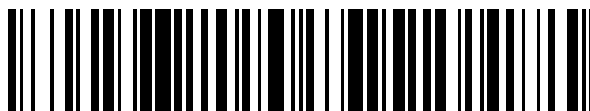


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 585 360**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/713 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.08.2010 E 10807154 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.05.2016 EP 2462229**

54 Título: **Tratamiento de enfermedades relacionadas con un gen de la insulina (INS) por inhibición de la transcripción antisentido natural en un gen de la insulina (INS)**

30 Prioridad:

05.08.2009 US 231451 P

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

05.10.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**COLLARD, JOSEPH y
KHORKOVA SHERMAN, OLGA**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 585 360 T3

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

DESCRIPCIÓN

Tratamiento de enfermedades relacionadas con un gen de la insulina (INS) por inhibición de la transcripción antisentido natural en un gen de la insulina (INS)

5

CAMPO DE LA DESCRIPCIÓN

Los aspectos de la descripción comprenden oligonucleótidos que modulan la expresión y/o la función de un gen de la insulina (INS) y las moléculas asociadas.

10

ANTECEDENTES

La hibridación de ADN-ARN y la de ARN-ARN son importantes para muchos aspectos de la función de los ácidos nucleicos lo que incluye replicación, transcripción y traducción de ADN. La hibridación es fundamental también para diversas tecnologías que detectan un ácido nucleico en particular o alteran su expresión. Los nucleótidos antisentido, por ejemplo, desorganizan la expresión génica mediante hibridación a ARN diana, interfiriendo así con el splicing, la transcripción, la traducción y la replicación de ARN. El ADN antisentido presenta la característica añadida de que los híbridos ADN-ARN actúan como un sustrato para la digestión por la ribonucleasa H, una actividad que está presente en la mayoría de los tipos celulares. Las moléculas antisentido pueden suministrarse en células, como sucede en los oligodesoxinucleótidos (ODN), o pueden expresarse a partir de genes endógenos como moléculas de ARN. La FDA ha aprobado recientemente un fármaco antisentido, VITRAVENE™ (para tratamiento de retinitis por citomegalovirus), lo que refleja que los fármacos antisentido tienen utilidad terapéutica.

El documento US-2004/109.848 describe la modulación de la expresión alfa de AP-2.

25 El documento WO-01/07.461 describe la modulación antisentido de la expresión de MEKK5.

El documento WO-2004/003.201 describe la modulación antisentido de la expresión de LRH1.

El documento US-2005/182.004 describe la modulación de la expresión de DC-SIGN.

El documento WO-2009/062.113 describe procedimientos y compuestos para modular la producción de insulina.

30 Wahlestedt y col. 2006 (Drug Discovery Today, vol. 11(11-12): 503-508) y el documento WO-2007/087.113 describen transcripciones de ARN naturales antisentido y no codificantes como posibles dianas farmacológicas.

Schwartz y col., 2008 (Nature Structure & Molecular Biology, vol. 15(8):842-848) describe que las transcripciones antisentido son dianas para activar ARN pequeños.

RESUMEN DE LA INVENCION

35

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

RESUMEN DE LA DESCRIPCIÓN

40

En un aspecto, la descripción proporciona procedimientos para inhibir la acción de una transcripción antisentido natural usando oligonucleótido(s) antisentido dirigidos a cualquier región de la transcripción antisentido natural que produce regulación por aumento del gen de sentido directo correspondiente. En la presente memoria descriptiva también se contempla que la inhibición de la transcripción antisentido natural puede conseguirse mediante siRNA, 45 ribozimas y moléculas pequeñas, que se consideran dentro del alcance de la presente descripción.

Un aspecto proporciona un procedimiento de modulación de la función y/o la expresión de un polinucleótido del gen de la insulina (INS) en células o tejidos de pacientes *in vivo* o *in vitro* que comprende la puesta en contacto de dichas células o tejidos con un oligonucleótido antisentido de 5 a 30 nucleótidos de longitud donde dicho oligonucleótido 50 tiene al menos el 50% de identidad de secuencia con un complemento inverso de un polinucleótido que comprende de 5 a 30 nucleótidos consecutivos dentro de los nucleótidos 1 a 334 de la SEQ ID NO: 2 o de los nucleótidos 1 a 582 de la SEQ ID NO: 3 modulando así la función y/o expresión del polinucleótido del gen de la insulina (INS) en células o tejidos de pacientes *in vivo* o *in vitro*.

55 En otro aspecto, un oligonucleótido se dirige a una secuencia antisentido natural de un polinucleótido del gen de la insulina (INS), por ejemplo, nucleótidos determinados en las SEQ ID NO: 2 y 3, y cualquier variante, alelo, homólogo, mutante, derivado, fragmento y secuencias complementarias de los mismos. Los ejemplos de oligonucleótidos antisentido se determinan como SEQ ID NO: 4 a 11.

Otro aspecto proporciona un procedimiento de modulación de la función y/o la expresión de un polinucleótido del gen de la insulina (INS) en células o tejidos de pacientes *in vivo* o *in vitro* que comprende la puesta en contacto de dichas células o tejidos con un oligonucleótido antisentido de 5 a 30 nucleótidos de longitud donde dicho oligonucleótido tiene al menos el 50% de identidad de secuencia con un complemento inverso del antisentido del polinucleótido del gen de la insulina (INS); modulando así la función y/o expresión del polinucleótido del gen de la insulina (INS) en células o tejidos de pacientes *in vivo* o *in vitro*.

Otro aspecto proporciona un procedimiento de modulación de la función y/o la expresión de un polinucleótido del gen de la insulina (INS) en células o tejidos de pacientes *in vivo* o *in vitro* que comprende la puesta en contacto de dichas células o tejidos con un oligonucleótido antisentido de 5 a 30 nucleótidos de longitud donde dicho oligonucleótido tiene al menos el 50% de identidad de secuencia con un oligonucleótido antisentido en un polinucleótido antisentido del gen de la insulina (INS); modulando así la función y/o expresión del polinucleótido del gen de la insulina (INS) en células o tejidos de pacientes *in vivo* o *in vitro*.

15 En un aspecto, una composición comprende uno o más oligonucleótidos antisentido que se unen con polinucleótidos de sentido directo y/o antisentido del gen de la insulina (INS).

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

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

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

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

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

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

A continuación se describen otros aspectos.

40 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 es un gráfico de resultados de PCR en tiempo real que muestran el número de veces de cambio + desviación típica en ARNm de INS después del tratamiento de células MCF-7 con oligonucleótidos de fosforotioato introducidos usando Lipofectamina 2000, en comparación con el control. Los resultados de PCR en tiempo real muestran que los niveles de ARNm INS en células MCF-7 aumentan significativamente 48 h después del tratamiento con un oligonucleótido diseñado para HS.70779 antisentido INS y un oligonucleótido diseñado para HS.621165. Las barras denotadas como CUR-0776, CUR-0778, CUR-0780, CUR-0777, CUR-0782, CUR-0784, CUR-0785 y CUR-0781 corresponden a muestras tratadas con las SEQ ID NO: 4 a 11 respectivamente.

50 Descripción del listado de secuencias

SEQ ID NO: 1: Insulina (INS) de Homo sapiens, variante de transcripción 1, ARNm (NCBI número de acceso: NM-000207)

55 SEQ ID NO: 2: Secuencia antisentido natural (Hs.707779); SEQ ID NO: 3: Secuencia antisentido natural (Hs.621165);

SEQ ID NO: 4 a 11: Oligonucleótidos antisentido. * indica enlace de fosfotioato.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA DESCRIPCIÓN

A continuación se describen varios aspectos de la descripción con referencia a las aplicaciones de ejemplo como ilustración. Debe entenderse que se exponen numerosos detalles, relaciones y procedimientos específicos para proporcionar una plena comprensión de la descripción. Sin embargo, un experto en la materia relevante reconocerá fácilmente que la descripción puede llevarse a cabo sin uno o más de los detalles específicos o con otros procedimientos.

La presente descripción no está limitada a la ordenación de hechos o acontecimientos, ya que algunos hechos se producen en órdenes diferentes y/o simultáneamente con otros hechos o acontecimientos. Además, no todos los hechos o acontecimientos ilustrados son necesarios para implementar una metodología de acuerdo con la presente descripción.

Todos los genes, nombres de genes y productos génicos divulgados en la presente memoria descriptiva pretenden corresponder a homólogos de cualquier especie para los cuales son aplicables las composiciones y procedimientos divulgados en la presente memoria descriptiva. Así, los términos incluyen, pero no se limitan a, genes y productos génicos de seres humanos y ratones. Debe entenderse que cuando se divulga un gen o un producto génico de una especie en particular, la presente descripción pretende ser sólo ilustrativa, y no debe interpretarse como limitativa salvo en el contexto en que aparezca claramente indicado. Así, por ejemplo, para los genes divulgados en la presente memoria descriptiva, que en algunos aspectos se refieren a secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos de mamíferos pretenden comprender genes y productos génicos homólogos y/u ortólogos de otros animales que incluyen, pero no se limitan a otros mamíferos, peces, anfibios, reptiles y aves. En algunos aspectos, los genes o secuencias de ácidos nucleicos son humanos.

Definiciones

La terminología usada en la presente memoria descriptiva persigue sólo describir aspectos particulares y no pretende ser limitativa de la descripción. Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, las formas en singular "un", "una" y "el/la" pretenden incluir también las formas en plural, a no ser que el contexto indique claramente lo contrario. Además, en la medida en que los términos "que incluye", "incluye", "que tiene", "tiene", "con", o variantes de los mismos se usan en la descripción detallada y/o en las reivindicaciones, dichos términos pretenden ser inclusivos de una manera similar al término "que comprende."

El término "aproximadamente" o "en torno a" significa dentro de un intervalo de error aceptable para el valor en particular según lo determina un experto en la materia, que dependerá en parte de cómo se mida o determine el valor, es decir, de las limitaciones del sistema de medidas. Por ejemplo, "aproximadamente" puede significar dentro de 1 o más de 1 desviación típica, para la práctica en la materia. Alternativamente, "aproximadamente" puede significar un intervalo de hasta el 20%, preferentemente hasta el 10%, más preferentemente hasta el 5% y más preferentemente todavía hasta el 1% de un valor dado. Alternativamente, en particular con respecto a sistemas o procesos biológicos, el término puede significar dentro de un orden de magnitud, preferentemente dentro de 5 veces, y más preferentemente dentro de 2 veces, de un valor. Cuando se describen valores particulares en la solicitud y en las reivindicaciones, salvo que se indique lo contrario, debe suponerse que el término "aproximadamente" significa dentro de un intervalo de error aceptable para el valor en particular.

Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "ARNm" significa la o las transcripciones de ARNm conocidas en la actualidad de un gen diana, y cualquier transcripción adicional que pudiera elucidarse.

Por "oligonucleótidos antisentido" o "compuesto antisentido" se indica una molécula de ARN o ADN que se une a otro ARN o ADN (ARN, ADN diana). Por ejemplo, si se trata de un oligonucleótido de ARN se une a otro ARN diana por medio de interacciones ARN-ARN y altera la actividad del ARN diana. Un oligonucleótido antisentido puede regular por aumento o por reducción la expresión y/o función de un polinucleótido en particular. La definición pretende incluir cualquier molécula ARN o ADN extraña que sea útil desde un punto de vista terapéutico, diagnóstico u otro. Dichas moléculas incluyen, por ejemplo, moléculas ARN o ADN antisentido, ARN interferente (ARNi), micro-ARN, moléculas de ARN de atracción, siRNA, ARN enzimático, ARN de edición terapéutico y ARN agonista y antagonista, compuestos oligoméricos antisentido, oligonucleótidos antisentido, oligonucleótidos de secuencia de guía externa (EGS), splicer alternativos, cebadores, sondas, y otros compuestos oligoméricos que hibridan al menos una parte del ácido nucleico diana. De este modo, estos compuestos pueden introducirse en forma de compuestos monocatenarios, bicatenarios, parcialmente monocatenarios u oligoméricos circulares.

En el contexto de la presente descripción, el término "oligonucleótido" se refiere a un oligómero o polímero de ácido ribonucleico (ARN) o ácido desoxirribonucleico (ADN) o miméticos de los mismos. El término "oligonucleótido",

incluye también oligómeros lineales o circulares de monómeros o uniones naturales y/o modificados, que incluyen desoxirribonucleósidos, ribonucleósidos, formas sustituidas y alfa-anómeras de los mismos, ácidos nucleicos peptídicos (PNA), ácidos nucleicos bloqueados (LNA), fosforotioato, metilfosfonato, y similares. Los oligonucleótidos son capaces de unirse específicamente a un polinucleótido diana por medio de un patrón regular de interacciones monómero-monómero, tales como un tipo de Watson-Crick de apareamiento de bases, tipos Hoögsteen o Hoögsteen inverso de apareamiento de bases, o similares.

El oligonucleótido puede ser "quimérico", es decir, compuesto por diferentes regiones. En el contexto de la presente descripción los compuestos "quiméricos" son oligonucleótidos, que contienen dos o más regiones químicas, por ejemplo, región o regiones de ADN, región o regiones de ARN, región o regiones de PNA, etc. Cada región química está formada por al menos una unidad de monómero, es decir, un nucleótido en el caso de un compuesto de oligonucleótidos. Estos oligonucleótidos comprenden normalmente al menos una región donde el oligonucleótido está modificado con el fin de mostrar una o más propiedades deseadas. Las propiedades deseadas del oligonucleótido incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, un aumento de la resistencia a la degradación de la nucleasa, un aumento en la captación celular y/o un aumento en la afinidad de unión para el ácido nucleico diana. Por tanto, diferentes regiones del oligonucleótido pueden tener distintas propiedades. Los oligonucleótidos quiméricos de la presente descripción pueden formarse como estructuras mixtas de dos o más oligonucleótidos, oligonucleótidos modificados, oligonucleósidos y/o análogos de oligonucleótidos tal como se describe anteriormente.

El oligonucleótido puede estar compuesto por regiones que pueden asociarse en "registro" que se produce cuando los monómeros están ligados consecutivamente, como en el ADN natural, o ligados a través de separadores. Los separadores pretenden constituir un "puente" covalente entre las regiones y en algunos casos tienen una longitud que no supera aproximadamente 100 átomos de carbono. Los separadores pueden llevar diferentes funcionalidades, por ejemplo, teniendo carga positiva o negativa, llevando propiedades de unión de ácidos nucleicos especiales (intercaladores, elementos de unión de surcos, toxinas, fluoróforos, etc.), siendo lipófilos, induciendo estructuras secundarias especiales como, por ejemplo, alanina que contiene péptidos que inducen hélices alfa.

Tal como se usa en la presente memoria descriptiva "gen de la insulina (INS)" incluye todos los miembros de la familia, mutantes, alelos, fragmentos, especies, secuencias codificantes y no codificantes, cadenas de polinucleótidos de sentido directo y antisentido, etc.

Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, los términos INS, insulina, ILPR, precursor de la insulina e IRDN, se consideran idénticos en la bibliografía y se usan indistintamente en la presente solicitud.

Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "oligonucleótido específico para" u "oligonucleótido que se dirige a" se refiere a un oligonucleótido que tiene una secuencia (i) capaz de formar un complejo estable con una parte del gen diana, o (ii) capaz de formar un dúplex estable con una parte de una transcripción de ARNm del gen diana. La estabilidad de los complejos y los dúplex puede determinarse mediante cálculos teóricos y/o ensayos *in vitro*. En los Ejemplos mostrados a continuación se describen ensayos de ejemplo para determinar la estabilidad de complejos y dúplex de hibridación.

Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "ácido nucleico diana" comprende ADN, ARN (que comprende pre-ARNm y ARNm) transcritos desde dicho ADN, y también ADNc derivado de dicho ARN, secuencias codificantes y no codificantes, polinucleótidos de sentido directo o antisentido. La hibridación específica de un compuesto oligomérico con su ácido nucleico diana interfiere con la función normal del ácido nucleico. Esta modulación de función de un ácido nucleico diana por compuestos que lo hibridan específicamente se refiere generalmente como "antisentido". Las funciones de ADN que se interfieren incluyen, por ejemplo, replicación y transcripción. Las funciones de ARN que se interfieren, incluyen todas las funciones vitales como, por ejemplo, translocación del ARN en el sitio de traducción de proteínas, traducción de proteínas desde el ARN, splicing del ARN para producir una o más especies de ARNm, y actividad catalítica que puede comprometerse o facilitarse mediante el ARN. El efecto global de dicha interferencia con la función de ácido nucleico diana es la modulación de la expresión de un producto codificado u oligonucleótidos.

El ARN interferente "ARNi" está mediado por moléculas de ARN bicatenario (dsRNA) que tienen homología específica de secuencias con sus secuencias de ácidos nucleicos "diana". En determinados aspectos de la presente descripción, los mediadores son dúplex de ARN "interferente pequeño" (siRNA) de 5-25 nucleótidos. Los siRNA se obtienen del procesamiento de dsRNA por una enzima ARNasa conocida como dicer. Los productos dúplex de siRNA son reclutados en un complejo de complejo de siRNA multiproteína denominado RISC (complejo de silenciamiento inducido de ARN). Sin desear verse limitado por ninguna teoría en particular, se cree que un RISC

está guiado a un ácido nucleico diana (de forma adecuada ARNm), donde el dúplex siRNA interacciona de una forma específica de secuencia para mediar en la escisión de una forma catalítica. Los ARN interferentes pequeños que pueden usarse de acuerdo con la presente descripción pueden sintetizarse y usarse de acuerdo con procedimientos que son bien conocidos en la técnica y que serán familiares para el experto en la materia. Los ARN interferentes pequeños para su uso en los procedimientos de la presente descripción comprenden de forma adecuada entre aproximadamente 1 y aproximadamente 50 nucleótidos (nt). En ejemplos de aspectos no limitativos, los siRNA pueden comprender de aproximadamente 5 a aproximadamente 40 nt, de aproximadamente 5 a aproximadamente 30 nt, de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 nt, de aproximadamente 15 a aproximadamente 25 nt o de aproximadamente 20-25 nucleótidos.

10

La selección de oligonucleótidos apropiados se ve facilitada por el uso de programas informáticos que alinean automáticamente secuencias de ácidos nucleicos e indican regiones de identidad u homología. Dichos programas se usan para comparar secuencias de ácidos nucleicos obtenidas, por ejemplo, mediante búsqueda en bases de datos tales como GenBank o secuenciación de productos PCR. La comparación de secuencias de ácidos nucleicos entre una serie de especies permite la selección de secuencias de ácidos nucleicos que muestran un grado de identidad apropiado entre especies. En el caso de genes que no han sido secuenciados, se llevan a cabo procedimientos Southern blot para permitir la determinación del grado de identidad entre genes en especies diana y otras especies. Mediante la realización de procedimientos Southern blot en diversos grados de astringencia, como es bien conocido en la técnica, es posible obtener una medida aproximada de la identidad. Estos procedimientos permiten la selección de oligonucleótidos que muestran un alto grado de complementariedad con secuencias diana de ácidos nucleicos en un sujeto que debe ser sometido a control y un menor grado de complementariedad con secuencias de ácidos nucleicos correspondientes en otras especies. Un experto en la materia comprenderá que existe una amplitud considerable en la selección de regiones de genes apropiadas para su uso en la presente descripción.

Por "ARN enzimático" se entiende una molécula de ARN con actividad enzimática. Los ácidos nucleicos enzimáticos (ribozimas) actúan en primer lugar mediante unión a un ARN diana. Dicha unión tiene lugar a través de la parte de unión diana de un ácido nucleico enzimático que se mantiene en estrecha proximidad con una parte enzimática de la molécula que actúa para escindir el ARN diana. Así, el ácido nucleico enzimático reconoce primero y después se une a un ARN diana a través de un apareamiento de bases, y una vez unido al sitio correcto, actúa enzimáticamente para cortar el ARN diana.

Por "ARN señuelo" se entiende una molécula de ARN que imita el dominio de unión natural para un ligando. El ARN señuelo compete por tanto con la diana de unión natural para la unión de un ligando específico. Por ejemplo, se ha demostrado que la sobreexpresión del ARN de respuesta de transactivación de VIH (TAR) puede actuar como "señuelo" y unirse de manera eficaz a la proteína tat de VIH, impidiendo así la unión a las secuencias TAR codificadas en el ARN del VIH. Esto se entiende como un ejemplo específico. Los expertos en la materia reconocerán que se trata sólo de un ejemplo, y que otros aspectos pueden generarse fácilmente usando técnicas conocidas generalmente en la técnica.

Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "monómeros" indica normalmente monómeros ligados a enlaces de fosfodiéster o análogos de los mismos para formar oligonucleótidos de tamaño comprendido entre varias unidades monoméricas, por ejemplo, de aproximadamente 3-4, a aproximadamente varios cientos de unidades monoméricas. Los análogos de enlaces de fosfodiéster incluyen: fosforotioato, fosforoditioato, metilfosforato, fosforoselenoato, fosforamidoato, y similares, como se describe en más detalle más adelante.

