, 14 & 17). Las células se recolectaron el día 20 mediante el uso del amortiguador de lisis Magnapure (Roche) y el ARN se aisló en el sistema MagNA pure 96 (Roche) de acuerdo con las instrucciones del fabricante que incluyen la etapa de tratamiento de DNasa. Las bibliotecas NGS se prepararon a partir de 100 ng de ARN total mediante el uso de las plataformas Illumina® del kit KAPA mRNA HyperPrep (Roche). Las bibliotecas se sometieron a secuenciación de extremos apareados en un secuenciador NovaSeq6000 (Illumina) con 150 pb de longitud de lectura. El análisis de datos se llevó a cabo mediante el uso de CLC Genomics Workbench 21. Los datos se analizaron primero mediante la ejecución de un análisis de mapeo de grandes brechas mediante el uso del ensamblaje del genoma hg38, seguido del descubrimiento de transcritos. Los nuevos eventos de empalme previstos se examinaron mediante inspección visual manual para identificar eventos de empalme reales. Estos son algunos de los eventos de empalme incorrecto identificados como resultado de la disminución de TDP43 que después restablecimos nuevamente mediante el uso de un ASO (ejemplo 2).

STMN2: Inclusión de un nuevo exón 2, que contiene un sitio de señal poliA, lo que da como resultado un transcrito truncado que produce una proteína STMN2 truncada. La primera base del nuevo exón 2 se ubica en Chr 8 pos 79,616,822 (hg38).

CAMK2B: Nuevo uso del sitio donador de empalme que da como resultado un exón alargado, lo que provoca una descomposición mediada sin sentido del transcrito. La

última base del exón alargado se ubica en la posición Chr 7 pos 44,222,117 (hg38) que se empalma junto con el siguiente sitio aceptor de empalme canónico en Chr 7 pos 44,220,901 (hg38).

KALRN: Inclusión de un nuevo exón que da como resultado un codón de parada prematuro y una descomposición mediada sin sentido del transcrito. El nuevo exón tenía dos posibles sitios aceptores de empalme y el mismo sitio donante de empalme, lo que resultó en un exón con la primera y la última base que estaba en ya sea chr 3 (hg38): (124,700,977; 124,701,255) o (124,701,093-124,701,255).

UNC13A: Inclusión de un nuevo exón que da como resultado un codón de parada prematuro y una descomposición mediada sin sentido del transcrito. El nuevo exón tenía dos posibles sitios aceptores de empalme y el mismo sitio donante de empalme, lo que resultó en un exón con la primera y la última base que estaba en ya sea chr 19 (hg38): (17,642,591; 17,642,414) o (17,642,541-17,642,414). UNC13A se encuentra en la cadena negativa.

ACTL6B: Se descubrió la inclusión de un nuevo exón de 69 pares de bases en ACTL6B tras la pérdida de TDP43. La primera y última base en el nuevo exón es 100,650,643 y 100,650,575

De acuerdo con la anotación del gen humano hg38 con el ACTL6B colocado en la orientación negativa.

Ejemplo 2: Restablecimiento mejorada del empalme mediante el uso de un MOE ASO con repetición de CA con conjugación de colesterol en glutaneuronas disminuidas en TDP43

Aquí se muestra la capacidad de ASO con repetición de CA para inducir empalme apropiado en las dianas de TDP43 STMN2, KALRN, CAMK2B, ACTL6B y UNC13A. Demostramos que ASO con repetición de CA MOE con colesterol conjugado al extremo 5' tienen una capacidad especialmente potente para restablecer el empalme de los genes diana afectados.

Se sembraron neuronas glutamatérgicas humanas (Fujifilms) en 60 000 células viables junto con 10 000 astrocitos viables (Fujifilms) en placas de 96 pocillos recubiertas con solución de laminina y poli(etilenimina) (Sigma Aldrich) en 200 µl de medio de cultivo (día -1). Para atenuar TDP-43, se adicionó el compuesto A (ID NO: 1, SEQ ID 13) al medio de cultivo a 5 µM el día 0 (excepto cuatro pocillos de control por placa). La mitad del medio de cultivo celular se cambió 3 veces por semana durante todo el experimento (días 2, 5, 7, 9, 12, 14, 16 & 19). Los ASO con repetición de CA se

adicionaron al medio de cultivo celular el día 5 en dosis variables. (25 uM, 7,91 uM, 2,5 uM, 0,791 uM, 0,25 uM, 0,0791 uM, 0,025 uM, 0,00791 uM).