45

El término "nucleótido" cubre nucleótidos de ocurrencia natural así como nucleótidos de ocurrencia no natural. Para el experto en la materia estará claro que varios nucleótidos que anteriormente se han considerado "de ocurrencia no natural" se han encontrado posteriormente en la naturaleza. Así, los "nucleótidos" incluyen no sólo las moléculas que contienen heterociclos de purina y pirimidina conocidos, sino también análogos heterocíclicos y tautómeros de los mismos. Algunos ejemplos ilustrativos de otros tipos de nucleótidos son moléculas que contienen adenina, guanina, timina, citosina, uracilo, purina, xantina, diaminopurina, 8-oxo-N6-metiladenina, 7-deazaxantina, 7-deazaguanina, N4,N4-etanocitosina, N6,N6-etano-2,6-diaminopurina, 5-metilcitosina, 5-(C3-C6)-alquilcitosina, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, seudoisocitosina, 2-hidroxi-5-metil-4-triazolopiridina, isocitosina, isoguanina, inosina y los nucleótidos "de ocurrencia no natural" descritos en la patente de EE.UU. n° 5.432.272. El término "nucleótido" pretende cubrir todos y cada uno de estos ejemplos así como análogos y tautómeros de los mismos. Los nucleótidos especialmente interesantes son aquellos que contienen adenina, guanina, timina, citosina y uracilo, que se consideran los nucleótidos de ocurrencia natural en relación con la aplicación terapéutica y diagnóstica en seres humanos. Los nucleótidos incluyen los azúcares naturales 2'-desoxi y 2'-hidroxilo, por ejemplo, tal como se describe en Kornberg y Baker, DNA Replication, 2nd Ed. (Freeman, San Francisco, 1992) así como sus análogos.

50

55

"Análogos" en referencia a los nucleótidos incluye nucleótidos sintéticos que tienen fracciones de bases modificadas y/o fracciones de azúcar modificadas. Dichos análogos incluyen nucleótidos sintéticos diseñados para mejorar las propiedades de unión, por ejemplo, estabilidad en dúplex o tríplex, especificidad, o similares.

5

Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, "hibridación" significa el apareamiento de cadenas sustancialmente complementarias de compuestos oligoméricos. Un mecanismo de apareamiento implica enlaces de hidrógeno, que pueden ser enlaces de hidrógeno de Watson-Crick, Hoogsteen o Hoogsteen invertido, entre bases de nucleósidos o nucleótidos (nucleótidos) complementarias de las cadenas de compuestos oligoméricos. Por ejemplo, la adenina y la timina son nucleótidos complementarios que se emparejan a través de la formación de enlaces de hidrógeno. La hibridación puede ocurrir en diversas circunstancias.

10

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

15

Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, la frase "condiciones de hibridación de astringencia" o "condiciones de astringencia" se refiere a condiciones en las que un compuesto de la descripción se hibridará con su secuencia diana, pero con un número mínimo de otras secuencias. Las condiciones de astringencia dependen de la secuencia y serán diferentes en distintas circunstancias y en el contexto de la presente descripción, "condiciones de astringencia" en las que los compuestos oligoméricos se hibridan con una secuencia diana están determinadas por la naturaleza y la composición de los compuestos oligoméricos y los ensayos en los que son investigados. En general, las condiciones de hibridación de astringencia comprenden bajas concentraciones (<0,15 M) de sales con cationes inorgánicas como Na⁺⁺ o K⁺⁺ (es decir, baja fuerza iónica), temperatura superior a 20°C-25°C por debajo de la T_f del complejo compuesto oligomérico:secuencia diana, y la presencia de agentes de desnaturalización tales como formamida, dimetilformamida, sulfóxido de dimetilo o el detergente dodecilsulfato de sodio (SDS). Por ejemplo, la tasa de hibridación disminuye un 1,1% por cada 1% de formamida. Un ejemplo de una condición de hibridación de alta astringencia es tampón de cloruro de sodio-sulfato de sodio 0,1 X (SSC)/SDS al 0,1% (p/v) a 60°C durante 30 minutos.

20

25

30

"Complementario", tal como se usa en la presente memoria descriptiva, se refiere a la capacidad de apareamiento preciso entre dos nucleótidos en una o dos cadenas oligoméricas. Por ejemplo, si una nucleobase en una determinada posición de un compuesto antisentido es capaz de un enlace de hidrógeno con una nucleobase en una determinada posición de un ácido nucleico diana, siendo dicho ácido nucleico diana una molécula de ADN, ARN u oligonucleótido, entonces la posición del enlace de hidrógeno entre el oligonucleótido y el ácido nucleico diana se considera una posición complementaria. El compuesto oligomérico y la molécula de ADN, ARN u oligonucleótido adicional son complementarios entre sí cuando un número suficiente de posiciones complementarias en cada molécula está ocupado por nucleótidos que pueden formar enlaces de hidrógeno entre sí. Así, "específicamente hibridable" y "complementario" son términos que se usan para indicar un grado suficiente de apareamiento o complementariedad precisos en un número suficiente de nucleótidos de tal forma que tiene lugar una unión estable y específica entre el compuesto oligomérico y un ácido nucleico diana.

35

40

45

Debe entenderse en la técnica que la secuencia de un compuesto oligomérico no debe ser complementaria al 100% con la de su ácido nucleico diana para ser específicamente hibridable. Por otra parte, un oligonucleótido puede hibridarse con uno o más segmentos de forma que los segmentos que intervienen o son adyacentes no intervienen en el episodio de hibridación (por ejemplo, una estructura en bucle, una estructura en horquilla o sin correspondencia). Los compuestos oligoméricos de la presente descripción comprenden al menos aproximadamente el 70%, o al menos aproximadamente el 75%, o al menos aproximadamente el 80%, o al menos aproximadamente el 85%, o al menos aproximadamente el 90%, o al menos aproximadamente el 95%, o al menos aproximadamente el 99% de complementariedad de secuencia con una región diana en la secuencia de ácidos nucleicos diana a la que se dirigen. Por ejemplo, un compuesto antisentido en el que 18 de 20 nucleótidos del compuesto antisentido son complementarios con una región diana, y por tanto se hibridarían específicamente, representaría una complementariedad del 90%. En este ejemplo, los nucleótidos no complementarios restantes pueden agruparse o intercalarse con nucleótidos complementarios y no tienen que ser contiguos entre sí o con los nucleótidos complementarios. De este modo, un compuesto antisentido que tiene una longitud de 18 nucleótidos y tiene 4 (cuatro) nucleótidos no complementarios que están flanqueados por dos regiones de complementariedad completa

50

55

con el ácido nucleico diana tendrían un 77,8% de complementariedad global con el ácido nucleico diana y así se situarían dentro del alcance de la presente descripción. El porcentaje de complementariedad de un compuesto antisentido con una región de un ácido nucleico diana puede determinarse de forma sistemática mediante programas BLAST (herramientas básicas de búsqueda de alineaciones locales) y programas PowerBLAST conocidos en la técnica. El porcentaje de homología, identidad de secuencia o complementariedad puede determinarse, por ejemplo, mediante el programa Gap (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison Wis.), usando ajustes por omisión, que usa el algoritmo de Smith y Waterman (Adv. Appl. Math., (1981) 2, 482-489).

10 Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "punto de fusión térmica (Tf)" se refiere a la temperatura, para valores definidos de fuerza iónica, pH y concentración de ácidos nucleicos, para el que el 50% de los oligonucleótidos complementarios con la secuencia diana se hibridan con la secuencia diana en equilibrio. Normalmente, las condiciones de astringencia serán aquellas en las que la concentración de sales sea al menos aproximadamente de 0,01 a 1,0 M de concentración de iones Na (u otras sales) a pH de 7,0 a 8,3 y la temperatura sea de al menos aproximadamente 30°C para oligonucleótidos cortos (por ejemplo, de 10 a 50 nucleótidos). Las condiciones de astringencia pueden conseguirse también con la adición de agentes de desestabilización como la formamida.

20 Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, "modulación" significa un aumento (estimulación) o una disminución (inhibición) en la expresión de un gen.

El término "variante", cuando se usa en el contexto de una secuencia de polinucleótidos, puede comprender una secuencia de polinucleótidos relacionada con un gen natural. Esta definición puede incluir también, por ejemplo, variantes "alélicas", "splice", de "especies" o "polimórficas". Una variante splice puede tener una identidad significativa con una molécula de referencia, aunque en general tendrá un número mayor o menor de polinucleótidos debido al splicing alterno de exones durante procesamiento de ARNm. El polipéptido correspondiente puede poseer dominios funcionales adicionales o una ausencia de dominios. Las variantes de especies son secuencias de polinucleótidos que varían de una especie a otra. De especial utilidad en la descripción son las variantes de productos génicos naturales. Las variantes pueden proceder de al menos una mutación en la secuencia de ácidos nucleicos y pueden producir ARNm alterados o polipéptidos cuya estructura o función puede estar o no alterada. Cualquier gen natural o recombinante dado puede tener ninguna, una o muchas formas alélicas. Los cambios mutacionales comunes que dan origen a las variantes se adscriben en general a deleciones, adiciones o sustituciones naturales de nucleótidos. Cada uno de estos tipos de cambios puede producirse en solitario, o en combinación con los otros, una o más veces en una secuencia dada.

35 Los polipéptidos resultantes tendrán generalmente una identidad de aminoácidos importante relativa entre sí. Una variante polimórfica es una variación en la secuencia de polinucleótidos de un gen en particular entre individuos de una especie dada. Las variantes polimórficas pueden comprender también "polimorfismos de nucleótidos únicos" (SNP) o mutaciones de base únicas donde la secuencia de polinucleótidos varía en una base. La presencia de SNP puede ser indicativa, por ejemplo, de una cierta población con una propensión para un estado patológico, que es susceptible frente a resistencia.

45 Los polinucleótidos derivados incluyen ácidos nucleicos sometidos a modificación química, por ejemplo, sustitución de hidrógeno por un grupo alquilo, acilo o amino. Los derivados como, por ejemplo, los oligonucleótidos derivados, pueden comprender partes de ocurrencia no natural, tales como fracciones de azúcares alteradas o enlaces entre azúcares. Los ejemplos entre ellos son fosforotioato y otras especies que contienen azufre que son conocidas en la técnica. Los ácidos nucleicos derivados pueden contener también etiquetas, que incluyen radionucleótidos, enzimas, agentes fluorescentes, agentes quimioluminiscentes, agentes cromógenos, sustratos, cofactores, inhibidores, partículas magnéticas, y similares.

50 Un polipéptido o péptido "derivado" es aquel que ha sido modificado, por ejemplo, por glucosilación, pegilación, fosforilación, sulfatación, reducción/alquilación, acilación, acoplamiento químico o tratamiento con formalina leve. Un derivado también puede ser modificado para contener una etiqueta detectable, ya sea directa o indirectamente, lo que incluye, pero no se limita a, una etiqueta de radioisótopo, fluorescente y de enzima.

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

"Mamífero" cubre mamíferos de sangre caliente que están normalmente bajo cuidados médicos (por ejemplo, seres humanos y animales domésticos). Los ejemplos incluyen felinos, cánidos, equinos, bovinos y humanos, así como simplemente humanos.

- 5 "Tratar" o "tratamiento" cubre el tratamiento de un estado patológico en un mamífero, e incluye: (a) prevención de la aparición del estado patológico en un mamífero, en particular, cuando dicho mamífero muestra predisposición al estado patológico pero todavía no se le ha diagnosticado; (b) inhibición del estado patológico, por ejemplo, interrumpiendo su desarrollo; y/o (c) alivio del estado patológico, por ejemplo, provocando la regresión del estado patológico hasta que se alcanza un criterio de valoración deseado. Tratamiento incluye también la mejora de un
10 síntoma de una enfermedad (por ejemplo, aliviar el dolor o las molestias), de manera que dicha mejora puede afectar o no directamente a la enfermedad (por ejemplo, causa, transmisión, expresión, etc.).

Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, "cáncer" se refiere a todos los tipos de cáncer o neoplasias o tumores malignos presentes en los mamíferos, que incluye, pero no se limita a: leucemias, linfomas, melanomas,
15 carcinomas y sarcomas. El cáncer se manifiesta como un "tumor" o tejido que comprende células malignas del cáncer. Los ejemplos de tumores incluyen sarcomas y carcinomas tales como, pero sin limitarse a ellos: fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteógeno, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rhabdomiosarcoma, carcinoma de colon, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de ovarios,
20 cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de las glándulas sudoríparas, carcinoma de las glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistoadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de las células renales, hepatoma, carcinoma de los conductos biliares, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, cáncer de cuello de útero, tumor testicular, carcinoma de pulmón, carcinoma microcítico pulmonar, carcinoma de vejiga,
25 carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma y retinoblastoma. Los cánceres adicionales que pueden ser tratados por la composición divulgada de acuerdo con la descripción incluyen pero no se limitan a, por ejemplo, enfermedad de Hodgkin, linfoma no hodgkiniano, mieloma múltiple, neuroblastoma, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, rhabdomiosarcoma, trombocitosis primaria,
30 macroglobulinemia primaria, tumores microcíticos pulmonares, tumores cerebrales primarios, cáncer de estómago, cáncer de colon, insulinoma pancreático maligno, carcinoide maligno, cáncer de la vejiga urinaria, lesiones cutáneas premalignas, cáncer testicular, linfomas, cáncer de tiroides, neuroblastoma, cáncer esofágico, cáncer de las vías genitourinarias, hipercalcemia maligna, cáncer de cuello de útero, cáncer de endometrio, cáncer de la corteza suprarrenal y cáncer de próstata.

35 "Enfermedad o trastorno neurológico" se refiere a cualquier enfermedad o trastorno del sistema nervioso y/o el sistema visual. "Enfermedad o trastorno neurológico" incluye enfermedades o trastornos que afectan al sistema nervioso central (encéfalo, tronco del encéfalo y cerebelo), el sistema nervioso periférico (que incluye los nervios craneales) y el sistema nervioso autónomo (algunas de cuyas partes están situadas en los sistemas nerviosos central y periférico). Los ejemplos de trastornos neurológicos incluyen pero no se limitan a, cefalea, estupor y coma, demencia, convulsiones, trastornos del sueño, traumatismos, infecciones, neoplasias, neuro-oftalmología, trastornos del movimiento, enfermedades desmielinizantes, trastornos de la médula espinal, y trastornos de los nervios periféricos, los músculos y las uniones neuromusculares. Las adicciones y las enfermedades mentales incluyen, pero no se limitan a, trastorno bipolar y esquizofrenia, que se incluyen también en la definición de trastorno
45 neurológico. A continuación se ofrece una lista de varios trastornos neurológicos, síntomas, signos y síndromes que pueden tratarse usando composiciones y procedimientos de acuerdo con la presente descripción: afasia epileptiforme adquirida; encefalomiелitis diseminada aguda; adrenoleucodistrofia; degeneración macular relacionada con la edad; agenesia del cuerpo calloso; agnosia; síndrome de Aicardi; enfermedad de Alexander; enfermedad de Alpers; hemiplejía alternante; demencia vascular; esclerosis lateral amiotrófica; anencefalia; síndrome de Angelman;
50 angiomatosis; anoxia; afasia; apraxia; quistes aracnoideos; aracnoiditis; malformación de Arnold-Chiari; malformación arteriovenosa; síndrome de Asperger; ataxia telangiectasia; trastorno de hiperactividad con déficit de atención; autismo; disfunción autónoma; dolor de espalda; enfermedad de Batten; enfermedad de Behçet; parálisis de Bell; blefaroespasmo esencial benigno; amiotrofia focal benigna; hipertensión intracraneal benigna; enfermedad de Binswanger; blefaroespasmo; síndrome de Bloch-Sulzberger; lesión del plexo braquial; absceso cerebral; lesión
55 cerebral; tumores cerebrales (que incluyen glioblastoma multiforme); tumor medular; síndrome de Brown-Séquard; enfermedad de Canavan; síndrome del canal carpiano; causalgia; síndrome doloroso central; mielínólisis pontina central; trastorno cefálico; aneurisma cerebral; arterioesclerosis cerebral; atrofia cerebral; gigantismo cerebral; parálisis cerebral; enfermedad de Charcot-Marie-Tooth; neuropatía inducida por la quimioterapia y dolor neuropático; malformación de Chiari; corea; polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica; dolor crónico; síndrome del dolor

crónico regional; síndrome de Coffin-Lowry; coma, que incluye estado vegetativo persistente; diplejía facial congénita; degeneración corticobasal; arteritis craneal; craneosinostosis; enfermedad de Creutzfeldt-Jakob; trastornos traumáticos acumulados; síndrome de Cushing; enfermedad de cuerpos de inclusión citomegálicos; infección por citomegalovirus; síndrome de ojos danzantes-pies danzantes; síndrome de Dandy Walker; enfermedad de Dawson; síndrome de Morsier; parálisis de Déjerine-Klumke; demencia; dermatomiositis; neuropatía diabética; esclerosis difusa; disautonomía; disgrafía; dislexia; distonías; encefalopatía epiléptica infantil temprana; síndrome de la silla vacía; encefalitis; encefaloceles; angiomatosis del encefalotrigémino; epilepsia; parálisis de Erb; temblor esencial; enfermedad de Fabry; síndrome de Fahr; desvanecimiento; parálisis espástica familiar; convulsiones febriles; síndrome de Fisher; ataxia de Friedreich; demencia frontotemporal y otras "tauropatías"; enfermedad de Gaucher; síndrome de Gerstmann; arteritis de células gigantes; enfermedad de inclusión de células gigantes; leucodistrofia de células globoides; síndrome de Guillain-Barré; mielopatía asociada con HTLV-1; enfermedad de Hallervorden-Spatz; lesión cefálica; cefalea; espasmo hemifacial; paraplejía espástica hereditaria; hereditopatía atáxica polineurítica; herpes zóster ótico; herpes zoster; síndrome de Hirayama; demencia asociada con el VIH y neuropatía (también manifestaciones neurológicas del sida); holoprosencefalia; enfermedad de Huntington y otras enfermedades de repetición de poliglutamina; hidranencefalia; hidrocefalia; hipercortisolismo; hipoxia; encefalomielititis de mediación inmunitaria; miositis por cuerpos de inclusión; pigmento de incontinencia; enfermedad infantil de almacenamiento de ácido fitánico; enfermedad de Refsum infantil; espasmos infantiles; miopatía inflamatoria; quiste intracraneal; hipertensión intracraneal; síndrome de Joubert; síndrome de Keams-Sayre; enfermedad de Kennedy; síndrome de Kinsbourne; síndrome de Klippel-Feilo; enfermedad de Krabbe; enfermedad de Kugelberg-Welander; kuru; enfermedad de Lafora; síndrome miasténico de Lambert-Eaton; síndrome de Landau-Kleffner; síndrome medular lateral (Wallenberg); discapacidades de aprendizaje; enfermedad de Leigh; síndrome de Lennox-Gustaut; síndrome de Lesch-Nyhan; leucodistrofia; demencia de cuerpos de Lewy; lisencefalia; síndrome de enclaustramiento; enfermedad de Lou Gehrig (es decir, enfermedad de las neuronas motoras o esclerosis lateral amiotrófica); enfermedad de los discos lumbares; secuelas neurológicas de la enfermedad de Lyme; enfermedad de Machado-Joseph; macroencefalia; megalencefalia; síndrome de Melkersson-Rosenthal; enfermedad de Menière; meningitis; enfermedad de Menkes; leucodistrofia metacromática; microcefalia; migraña; síndrome de Miller Fisher; miniaccidentes cerebrovasculares; miopatías mitocondriales; síndrome de Mobius; amiotrofia monomérica; enfermedad de las neuronas motoras; enfermedad de Moyamoya; mucopolisacaridosis; demencia multiinfarto; neuropatía motora multifocal; esclerosis múltiple y otros trastornos desmielinizantes; atrofia sistémica múltiple con hipotensión postural; distrofia muscular P; miastenia grave; esclerosis difusa mielinoelástica; encefalopatía mioclónica de los lactantes; mioclonía; miopatía; miotonía congénita; narcolepsia; neurofibromatosis; síndrome maligno neuroléptico; manifestaciones neurológicas del sida; secuelas neurológicas del lupus; neuromiotonía; lipofuscinosis ceroid neuronal; trastornos de migración neuronal; enfermedad de Niemann-Pick; síndrome de O'Sullivan-McLeod; neuralgia occipital; secuencia de disrafia de columna oculta; síndrome de Ohtahara; atrofia olivopontocerebelosa; mioclonía opsoclonía; neuritis óptica; hipotensión ortostática; síndrome de sobreuso; parestesia; enfermedad o trastorno neurodegenerativo (enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), demencia, esclerosis múltiple y otras enfermedades y trastornos asociados con muerte de las células con neuronales); paramiotonía congénita; enfermedades paraneoplásicas; ataques paroxísticos; síndrome de Parry Romberg; enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher; parálisis periódicas; neuropatía periférica; neuropatía dolorosa y dolor neuropático; estado vegetativo persistente; trastornos de defecto del desarrollo; reflejo de estornudo fótico; enfermedad de almacenamiento del ácido fitánico; enfermedad de Pick; nervio pinzado; tumores hipofisarios; polimiositis; porencefalia; síndrome post-polio; neuralgia post-herpética; encefalomielititis post-infecciosa; hipotensión postural; síndrome de Prader-Willi; esclerosis lateral primaria; enfermedades de priones; atrofia hemifacial progresiva; leucoencefalopatía multifocal progresiva; poliodistrofia esclerosante progresiva; parálisis supranuclear progresiva; seudotumor cerebral; síndrome de Ramsay-Hunt (tipos I y II); encefalitis de Rasmussen; síndrome de distrofia simpática de reflejo; enfermedad de Refsum; trastornos motores repetitivos; lesiones por esfuerzos repetitivos; síndrome de la pierna inquieta; mielopatía asociada con retrovirus; síndrome de Rett; síndrome de Reye; baile de San Vito; enfermedad de Sandhoff; enfermedad de Schilder; esquicefalia; displasia septo-óptica; síndrome del bebé sacudido; zona; síndrome de Shy-Drager; síndrome de Sjogren; apnea del sueño; síndrome de Soto; espasticidad; espina bífida; lesión en la médula espinal; tumores en la médula espinal; atrofia muscular medular; síndrome de Stiff-Person; accidente cerebrovascular; síndrome de Sturge-Weber; panencefalitis esclerosante subaguda; encefalopatía arterioesclerótica subcortical; corea de Sydenham; síncope; siringomielia; discinesia tardía; enfermedad de Tay-Sachs; arteritis temporal; síndrome de la médula espinal anclada; enfermedad de Thomsen; síndrome de salida torácica; tic doloroso; parálisis de Todd; síndrome de Tourette; ataque isquémico transitorio; encefalopatías espongiiformes transmisibles; mielitis transversa; lesión cerebral traumática; temblor; neuralgia del trigémino; paraparesia espástica tropical; esclerosis tuberosa; demencia vascular (demencia multiinfarto); vasculitis que incluye arteritis temporal; enfermedad de Von Hippel-Lindau; síndrome de Wallenberg; enfermedad de Werdnig-Hoffman; síndrome de West; lesión por latigazo; síndrome de Williams; enfermedad de Wildon; y síndrome de Zellweger.

"Enfermedad metabólica" se refiere a una amplia variedad de enfermedades y trastornos del sistema endocrino que incluyen, por ejemplo, resistencia a la insulina, diabetes, obesidad, disminución de la tolerancia a la glucosa, alto colesterol en sangre, hiperglucemia, dislipidemia e hiperlipidemia.

5

Una "Inflamación" se refiere a enfermedades y afecciones sistémicas asociadas localmente con migración y atracción de monocitos, leucocitos y/o neutrófilos. Los ejemplos de inflamación incluyen, pero no se limitan a, inflamación resultante de infección con organismos patógenos (que incluyen bacterias grampositivas, bacterias gramnegativas, virus, hongos y parásitos como protozoos y helmintos), rechazo de trasplante (que incluye rechazo de órganos sólidos como riñón, hígado, corazón, pulmón o córnea, así como rechazo de trasplantes de médula ósea que incluyen enfermedad del injerto contra el huésped (EICH)), o de reacciones autoinmunitarias crónicas o agudas localizadas o reacciones alérgicas. Las enfermedades autoinmunitarias incluyen glomerulonefritis aguda; artritis reumatoide o reactiva; glomerulonefritis crónica; enfermedades inflamatorias intestinales como enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y enterocolitis necrosante; síndromes asociados a transfusión de granulocitos; dermatosis inflamatorias como dermatitis de contacto, dermatitis atópica, psoriasis; lupus eritematoso sistémico (LES), tiroiditis autoinmunitaria, esclerosis múltiple, y algunas formas de diabetes, o cualquier otro estado autoinmunitario donde el ataque por el propio sistema inmunitario del sujeto produce destrucción patológica del tejido. Las reacciones alérgicas incluyen asma alérgica, bronquitis crónica, hipersensibilidad aguda y retardada. Los estados patológicos inflamatorios sistémicos incluyen inflamación asociada con traumatismos, quemaduras, reperfusión después de episodios isquémicos (por ejemplo, episodios trombóticos en el corazón, el cerebro, el intestino o la vasculatura periférica, que incluye infarto de miocardio y accidente cerebrovascular), sepsis, SDRA o síndrome de disfunción orgánica múltiple. El reclutamiento de células inflamatorias también provoca placas ateroscleróticas. La inflamación incluye, pero no se limita a, linfoma no hodgkiniano, granulomatosis de Wegener, tiroiditis de Hashimoto, carcinoma hepatocelular, atrofia del timo, pancreatitis crónica, artritis reumatoide, hiperplasia linfoide reactiva, artrosis, colitis ulcerosa, carcinoma papilar, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, colecistitis aguda, colecistitis crónica, cirrosis, sialoadenitis crónica, peritonitis, pancreatitis aguda, pancreatitis crónica, gastritis crónica, adenomiosis, endometriosis, cervicitis aguda, cervicitis crónica, hiperplasia linfoide, esclerosis múltiple, hipertrofia secundaria a púrpura trombocitopénica idiopática, nefropatía primaria de IgA, lupus eritematoso sistémico, psoriasis, enfisema pulmonar, pielonefritis crónica y cistitis crónica.

30

Una enfermedad o trastorno cardiovascular incluye aquellos trastornos que pueden provocar isquemia o estar causados por reperfusión del corazón. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, aterosclerosis, enfermedad de las arterias coronarias, miocarditis granulomatosa, miocarditis crónica (no granulomatosa), cardiomiopatía hipertrófica primaria, enfermedad de las arterias periféricas (EAP), accidente cerebrovascular, angina de pecho, infarto de miocardio, daños en el tejido cardiovascular causados por paro cardíaco, daños en el tejido cardiovascular causados por derivación cardíaca, choque cardíaco y afecciones relacionadas que serían conocidas por los expertos en la materia o que implican disfunción o daño del tejido en el corazón o en la vasculatura, especialmente, pero sin limitarse a, daño en el tejido relacionado con activación de INS. Las enfermedades del sistema cardiovascular incluyen, pero no se limitan a, aterosclerosis, miocarditis granulomatosa, infarto de miocardio, fibrosis miocárdica secundaria a valvulopatías, fibrosis miocárdica sin infarto, cardiomiopatía hipertrófica primaria y miocarditis crónica (no granulomatosa).

40

Composiciones y moléculas de polinucleótidos y oligonucleótidos

45 *Dianas*: En un aspecto, las dianas comprenden secuencias de ácidos nucleicos de un gen de la insulina (INS), que incluyen sin limitación secuencias codificantes y/o no codificantes de sentido directo y/o antisentido asociadas con un gen de la insulina (INS).

La epidemia de diabetes de tipo 2 y la disminución de la tolerancia a la glucosa es una de las causas principales de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. En los dos trastornos, tejidos como el músculo, la grasa y el hígado responden peor o se hacen resistentes a la insulina. Este estado está relacionado también con otros problemas comunes de salud, tales como obesidad, enfermedad del ovario poliquístico, hiperlipidemia, hipertensión y aterosclerosis. La fisiopatología de la resistencia a la insulina implica una compleja red de vías de señalización, activadas por el receptor de la insulina, que regula el metabolismo intermedio y su organización en células. No obstante, estudios recientes han mostrado que otras muchas hormonas y acontecimientos de señalización atenúan la acción de la insulina, y son importantes en la diabetes de tipo 2.

55

La diabetes de tipo 2 es un trastorno común acompañado a menudo por numerosas anomalías metabólicas que producen un riesgo elevado de morbilidad cardiovascular. El control intensivo de la glucosa retrasa el inicio y

retarda la progresión de enfermedad microvascular y posiblemente de enfermedad macrovascular en pacientes con diabetes de tipo 2. En las primeras fases de la enfermedad, la resistencia a la insulina desempeña un papel importante en el desarrollo de hiperglucemia y otras anomalías metabólicas, y los pacientes con diabetes de tipo 2 se benefician a menudo de medidas para mejorar la sensibilidad a la insulina tales como pérdida de peso, cambios en la dieta y ejercicio. Más adelante, el uso de secretagogos de insulina oral y sensibilizadores a la insulina como monoterapia y en combinación ayuda a mantener la glucemia durante periodos variables de tiempo. Finalmente, debido al carácter progresivo de la enfermedad y al descenso progresivo en la función de células beta pancreáticas, la insulino terapia es casi siempre obligatoria para alcanzar los objetivos glucémicos óptimos. No todos los pacientes son candidatos para un tratamiento agresivo con insulina; por tanto, los objetivos de la terapia deben modificarse, especialmente en ancianos y en personas afectadas por comorbilidades. Los candidatos para tratamiento intensivo deben estar motivados, ser cumplidores y recibir formación, no padecer otras afecciones médicas ni limitaciones físicas importantes que pudieran evitar una administración precisa y fiable de HGM e insulina. Los pacientes para los cuales más éxito consigue la terapia de combinación son aquellos que no alcanzaron un control glucémico adecuado con agentes orales diarios pero que siguen mostrando algunas evidencias de respuesta a la medicación. Se administra insulina de acción intermedia para antes de acostarse o intermedia premezclada antes de la cena o de acción rápida y se incrementa progresivamente hasta que la concentración de FPG se normalice. Si la terapia de combinación no tiene éxito, se aconseja un régimen mixto dividido de insulina de acción intermedia y rápida repartido de forma igualitaria entre los periodos de antes del desayuno y antes de la cena para pacientes obesos, y se aconsejan regímenes más intensivos para pacientes delgados. La insulino terapia se asocia invariablemente con ganancia de peso e hipoglucemia. El uso de metformina o glitazonas en combinación con insulina ha demostrado tener propiedades de ahorro de insulina. Además, el uso de metformina puede ayudar en la ganancia de peso. El uso de bombas de infusión de insulina subcutánea continua puede resultar especialmente beneficioso en el tratamiento de pacientes con diabetes mellitus de tipo 2 que no responden satisfactoriamente a estrategias de tratamientos más convencionales. Así pues, se requieren nuevas terapias dirigidas para prevenir, manejar, controlar o tratar a pacientes que tienen riesgo de desarrollar o que han desarrollado enfermedades o trastornos asociados con irregularidades de la insulina.

En algunos aspectos, se usan oligonucleótidos antisentido para prevenir o tratar enfermedades o trastornos asociados con miembros de la familia del gen de la insulina (INS). Las enfermedades y trastornos mediados por el gen de la insulina (INS) de ejemplo que pueden tratarse con células/tejidos regenerados a partir de células madre obtenidas usando los compuestos antisentido comprenden: una enfermedad o trastorno asociado con la función y/o expresión anómala de INS, diabetes o trastornos relacionados con ella (por ejemplo, diabetes de tipo I, de tipo II, diabetes gestacional, cetoacidosis diabética, coma hiperosmolar no cetósico, hipoglucemia, coma diabético, diabetes mellitus neonatal, diabetes mellitus neonatal permanente, resistencia a la insulina, obesidad, etc.), una enfermedad o trastorno metabólico (por ejemplo, un estado no diabético resistente a la insulina, obesidad, disminución de la tolerancia a la glucosa (DTG), síndrome metabólico, síndrome de MODY, retinopatía diabética, insulinoma, diabetes del adulto, nefropatía diabética, hiperglucemia, nefropatía diabética, hipercolesterolemia, hiperinsulinismo, dislipidemia hiperlipidemia y una enfermedad metabólica relacionada con la edad, etc.), una enfermedad o trastorno asociado con deterioro en la regulación del nivel de insulina, neuropatía (por ejemplo, neuropatía sensorial, neuropatía autónoma, neuropatía motora, retinopatía), síndrome del ovario poliquístico, cáncer, inflamación, una enfermedad o trastorno neurológico, una enfermedad o trastorno cardíaco, una enfermedad autoinmunitaria, una neoplasia prostática, hirsutismo e hipertensión.

En otro aspecto, los oligonucleótidos antisentido modulan la expresión normal y/o la función normal de un gen de la insulina (INS) en pacientes que sufren o están en riesgo de desarrollar enfermedades o trastornos asociados con el gen de la insulina (INS).

En un aspecto, los oligonucleótidos son específicos para polinucleótidos de un gen de la insulina (INS), que incluyen, sin limitación, regiones no codificantes. Las dianas del gen de la insulina (INS) comprenden variantes de un gen de la insulina (INS); mutantes de un gen de la insulina (INS), que incluyen SNP; secuencias no codificantes de un gen de la insulina (INS); alelos, fragmentos y similares. Preferentemente el oligonucleótido es una molécula de ARN antisentido.

De acuerdo con aspectos de la descripción, la molécula del ácido nucleico diana no se limita a polinucleótidos del gen de la insulina (INS) en solitario sino que se extiende a cualquiera de las isoformas, receptores, homólogos, regiones no codificantes y similares de un gen de la insulina (INS).

En otro aspecto, un oligonucleótido se dirige a una secuencia antisentido natural (antisentido natural a las regiones codificantes y no codificantes) de unas dianas del gen de la insulina (INS), que incluyen, sin limitación, variantes,

alelos, homólogos, mutantes, derivados, fragmentos y secuencias complementarios de los mismos. Preferentemente el oligonucleótido es una molécula de ARN o ADN antisentido.

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

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

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

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

35 En otro aspecto, el direccionamiento de un gen de la insulina (INS) que incluye sin limitación, secuencias antisentido que se identifican y se expanden, usando por ejemplo, PCR, hibridación, etc., una o más de las secuencias determinadas como SEQ ID NO: 2 y 3, y similares, modulan la expresión o función de un gen de la insulina (INS). En un aspecto, la expresión o función se regula por incremento en comparación con un control. En otro aspecto, la expresión o función se regula por disminución en comparación con un control.

40 En otro aspecto, los oligonucleótidos comprenden secuencias de ácidos nucleicos determinadas como SEQ ID NO: 4 a 11 que incluyen secuencias antisentido que se identifican y amplían, usando por ejemplo, PCR, hibridación, etc. Estos oligonucleótidos pueden comprender uno o más nucleótidos modificados, fragmentos más cortos o más largos, enlaces modificados y similares. Los ejemplos de enlaces modificados o enlaces internucleótidos comprenden fosforotioato, fosforoditioato o similares. En otro aspecto, los nucleótidos comprenden un derivado de fósforo. El derivado de fósforo (o grupo fosfato modificado) que puede fijarse al azúcar o a una fracción de análogo de azúcar en los oligonucleótidos modificados de la presente descripción puede ser monofosfato, difosfato, trifosfato, alquilfosfato, alcanofosfato, fosforotioato y similares. La preparación de los análogos de fosfato indicados anteriormente, y su incorporación en nucleótidos, nucleótidos modificados y oligonucleótidos, *per se*, también se conoce y no es preciso describirla en el presente documento.

50 La especificidad y sensibilidad de antisentido también es controlada por los expertos en la materia para usos terapéuticos. Los oligonucleótidos antisentido se han empleado como fracciones terapéuticas en el tratamiento de estados patológicos en animales y en el ser humano. Los oligonucleótidos antisentido se han administrado de forma segura y efectiva a seres humanos y en la actualidad están en curso numerosos ensayos clínicos. Así se establece que los oligonucleótidos pueden ser útiles modalidades terapéuticas que pueden configurarse para ser útiles en regímenes terapéuticos para el tratamiento de células, tejidos y animales, especialmente seres humanos.

En algunos aspectos de la presente descripción los compuestos oligoméricos antisentido, en especial los oligonucleótidos, se unen con moléculas diana de ácidos nucleicos y modulan la expresión y/o función de moléculas

codificadas por un gen diana. Las funciones de ADN para interferencia comprenden, por ejemplo, replicación y transcripción. Las funciones de ARN para interferencia comprenden todas las funciones vitales como, por ejemplo, translocación del ARN en el sitio de traducción de proteínas, traducción de proteínas desde el ARN, splicing del ARN para producir una o más especies de ARNm y actividad catalítica que puede comprometerse o facilitarse por medio del ARN. Las funciones pueden tener regulación por aumento o estar inhibidas, dependiendo de las funciones deseadas.

Los compuestos antisentido incluyen compuestos oligoméricos antisentido, oligonucleótidos antisentido, oligonucleótidos de secuencias de guía externa (EGS), splicers alternativos, cebadores, sondas y otros compuestos oligoméricos que hibridan al menos una parte del ácido nucleico diana. De este modo, estos compuestos pueden introducirse en forma de compuestos oligoméricos monocatenarios, bicatenarios, parcialmente monocatenarios o circulares.

El direccionamiento de un compuesto antisentido a una molécula de ácidos nucleicos en particular, en el contexto de la presente descripción, puede ser un proceso en varias etapas. El proceso comienza normalmente con la identificación de un ácido nucleico diana cuya función debe modularse. Este ácido nucleico diana puede ser, por ejemplo, un gen celular (o ARNm transcrito desde el gen) cuya expresión se asocia con un trastorno o estado patológico en particular, o una molécula de ácido nucleico a partir de un agente infeccioso. En la presente descripción, el ácido nucleico diana codifica un gen de la insulina (INS).

El proceso de direccionamiento también incluye normalmente la determinación de al menos una región diana, segmento o sitio en el ácido nucleico diana para que la interacción antisentido tenga lugar de forma que se produzca el efecto deseado, por ejemplo, la modulación de expresión. En el contexto de la presente descripción, el término "región" se define como una parte del ácido nucleico diana que tiene al menos una estructura, función o característica identificable. En las regiones de ácidos nucleicos diana hay segmentos. Los "segmentos" se definen como regiones menores o sub-porciones de regiones en un ácido nucleico diana. "Sitios", tal como se usa en la presente descripción, se definen como posiciones en un ácido nucleico diana.

En un aspecto, los oligonucleótidos antisentido se unen con las secuencias antisentido naturales de un gen de la insulina (INS) y modulan la expresión y/o función de un gen de la insulina (INS) (SEQ ID NO: 1 a 3). Los ejemplos de secuencias antisentido incluyen las SEQ ID NO: 4 a 11.

En otro aspecto, los oligonucleótidos antisentido se unen con uno o más segmentos de un polinucleótido del gen de la insulina (INS) y modulan la expresión y/o función de un gen de la insulina (INS). Los segmentos comprenden al menos cinco nucleótidos consecutivos de polinucleótidos de un gen de la insulina (INS) de sentido directo o antisentido.

En otro aspecto, los oligonucleótidos antisentido son específicos para secuencias antisentido naturales de un gen de la insulina (INS) donde la unión de los oligonucleótidos a las secuencias antisentido naturales de un gen de la insulina (INS) modulan la expresión y/o la función de un gen de la insulina (INS).

En otro aspecto, los compuestos de oligonucleótidos comprenden secuencias determinadas como SEQ ID NO: 4 a 11, secuencias antisentido que se identifican y se expanden, usando por ejemplo, PCR, hibridación etc. Estos oligonucleótidos pueden comprender uno o más nucleótidos modificados, fragmentos más cortos o más largos, enlaces modificados y similares. Los ejemplos de enlaces modificados o enlaces internucleótido comprenden fosforotioato, fosforoditioato o similares. En otro aspecto, los nucleótidos comprenden un derivado de fósforo. El derivado de fósforo (o grupo fosfato modificado) que puede fijarse al azúcar o a la fracción de análogo del azúcar en los oligonucleótidos modificados de la presente descripción puede ser monofosfato, difosfato, trifosfato, alquilfosfato, alcanofosfato, fosforotioato y similares. La preparación de los análogos de fosfato indicados anteriormente, y su incorporación en nucleótidos, nucleótidos modificados y oligonucleótidos, *per se*, también se conoce y no es preciso describirla en el presente documento.

Dado que, tal como se conoce en la técnica, el codón de inicio de traducción es normalmente 5'-AUG (en moléculas de ARNm transcritas; 5'-ATG en la molécula de ADN correspondiente), el codón de inicio de traducción se refiere también como "codón AUG", "codón de inicio" o "codón de inicio AUG". Una minoría de genes tiene un codón de inicio de traducción que tiene la secuencia de ARN 5'-GUG, 5'-UUG o 5'-CUG; y 5'-AUA, 5'-ACG y 5'-CUG han demostrado que funcionan *in vivo*. Así, los términos "codón de inicio de traducción" y "codón de inicio" pueden comprender numerosas secuencias de codones, aun cuando el aminoácido iniciador en cada caso es normalmente metionina (en eucariotas) o formilmetionina (en procariotas). Los genes eucariotas y procariotas pueden tener dos o

más codones de inicio alternativos, pudiendo usarse uno cualquiera de los cuales preferentemente para inicio de la traducción en un tipo celular o tejido en particular, o en un conjunto determinado de condiciones. En el contexto de la descripción, "codón de inicio" y "codón de inicio de traducción" se refieren al codón o los codones que se usan *in vivo* para iniciar la traducción de un ARNm transcrito a partir de un gen que codifica un gen de la insulina (INS), con independencia de la secuencia o las secuencias de dichos codones. Un codón de terminación de traducción (o "codón de fin") de un gen puede tener una de entre tres secuencias, es decir, 5'-UAA, 5'-UAG y 5'-UGA (las secuencias de ADN correspondientes son 5'-TAA, 5'-TAG y 5'-TGA, respectivamente).