En total, las células se trataron con 7 ASO diferentes que contenían repeticiones de CA, así como un ASO de control negativo (tabla 1). 12 pocillos en la placa recibieron solamente el compuesto A (SEQ ID 13) para servir como referencia inicial.

Las células se recolectaron el día 21 mediante el uso del amortiguador de lisis Magnapure (Roche) y el ARN se aisló en el sistema MagNA pure 96 (Roche) de acuerdo con las instrucciones del fabricante que incluyen la etapa de tratamiento de DNasa. El ARN purificado se desnaturalizó 30 s a 90 antes de la síntesis de cADN. El cADN se creó mediante el uso del kit de síntesis de cADN avanzado iScript para RT-qPCR (Biorad) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Las mediciones de los niveles de expresión de los genes diana se llevaron a cabo mediante PCR digital por goteo mediante el uso del sistema QX1 (Bio-Rad) junto con la edición estándar del programa informático QX1. Los ensayos de sonda de PCR usados para medir la expresión de ARNm diana normalmente empalmado se diseñaron para abarcar los dos exones, en donde en el medio aparecería el nuevo exón “mutante”.

El valor de expresión de los experimentos se muestra en la Tabla 1. El ARN se examinó mediante la medición de cuatro genes en una ejecución de reacción de ddPCR cuádruple. Mezcla 1 (TARDBP, STMN2, KALRN, HPRT1) Mezcla 2 (

Se usaron ensayos de sonda de PCR diseñados a medida sintetizados en (Integrated DNA technologies (IDT)) o ensayos de ddPCR prediseñados de biorad:

Mezcla de sonda 1

TARDBP:

Cebador 1: CAGCTCATCCTCAGTCATGTC, Cebador 2: GATGGTGTGACTGCAAACCTTC, Sonda: /5Cy5/CAGCGCCCCACAAACACTTTTCT/3IAbRQSp/)

STMN2:

Cebador 1: CTGCTCAGCGTCTGC, Cebador 2: GTTGCGAGGTTCCGG, Sonda: /5HEX/CTAAAACAG/ZEN/CAATGGCCTACAAGGAAAAAATGAAG/3IABkFQ/

KALRN:

Cebador 1: CGAGCCCTCGGAGTTTG, Cebador 2: TCCTTCCAAGAAATGGTGGC, Sonda: /56-FAM/CGACTTCCA/ZEN/GAATATGATGCTGCTGCTGATG/3IABkFQ/

La siguiente sonda HPRT1 marcada con CY5.5 se adquirió de BioRad: dHsaCPE13136107.

Mezcla de sonda 2:

ACTL6B:

Cebador 1: TCTGAGCCAAACCTGCAC, Cebador 2: ATCAGCTCTGTCAGCTTCTCC,

Sonda: /5HEX/CGAGGCTCC/ZEN/GTGGAACACACG/3IABkFQ/)

UNC13A:

Cebador 1: GATCAAAGGCGAGGAGAAGG, Cebador 2:

TGGCATCTGGGATCTTCAC, Sonda: /56-

FAM/ACCTGTCTG/ZEN/CATGAGAACCTGTTCCACTTC /3IABkFQ/

CAMK2B:

Cebador 1: CTGACAGTGCCAATACCACC, Cebador 2: GCTGCTCCGTGGTCTTAAT,

Sonda: /5Cy5/ATGAAGACGCTAAAGCCCGGAAGCAG/3IAbRQSp/

La siguiente sonda GAPDH marcada con CY5.5 se adquirió de BioRad: dHsaCPE70459273.