Los términos "región de codón de inicio" y "región de codón de inicio de traducción" se refiere a una porción de dicho ARNm o gen que comprende de aproximadamente 25 a aproximadamente 50 nucleótidos contiguos en cualquier dirección (es decir, 5' o 3') desde un codón de inicio de traducción. Análogamente, los términos "región de codón de fin" y "región de codón de terminación de traducción" se refieren a una porción de dicho ARNm o gen que comprende de aproximadamente 25 a aproximadamente 50 nucleótidos contiguos en cualquier dirección (es decir, 5' o 3') desde un codón de terminación de traducción. En consecuencia, la "región de codón de inicio" (o "región de codón de inicio de traducción") y la "región de codón de fin" (o "región de codón de terminación de traducción") son regiones que pueden ser objeto de direccionamiento de manera efectiva mediante los compuestos antisentido de la presente descripción.

El marco de lectura abierto (ORF) o "región codificante", que como se conoce en la técnica se refieren a la región entre el codón de inicio de traducción y el codón de terminación de traducción, es también una región que puede ser objeto de un direccionamiento de manera efectiva. Dentro del contexto de la presente descripción, una región direccionada es la región intragénica que comprende el codón de inicio o de terminación de traducción del marco de lectura abierto (ORF) de un gen.

Otra región diana incluye la región 5' no traducida (5'UTR), que en la técnica se refiere a la porción de un ARNm en la dirección 5' desde el codón de inicio de traducción, y que incluye así nucleótidos entre el sitio caperuza 5' y el codón de inicio de traducción de un ARNm (o nucleótidos correspondientes en el gen). Otra región diana más incluye la región 3' no traducida (3'UTR), que en la técnica se refiere a la porción de un ARNm en la dirección 3' desde el codón de terminación de traducción, y que incluye así nucleótidos entre el codón de terminación de traducción y el extremo 3' de un ARNm (o nucleótidos correspondientes en el gen). El sitio caperuza 5' de un ARNm comprende un resto de guanosina metilado N7 unido al resto más en 5' del ARNm por medio de una unión trifosfato 5'-5'. Se considera que la región caperuza 5' de unión de un ARNm incluye la estructura caperuza 5' en sí así como los 50 primeros nucleótidos adyacentes al sitio caperuza. Otra región diana para la presente descripción es la región caperuza 5'.

Aunque algunas transcripciones de ARNm eucariota se traducen directamente, muchas contienen una o más regiones, conocidas como "intrones", que se escinden desde una transcripción antes de traducirse. Las regiones restantes (y por tanto traducidas) se conocen como "exones" y se empalman entre sí para formar una secuencia de ARNm continua. En un aspecto, los sitios de splicing de direccionamiento, es decir, uniones intrón-exón o uniones exón-intrón, son especialmente útiles en situaciones donde interviene un splicing aberrante implicado en una enfermedad, o donde existe una sobreproducción de un producto de splicing en particular implicado en una enfermedad. Una unión de fusión aberrante debida a la reorganización o la delección es otro aspecto de un sitio diana. Las transcripciones de ARNm producidas mediante el proceso de splicing de dos (o más) ARNm de diferentes fuentes de genes se conocen como "transcripciones de fusión". Los intrones pueden ser objeto de direccionamiento usando compuestos antisentido dirigidos, por ejemplo, a ADN o a pre-ARNm.

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

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

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

Pueden producirse transcripciones de ARN alternativas a partir de la misma región genómica de ADN. Estas transcripciones alternativas se conocen generalmente como "variantes". Más específicamente, las "variantes pre-ARNm" son transcripciones producidas a partir del mismo ADN genómico que difieren de otras transcripciones producidas a partir del mismo ADN genómico en su posición de inicio o de fin y contienen una secuencia de intrones

y de exones.

Tras la escisión de una o más regiones de exones o intrones, o de partes de las mismas durante el splicing, las variantes pre-ARNm producen "variantes de ARNm" menores. En consecuencia, las variantes de ARNm son 5 variantes pre-ARNm procesadas y cada variante pre-ARNm única siempre debe producir una única variante de ARNm como resultado del splicing. Estas variantes de ARNm se conocen también como "variantes de splice alternativas". Si no tiene lugar splicing de la variante pre-ARNm entonces la variante pre-ARNm es idéntica a la variante de ARNm.

10 Las variantes pueden producirse a través del uso de señales alternativas para la transcripción de inicio o de terminación. Los pre-ARNm y los ARNm pueden poseer más de un codón de inicio o codón de fin. Las variantes que proceden de un pre-ARNm o un ARNm que usan codones de inicio alternativos se conocen como "variantes de inicio alternativas" de ese pre-ARNm o ARNm. Estas transcripciones que usan un codón de fin alternativo se conocen como "variantes de terminación alternativas" de ese pre-ARNm o ARNm. Un tipo específico de variante de 15 terminación alternativa es la "variante poliA" en la que las múltiples transcripciones producidas proceden de la selección alternativa de una de las "señales de terminación poliA" por la maquinaria de transcripción, produciendo así transcripciones que terminan en sitios poliA únicos. Dentro del contexto de la descripción, los tipos de variantes descritos en la presente memoria descriptiva son también aspectos de ácidos nucleicos diana.

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

Aunque en la presente memoria descriptiva se exponen secuencias específicas de ciertos segmentos diana de 25 ejemplo, un experto en la materia reconocerá que sirven para ilustrar y describir aspectos particulares dentro del alcance de la presente descripción. Los segmentos diana adicionales son fácilmente identificables por el experto en la materia a la vista de la presente descripción.

Los segmentos diana de 5-100 nucleótidos de longitud que comprenden un fragmento de al menos cinco (5) 30 nucleótidos consecutivos seleccionados de entre los segmentos diana ilustrativos se consideran también adecuados para el direccionamiento.

Los segmentos diana pueden incluir secuencias de ADN o ARN que comprenden al menos los 5 nucleótidos consecutivos del extremo 5' de uno de los segmentos diana ilustrativos (siendo los restantes nucleótidos un 35 fragmento consecutivo del mismo ADN o ARN que comienza inmediatamente en la dirección 5' del extremo 5' del segmento diana y que continúa hasta que el ADN o ARN contiene de aproximadamente 5 a aproximadamente 100 nucleótidos). Análogamente, los segmentos diana están representados por secuencias de ADN o ARN que comprenden al menos los 5 nucleótidos consecutivos desde el extremo 3' de uno de los segmentos diana ilustrativos (siendo los restantes nucleótidos un fragmento consecutivo del mismo ADN o ARN que comienza inmediatamente 40 en la dirección 3' del extremo 3' del segmento diana y continúa hasta que el ADN o ARN contiene aproximadamente de 5 a aproximadamente 100 nucleótidos). Un experto en la materia provisto de los segmentos diana ilustrados en la presente memoria descriptiva podrá, sin una experimentación innecesaria, identificar segmentos diana adicionales.

Una vez identificadas uno o más regiones, segmentos o sitios diana, se eligen compuestos antisentido que son 45 suficientemente complementarios a la diana, es decir, que se hibridan suficientemente bien y con suficiente especificidad, para proporcionar el efecto deseado.

En algunos aspectos de la descripción los oligonucleótidos se unen con una cadena antisentido de una diana en particular. Los oligonucleótidos son de al menos 5 nucleótidos de longitud y pueden sintetizarse de manera que cada 50 oligonucleótido se dirija a secuencias superpuestas de forma que los oligonucleótidos se sinteticen para cubrir toda la longitud del polinucleótido diana. Las dianas incluyen también regiones codificantes y no codificantes.

En un aspecto, los ácidos nucleicos específicos son dirigidos por oligonucleótidos antisentido. El direccionamiento de un compuesto antisentido a un ácido nucleico en particular es un proceso en varias etapas. El proceso comienza 55 normalmente con la identificación de una secuencia de ácidos nucleicos cuya función debe modularse. Ésta puede ser, por ejemplo, un gen celular (o ARNm transcrito desde el gen) cuya expresión se asocia con un trastorno o estado patológico en particular, o con un polinucleótido no codificante como, por ejemplo, ARN no codificante (ncRNA).

Los ARN pueden clasificarse en (1) ARN mensajeros (ARNm), que se traducen en proteínas, y (2) ARN codificantes sin proteínas (ncRNA). Los ncRNA comprenden microARN, transcripciones antisentido y otras unidades de transcripción (TU) que contienen una alta densidad de codones de fin y carecen de "marcos de lectura abiertos" extensos. Muchos ncRNA parecen comenzar en sitios de inicio en regiones no traducidas 3' (3'UTR) de loci de codificación de proteínas. Los ncRNA son a menudo raros y al menos la mitad de los ncRNA que han sido secuenciados por el consorcio FANTOM no parecen estar poliadenilados. La mayor parte de los investigadores se han centrado por motivos evidentes en los ARNm poliadenilados que son procesados y exportados al citoplasma. Recientemente, se ha mostrado que el conjunto de ARN nucleares no poliadenilados puede ser muy grande, y que muchas de dichas transcripciones se originan en regiones intergénicas. El mecanismo por el que los ncRNA pueden regular la expresión génica es por apareamiento de bases con transcripciones diana. Los ARN que funcionan por apareamiento de bases pueden agruparse en (1) ARN codificados en cis que son codificados en la misma posición genética, pero en la cadena opuesta en la que actúan los ARN y por tanto muestran una complementariedad perfecta con su diana, y (2) ARN codificados en trans que son codificados en una posición cromosómica diferente a aquella en la que actúan los ARN y generalmente no muestran un potencial perfecto de apareamiento de bases con sus dianas.

Sin desear verse limitado por ninguna teoría, la perturbación de un polinucleótido antisentido por los oligonucleótidos antisentido descritos en la presente memoria descriptiva puede alterar la expresión de los ARN mensajeros de sentido directo correspondientes. Sin embargo, esta regulación puede ser discordante (el silenciamiento génico antisentido produce la elevación del ARN mensajero) o concordante (el silenciamiento génico antisentido produce la reducción concomitante del ARN mensajero). En estos casos, los oligonucleótidos antisentido pueden ser direccionados a partes superpuestas o no superpuestas de la transcripción antisentido que deriva en su silenciamiento génico o secuestro. El antisentido codificante y no codificante puede direccionarse de forma idéntica y cualquiera de las categorías es capaz de regular las transcripciones de sentido directo correspondientes, ya sea de forma concordante o no concordante. Las estrategias que se emplean para identificar nuevos oligonucleótidos para su uso frente a una diana pueden basarse en el silenciamiento génico de transcripciones ARN antisentido por oligonucleótidos antisentido o cualquier otro medio de modulación de la diana deseada.

Estrategia 1: En el caso de regulación discordante, el silenciamiento génico de la transcripción antisentido eleva la expresión del gen convencional (de sentido directo). Si este último gen codificara un fármaco diana conocido o posible, el silenciamiento génico de su contraparte antisentido imitaría de forma imaginable la acción de un agonista receptor o un estimulante enzimático.

Estrategia 2: En el caso de regulación concordante, podrían silenciarse de forma simultánea las transcripciones antisentido y de sentido directo y conseguir así una reducción sinérgica de la expresión génica convencional (de sentido directo). Si, por ejemplo, se usa un oligonucleótido antisentido para conseguir el silenciamiento génico, esta estrategia puede usarse para aplicar un oligonucleótido antisentido dirigido a la transcripción de sentido directo y otro oligonucleótido antisentido a la transcripción antisentido correspondiente, o un único oligonucleótido antisentido simétrico energéticamente que se dirige de forma simultánea a transcripciones de superposición de sentido directo y antisentido.

De acuerdo con la presente descripción, los compuestos antisentido incluyen oligonucleótidos antisentido, ribozimas, oligonucleótidos de secuencias de guía externa (EGS), compuestos siRNA, compuestos de interferencia de ARN (ARNi) monocatenarios o bicatenarios tales como compuestos siRNA, y otros compuestos oligoméricos que se hibridan al menos con una porción del ácido nucleico diana y modulan su función. De este modo, pueden ser ADN, ARN, de tipo ADN, de tipo ARN o mezclas de los mismos, o pueden ser miméticos de uno o más de los mismos. Estos compuestos pueden ser compuestos oligoméricos monocatenarios, bicatenarios, circulares o en horquilla y pueden contener elementos estructurales tales como abultamientos, no correspondencias o bucles internos terminales. Los compuestos antisentido se preparan de forma rutinaria linealmente aunque pueden unirse o prepararse de otro modo para que sean circulares y/o ramificados. Los compuestos antisentido pueden incluir construcciones tales como, por ejemplo, dos cadenas hibridadas para formar un compuesto total o parcialmente bicatenario o un monocatenario con suficiente autocomplementariedad para permitir la hibridación y la formación de un compuesto total o parcialmente bicatenario. Las dos cadenas pueden ligarse internamente dejando extremos 3' o 5' libres o pueden ligarse para formar un bucle o estructura en horquilla continuos. La estructura en horquilla puede contener un saliente en el extremo 5' o 3' que produce una extensión del carácter monocatenario. Los compuestos bicatenarios pueden incluir opcionalmente salientes en los extremos. Las modificaciones adicionales pueden incluir grupos conjugados fijados a uno de los extremos, posiciones de nucleótidos seleccionadas, posiciones de azúcares o a una de las uniones internucleosídicas. Alternativamente, las dos cadenas pueden estar ligadas por medio de una fracción que no es un ácido nucleico o de un grupo conector. Cuando se forman a partir de una única cadena, los

dsRNA pueden adoptar la forma de una molécula de tipo horquilla autocomplementaria que se dobla sobre sí misma para formar un dúplex. Así, los dsRNA pueden ser total o parcialmente bicatenarios. La modulación específica de la expresión génica puede conseguirse por expresión estable de horquillas de dsRNA en líneas celulares transgénicas, sin embargo, en algunos aspectos, la expresión génica o función es objeto de regulación por aumento. Cuando se

- 5 forma a partir de dos cadenas, o una única cadena que adopta la forma de una molécula de tipo horquilla autocomplementaria que se dobla sobre sí misma para formar un dúplex, las dos cadenas (o regiones de formación de dúplex de una sola cadena) son cadenas de ARN complementarias que emparejan bases en forma de Watson-Crick.
- 10 Una vez introducidos en un sistema, los compuestos de la descripción pueden activar la acción de una o más enzimas o proteínas estructurales para llevar a cabo la escisión u otra modificación del ácido nucleico diana o pueden actuar por medio de mecanismos basados en la ocupación. En general, los ácidos nucleicos (que incluyen oligonucleótidos) pueden describirse como "de tipo ADN" (es decir, que tienen generalmente uno o más azúcares 2'-desoxi y, generalmente, bases T y no U) o "de tipo ARN" (es decir, que tienen generalmente uno o más azúcares 2'-
- 15 hidroxilo o 2'-modificados y, generalmente bases U y no T). Las hélices de los ácidos nucleicos pueden adoptar más de un tipo de estructura, con mucha frecuencia las formas A y B. Según se cree, en general, los oligonucleótidos que tienen una estructura semejante a la forma B son "de tipo ADN" y los que tienen una estructura semejante a la forma A son "de tipo ARN." En algunos casos (quiméricos), un compuesto antisentido puede contener regiones de forma A y B.

- 20 En otro aspecto, los oligonucleótidos o compuestos antisentido deseados comprenden al menos uno de entre: ARN antisentido, ADN antisentido, oligonucleótidos antisentido quiméricos, oligonucleótidos antisentido que comprenden uniones modificadas, ARN interferente (ARNi), ARN interferente corto (siRNA); micro-ARN interferente (miRNA); ARN temporal pequeño (stRNA); o ARN en horquilla corto (shARN); activación génica inducida por ARN pequeño
- 25 (aRNA); ARN pequeños de activación (saRNA), o combinaciones de los mismos.

Los dsRNA pueden activar también la expresión génica, un mecanismo que ha recibido el nombre de "activación génica inducida por ARN pequeño" o aRNA. Los promotores génicos de direccionamiento dsRNA inducen una potente activación de transcripción de los genes asociados. El aRNA se demostró en células humanas usando

30 dsRNA sintéticos, denominados "ARN de activación pequeños" (saRNA).

Se ha descubierto que el ARN bicatenario pequeño (dsRNA), tal como el ARN interferente pequeño (siRNA) y el microARN (miRNA), activan un mecanismo conservado evolutivo conocido como interferencia de ARN (ARNi). El ARNi conduce invariablemente a un silenciamiento génico. Sin embargo, en aspectos descritos en detalle en la

35 sección de ejemplos que se ofrece más adelante, se muestra que los oligonucleótidos aumentan la expresión y/o la función de los polinucleótidos del gen de la insulina (INS) y los productos codificados de los mismos. Los dsRNA también pueden actuar como ARN de activación pequeños (saRNA). Sin desear verse limitado por ninguna teoría, por direccionamiento de secuencias en promotores génicos, los saRNA inducirían una expresión génica diana en un fenómeno referido como activación de transcripción inducida por dsRNA (aRNA).

40 En un aspecto adicional, los "segmentos diana" identificados en la presente memoria descriptiva pueden emplearse en un cribado de compuestos adicionales que modulan la expresión de un polinucleótido del gen de la insulina (INS). Los "moduladores" son aquellos compuestos que reducen o incrementan la expresión de una molécula de ácidos nucleicos que codifica un gen de la insulina (INS) y que comprende al menos una parte de 5-nucleótido que es

45 complementaria de un segmento diana. El procedimiento de cribado comprende las etapas de puesta en contacto de un segmento diana de una molécula de ácido nucleico que codifica polinucleótidos de sentido directo o antisentido naturales de un gen de la insulina (INS) con uno o más moduladores candidatos, y que selecciona uno o más moduladores candidatos que reducen o aumentan la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica un polinucleótido del gen de la insulina (INS), por ejemplo, las SEQ ID NO: 4 a 11. Una vez que se muestra que el

50 modulador o moduladores candidatos son capaces de modular (por ejemplo, reduciendo o incrementando) la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica un polinucleótido del gen de la insulina (INS), el modulador puede emplearse en estudios de investigación adicionales de la función de un polinucleótido del gen de la insulina (INS), o para su uso como un agente de investigación, diagnóstico o terapéutico de acuerdo con la presente descripción.

55 El direccionamiento de la secuencia antisentido natural modula la función del gen diana. Por ejemplo, el gen de la insulina (INS) (por ejemplo, número de acceso NM-000207). En un aspecto, la diana es un polinucleótido antisentido del gen de la insulina (INS). En un aspecto, un oligonucleótido antisentido se dirige a secuencias de sentido directo y/o antisentido naturales de un polinucleótido del gen de la insulina (INS) (por ejemplo, número de acceso NM-

000207), variantes, alelos, isoformas, homólogos, mutantes, derivados, fragmentos y secuencias complementarias de los mismos. Preferentemente el oligonucleótido es una molécula antisentido y las dianas incluyen regiones codificantes y no codificantes de polinucleótidos del gen de la insulina (INS) antisentido y/o de sentido directo.

5 Los segmentos diana de la presente descripción pueden combinarse también con sus compuestos complementarios antisentido respectivos de la presente descripción para formar oligonucleótidos bicatenarios (dúplex) estabilizados.

Dichas fracciones de oligonucleótidos bicatenarios han mostrado en la técnica que modulan la expresión diana y regulan la traducción así como el procesamiento de ARN a través de un mecanismo antisentido. Por otra parte, las
10 fracciones bicatenarias pueden someterse a modificaciones químicas. Por ejemplo, dichas fracciones bicatenarias han demostrado capacidad para inhibir la diana por la hibridación clásica de la cadena antisentido del dúplex o la diana, activando así la degradación enzimática de la diana.

En un aspecto, un oligonucleótido antisentido se dirige a polinucleótidos del gen de la insulina (INS) (por ejemplo,
15 número de acceso NM-000207), variantes, alelos, isoformas, homólogos, mutantes, derivados, fragmentos y secuencias complementarias de los mismos. Preferentemente el oligonucleótido es una molécula antisentido.

De acuerdo con aspectos de la descripción, la molécula del ácido nucleico diana no se limita al gen de la insulina (INS) en solitario sino que se extiende a cualquiera de las isoformas, receptores, homólogos y similares de una
20 molécula del gen de la insulina (INS).

En otro aspecto, un oligonucleótido se dirige a una secuencia antisentido natural de un polinucleótido del gen de la insulina (INS), por ejemplo, los polinucleótidos determinados en las SEQ ID NO: 2 y 3, y cualquiera de sus variantes, alelos, homólogos, mutantes, derivados, fragmentos y secuencias complementarias. Los ejemplos de
25 oligonucleótidos antisentido se determinan como las SEQ ID NO: 4 a 11.

En un aspecto, los oligonucleótidos son complementarios a o se unen con secuencias de ácidos nucleicos de un gen de la insulina (INS) antisentido, que incluye sin limitación secuencias no codificantes de sentido directo y/o antisentido asociadas con un polinucleótido del gen de la insulina (INS) y modulan la expresión y/o la función de una
30 molécula del gen de la insulina (INS).

En otro aspecto, los oligonucleótidos son complementarios a o se unen con secuencias de ácidos nucleicos de un gen de la insulina (INS) antisentido natural, determinadas en las SEQ ID NO: 2 y 3 y modulan la expresión y/o la función de una molécula del gen de la insulina (INS).
35

En un aspecto, los oligonucleótidos comprenden secuencias de al menos 5 nucleótidos consecutivos de las SEQ ID NO: 4 a 11 y modulan la expresión y/o la función de una molécula del gen de la insulina (INS).

Las dianas de polinucleótidos comprenden el gen de la insulina (INS), que incluye miembros de la familia de los
40 mismos, variantes de un gen de la insulina (INS); mutantes de un gen de la insulina (INS), que incluye SNP; secuencias no codificantes de un gen de la insulina (INS); alelos de un gen de la insulina (INS); variantes, fragmentos y similares de especies. Preferentemente el oligonucleótido es una molécula antisentido.

En otro aspecto, los polinucleótidos del gen de la insulina (INS) que se dirigen a oligonucleótidos comprenden: ARN
45 antisentido, ARN interferente (ARNi), ARN interferente corto (siRNA); micro-ARN interferente (miRNA); un ARN temporal pequeño (stRNA); o un ARN en horquilla corto (shARN); activación génica inducida por ARN pequeño (aRNA); o ARN de activación pequeño (saRNA).

En otro aspecto, el direccionamiento de un polinucleótido del gen de la insulina (INS), por ejemplo las SEQ ID NO: 2
50 y 3, modula la expresión o función de estas dianas. En un aspecto, la expresión o función es regulada por aumento en comparación con un control. En otro aspecto, la expresión o función es regulada por disminución en comparación con un control.

En otro aspecto, los compuestos antisentido comprenden secuencias determinadas en las SEQ ID NO: 4 a 11. Estos
55 oligonucleótidos pueden comprender uno o más nucleótidos modificados, fragmentos más cortos o más largos, enlaces modificados y similares.

En otro aspecto, las SEQ ID NO: 4 a 11 comprenden uno o más nucleótidos LNA.

La modulación de un ácido nucleico diana deseada puede llevarse a cabo de diversas formas conocidas en la técnica. Por ejemplo, los oligonucleótidos antisentido, siRNA, etc. Las moléculas de ácidos nucleicos enzimáticas (por ejemplo, ribozimas) son moléculas de ácidos nucleicos capaces de catalizar una o más de una diversidad de reacciones, que incluyen la capacidad de escindir repetidamente otras moléculas de ácidos nucleicos separadas de una forma específica de secuencias de bases de nucleótidos. Dichas moléculas de ácidos nucleicos enzimáticas pueden usarse, por ejemplo, para dirigirse prácticamente a cualquier transcripción de ARN.

Dada su especificidad de secuencias, las moléculas de ácidos nucleicos enzimáticas trans-escisión son prometedoras como agentes terapéuticos para enfermedades humanas. Las moléculas de ácidos nucleicos enzimáticas pueden diseñarse de manera que escindan dianas de ARN específicas dentro del sustrato del ARN celular. Dicho acontecimiento de escisión convierte al ARNm en no funcional y anula la expresión de proteínas a partir de ese ARN. De esta forma, la síntesis de una proteína asociada con un estado patológico puede inhibirse selectivamente.

En general, los ácidos nucleicos enzimáticos con actividad de escisión de ARN actúan primero uniéndose a un ARN diana. Dicha unión tiene lugar a través de la parte de unión a diana de un ácido nucleico enzimático que se mantiene en estrecha proximidad con una porción enzimática de la molécula que actúa para escindir el ARN diana. Así, el ácido nucleico enzimático primero reconoce y después se une a un ARN diana a través de apareamiento de bases complementarias, y una vez unido al sitio correcto, actúa enzimáticamente para cortar el ARN diana. La escisión estratégica de dicho ARN diana destruirá su capacidad para dirigir la síntesis de una proteína codificada. Después de que un ácido nucleico enzimático se haya unido y escindido su ARN diana, es liberado desde este ARN para buscar otra diana y puede unirse repetidamente a nuevas dianas y escindir las.

Se han usado varios enfoques tales como estrategias de selección *in vitro* (evolución) para la evolución de nuevos catalizadores de ácidos nucleicos capaces de catalizar diversas reacciones, tales como escisión y ligación de uniones de fosfodiéster y uniones de amida.

El desarrollo de ribozimas que son óptimas para la actividad catalítica contribuiría de modo significativo a cualquier estrategia que emplee ribozimas de escisión de ARN para el propósito de regular la expresión génica. Por ejemplo, la ribozima de cabeza de martillo actúa con una tasa catalítica (k_{cat}) de aproximadamente 1 min^{-1} en presencia de concentraciones de saturación (10 mM) de cofactor Mg^{2+} . Se ha demostrado que una ribozima "ARN ligasa" artificial cataliza la reacción de automodificación correspondiente con una tasa aproximadamente 100 min^{-1} . Además, se sabe que algunas ribozimas de cabeza de martillo modificadas que tienen brazos de unión al sustrato hechos de ADN catalizan la escisión de ARN con múltiples tasas de producción que se aproximan a 100 min^{-1} . Finalmente, la sustitución de un resto específico dentro del núcleo catalítico de la cabeza de martillo con determinados análogos de nucleótidos proporciona ribozimas modificadas que muestran una mejora de hasta 10 veces en la tasa de catálisis. Estos hallazgos revelan que las ribozimas pueden promover las transformaciones químicas con tasas de catálisis significativamente mayores que las mostradas *in vitro* por la mayoría de las ribozimas de autoescisión natural. Así pues, es posible que las estructuras de determinadas ribozimas de autoescisión puedan optimizarse para proporcionar una actividad catalítica máxima, o que puedan prepararse motivos de ARN totalmente nuevos que muestren tasas significativamente más rápidas para la escisión de fosfodiéster de ARN.

La escisión intermolecular de un sustrato de ARN por un catalizador de ARN que se ajusta al modelo de "cabeza de martillo" fue mostrada por primera vez en 1987. El catalizador de ARN fue recuperado y se hizo reaccionar con múltiples moléculas de ARN, que mostraron que era verdaderamente catalítico.

Los ARN catalíticos diseñados basándose en el motivo de "cabeza de martillo" se han usado para escindir secuencias diana específicas con la realización de cambios de base apropiados en el ARN catalítico con el fin de mantener el apareamiento de bases necesario con las secuencias diana. Esto ha permitido el uso del ARN catalítico para escindir secuencias diana específicas e indica que los ARN catalíticos diseñados de acuerdo con el modelo "cabeza de martillo" pueden escindir posiblemente ARN de sustrato específicos *in vivo*.

La interferencia de ARN (ARNi) se ha convertido en una poderosa herramienta para modular la expresión génica en mamíferos y células de mamíferos. Este enfoque requiere el suministro de ARN interferente pequeño (siRNA) como ARN o como ADN, usando un plásmido de expresión o un virus y la secuencia codificante para ARN en horquilla pequeños que son procesados como siRNA. Este sistema permite el transporte eficiente de los pre-siRNA en el citoplasma donde están activos y permite el uso de promotores específicos de tejido y regulados para la expresión génica.

En un aspecto, un oligonucleótido o compuesto antisentido comprende un oligómero o polímero de ácido ribonucleico (ARN) y/o ácido desoxirribonucleico (ADN), o un mimético, quimera, análogo u homólogo del mismo. Este término incluye oligonucleótidos compuestos por nucleótidos, azúcares y uniones de internucleósidos covalentes (estructura principal) de ocurrencia natural así como oligonucleótidos que tienen porciones de ocurrencia no natural que actúan de forma análoga. Dichos oligonucleótidos modificados o sustituidos son preferidos a menudo con respecto a las formas naturales debido a sus propiedades convenientes como, por ejemplo, captación celular reforzada, mayor afinidad por ácidos nucleicos diana y aumento en la estabilidad en presencia de nucleasas.

De acuerdo con la presente descripción, los oligonucleótidos o "compuestos antisentido" incluyen oligonucleótidos antisentido (por ejemplo, ARN, ADN, mimético, quimera, análogo u homólogo de los mismos), ribozimas, oligonucleótidos de secuencias de guía externa (EGS), compuestos siRNA, compuestos de ARN interferentes (ARNi) monocatenarios o bicatenarios como compuestos siRNA, saRNA, aRNA, y otros compuestos oligoméricos que se hibridan al menos con una porción del ácido nucleico diana y modulan su función. De este modo, pueden ser ADN, ARN, de tipo ADN, de tipo ARN, o mezclas de los mismos, o puede ser miméticos de uno o más de los mismos. Estos compuestos pueden ser compuestos oligoméricos monocatenarios, bicatenarios, circulares o en horquilla y pueden contener elementos estructurales tales como protuberancias, ausencias de correspondencias o bucles internos o terminales. Los compuestos antisentido se preparan rutinariamente de forma lineal pero pueden unirse o prepararse de otro modo para que sean circulares y/o ramificados. Los compuestos antisentido pueden incluir construcciones como, por ejemplo, dos cadenas hibridadas para formar un compuesto total o parcialmente bicatenario o una cadena única con suficiente autocomplementariedad para permitir la hibridación y la formación de un compuesto total o parcialmente bicatenario. Las dos cadenas pueden estar unidas internamente dejando extremos 3' o 5' libres o pueden estar unidas para formar una estructura continua en horquilla o bucle. La estructura en horquilla puede contener un saliente en el extremo 5' o 3' que produce una extensión de carácter monocatenario. Los compuestos bicatenarios pueden incluir opcionalmente salientes en los extremos. Las modificaciones adicionales pueden incluir grupos conjugados unidos a uno de los extremos, posiciones seleccionadas de nucleótidos, posiciones de azúcares o en una de las uniones internucleosídicas. Alternativamente, las dos cadenas pueden unirse por medio de un grupo conector o una fracción no de ácidos nucleicos. Cuando se forman a partir de sólo una cadena, el dsRNA puede adoptar la forma de una molécula de tipo horquilla autocomplementaria que se dobla sobre sí misma para formar un dúplex. Así, los dsRNA pueden ser total o parcialmente bicatenarios. La modulación específica de la expresión génica puede conseguirse mediante expresión estable de horquillas de dsRNA en líneas celulares transgénicas. Cuando se forma a partir de dos cadenas, o de una sola cadena que toma la forma de una molécula de tipo horquilla autocomplementaria que se dobla sobre sí misma para formar un dúplex, las dos cadenas (o regiones de formación dúplex de una única cadena) son cadenas de ARN complementarias que emparejan las bases en forma de Watson-Crick.

Una vez introducidos en un sistema, los compuestos de la descripción pueden desencadenar la acción de una o más enzimas o proteínas estructurales para realizar la escisión u otra modificación del ácido nucleico diana o pueden actuar por medio de mecanismos basados en la ocupación. En general, los ácidos nucleicos (que incluyen los oligonucleótidos) pueden describirse como "de tipo ADN" (es decir, que tienen generalmente uno o más 2'-desoxi-azúcares y, generalmente, bases T y no U) o "de tipo ARN" (es decir, que tienen generalmente uno o más azúcares 2'-hidroxilo o 2'-modificados y, generalmente bases U y no T bases). Las hélices de ácidos nucleicos pueden adoptar más de un tipo de estructura, con la máxima frecuencia las formas A y B. Según se cree, en general, los oligonucleótidos que tienen una estructura de tipo forma B son "de tipo ADN" y los que tienen una estructura de tipo forma A son "de tipo ARN." En algunos aspectos (quiméricos), un compuesto antisentido puede contener regiones de formas A y B.

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

En un aspecto, los compuestos antisentido de la descripción tienen porciones antisentido de 10 a 50 nucleótidos de longitud. Un experto en la materia observará que esto comprende oligonucleótidos que tienen porciones antisentido

de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 ó 50 nucleótidos de longitud, o cualquier intervalo intermedio. En algunos aspectos, los oligonucleótidos tienen 15 nucleótidos de longitud.

- 5 En un aspecto, los compuestos antisentido o de oligonucleótidos de la descripción tienen porciones antisentido de 12 ó 13 a 30 nucleótidos de longitud. Un experto en la materia observará que esto comprende compuestos antisentido que tienen porciones antisentido de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ó 30 nucleótidos de longitud, o cualquier intervalo intermedio.
- 10 En otro aspecto, los compuestos oligoméricos de la presente descripción incluyen también variantes en las que está presente una base diferente en una o más de las posiciones de nucleótidos en el compuesto. Por ejemplo, si el primer nucleótido es una adenosina, pueden producirse variantes que contienen timidina, guanosina o citidina en esta posición. Esto puede realizarse en cualquiera de las posiciones de los compuestos antisentido o dsRNA. A continuación se someten estos compuestos a ensayo usando los procedimientos descritos en la presente memoria
- 15 descriptiva para determinar su capacidad de inhibir la expresión de un ácido nucleico diana.

En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencia o complementariedad, entre el compuesto antisentido y la diana, es de aproximadamente el 40% a aproximadamente el 60%. En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencia o complementariedad es de aproximadamente el 60% a aproximadamente el 70%. En algunos

20 aspectos, la homología, identidad de secuencia o complementariedad es de aproximadamente el 70% a aproximadamente el 80%. En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencia o complementariedad es de aproximadamente el 80% a aproximadamente el 90%. En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencia o complementariedad es aproximadamente el 90%, aproximadamente el 92%, aproximadamente el 94%, aproximadamente el 95%, aproximadamente el 96%, aproximadamente el 97%, aproximadamente el 98%,

25 aproximadamente el 99% o aproximadamente el 100%.

En otro aspecto, los oligonucleótidos antisentido, tales como por ejemplo, moléculas de ácido nucleico tal como se describe en las SEQ ID NO: 4 a 11 comprenden una o más sustituciones o modificaciones. En un aspecto, los

30 nucleótidos son sustituidos por ácidos nucleicos bloqueados (LNA).

30 En otro aspecto, los oligonucleótidos se dirigen a una o más regiones de las moléculas de ácido nucleico de sentido directo y/o antisentido de secuencias codificantes y/o no codificantes asociadas con el gen de la insulina (INS) y las secuencias determinadas como SEQ ID NO: 1 a 3. Los oligonucleótidos se dirigen también a regiones superpuestas de las SEQ ID NO: 1 a 3.

35 Algunos oligonucleótidos de la presente descripción son oligonucleótidos quiméricos. Los "oligonucleótidos quiméricos" o "quimeras", en el contexto de la presente descripción, son oligonucleótidos que contienen dos o más regiones químicamente distintas, constituidas cada una por al menos un nucleótido. Estos oligonucleótidos contienen normalmente al menos una región de nucleótidos modificados que confiere una o más propiedades beneficiosas

40 (como, por ejemplo, aumento en la resistencia a la nucleasa, aumento en la captación en células, incremento en la afinidad de unión para la diana) y una región que es un sustrato para enzimas capaz de escisión de híbridos ARN:ADN o ARN:ARN. A modo de ejemplo, la ARNasa H es una endonucleasa celular que escinde la cadena de ARN de un dúplex ARN:ADN. La activación de ARNasa H, por tanto, produce la escisión del ARN diana, con lo que mejora enormemente la eficiencia de la modulación antisentido de la expresión génica. En consecuencia, a menudo

45 pueden obtenerse resultados comparables con oligonucleótidos más cortos cuando se usan oligonucleótidos quiméricos, en comparación con desoxi oligonucleótidos fosforotioato que se hibridan en la misma región diana. La escisión del ARN diana puede detectarse rutinariamente por electroforesis en gel y, en caso necesario, técnicas asociadas de hibridación de ácidos nucleicos conocidas en la técnica. En un aspecto, un oligonucleótido quimérico comprende al menos una región modificada para aumentar la afinidad de unión a diana, y, normalmente, una región

50 que actúa como un sustrato para la ARNasa H. La afinidad de un oligonucleótido por su diana (en este caso, un ácido nucleico que codifica ras) se determina rutinariamente midiendo la T_f de un par oligonucleótido/diana, que es la temperatura a la cual el oligonucleótido y la diana se disocian; la disociación se detecta por medios espectrofotométricos. Cuanto mayor es la T_f , más elevada es la afinidad del oligonucleótido por la diana.

55 Los compuestos quiméricos antisentido de la descripción pueden formarse como estructuras de material compuesto de dos o más oligonucleótidos, oligonucleótidos modificados, oligonucleósidos y/u oligonucleótidos miméticos tal como se ha descrito anteriormente. Dichos compuestos se han referido también en la técnica como híbridos o gápmers. Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de dichas estructuras híbridas comprenden, pero no se limitan a, las patentes de EE.UU. nº 5.013.830; 5.149.797; 5.220.007; 5.256.775;

5.366.878; 5.403.711; 5.491.133; 5.565.350; 5.623.065; 5.652.355; 5.652.356; y 5.700.922.

En otro aspecto, la región del oligonucleótido que se modifica comprende al menos un nucleótido modificado en la posición 2' del azúcar, con la máxima preferencia en 2'-O-alquilo, 2'-O-alquil-O-alquilo o 2'-fluoro-nucleótido modificado. En otros aspectos, las modificaciones de ARN incluyen modificaciones 2'-fluoro, 2'-amino y 2' O-metilo en la ribosa de pirimidinas, restos abásicos o una base invertida en el extremo 3' del ARN. Dichas modificaciones se incorporan rutinariamente en los oligonucleótidos y estos oligonucleótidos han demostrado tener una Tf superior (es decir, mayor afinidad de unión a la diana) que los 2'-desoxi oligonucleótidos con respecto a una diana dada. El efecto de dicho aumento de la afinidad es una mejora sustancial de la inhibición de la expresión génica del oligonucleótido ARNi. La ARNasa H es una endonucleasa celular que escinde la cadena de ARN de dúplex ARN:ADN; la activación de esta enzima produce por tanto la escisión del ARN diana, y así puede mejorar enormemente la eficiencia de la inhibición de ARNi. La escisión del ARN diana puede mostrarse rutinariamente mediante electroforesis en gel. En otro aspecto, el oligonucleótido quimérico es modificado también para mejorar la resistencia a la nucleasa. Las células contienen una variedad de exonucleasas y endonucleasas que pueden degradar los ácidos nucleicos. Se ha mostrado que una serie de modificaciones de nucleótidos y nucleósidos para preparar el oligonucleótido en el que se incorporan son más resistentes a la digestión de la nucleasa que el oligodesoxinucleótido natural. La resistencia a la nucleasa se mide rutinariamente incubando oligonucleótidos con extractos celulares o soluciones aisladas de nucleasa y midiendo la magnitud de oligonucleótido intacto que queda con el tiempo, normalmente por electroforesis en gel. Los oligonucleótidos que han sido modificados para mejorar su resistencia a la nucleasa sobreviven intactos durante más tiempo que los oligonucleótidos no modificados. Se han mostrado diversas modificaciones de oligonucleótidos para mejorar o conferir resistencia a la nucleasa. En la actualidad se prefieren más los oligonucleótidos que contienen al menos una modificación de fosforotioato. En algunos casos, las modificaciones de oligonucleótidos que mejoran la afinidad de unión a la diana son capaces también, independientemente, de mejorar la resistencia a la nucleasa. Pueden encontrarse algunas modificaciones convenientes en De Mesmaeker y col. (1995) Acc. Chem. Res., 28:366-374.

Los ejemplos específicos de algunos oligonucleótidos contemplados por la presente descripción incluyen los que comprenden estructuras principales modificadas como, por ejemplo, fosforotioatos, fosfotriésteres, metilfosfonatos, uniones entre azúcares de alquilo o cicloalquilo de cadena corta o uniones entre azúcares heteroatómicas o heterocíclicas de cadena corta. Los más preferidos son oligonucleótidos con estructuras principales de fosforotioato y con estructuras principales de heteroátomos, en particular estructuras principales de CH₂-NH-O-CH₂, CH-N(CH₃)-O-CH₂ [conocido como estructura principal de metileno(metilimino) o MMI], CH₂-O-N(CH₃)-CH₂, CH₂-N(CH₃)-N(CH₃)-CH₂ y O-N(CH₃)-CH₂-CH₂, donde la estructura principal de fosfodiéster natural se representa como O-P-O-CH₂. También se prefieren las estructuras principales de amida divulgadas por De Mesmaeker y col. (1995) Acc. Chem. Res. 28:366-374. Además hay oligonucleótidos que tienen estructuras principales de morfolino (Summerton y Weller, patente de EE.UU. nº 5.034.506). En otros aspectos, tales como la estructura principal de ácido nucleico peptídico (PNA), la estructura principal de fosfodiéster del oligonucleótido está sustituida por una estructura principal de poliamida, estando los nucleótidos unidos directa o indirectamente a los átomos de nitrógeno aza de la estructura principal de poliamida. Los oligonucleótidos preferidos pueden comprender también una o más fracciones de azúcares sustituidas. Los oligonucleótidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': OH, SH, SCH₃, F, OCN, OCH₃OCH₃, OCH₃O(CH₂)_nCH₃, O(CH₂)_nNH₂ u O(CH₂)_nCH₃ donde n es de 1 a aproximadamente 10; alquilo inferior, alcoxiinferior, alquilo inferior sustituido, alcarilo o aralquilo en C1-C10; Cl; Br; CN; CF₃; OCF₃; O-, S- o N-alquilo; O-, S- o N-alqueno; SOCH₃; SO₂CH₃; ONO₂; NO₂; N₃; NH₂; heterocicloalquilo; heterocicloalcarilo; aminoalquilamino; polialquilamino; sililo sustituido; un grupo de escisión de ARN; un grupo reportero; un intercalador; un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido; o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un oligonucleótido y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. Una modificación incluye 2'-metoxietoxi[2'-O-CH₂-CH₂-OCH₃, también conocido como 2'-O-(2'-metoxietil)]. Otras modificaciones incluyen 2'-metoxi(2'-O-CH₃), 2'-propoxi(2'-O-CH₂CH₂CH₃) y 2'-fluoro (2'-F). Pueden realizarse también modificaciones similares en otras posiciones en el oligonucleótido, en particular en la posición 3' del azúcar en el nucleótido en el extremo 3' y en la posición 5' del nucleótido en el extremo 5'. Los oligonucleótidos pueden tener también azúcares miméticos tales como ciclobutilos en lugar del grupo pentofuranosilo.