Tabla 1: Tabla de compuestos

Anotación clave de Helm:

[LR](G) es un nucleósido de beta-D-oxi-LNA guanina,

[LR](T) es un nucleósido de beta-D-oxi-LNA timina,

[LR](A) es un nucleósido de beta-D-oxi-LNA adenina,

[LR]([5meC]) es un nucleósido de beta-D-oxi-LNA 5-metil citosina,

[MOE](G) es un nucleósido 2'-O-metoxietil-ARN guanina,

[MOE](T) nucleósido 2'-O-metoxietil-ARN timina,

[MOE](A) nucleósido 2'-O-metoxietil-ARN adenina,

[MOE]([5meC]) nucleósido 2'-O-metoxietil-ARN 5-metil citosina,

[dR](G) es un nucleósido de ADN guanina,

[dR](T) es un nucleósido de ADN timina,

[dR](A) es un nucleósido de ADN adenina,

[dR]([C]) es un nucleósido de ADN citosina,

[ChoITEG] es un colesterol enlazado a trietilen glicol

ID NO	Secuencia de análogo natural	SEQ ID NO de oligo	HELM	Secuencia diana natural	SEQ ID NO diana
ID NO: 1	TCCACA CTGAAC AAACC	SEQ ID NO 13	ARN1{[LR](T)[sP].[LR]([5meC])[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[d	GGTTTGT TCAGTGT GGA	SEQ ID NO 96

[illegible]

			1:R1.0		
ID NO: 8	[CoITEG]- CACACA CACACA CACACA CACACA CACAC	SEQ ID NO 21	QUÍM1{[CoITEG]}ARN1{[M OE]([5meC])[sP].[MOE](A)[s P].[MOE]([5meC])[sP].[MOE] (A)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)[sP].[MOE]([5m eC])[sP].[MOE](A)[sP].[MOE] ([5meC])[sP].[MOE](A)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MO E](A)[sP].[MOE]([5meC])[sP] .[MOE](A)[sP].[MOE]([5meC])sP].[MOE](A)[sP].[MOE]([5 meC])[sP].[MOE](A)[sP].[MO E]([5meC])[sP].[MOE](A)[sP] .[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)sP].[MOE]([5meC])[sP].[MO E](A)[sP].[MOE]([5meC])}AR N2{P}\$ARN2,QUÍM1,1:R2- 1:R1 ARN1,ARN2,1:R1- 1:R1.0	GTGTGT GTGTGT GTGTGT GTGTGT GTGTG	SEQ ID NO 97
ID NO: 9	CCAAATC TTATAAT AACTAC	SEQ ID NO 83	ARN1{[LR]([5meC])[sP].[dR](C)[sP].[LR](A)[sP].[LR](A)[sP].[LR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR] (C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[s P].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[d R](A)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[LR](A)[sP].[L R]([5meC])[sP].[dR](T)[sP].[L R](A)[sP].[LR]([5meC]))}.0	GTAGTTA TTATAAG ATTTGG	SEQ ID NO 99

Tabla 2: Rescate del empalme de ARNm diana de TDP43 después de la exposición a oligonucleótidos

Los datos que se muestran en la Tabla 2 se normalizaron para la expresión del gen constitutivo presente en la configuración de PCR dada (ya sea HPRT1 o GAPDH), y

finalmente se normalizaron al valor de expresión promedio de los pocillos de control (PBS) que no recibieron ningún ASO con repetición de CA o atenuación de TDP43. La expresión promedio para todas las condiciones dadas se muestra en la última columna. KD ("atenuación", describe pocillos que solo recibieron tratamiento con el gapmero ASO que degrada el ARNm de TDP43)