Los oligonucleótidos pueden incluir también, de forma adicional o alternativa, modificaciones o sustituciones de nucleobases (a menudo referida en la técnica simplemente como "bases"). Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, los nucleótidos "no modificados" o "naturales" incluyen adenina (A), guanina (G), timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Los nucleótidos modificados incluyen nucleótidos presentes de manera infrecuente o transitoria en los ácidos nucleicos naturales como, por ejemplo, hipoxantina, 6-metiladenina, 5-Me-pirimidinas, en particular 5-metilcitosina (también referida como 5-metil-2'-desoxicitosina y referida a menudo en la técnica como 5-Me-C), 5-

hidroximetilcitosina (HMC), glucosilo HMC y gentobiosilo HMC, así como nucleótidos sintéticos como, por ejemplo, 2-aminoadenina, 2-(metilamino)adenina, 2-(imidazolilalquil)adenina, 2-(aminoalquilamino)adenina u otras alquiladeninas heterosustituidas, 2-tiouracilo, 2-tiotimina, 5-bromouracilo, 5-hidroximetiluracilo, 8-azaguanina, 7-deazaguanina, N6(6-aminohehexil)adenina y 2,6-diaminopurina. Puede incluirse una base "universal" conocida en la técnica como, por ejemplo, inosina. Se ha mostrado que las sustituciones 5-Me-C aumentan la estabilidad de los dúplex de ácidos nucleicos en 0,6-1,2°C (Sanghvi, Y. S., en Crooke, S. T. y Lebleu, B., eds., *Antisense Research and Applications*, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278) y en la actualidad son sustituciones de bases.

Otra modificación de los oligonucleótidos de la descripción implica la unión química con el oligonucleótido de una o más fracciones o conjugados que mejoran la actividad o la captación celular del oligonucleótido. Dichas fracciones incluyen pero no se limitan a fracciones de lípidos tales como una fracción de colesterol, una fracción de colesterilo, un tioéter, por ejemplo, hexil-S-tritiltiol, tiocolesterol, una cadena alifática, por ejemplo, restos de dodecanodiol o undecilo, un fosfolípido, por ejemplo, di-hexadecilrac-glicerol o trietilamonio 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicerol-3-H-fosfonato, una poliamina o una cadena de polietilenglicol, o ácido acético adamantano. Los oligonucleótidos que comprenden fracciones lipófilas, así como los procedimientos para preparar dichos oligonucleótidos son conocidos en la técnica, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. nº 5.138.045, 5.218.105 y 5.459.255.

No es necesario que todas las posiciones de un oligonucleótido dado se modifiquen de manera uniforme, y de hecho puede incorporarse más de una de las modificaciones mencionadas anteriormente en un único oligonucleótido o incluso dentro de un único nucleósido en un oligonucleótido. La presente descripción incluye también oligonucleótidos que son oligonucleótidos quiméricos tal como se define en el presente documento.

En otro aspecto, la molécula de ácido nucleico de la presente descripción se conjuga con otra fracción que incluye pero no se limita a nucleótidos abásicos, poliéter, poliamina, poliamidas, péptidos, hidratos de carbono, lípidos o compuestos de polihidrocarburos. Los expertos en la materia reconocerán que estas moléculas pueden estar unidas con uno o más de nucleótidos que comprenden la molécula de ácido nucleico en varias posiciones en el azúcar, base o grupo fosfato.

Los oligonucleótidos usados de acuerdo con la presente descripción pueden prepararse de forma conveniente y rutinaria a través de la técnica bien conocida de síntesis en fase sólida. El equipo para dicha síntesis es comercializado por varios fabricantes, entre ellos Applied Biosystems. Puede emplearse también cualquier otro medio para dicha síntesis; la síntesis real de los oligonucleótidos se encuentra dentro de las capacidades de un experto en la materia. También es bien conocido el uso de técnicas similares para preparar otros oligonucleótidos tales como los fosforotioatos y los derivados de alquilo. Se conoce también suficientemente el uso de técnicas similares y productos de amiditas modificadas y vidrio de poro controlado (CPG) disponibles comercialmente tales como amiditas modificadas con biotina, fluoresceína, acridina o psoraleno y/o CPG (disponible en Glen Research, Sterling VA) para sintetizar oligonucleótidos marcados por fluorescencia biotinilados u otros modificados tales como oligonucleótidos modificados con colesterol.

De acuerdo con la descripción, el uso de modificaciones tal como el uso de monómeros LNA mejoran la potencia, la especificidad y la duración de acción y ensanchan las vías de administración de oligonucleótidos formados por productos químicos actuales como MOE, ANA, FANA, PS, etc. Esto puede conseguirse sustituyendo algunos de los monómeros en los oligonucleótidos actuales por monómeros LNA. El oligonucleótido modificado por LNA puede tener un tamaño similar al compuesto original o puede ser mayor o preferentemente menor. Así, los oligonucleótidos modificados LNA contienen menos de aproximadamente el 70%, más preferentemente menos de aproximadamente el 60%, con la máxima preferencia menos de aproximadamente el 50% de monómeros LNA y sus tamaños están entre aproximadamente 5 y 25 nucleótidos, más preferentemente entre aproximadamente 12 y 20 nucleótidos.

Las estructuras principales de oligonucleótidos modificadas comprenden, pero no se limitan a, fosforotioatos, fosforotioatos quirales, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, fosfonatos de metilo y otros alquilos que comprenden fosfonatos de 3'-alquileo y fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidatos que comprenden 3'-amino-fosforamidato y aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionalquilfosfonatos, tionalquilfosfotriésteres y boranofosfatos que tienen uniones 3'-5' normales, análogos de los mismos ligados en 2'-5' y aquellos que tienen polaridad invertida de los pares adyacentes de unidades de nucleósidos se unen 3'-5' a 5'-3' o 2'-5' a 5'-2'. También se incluyen diversas sales, sales mixtas y formas de ácidos libres.

Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de las uniones que contienen fósforo anteriores comprenden, pero no se limitan a, las patentes de EE.UU. nº 3.687.808; 4.469.863; 4.476.301; 5.023.243; 5.177.196; 5.188.897; 5.264.423; 5.276.019; 5.278.302; 5.286.717; 5.321.131; 5.399.676; 5.405.939; 5.453.496;

5.455.233; 5.466.677; 5.476.925; 5.519.126; 5.536.821; 5.541.306; 5.550.111; 5.563.253; 5.571.799; 5.587.361; y 5.625.050.

Las estructuras principales de oligonucleótidos modificadas que no incluyen un átomo de fósforo poseen estructuras principales que están formadas por uniones internucleosídicas de alquilo o cicloalquilo de cadena corta, uniones internucleosídicas mixtas de heteroátomos y alquilo o cicloalquilo, o una o más uniones internucleosídicas heteroatómicas o heterocíclicas de cadena corta. Comprenden aquellas que tienen uniones morfolino (formadas en parte a partir de la porción de azúcar de un nucleósido); estructuras principales de siloxano; estructuras principales de sulfuro, sulfóxido y sulfona; estructuras principales de formaceto y tioformaceto; estructuras principales de formaceto y tioformaceto de metileno; estructuras principales que contienen alqueno; estructuras principales de sulfamato; estructuras principales de metilimino y metilhidracino; estructuras principales de sulfonato y sulfonamida; estructuras principales de amida; y otras que tienen partes componentes de N, O, S y CH₂ mezcladas.

Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de los oligonucleósidos anteriores comprenden, pero no se limitan a, las patentes de EE.UU. nº 5.034.506; 5.166.315; 5.185.444; 5.214.134; 5.216.141; 5.235.033; 5.264.562; 5.264.564; 5.405.938; 5.434.257; 5.466.677; 5.470.967; 5.489.677; 5.541.307; 5.561.225; 5.596.086; 5.602.240; 5.610.289; 5.602.240; 5.608.046; 5.610.289; 5.618.704; 5.623.070; 5.663.312; 5.633.360; 5.677.437; y 5.677.439.

En otros miméticos de oligonucleótidos, tanto el azúcar como la unión internucleosídica, es decir, la estructura principal, de las unidades de nucleótidos están sustituidas por grupos nuevos. Las unidades de base se mantienen para la hibridación con un compuesto diana de ácidos nucleicos apropiado. Uno de estos compuestos oligoméricos, un oligonucleótido mimético que ha demostrado tener excelentes propiedades de hibridación, se refiere como ácido nucleico peptídico (PNA). En los compuestos PNA, la estructura principal de azúcar de un oligonucleótido es sustituida por una estructura principal que contiene en particular una estructura principal de aminoetilglicina. Las nucleobases se conservan y se unen directa o indirectamente a átomos de nitrógeno aza de la porción amida de la estructura principal. Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de compuestos PNA comprenden, pero no se limitan a, las patentes de EE.UU. nº 5.539.082; 5.714.331; y 5.719.262. También puede encontrarse la enseñanza de compuestos PNA en Nielsen, y col. (1991) Science 254,1497-1500.

En otro aspecto de la descripción los oligonucleótidos con estructuras principales de fosfortioato y oligonucleósidos con estructuras principales de heteroátomo, y en particular -CH₂-NH-O-CH₂-, -CH₂-N(CH₃)-O-CH₂- conocida como estructura principal de metileno (metilimino) o MMI, -CH₂-O-N(CH₃)-CH₂-, -CH₂N(CH₃)-N(CH₃)CH₂- y -O-N(CH₃)-CH₂-CH₂- donde la estructura principal de fosfoéster natural se representa como -O-P-O-CH₂- de la patente de EE.UU. de referencia anterior nº 5.489.677, y las estructuras principales de amida de la patente de EE.UU. de referencia anterior nº 5.602.240. También hay oligonucleótidos que tienen estructuras principales de morfolino de la patente de EE.UU. de referencia anterior nº 5.034.506.

Los oligonucleótidos modificados pueden contener también una o más fracciones de azúcares sustituidas. Los oligonucleótidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': OH; F; O-, S- o N-alquilo; O-, S- o N-alqueno; O-, S- o N-alquilo; o O-alquil-O-alquilo, donde el alquilo, el alqueno y el alquilo pueden estar sustituidos en C por CO alquilo o en C2 por CO alqueno y alquilo. En particular son O(CH₂)_nOmCH₃, O(CH₂)_nOCH₃, O(CH₂)_nNH₂, O(CH₂)_nCH₃, O(CH₂)_nONH₂ y O(CH₂)_nON(CH₂)_nCH₃)₂ donde n y m pueden ser de 1 a aproximadamente 10. Otros oligonucleótidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': C por CO, (alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, alcarilo, aralquilo, O-alcarilo o O-aralquilo, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, polialquilamino, sililo sustituido, un grupo de escisión de ARN, un grupo reportero, un intercalador, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un oligonucleótido, y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. Una modificación comprende 2'-metoxietoxi (2'-OCH₂CH₂OCH₃, también conocido como 2'-O-(2-metoxietil) o 2'-MOE), es decir, un grupo alcoxialcoxi. Una modificación adicional comprende 2'-dimetilaminooxietoxi, es decir, un grupo O(CH₂)₂ON(CH₃)₂, también conocido como 2'-DMAOE, tal como se describe en los ejemplos en la presente memoria descriptiva mostrados más adelante, y 2'-dimetilaminoetoxietoxi (también conocido en la técnica como 2'-O-dimetilaminoetoxietil o 2'-DMAEOE), es decir, 2'-O-CH₂-O-CH₂-N(CH₂)₂.

Otras modificaciones comprenden 2'-metoxi (2'-OCH₃), 2'-aminopropoxi (2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂) y 2'-fluoro (2'-F). Pueden prepararse también modificaciones similares en otras posiciones en el oligonucleótido, en particular la posición 3' del azúcar en el nucleótido del extremo 3' o en oligonucleótidos ligados en 2'-5' y en la posición 5' de nucleótido del extremo 5'. Los oligonucleótidos pueden tener también miméticos de azúcar tales como fracciones de

ciclobutilo en lugar del azúcar pentofuranosilo. Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de dichas estructuras de azúcar modificadas comprenden, pero no se limitan a, las patentes de EE.UU. nº 4.981.957; 5.118.800; 5.319.080; 5.359.044; 5.393.878; 5.446.137; 5.466.786; 5.514.785; 5.519.134; 5.567.811; 5.576.427; 5.591.722; 5.597.909; 5.610.300; 5.627.053; 5.639.873; 5.646.265; 5.658.873; 5.670.633; y 5.700.920.

5

Los oligonucleótidos pueden comprender también modificaciones o sustituciones de nucleobases (referidas a menudo en la técnica simplemente como "bases"). Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, los nucleótidos "no modificados" o "naturales" comprenden las bases purínicas adenina (A) y guanina (G), y las bases pirimidínicas timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Los nucleótidos modificados comprenden otros nucleótidos sintéticos y naturales tales como 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetilcitosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-propilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracilo y citosina, 5-propiniluracilo y citosina, 6-azouracilo, citosina y timina, 5-uracilo (seudo-uracilo), 4-tiouracilo, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo y otras adeninas y guaninas sustituidas en 8, 5-halo en particular 5-bromo, 5-trifluorometilo y otros uracilos y citosinas sustituidos en 5,7-metilguanina y 7-metiladenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-deazaguanina y 7-deazaadenina y 3-deazaguanina y 3-deazaadenina.

Además, los nucleótidos comprenden los divulgados en la patente de Estados Unidos nº 3.687.808, los divulgados en 'The Concise Encyclopedia of Polymer Science and Engineering', páginas 858-859, Kroschwitz, J.I., ed. John Wiley & Sons, 1990, los divulgados por Englisch y col., 'Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, página 613, y los divulgados por Sanghvi, Y.S., capítulo 15, 'Antisense Research and Applications', páginas 289-302, Crooke, S.T. y Lebleu, B. ea., CRC Press, 1993. Algunos de estos nucleótidos son especialmente útiles para aumentar la afinidad de unión de los compuestos oligoméricos de la descripción. Éstos comprenden pirimidinas sustituidas en 5,6-azapirimidinas y purinas sustituidas en N-2, N-6 y O-6, que comprenden 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. Las sustituciones de 5-metilcitosina han mostrado que aumentan la estabilidad del dúplex de ácidos nucleicos en 0,6-1,2°C (Sanghvi, Y.S., Crooke, S.T. y Lebleu, B., eds, 'Antisense Research and Applications', CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278) y en la actualidad son sustituciones de bases preferidas, todavía más en particular cuando se combinan con modificaciones de azúcares de 2'-O-metoxietilo.

Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de los nucleótidos modificados indicados anteriormente así como otros nucleótidos modificados comprenden, pero no se limitan a, las patentes de EE.UU. nº 3.687.808, así como 4.845.205; 5.130.302; 5.134.066; 5.175.273; 5.367.066; 5.432.272; 5.457.187; 5.459.255; 5.484.908; 5.502.177; 5.525.711; 5.552.540; 5.587.469; 5.596.091; 5.614.617; 5.750.692, y 5.681.941.

Otra modificación de los oligonucleótidos de la descripción implica la unión química con el oligonucleótido una o más fracciones o conjugados, que mejoran la actividad, la distribución celular o la captación celular del oligonucleótido.

Dichas fracciones comprenden pero no se limitan a, fracciones de lípidos tales como una fracción de colesterol, ácido cólico, un tioéter, por ejemplo, hexil-S-tritilol, un tiocolesterol, una cadena alifática, por ejemplo, restos de dodecanodiol o undecilo, un fosfolípido, por ejemplo, di-hexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato de trietilamonio, una poliamina o una cadena de polietilenglicol, o ácido acético adamantano, una fracción de palmitilo, o una fracción de octadecilamina o hexilamino-carbonil-t-oxicoesterol.

Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de dichos oligonucleótidos conjugados comprenden, pero no se limitan a, las patentes de EE.UU. nº 4.828.979; 4.948.882; 5.218.105; 5.525.465; 5.541.313; 5.545.730; 5.552.538; 5.578.717; 5.580.731; 5.580.731; 5.591.584; 5.109.124; 5.118.802; 5.138.045; 5.414.077; 5.486.603; 5.512.439; 5.578.718; 5.608.046; 4.587.044; 4.605.735; 4.667.025; 4.762.779; 4.789.737; 4.824.941; 4.835.263; 4.876.335; 4.904.582; 4.958.013; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.245.022; 5.254.469; 5.258.506; 5.262.536; 5.272.250; 5.292.873; 5.317.098; 5.371.241; 5.391.723; 5.416.203; 5.451.463; 5.510.475; 5.512.667; 5.514.785; 5.565.552; 5.567.810; 5.574.142; 5.585.481; 5.587.371; 5.595.726; 5.597.696; 5.599.923; 5.599.928 y 5.688.941.

Descubrimiento de fármacos: Los compuestos de la presente descripción también pueden aplicarse en las áreas de descubrimiento de fármacos y validación de dianas. La presente descripción comprende el uso de los compuestos y segmentos diana identificados en la presente memoria descriptiva en esfuerzos de descubrimiento de fármacos para determinar las relaciones que existen entre un polinucleótido del gen de la insulina (INS) y un estado patológico, fenotipo o enfermedad. Estos procedimientos incluyen la detección o modulación de un polinucleótido del gen de la insulina (INS) que comprende la puesta en contacto de una muestra, tejido, célula u organismo con los compuestos de la presente descripción, la medida del nivel de ácidos nucleicos o proteínas de un polinucleótido del gen de la

insulina (INS) y/o un criterio de valoración fenotípico o químico relacionado en algún momento después del tratamiento, y opcionalmente la comparación del valor medido con una muestra no tratada o una muestra tratada con un compuesto adicional de la descripción. Estos procedimientos también pueden realizarse en paralelo o en combinación con otros experimentos para determinar la función de genes desconocidos para el proceso de validación de diana o para determinar la validez de un producto génico en particular como diana para el tratamiento o prevención de una enfermedad, afección o fenotipo determinados.

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

10 La transferencia de un ácido nucleico exógeno en una célula u organismo hospedador puede valorarse mediante la detección directa de la presencia del ácido nucleico en la célula u organismo. Dicha detección puede conseguirse por varios procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la presencia del ácido nucleico exógeno puede detectarse mediante Southern blot o por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando cebadores que amplifican específicamente secuencias de nucleótidos asociadas con el ácido nucleico. La expresión de los ácidos nucleicos exógenos también puede medirse usando procedimientos convencionales que incluyen análisis de expresión génica. Por ejemplo, el ARNm producido a partir de un ácido nucleico exógeno puede ser detectado y cuantificado mediante Northern blot y PCR de transcripción inversa (RT-PCR).

La expresión de ARN a partir del ácido nucleico exógeno también puede detectarse midiendo una actividad enzimática o una actividad de proteína reportera. Por ejemplo, la actividad de modulación antisentido puede medirse indirectamente como una disminución o un aumento en la expresión del ácido nucleico diana a modo de una indicación de que el ácido nucleico exógeno produce el ARN efector. Basándose en la conservación de secuencias, los cebadores pueden diseñarse y usarse de manera que amplifiquen regiones codificantes de los genes diana. Inicialmente, la región codificante de máxima expresión de cada gen puede usarse para construir un gen de control modelo, aunque puede usarse cualquier región codificante o no codificante. Cada gen de control se ensambla mediante la inserción de cada región codificante entre una región codificante reportera y su señal poli(A). Estos plásmidos producirían un ARNm con un gen reportero en la parte en dirección 5' del gen y un ARNi diana potencial en la región no codificante de 3'. La efectividad de los oligonucleótidos antisentido individuales se sometería a ensayo mediante modulación del gen reportero. Los genes reporteros útiles en los procedimientos de la presente descripción incluyen acetohidroxiácido-sintasa (AHAS), fosfatasa alcalina (AP), beta-galactosidasa (LacZ), beta-glucuronidasa (GUS), cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), proteína fluorescente verde (GFP), proteína fluorescente roja (RFP), proteína fluorescente amarilla (YFP), proteína fluorescente cian (CFP), peroxidasa de rábano picante (HRP), luciferasa (Luc), nopalina-sintasa (NOS), octopina-sintasa (OCS), y derivados de los mismos. Existen múltiples marcadores seleccionables que confieren resistencia a la ampicilina, la bleomicina, el cloranfenicol, la gentamicina, la higromicina, la kanamicina, la lincomicina, el metotrexato, la fosfotricina, la puromicina y la tetraciclina. Los procedimientos para determinar la modulación de un gen reportero son bien conocidos en la técnica, e incluyen, pero no se limitan a, procedimientos fluorométricos (por ejemplo, espectroscopia por fluorescencia, clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), microscopia de fluorescencia) y determinación de la resistencia a antibióticos.

La expresión de proteínas INS y ARNm puede someterse a ensayo usando procedimientos conocidos para los expertos en la materia y descritos en otra parte en la presente memoria descriptiva. Por ejemplo, pueden usarse inmunoensayos como ELISA para medir los niveles de proteínas. Existen anticuerpos del gen de la insulina (INS) para ELISA disponibles comercialmente, por ejemplo, en R&D Systems (Minneapolis, MN), Abcam (Cambridge, MA).

En algunos aspectos, se evalúa la expresión de INS (por ejemplo, ARNm o proteínas) en una muestra (por ejemplo, células o tejidos *in vivo* o *in vitro*) tratada usando un oligonucleótido antisentido de la descripción por comparación con la expresión del gen de la insulina (INS) en una muestra de control. Por ejemplo, la expresión de la proteína o el ácido nucleico puede compararse usando procedimientos conocidos para los expertos en la materia con el de una muestra tratada en simulación o no tratada. Alternativamente, la comparación con una muestra tratada con un oligonucleótido antisentido de control (por ejemplo, uno que tiene una secuencia alterada o diferente) puede realizarse dependiendo de la información que se desee. En otro aspecto, puede compararse una diferencia en la expresión de la proteína o el ácido nucleico del gen de la insulina (INS) en una muestra tratada con respecto a una muestra no tratada con la diferencia en la expresión de un ácido nucleico diferente (que incluye cualquier patrón que el investigador considere adecuado, por ejemplo, un gen constitutivo) en una muestra tratada con respecto a una muestra no tratada.

Las diferencias observadas pueden expresarse según se desee, por ejemplo, en forma de una proporción o fracción, para su uso en una comparación con un control. En algunos aspectos, el nivel de un ARNm o proteína del gen de la

insulina (INS), en una muestra tratada con un oligonucleótido antisentido de la presente descripción, se incrementa o se reduce en de aproximadamente 1,25 veces a aproximadamente 10 veces o más con respecto a una muestra no tratada o una muestra tratada con un ácido nucleico de control. En algunos aspectos, el nivel de un ARNm o proteína del gen de la insulina (INS) aumenta o disminuye en al menos aproximadamente 1,25 veces, al menos 5 aproximadamente 1,3 veces, al menos aproximadamente 1,4 veces, al menos aproximadamente 1,5 veces, al menos aproximadamente 1,6 veces, al menos aproximadamente 1,7 veces, al menos aproximadamente 1,8 veces, al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 2,5 veces, al menos aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 3,5 veces, al menos aproximadamente 4 veces, al menos aproximadamente 4,5 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 5,5 veces, al menos aproximadamente 6 veces, al menos aproximadamente 6,5 veces, al menos aproximadamente 7 veces, al menos aproximadamente 7,5 veces, al menos aproximadamente 8 veces, al menos aproximadamente 8,5 veces, al menos aproximadamente 9 veces, al menos aproximadamente 9,5 veces, o al menos aproximadamente 10 veces o más.

Kits, reactivos de investigación, diagnóstico y productos terapéuticos

15 Los compuestos de la presente descripción pueden usarse para diagnóstico, tratamientos y profilaxis, y como reactivos de investigación y componentes de kits. Además, los oligonucleótidos antisentido, que son capaces de inhibir la expresión génica con especificidad exquisita, son usados a menudo por los expertos en la materia para determinar la función de genes concretos o para distinguir entre las funciones de diversos miembros de una vía biológica.

20 Para su uso en kits y en diagnósticos y en diversos sistemas biológicos, los compuestos de la presente descripción, ya sea en solitario o en combinación con otros compuestos o productos terapéuticos, son útiles como herramientas y/o análisis de combinatoria para determinar los patrones de expresión de una parte o del complemento completo de los genes expresados en las células y los tejidos.

Tal como se usa en la presente memoria descriptiva el término "sistema biológico" o "sistema" se define como cualquier organismo, célula, cultivo celular o tejido que expresa, o se hace competente para expresar productos del gen de la insulina (INS). Estos productos incluyen, pero no se limitan a, seres humanos, animales transgénicos, 30 células, cultivos celulares, tejidos, xenoinjertos, trasplantes y combinaciones de los mismos.

A modo de ejemplo no limitativo, los patrones de expresión en las células o tejidos tratados con uno o más compuestos antisentido se comparan con las células o tejidos de control no tratados con compuestos antisentido y los patrones producidos se analizan para conocer los niveles diferenciales de expresión génica cuando 35 corresponden, por ejemplo, a asociación con enfermedad, vías de señalización, localización celular, nivel de expresión, tamaño, estructura o función de los genes examinados. Estos análisis pueden realizarse en células simuladas o no simuladas y en presencia o ausencia de otros compuestos que afectan a los patrones de expresión.

Los ejemplos de procedimientos de análisis de expresión génica conocidos en la técnica incluyen matrices o micromatrices de ADN (Brazma y Vilo, (2000) FEBS Lett., 480, 17-24; Celis, y col., (2000) FEBS Lett., 480, 2-16), SAGE (análisis en serie de expresión génica) (Madden, y col., (2000) Drug Discov. Today, 5, 415-425), READS (amplificación de enzimas de restricción de ADN digeridos) (Prashar y Weissman, (1999) Methods Enzymol., 303, 258-72), TOGA (análisis de expresión génica total) (Sutcliffe, y col., (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 97, 1976-81), matrices de proteínas y proteómica (Celis, y col., (2000) FEBS Lett., 480, 2-16; Jungblut, y col., Electrophoresis, 45 1999, 20, 2100-10), secuenciación de etiquetas de secuencias expresadas (EST) (Celis, y col., FEBS Lett., 2000, 480, 2-16; Larsson, y col., J. Biotechnol., 2000, 80, 143-57), huella digital de ARN sustractivo (SuRF) (Fuchs, y col., (2000) Anal. Biochem. 286, 91-98; Larson, y col., (2000) Cytometry 41, 203-208), clonación sustractiva, visualización diferencial (DD) (Jurecic y Belmont, (2000) Curr. Opin. Microbiol. 3, 316-21), hibridación genómica comparativa (Carulli, y col., (1998) J. Cell Biochem. Suppl., 31, 286-96), técnicas FISH (hibridación fluorescente *in situ*) (Going y 50 Gusterson, (1999) Eur. J. Cancer, 35, 1895-904) y procedimientos de espectrometría de masas (To, Comb. (2000) Chem. High Throughput Screen, 3,235-41).

Los compuestos de la descripción son útiles para investigación y diagnóstico, dado que estos compuestos se hibridan con ácidos nucleicos que codifican un gen de la insulina (INS). Por ejemplo, los oligonucleótidos que se 55 hibridan con esta eficiencia y en las condiciones tal como se divulga en la presente memoria descriptiva como para ser moduladores efectivos del gen de la insulina (INS) son cebadores o sondas efectivos en condiciones que favorecen la amplificación o la detección génica, respectivamente. Estos cebadores y sondas son útiles en procedimientos que requieren la detección específica de moléculas de ácidos nucleicos que codifican un gen de la insulina (INS) y en la amplificación de dichas moléculas de ácidos nucleicos para la detección o para su uso en

estudios adicionales de un gen de la insulina (INS). La hibridación de los oligonucleótidos antisentido, en particular los cebadores y las sondas, de la descripción con un ácido nucleico que codifica un gen de la insulina (INS) puede detectarse por medios conocidos en la técnica. Dichos medios pueden incluir conjugación de una enzima en el oligonucleótido, radiomarcado del oligonucleótido o cualquier otro medio de detección adecuado. Pueden prepararse también kits que usan dichos medios de detección para detectar el nivel de un gen de la insulina (INS) en una muestra.

La especificidad y la sensibilidad de compuestos antisentido también son manejadas por los expertos en la materia para usos terapéuticos. Los compuestos antisentido se han empleado como fracciones terapéuticas en el tratamiento de estados patológicos en animales, que incluyen los seres humanos. Se han administrado fármacos de oligonucleótidos antisentido de forma segura y efectiva en seres humanos y actualmente existen numerosos ensayos clínicos en curso. Se establece así que los compuestos antisentido pueden ser modalidades terapéuticas útiles que pueden configurarse para ser útiles en regímenes terapéuticos para el tratamiento de células, tejidos y animales, especialmente seres humanos.

Para fines terapéuticos, un animal, preferentemente un ser humano, del que se sospecha que tiene una enfermedad o trastorno que puede tratarse mediante la modulación de la expresión de un polinucleótido del gen de la insulina (INS), se trata con la administración de compuestos antisentido de acuerdo con la presente descripción. Por ejemplo, en un aspecto no limitativo, los procedimientos comprenden la etapa de administrar al animal necesitado de tratamiento una cantidad terapéuticamente efectiva de un modulador del gen de la insulina (INS). Los moduladores del gen de la insulina (INS) de la presente descripción modulan de manera efectiva la actividad de un gen de la insulina (INS) o modulan la expresión de una proteína del gen de la insulina (INS). En un aspecto, la actividad o expresión de un gen de la insulina (INS) en un animal es inhibida por aproximadamente el 10% en comparación con un control. Preferentemente, la actividad o expresión de un gen de la insulina (INS) en un animal se inhibe aproximadamente en el 30%. Más preferentemente, la actividad o expresión de un gen de la insulina (INS) en un animal se inhibe en el 50% o más. Así, los compuestos oligoméricos modulan la expresión de un ARNm del gen de la insulina (INS) en al menos el 10%, al menos el 50%, al menos el 25%, al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 98%, al menos el 99% o en el 100% en comparación con un control.

En un aspecto, la actividad o expresión de un gen de la insulina (INS) y/o en un animal se incrementa en aproximadamente el 10% en comparación con un control. Preferentemente, la actividad o expresión de un gen de la insulina (INS) en un animal se incrementa en aproximadamente el 30%. Más preferentemente, la actividad o expresión de un gen de la insulina (INS) en un animal se incrementa en el 50% o más. Así, los compuestos oligoméricos modulan la expresión de un gen de la insulina (INS) de ARNm en al menos el 10%, al menos el 50%, al menos el 25%, al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 98%, al menos el 99%, o en el 100% en comparación con un control.

Por ejemplo, la reducción de la expresión de un gen de la insulina (INS) puede medirse en suero, sangre, tejido adiposo, hígado o cualquier otro cuerpo líquido, tejido u órgano del animal. Preferentemente, las células contenidas en dichos líquidos, tejidos u órganos en análisis contienen una molécula de ácido nucleico que codifica péptidos del gen de la insulina (INS) y/o las proteínas del gen de la insulina (INS) en sí.

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

Conjugados: Otra modificación de los oligonucleótidos de la descripción implica la unión química al oligonucleótido de una o más fracciones o conjugados que mejoran la actividad, la distribución celular o la captación celular del oligonucleótido. Estas fracciones o conjugados pueden incluir grupos conjugados unidos de forma covalente a grupos funcionales tales como grupos hidroxilo primarios o secundarios. Los grupos conjugados de la descripción incluyen intercaladores, moléculas reporteras, poliaminas, poliamidas, polietilenglicoles, poliéteres, grupos que mejoran las propiedades farmacodinámicas de los oligómeros y grupos que mejoran las propiedades farmacocinéticas de los oligómeros. Los grupos conjugados típicos incluyen colesterolos, lípidos, fosfolípidos, biotina, fenacina, folato, fenantridina, antraquinona, acridina, fluoresceínas, rodaminas, cumarinas y colorantes. Los grupos que mejoran las propiedades farmacodinámicas, en el contexto de la presente descripción, incluyen grupos que mejoran la captación, mejoran la resistencia a la degradación y/o refuerzan la hibridación específica de secuencias con el ácido nucleico diana. Los grupos que mejoran las propiedades farmacocinéticas, en el contexto de

- la presente descripción, incluyen grupos que mejoran la captación, la distribución, el metabolismo o la excreción de los compuestos de la presente descripción. Se desvelan grupos conjugados representativos en la solicitud de patente internacional nº PCT/US92/09.196, presentada el 23 de octubre de 1992, y la patente de EE.UU. nº 6.287.860. Las fracciones conjugadas incluyen, pero no se limitan a, fracciones lipídicas tales como una fracción de
- 5 colesterol, ácido cólico, un tioéter, por ejemplo, hexil-5-tritilol, un tiocolesterol, una cadena alifática, por ejemplo, restos de dodecanodiol o undecilo, un fosfolípido, por ejemplo, di-hexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato de trietilamonio, una poliamina o una cadena de polietilenglicol, o ácido acético adamantano, una fracción de palmitilo, o una fracción de octadecilamina o hexilamino-carbonil-oxicolesterol. Los oligonucleótidos de la descripción pueden también conjugarse con sustancias farmacológicas activas, por ejemplo, aspirina,
- 10 warfarina, fenilbutazona, ibuprofeno, suprofen, fenbufeno, cetoprofeno, (S)-(+)-pranoprofeno, carprofeno, dansilsarcosina, ácido 2,3,5-triyodobenzoico, ácido flufenámico, ácido folínico, una benzotiadiazida, clorotiácida, una diacepina, indometicina, un barbitúrico, una cefalosporina, un fármaco sulfa, un antidiabético, un antibacteriano o un antibiótico.
- 15 Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de dichos oligonucleótidos conjugados incluyen, pero no se limitan a, las patentes de EE.UU. nº 4.828.979; 4.948.882; 5.218.105; 5.525.465; 5.541.313; 5.545.730; 5.552.538; 5.578.717. 5.580.731; 5.580.731; 5.591.584; 5.109.124; 5.118.802; 5.138.045; 5.414.077; 5.486.603; 5.512.439; 5.578.718; 5.608.046; 4.587.044; 4.605.735; 4.667.025; 4.762.779; 4.789.737; 4.824.941; 4.835.263; 4.876.335; 4.904.582; 4.958.013; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136;
- 20 5.245.022; 5.254.469; 5.258.506; 5.262.536; 5.272.250; 5.292.873; 5.317.098; 5.371.241. 5.391.723; 5.416.203, 5.451.463; 5.510.475; 5.512.667; 5.514.785; 5.565.552; 5.567.810; 5.574.142; 5.585.481; 5.587.371; 5.595.726; 5.597.696; 5.599.923; 5.599.928 y 5.688.941.

- Formulaciones:* Los compuestos de la descripción pueden también mezclarse, encapsularse, conjugarse o asociarse
- 25 por otros medios con otras moléculas, estructuras moleculares o mezclas de compuestos, como, por ejemplo, liposomas, moléculas dirigidas a receptores, formulaciones orales, rectales, tópicas u otras, para ayudar a la captación, distribución y/o absorción. Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de dichas formulaciones de ayuda a la captación, distribución y/o absorción incluyen, pero no se limitan a, las patentes de EE.UU. nº 5.108.921; 5.354.844; 5.416.016; 5.459.127; 5.521.291; 5.543.165; 5.547.932; 5.583.020;
- 30 5.591.721; 4.426.330; 4.534.899; 5.013.556; 5.108.921; 5.213.804; 5.227.170; 5.264.221; 5.356.633; 5.395.619; 5.416.016; 5.417.978; 5.462.854; 5.469.854; 5.512.295; 5.527.528; 5.534.259; 5.543.152; 5.556.948; 5.580.575; y 5.595.756.

- Aunque los oligonucleótidos antisentido no necesitan ser administrados en el contexto de un vector con el fin de
- 35 modular una expresión y/o función diana, los aspectos de la descripción se refieren a construcciones de vectores de expresión para la expresión de oligonucleótidos antisentido, que comprenden promotores, secuencias de genes de promotores híbridos y poseen una intensa actividad de promotores constitutivos, o una actividad de promotores que pueden ser inducidos en el caso deseado.

- 40 En un aspecto, la práctica de la descripción implica la administración de al menos uno de los oligonucleótidos antisentido precedentes con un sistema de administración adecuado de ácidos nucleicos. En un aspecto, ese sistema incluye un vector no vírico unido de forma operativa al polinucleótido. Los ejemplos de dichos vectores no víricos incluyen el oligonucleótido en solitario (por ejemplo, una cualquiera o más de las SEQ ID NO: 4 a 11) o en combinación con una formulación adecuada de proteínas, polisacáridos o lípidos.

- 45 Los sistemas adecuados de suministro de ácidos nucleicos incluyen además vector vírico, normalmente una secuencia de al menos uno de entre un adenovirus, un virus asociado a adenovirus (AAV), un adenovirus dependiente de un cooperador, un retrovirus o un virus de hemaglutinina de complejo liposómico de Japón (HVJ). Preferentemente, el vector vírico comprende un promotor eucariota fuerte ligado operativamente al polinucleótido,
- 50 por ejemplo, un promotor de citomegalovirus (CMV).

- Los vectores incluyen además vectores víricos, proteínas de fusión y conjugados químicos. Los vectores retrovirales incluyen virus de la leucemia murina de Moloney y virus basados en VIH. Un vector vírico basado en VIH comprende
- 55 al menos dos vectores donde los genes gag y pol corresponden a un genoma de VIH y el gen env corresponde a otro virus. Se prefieren los vectores víricos de ADN. Estos vectores incluyen vectores pox tales como vectores ortopox o avipox, vectores de herpesvirus tales como vector del virus del herpes simple I (HSV), vectores de adenovirus y vectores de virus asociados a adenovirus).

Los compuestos antisentido de la descripción comprenden cualquier sal, éster o sal de dichos ésteres

farmacéuticamente aceptables, o cualquier otro compuesto que, tras la administración a un animal, que incluye un ser humano, es capaz de proporcionar (directa o indirectamente) el metabolito o resto biológicamente activo del mismo.

- 5 El término "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales fisiológica y farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la descripción: es decir, sales que conservan la actividad biológica deseada del compuesto de origen y no imparten efectos toxicológicos no deseados al mismo. Para los oligonucleótidos, se describen ejemplos adicionales de sales farmacéuticamente aceptables y sus usos en la patente de EE.UU. n° 6.287.860.
- 10 La presente descripción incluye también composiciones farmacéuticas y formulaciones que incluyen los compuestos antisentido de la descripción. Las composiciones farmacéuticas de la presente descripción pueden administrarse en una serie de formas dependiendo del tratamiento local o sistémico que se desee y del área que se tratará. La administración puede ser tópica (incluida oftálmica y en membranas mucosas como en administración vaginal y rectal), pulmonar, por ejemplo, por inhalación o insuflado de polvos o aerosoles, que incluye con nebulizador;
- 15 intratraqueal, intranasal, epidérmica y transdérmica, oral o parenteral. La administración parenteral incluye inyección o infusión intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular; o intracraneal, por ejemplo, administración intratecal o intraventricular.

- Para el tratamiento de los tejidos en el sistema nervioso central, la administración puede realizarse, por ejemplo, por
- 20 inyección o infusión en el líquido cefalorraquídeo. La administración de ARN antisentido en el líquido cefalorraquídeo se describe, por ejemplo, en la solicitud de patente de EE.UU. publicación n° 2007/0.117.772, "Procedimientos para ralentizar la progresión de enfermedad de ELA familiar".

- Cuando se pretende que el oligonucleótido antisentido de la presente descripción sea administrado a las células en
- 25 el sistema nervioso central, la administración puede realizarse con uno o más agentes capaces de promover la penetración del oligonucleótido antisentido del sujeto a través de la barrera hematoencefálica. La inyección puede realizarse, por ejemplo, en la corteza entorrinal o en el hipocampo. El suministro de factores neurotróficos mediante la administración de un vector de adenovirus en las neuronas motoras en tejido muscular se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. n° 6.632.427, "Transferencia génica mediada por vectores de adenovirus en neuronas
- 30 motoras medulares". El suministro de vectores directamente en el encéfalo, por ejemplo, en el cuerpo estriado, el tálamo, el hipocampo o la sustancia negra, se conoce en la técnica y se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. n° 6.756.523, "Vectores de adenovirus para la transferencia de genes extraños en células del sistema nervioso central en particular en el encéfalo". La administración puede ser rápida, por ejemplo por inyección, o realizarse durante un periodo de tiempo, por ejemplo, por infusión lenta o administración de formulaciones de
- 35 liberación lenta.