Tratamiento	Concentración de rescate de ASO uM	TDP43	STMN2	KALRN	ACT L6B	UNC 13A	CAM K2B
KD		4,2	13,1	1,0	0,3	3,1	4,8
KD		4,8	14,1	0,8	0,5	2,9	8,6
KD		9,6	8,9	1,7	0,7	3,9	8,1
KD		8,0	12,5	3,5	0,4	3,0	6,6
KD		5,4	16,1	1,5	0,2	4,9	5,3
KD		5,8	22,1	4,1	1,4	4,3	8,7
KD		3,8	16,1	1,7	0,2	2,9	6,3
KD		5,6	18,7	3,1	0,6	3,4	8,2
KD		5,1	16,0	1,2	0,6	2,0	6,8
KD		6,0	13,3	1,4	0,7	2,1	5,9
KD		3,4	13,5	1,6	0,5	2,3	5,8
KD		5,6	14,1	1,2	0,5	2,8	5,8
PBS		92,8	107,5	97,1	93,4	93,0	96,8
PBS		102,9	90,4	86,3	86,0	73,7	77,2
PBS		101,8	105,6	109,8	92,3	105,7	115,3
PBS		102,6	96,4	106,8	128,2	127,6	110,7
KD + ID NO: 2	25	3,2	46,2	28,5	15,1	6,6	18,9
KD + ID NO: 2	7,911	2,7	37,8	17,8	11,4	7,8	20,2
KD + ID NO: 2	2,5	3,4	32,0	13,3	3,9	4,1	15,1
KD + ID NO: 2	0,792	6,0	26,8	10,4	3,1	4,7	14,4
KD + ID NO: 2	0,25	5,2	22,8	4,4	1,0	4,7	9,8
KD + ID NO: 2	0,079	6,9	18,5	2,4	0,7	5,1	8,3
KD + ID NO: 2	0,025	7,9	14,4	1,0	0,4	2,5	6,6

KD + ID NO: 2	0,008	6,1	13,4	0,7	0,4	2,3	5,3
KD + ID NO: 3	25	NA	NA	NA	NA	NA	NA
KD + ID NO: 3	7,911	4,6	37,5	19,8	0,6	3,5	10,2
KD + ID NO: 3	2,5	4,6	22,1	8,1	0,8	3,1	8,4
KD + ID NO: 3	0,792	7,2	14,4	1,9	0,0	3,3	12,7
KD + ID NO: 3	0,25	5,9	17,8	1,1	1,2	3,5	7,6
KD + ID NO: 3	0,079	4,9	16,8	1,2	0,5	3,7	5,5
KD + ID NO: 3	0,025	4,4	11,7	2,2	0,2	2,2	5,2
KD + ID NO: 3	0,008	6,5	16,8	1,2	0,3	4,5	6,4
KD + ID NO: 5	25	3,3	91,2	53,3	47,6	7,8	28,4
KD + ID NO: 5	7,911	3,7	72,4	39,7	22,2	4,1	16,4
KD + ID NO: 5	2,5	1,4	58,3	32,5	14,9	3,9	15,6
KD + ID NO: 5	0,792	2,2	49,3	27,6	6,9	3,2	13,7
KD + ID NO: 5	0,25	2,7	35,2	14,8	4,2	4,5	13,3
KD + ID NO: 5	0,079	4,2	23,9	5,5	0,1	2,6	9,8
KD + ID NO: 5	0,025	6,5	16,0	2,0	0,2	1,3	7,7
KD + ID NO: 5	0,008	5,2	18,8	2,0	0,4	3,7	6,1
KD + ID NO: 6	25	2,5	104,1	74,8	41,0	10,8	30,2
KD + ID NO: 6	7,911	2,6	85,7	50,3	16,8	9,8	19,0

KD + ID NO: 6	2,5	3,1	76,0	54,6	18,8	6,4	21,3
KD + ID NO: 6	0,792	2,7	73,0	45,8	13,9	4,2	18,9
KD + ID NO: 6	0,25	5,3	66,3	32,6	3,9	4,7	21,8
KD + ID NO: 6	0,079	2,9	54,7	27,5	2,7	4,1	16,2
KD + ID NO: 6	0,025	6,9	26,7	13,3	0,7	2,5	10,9
KD + ID NO: 6	0,008	3,8	19,7	3,0	1,0	3,4	8,4
KD + ID NO: 4	25	2,8	51,6	28,7	6,3	4,8	18,7
KD + ID NO: 4	7,911	5,4	45,7	23,5	1,5	4,1	12,8
KD + ID NO: 4	2,5	5,3	27,6	8,6	0,5	5,2	9,7
KD + ID NO: 4	0,792	5,3	19,7	5,5	0,2	3,3	7,7
KD + ID NO: 4	0,25	5,7	18,8	0,8	0,9	4,3	5,6
KD + ID NO: 4	0,079	6,3	17,2	0,6	0,1	4,3	7,6
KD + ID NO: 4	0,025	5,9	11,9	1,3	0,4	2,5	5,7
KD + ID NO: 4	0,008	6,8	17,9	0,5	0,4	4,3	6,4
KD + ID NO: 7	25	3,1	99,9	57,3	47,5	7,8	25,0
KD + ID NO: 7	7,911	4,2	80,3	44,7	25,7	5,0	19,3
KD + ID NO: 7	2,5	3,5	58,4	35,2	16,5	4,1	12,7
KD + ID NO: 7	0,792	2,4	49,7	14,7	2,7	3,8	15,2
KD + ID NO: 7	0,25	3,8	36,6	14,2	6,3	3,3	7,6

KD + ID NO: 7	0,079	3,9	26,7	5,6	0,5	2,2	7,4
KD + ID NO: 7	0,025	4,0	16,9	3,1	0,1	2,5	5,9
KD + ID NO: 7	0,008	3,8	17,8	3,0	1,0	3,9	8,7
KD + ID NO: 8	25	3,5	91,4	58,1	32,7	8,5	25,3
KD + ID NO: 8	7,911	3,5	82,6	48,7	15,7	9,3	24,2
KD + ID NO: 8	2,5	3,0	73,0	44,2	14,2	6,1	20,7
KD + ID NO: 8	0,792	2,5	72,5	47,6	14,6	5,6	21,9
KD + ID NO: 8	0,25	2,4	57,8	35,9	10,1	5,1	19,4
KD + ID NO: 8	0,079	3,2	54,2	21,0	5,4	4,1	14,1
KD + ID NO: 8	0,025	7,9	25,7	8,8	0,7	3,4	4,7
KD + ID NO: 8	0,008	7,0	21,2	4,7	0,4	2,7	7,5
KD + ID NO: 9	25	6,7	16,7	1,7	1,0	2,4	7,3
KD + ID NO: 9	7,911	4,2	17,3	0,5	0,7	4,1	6,1
KD + ID NO: 9	2,5	6,1	17,5	3,5	0,4	4,0	5,8
KD + ID NO: 9	0,792	4,1	13,0	1,3	0,5	2,7	6,3
KD + ID NO: 9	0,25	6,6	15,5	2,0	0,6	3,4	6,6
KD + ID NO: 9	0,079	5,5	11,5	0,8	0,0	2,6	10,3
KD + ID NO: 9	0,025	6,2	17,5	2,2	0,2	4,2	3,8
KD + ID NO: 9	0,008	4,3	19,0	2,4	0,4	2,7	6,7

Determinadas referencias

Salter CG, Beijer D, Hardy H, *et al.* Truncating SLC5A7 mutations underlie a spectrum of dominant hereditary motor neuropathies. *Neurol Genet.* 2018;4(2):e222.

Yukiko Nasu-Nishimura 1, Tomoatsu Hayashi, Tomohiro Ohishi, Toshio Okabe, Susumu Ohwada, Yoshimi Hasegawa, Takao Senda, Chikashi Toyoshima, Tsutomu Nakamura, Tetsu Akiyama. Role of the Rho GTPase-activating Protein RICS in Neurite Outgrowth. *Genes Cells.* Junio de 2006;11(6):607-14.

Arundhati Jana, Edward L. Hogan y Kalipada Pahan. Ceramide and neurodegeneration: Susceptibility of neurons and oligodendrocytes to cell damage and death. *J Neurol Sci.*, 15 de marzo de 2009; 278(1-2): 5–15.

Conti *et al.* TDP-43 affects splicing profiles and isoform production of genes involved in the apoptotic and mitotic cellular pathways. *Nucleic Acids Res.* 15 de octubre de 2015; 43(18): 8990–9005.

Humphrey *et al.* Quantitative analysis of cryptic splicing associated with TDP-43 depletion. *BMC Medical Genomics* 2017; tomo 10, artículo número: 38 (2017).

Melamed *et al.* Premature polyadenylation-mediated loss of stathmin-2 is a hallmark of TDP-43-dependent neurodegeneration. *Nat Neurosci.* Feb de 2019; 22(2): 180–190.

Klim *et al.*, ALS-implicated protein TDP-43 sustains levels of STMN2, a mediator of motor neuron growth and repair. *Nature Neuroscience* 22, páginas 167–179 (2019)

SECUENCIAS

SEQ ID NO	Secuencia 5'-3'
N/A	ACACACAC
N/A	ACACACACA
1	ACACACACAC
2	ACACACACACA
3	ACACACACACAC
4	ACACACACACACA
5	ACACACACACACACAC
6	ACACACACACACACACAC
N/A	CACACAC
N/A	CACACACA
N/A	CACACACAC
7	CACACACACA

8	CACACACACAC
9	CACACACACACA
10	CACACACACACAC
11	CACACACACACACACA
12	CACACACACACACACACA
13	TCCACACTGAACAAACC
14	CACACACACACACACACACAC
15	ACACACACACACACACACACAC
16	CACACACACACAACACACACACAC
17	CACACACACACACACACACACAC
18	ACACACACACACACACACACACAC
19	CACACACACACACACACACACACAC
20	ACACACACACACACACACACACAC
21	CACACACACACACACACACACACAC
22	ACACACACACACACACACACACACAC
23	CACACACACACACACACACACACACAC
24	ACACACACACACACACACCACACACACACACA
25	CACACACACACACACACACACACACACACACA
26	CACACACACACACACACAACACACACACACACAC
27	ACACACACACACACACACCACACACACACACACACA
28	ACACACACACACACACACACACACACACACACAC
29	CACACACCCACICACACACGCAC
30	CACACICACACACACACACACAC
31	CACACACACACICACACACACAC
32	CACACICACACACACACACACTC
33	CACATACACACCCACACACACAC
34	CACACACACACACACACGCACAC
35	CACICACICACACACICACICAC
36	CACACACACACACACTCTCACAC
37	CTCACACACACACACACACACAC
38	CACACACACACAAACACACACAC
39	CACACGCACGCACACACACACAC
40	CACGCACACACCCACACACTCAC
41	CACACACACACACTCTCTCACAC

42	CACACACACACACICICICAC
43	CACTCACACACTCACACACAC
44	CACGCACACACGCACACACAC
45	CACCCACACACCCACACACAC
46	CACACGCACATACACACACCC
47	TTCACACACACACACACACAC
48	CACACACACACACACACACAA
49	CACACACACACACACACACAI
50	CACAIACACACACACACACAC
51	CATACACACACACACACATAC
52	CAAACACACACACACACACAC
53	CACACACACTCACACACACAC
54	CACAGACACACACACACACAC
55	CACAAACACACACACACACAC
56	CACATACACACACACACACAC
57	CATACGCACATACACGCACACA
58	CACATATACACATACACACAC
59	CACACACACACACACACTCTCT
60	CACGCACACACACACACACAC
61	CACACACACACACACAITITIT
62	CGCACACACACACACACACAC
63	CACACACACACACACAGACAG
64	CACACACACAAAAAACACACAC
65	CACACACACACCCCCCACACAC
66	CACACACACTCTCTCACACAC
67	CACAAACACACACACACACAC
68	CACTCACACACACACACACAC
69	CACACACACAAACACACACAC
70	CACCCACACACACACACACAC
71	CTCTCTCACACACACACACAC
72	CAAACACACACACACACACAC
73	CACACACACCCACACACACAC
74	CACACACACACACCCACACAC
75	CACACACACACACGCACACAC

76	CACACACACACACACTCACACACAC
77	CACACACACATACACACACACACAC
78	CACACACACAGACACACACACACAC
79	TTTACACACACACACACACACACAC
80	CACGCACACGCACACACACACACAC
81	CACGCACACACGCACACACACGCAC
82	CACACGCACACACACACACACACAC
83	CCAAATCTTATAATAACTAC
84	UGUGUGUGUGU
85	UGUGUGUGUGUG
86	UGUGUGUGUGUGU
87	GUGUGUGUGU
88	GUGUGUGUGUG
89	GUGUGUGUGUGU
90	GUGUGUGUGUGUG
91	UGUGUGUGUGUGUG
92	GUGUGUGUGUGUGU
93	UGUGUGUGUGUGUGUGUGUG
94	GUGUGUGUGUGUGUGUGUGU
95	UGUGUGUGUG
96	GGTTTGTTTCAGTGTGGA
97	GTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTG
98	GTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTG
99	GTAGTTATTATAAGATTTGG