- Los oligonucleótidos antisentido del sujeto pueden estar también ligados o conjugados con agentes que proporcionan propiedades farmacéuticas o farmacodinámicas. Por ejemplo, el oligonucleótido antisentido puede acoplarse con cualquier sustancia conocida en la técnica para promover la penetración o el transporte a través de la
- 40 barrera hematoencefálica, tal como un anticuerpo para el receptor de la transferrina, y administrarse mediante inyección intravenosa. El compuesto antisentido puede estar ligado con un vector vírico, por ejemplo, que hace el compuesto antisentido más efectivo y/o aumenta el transporte del compuesto antisentido a través de la barrera hematoencefálica. La disrupción osmótica de la barrera hematoencefálica también puede conseguirse, por ejemplo, por infusión de azúcares que incluyen, pero no se limitan a, mesoeritritol, xilitol, D(+) galactosa, D(+) lactosa, D(+)
- 45 xilosa, dulcitol, mioinositol, L(-) fructosa, D(-) manitol, D(+) glucosa, D(+) arabinosa, D(-) arabinosa, celobiosa, D(+) maltosa, D(+) rafinosa, L(+) ramnosa, D(+) melibiosa, D(-) ribosa, adonitol, D(+) arabitol, L(-) arabitol, D(+) fucosa, L(-) fucosa, D(-) lixosa, L(+) lixosa, y L(-) lixosa, o aminoácidos que incluyen, pero no se limitan a, glutamina, lisina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glicina, histidina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, tirosina, valina, y taurina. Los procedimientos y materiales para mejorar la penetración de la
- 50 barrera hematoencefálica se describen, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. n° 4.866.042, "Procedimiento para el suministro de material genético a través de la barrera hematoencefálica", n° 6.294.520, "Material para el paso a través de la barrera hematoencefálica" y n° 6.936.589, "Sistemas de suministro parenteral".

- Los compuestos antisentido del sujeto pueden mezclarse, encapsularse, conjugarse o asociarse por otros medios
- 55 con otras moléculas, estructuras moleculares o mezclas de compuestos, por ejemplo, liposomas, moléculas dirigidas a receptores, formulaciones orales, rectales, tópicas u otras, para ayudar en la captación, la distribución y/o la absorción. Por ejemplo, los lípidos catiónicos pueden incluirse en la formulación para facilitar la captación de oligonucleótidos. Una de estas composiciones que ha demostrado capacidad para facilitar la captación es LIPOFECTIN (disponible en GIBCO-BRL, Bethesda, MD).

Según se cree los oligonucleótidos con al menos una modificación 2'-O-metoxietilo son especialmente útiles para administración oral. Las composiciones farmacéuticas y las formulaciones para administración tópica pueden incluir parches transdérmicos, pomadas, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, espráis, líquidos y polvos. Pueden ser necesarios o convenientes vehículos farmacéuticos convencionales, bases acuosas, en polvo u oleosas, espesantes y similares. También pueden ser útiles profilácticos, guantes y similares.

Las formulaciones farmacéuticas de la presente descripción, que pueden presentarse de forma conveniente en forma de dosis unitarias, pueden prepararse de acuerdo con técnicas convencionales bien conocidas en la industria farmacéutica. Dichas técnicas incluyen la etapa de poner en asociación los ingredientes activos con el o los vehículos o excipientes farmacéuticos. En general, las formulaciones se preparan llevando de manera íntima y uniforme en asociación los ingredientes activos con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos o ambos, y entonces, en caso necesario, modelar el producto.

Las composiciones de la presente descripción pueden formularse en cualquiera de las muchas formas posibles de dosificación tales como, sin limitarse a, comprimidos, cápsulas, cápsulas en gel, jarabes líquidos, geles blandos, supositorios y enemas. Las composiciones de la presente descripción también pueden formularse en forma de suspensiones en medios acuosos, no acuosos o mixtos. Las suspensiones acuosas pueden contener además sustancias que incrementan la viscosidad de la suspensión que incluyen, por ejemplo, carboximetilcelulosa sódica, sorbitol y/o dextrano. La suspensión puede contener también estabilizantes.

Las composiciones farmacéuticas de la presente descripción incluyen, pero no se limitan a, soluciones, emulsiones, espumas y formulaciones que contienen liposomas. Las composiciones farmacéuticas y las formulaciones de la presente descripción pueden comprender uno o más potenciadores de penetración, vehículos, excipientes u otros ingredientes activos o inactivos.

Las emulsiones son normalmente sistemas heterogéneos de un líquido dispersado en otro en forma de pequeñas gotas que superan normalmente 0.1 μm de diámetro. Las emulsiones pueden contener componentes adicionales además de las fases dispersadas, y el fármaco activo que puede estar presente en forma de una solución ya sea en la fase acuosa, la fase oleosa o en sí mismo como una fase separada. Las microemulsiones se incluyen como un aspecto de la presente descripción. Las emulsiones y los usos de las mismas son bien conocidos en la técnica y se describen adicionalmente en la patente de EE.UU. n° 6.287.860.

Las formulaciones de la presente descripción incluyen formulaciones liposómicas. Tal como se usa en la presente descripción, el término "liposoma" significa una vesícula compuesta por lípidos anfífilos dispuestos en una bicapa o bicapas esféricas. Los liposomas son vesículas unilaminares o multilaminares que tienen una membrana formada por material lipófilo y un interior acuoso que contiene la composición que se suministrará. Los liposomas catiónicos son liposomas de carga positiva que según se cree interaccionan con moléculas de ADN de carga negativa para formar un complejo estable. Según se cree, los liposomas que son sensibles al pH o están cargados negativamente, atrapan ADN en lugar de formar complejo con él. Se han usado liposomas catiónicos y no catiónicos para suministrar ADN a las células.

Los liposomas incluyen también liposomas "estabilizados estéricamente", un término que, tal como se usa en la presente memoria descriptiva, se refiere a liposomas que comprenden uno o más lípidos especializados. Cuando se incorporan en liposomas, estos lípidos especializados producen liposomas con tiempos de circulación mejorados con respecto a los liposomas que carecen de dichos lípidos especializados. Los ejemplos de liposomas estabilizados estéricamente son aquellos en los que una parte de la porción de lípidos que forma vesículas del liposoma comprende uno o más glucolípidos o se deriva con uno o más polímeros hidrófilos, tales como una fracción de polietilenglicol (PEG). Los liposomas y sus usos se describen adicionalmente en la patente de EE.UU. n° 6.287.860.

Las formulaciones farmacéuticas y las composiciones de la presente descripción pueden incluir también tensioactivos. El uso de tensioactivos en productos farmacológicos, formulaciones y emulsiones es bien conocido en la técnica. Los tensioactivos y sus usos se describen adicionalmente en la patente de EE.UU. n° 6.287.860.

En un aspecto, la presente descripción emplea diversos potenciadores de penetración para realizar el suministro eficiente de ácidos nucleicos, en particular de oligonucleótidos. Además de ayudar a la difusión de los fármacos no lipófilos a través de membranas celulares, los potenciadores de penetración mejoran también la permeabilidad de los fármacos lipófilos. Los potenciadores de penetración pueden clasificarse como pertenecientes a una de las cinco categorías extensas, es decir, tensioactivos, ácidos grasos, sales biliares, agentes de quelación y agentes no

tensioactivos de no quelación. Los potenciadores de penetración y sus usos se describen adicionalmente en la patente de EE.UU. n° 6.287.860.

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

Las formulaciones para la administración tópica incluyen aquellas en las que los oligonucleótidos de la descripción están en mezcla con un agente de suministro tópico tal como lípidos, liposomas, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, esteroides, agentes de quelación y tensioactivos. Los lípidos y los liposomas incluyen modalidades neutras (por ejemplo, dioleoil-fosfatidil-DOPE-etanolamina, dimiristoilfosfatidilcolina DMPC, diestearoilfosfatidilcolina), negativas (por ejemplo, dimiristoilfosfatidilglicerol DMPG) y catiónicas (por ejemplo, dioleoil-tetrametilaminopropil-DOTAP y dioleoil-fosfatidiletanolamina DOTMA).

Para administración tópica u otra, los oligonucleótidos de la descripción pueden encapsularse en liposomas o pueden formar complejos con los mismos, en particular con liposomas catiónicos. Alternativamente, los oligonucleótidos pueden formar complejos con lípidos, en particular con lípidos catiónicos, ácidos grasos y ésteres, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, y sus usos se describen adicionalmente en la patente de EE.UU. n° 6.287.860.

Las composiciones y las formulaciones para administración oral incluyen polvos o gránulos, micropartículas, nanopartículas, suspensiones o soluciones en agua o medios no acuosos, cápsulas, cápsulas de geles, sobres, comprimidos o minicomprimidos. Los espesantes, los agentes saborizantes, los diluyentes, los emulsionantes, los adyuvantes de dispersión o los aglutinantes pueden ser deseables. Las formulaciones orales son aquellas en las que los oligonucleótidos de la descripción se administran en conjunción con uno o más tensioactivos o agentes de quelación potenciadores de penetración. Los tensioactivos incluyen ácidos grasos y/o ésteres o sales de los mismos, ácidos biliares y/o sales de los mismos. Los ácidos/sales biliares y los ácidos grasos y sus usos se describen adicionalmente en la patente de EE.UU. n° 6.287.860. También son combinaciones de potenciadores de penetración, por ejemplo, los ácidos/sales grasos en combinación con ácidos/sales biliares. Una combinación especial es la sal sódica de ácido láurico, ácido cáprico y UDCA. Los potenciadores de penetración adicionales incluyen éter polioxietileno-9-laurílico, éter polioxietileno-20-cetílico. Los oligonucleótidos de la descripción pueden suministrarse oralmente, en forma granular que incluye partículas secas pulverizadas, o en complejo para formar micro o nanopartículas. Los agentes de formación de complejo de los oligonucleótidos y sus usos se describen adicionalmente en la patente de EE.UU. n° 6.287.860.

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

Algunos aspectos de la descripción proporcionan composiciones farmacéuticas que contienen uno o más compuestos oligoméricos y uno o más de otros agentes quimioterapéuticos que actúan mediante un mecanismo de no antisentido. Los ejemplos de dichos agentes quimioterapéuticos incluyen pero no se limitan a fármacos quimioterapéuticos contra el cáncer tales como daunorrubicina, daunomicina, dactinomicina, doxorrubicina, epirubicina, idarrubicina, esorrubicina, bleomicina, mafosfamida, ifosfamida, citosina arabinósido, biscloroetilnitrosourea, busulfano, mitomicina C, actinomicina D, mitramicina, prednisona, hidroxiprogesterona, testosterona, tamoxifeno, dacarbacina, procarbocina, hexametilmelamina, pentametilmelamina, mitoxantrona, amsacrina, clorambucilo, metilciclohexilnitrosourea, mostazas de nitrógeno, melfalán, ciclofosfamida, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-azacitidina, hidroxiaurea, desoxicofomicina, 4-hidroxiperoxiciclo-fosforamida, 5-fluorouracilo (5-FU), 5-fluorodesoxiuridina (5-FUdR), metotrexato (MTX), colchicina, taxol, vincristina, vinblastina, etopósido (VP-16), trimetrexato, irinotecán, topotecán, gemcitabina, tenipósido, cisplatino y dietilestilbestrol (DES). Cuando se usan con los compuestos de la descripción, dichos agentes quimioterapéuticos pueden usarse individualmente (por ejemplo, 5-FU y oligonucleótido), en secuencia (por ejemplo, 5-FU y oligonucleótido durante un periodo de tiempo seguido por MTX y oligonucleótido), o en combinación con uno o más de otros de dichos agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, 5-FU, MTX y oligonucleótido, o 5-FU, radioterapia y oligonucleótido). Los fármacos antiinflamatorios, que incluyen pero no se limitan a fármacos antiinflamatorios no esteroideos y corticoesteroides, y los fármacos antiviricos, que incluyen pero no se limitan a ribavirina, vidarabina, aciclovir y ganciclovir, también pueden combinarse en las composiciones de la descripción. Las combinaciones de compuestos antisentido y otros fármacos no antisentido están también dentro del alcance de la presente descripción. Es posible usar dos o más compuestos combinados de forma conjunta o en secuencia.

En otro aspecto relacionado, las composiciones de la descripción pueden contener uno o más compuestos antisentido, en particular oligonucleótidos, dirigidos a un primer ácido nucleico y uno o más compuestos antisentido adicionales dirigidos a un segundo ácido nucleico diana. Por ejemplo, la primera diana puede ser una secuencia antisentido particular de un gen de la insulina (INS), y la segunda diana puede ser una región desde otra secuencia de nucleótidos. Alternativamente, las composiciones de la descripción pueden contener dos o más compuestos antisentido dirigidos a diferentes regiones del mismo ácido nucleico diana del gen de la insulina (INS). En la presente memoria descriptiva se ilustran numerosos ejemplos de compuestos antisentido y pueden seleccionarse otros de entre los compuestos adecuados conocidos en la técnica. Es posible usar dos o más compuestos combinados de forma conjunta o en secuencia.

Dosificación:

La formulación de composiciones terapéuticas y su ulterior administración (dosificación) se encuentra según se cree dentro de los conocimientos generales de la técnica. La dosificación depende de la gravedad y la capacidad de respuesta del estado patológico para tratar, donde el curso de tratamiento dura de varios días a varios meses, o hasta que tenga lugar una curación o una disminución del estado patológico. Las pautas posológicas óptimas pueden calcularse a partir de medidas de acumulación de fármaco en el organismo del paciente. Los expertos en la materia pueden determinar fácilmente dosificaciones óptimas, metodologías de dosificación y tasas de repetición. Las dosificaciones óptimas pueden variar dependiendo de la potencia relativa de los oligonucleótidos individuales, y pueden estimarse generalmente basándose en los valores de CE50 que se consideren efectivos en modelos de animales *in vitro* e *in vivo*. En general, la dosificación es de 0,01 µg a 100 g por kg de peso corporal, y puede suministrarse una vez o más al día, cada semana, al mes o al año, o incluso una vez cada 2 a 20 años. Los expertos en la materia pueden estimar fácilmente las tasas de repetición para dosificación basándose en los tiempos de residencia y las concentraciones medidas del fármaco en los líquidos o tejidos corporales. Después del tratamiento con éxito, puede ser conveniente someter al paciente a terapia de mantenimiento para prevenir la recurrencia del estado patológico, donde el oligonucleótido se administra en dosis de mantenimiento comprendidas entre 0,01 µg y 100 g por kg de peso corporal, una vez o más al día, hasta una vez cada 20 años.

En algunos aspectos, un paciente es tratado con una dosis de fármaco que es de al menos aproximadamente 1, al menos aproximadamente 2, al menos aproximadamente 3, al menos aproximadamente 4, al menos aproximadamente 5, al menos aproximadamente 6, al menos aproximadamente 7, al menos aproximadamente 8, al menos aproximadamente 9, al menos aproximadamente 10, al menos aproximadamente 15, al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 25, al menos aproximadamente 30, al menos aproximadamente 35, al menos aproximadamente 40, al menos aproximadamente 45, al menos aproximadamente 50, al menos aproximadamente 60, al menos aproximadamente 70, al menos aproximadamente 80, al menos aproximadamente 90 o al menos aproximadamente 100 mg/kg peso corporal. Algunas dosis inyectadas de oligonucleótidos antisentido se describen, por ejemplo, en la patente de EE.UU. n° 7.563.884, "Modulación antisentido de expresión PTP1B".

Aunque anteriormente se han descrito varios aspectos de la presente descripción, debe entenderse que se han presentado sólo a modo de ejemplo, y no como limitación. Los numerosos cambios en los aspectos divulgados pueden realizarse de acuerdo con la descripción en la presente memoria descriptiva sin alejarse del espíritu o el alcance de la descripción. Así, la amplitud y el alcance de la presente descripción no deberían estar limitados por ninguno de los aspectos descritos anteriormente.

Mediante la cita de diversas referencias en este documento, los solicitantes no admiten que ninguna referencia en concreto suponga una "técnica anterior" a su invención. Los aspectos de las composiciones y los procedimientos de la invención se ilustran en los ejemplos siguientes.

50 EJEMPLOS

Los siguientes Ejemplos no limitativos sirven para ilustrar aspectos seleccionados de la descripción. Se observará que para los expertos en la materia serán evidentes las variaciones en las proporciones y las alternativas en los elementos de los componentes mostrados y que están dentro del alcance de los aspectos de la presente descripción.

Ejemplo 1: Diseño de oligonucleótidos antisentido específicos para una cadena antisentido de una molécula de ácido nucleico en un gen de la insulina (INS) y/o una cadena de sentido directo de un polinucleótido del gen de la insulina (INS)

Tal como se indica anteriormente el término "oligonucleótido específico para" o "oligonucleótido diana" se refiere a un oligonucleótido que tiene una secuencia (i) capaz de formar un complejo estable con una porción del gen diana, o (ii) capaz de formar un dúplex estable con una porción de una transcripción de ARNm del gen diana.

5

La selección de los oligonucleótidos apropiados se ve facilitada por el uso de programas informáticos que alinean automáticamente secuencias de ácidos nucleicos e indican regiones de identidad u homología. Dichos programas se usan para comparar secuencias de ácidos nucleicos obtenidas, por ejemplo, mediante búsqueda de bases de datos tales como GenBank o secuenciación de productos de PCR. La comparación de secuencias de ácidos nucleicos a partir de un intervalo de especies permite la selección de secuencias de ácidos nucleicos que muestran un grado de identidad apropiado entre especies. En el caso de genes que no han sido secuenciados, se realizan técnicas de Southern blot para permitir la determinación del grado de identidad entre genes en especies diana y otras especies. Al aplicar técnicas de Southern blot en grados de astringencia diversos, como es bien conocido en la técnica, es posible obtener una medida de identidad aproximada. Estos procedimientos permiten la selección de oligonucleótidos que muestran un alto grado de complementariedad para secuencias diana de ácidos nucleicos en un sujeto que debe ser controlado y un menor grado de complementariedad a secuencias de ácidos nucleicos correspondientes en otras especies. Un experto en la materia comprenderá que existe una amplitud considerable en la selección de regiones de genes apropiadas para su uso en la presente descripción.

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

Las propiedades de hibridación de los oligonucleótidos descritas en la presente memoria descriptiva pueden determinarse por uno o más ensayos *in vitro* tal como se conoce en la técnica. Por ejemplo, las propiedades de los oligonucleótidos descritas en la presente memoria descriptiva pueden obtenerse por determinación de la fuerza de unión entre la cadena antisentido diana natural y las moléculas de un fármaco potencial usando un ensayo de curva de fusión.

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

El ensayo de curva de fusión determina la temperatura a la cual tiene lugar una rápida transición desde una conformación bicatenaria a monocatenaria para el complejo cadena antisentido natural/Molécula. Esta temperatura es aceptada ampliamente como una medida fiable de la fuerza de la interacción entre las dos moléculas.

40

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

Para realizar el ensayo se mezcla el ADNc o un oligonucleótido correspondiente con la Molécula en concentraciones definidas por los protocolos específicos del fabricante. La mezcla se calienta a 95°C para disociar todos los complejos de dsDNA preformados, y después se enfría lentamente a temperatura ambiente u otra temperatura inferior definida por el fabricante del kit para permitir el apareamiento de las moléculas de ADN. Los complejos nuevamente formados se calientan entonces lentamente a 95°C con recogida continua simultánea de datos sobre la cantidad de fluorescencia que es producida por la reacción. La intensidad de fluorescencia es inversamente proporcional a las cantidades de dsDNA presentes en la reacción. Los datos pueden recopilarse con el uso de un instrumento de PCR en tiempo real compatible con el kit (por ejemplo, ABI's StepOne Plus Real Time PCR System o LightTyper instrument, Roche Diagnostics, Lewes, RU).

Los picos de fusión se construyen trazando un gráfico del derivado negativo de fluorescencia con respecto a la

temperatura $(-d(\text{Fluorescencia})/dT)$ en el eje y) con respecto a la temperatura (eje x) usando software apropiado (por ejemplo, LightTyper (Roche) o SDS Dissociation Curve, ABI). Se analizan los datos para identificar la temperatura de la rápida transición desde el complejo dsDNA a moléculas monocatenarias. Esta temperatura se denomina T_f y es directamente proporcional a la fuerza de la interacción entre las dos moléculas. Normalmente, T_f será mayor que 5 40°C.

Ejemplo 2: Modulación de polinucleótidos de INS

Tratamiento de células MCF-7 con oligonucleótidos antisentido

10

Se cultivaron células MCF-7 de ATCC (cat# HTB-22) en medio de crecimiento (MEM/EBSS (Hyclone cat# SH30024, o Mediatech cat# MT-10-010-CV) + FBS al 10% (Mediatech cat# MT35-011-CV) + penicilina/estreptomicina (Mediatech cat# MT30-002-CI)) a 37°C y CO₂ al 5%. Un día antes del experimento se volvieron a sembrar en placa las células a la densidad de $1,5 \times 10^5$ /ml en placas de 6 pocillos y se incubaron a 37°C y CO₂ al 5%. En el día del 15 experimento se cambió el medio en las placas de 6 pocillos por medio de crecimiento nuevo. Se diluyeron todos los oligonucleótidos antisentido a la concentración de 20 µM. Se incubaron 2 µl de esta solución con 400µl de medio Opti-MEM (Gibco cat# 31985-070) y 4 µl de lipofectamina 2000 (Invitrogen cat# 11668019) a temperatura ambiente durante 20 min y se aplicó a cada pocillo de las placas de 6 pocillos con células MCF-7. Se usó una mezcla similar que incluía 2 µl de agua en lugar de la solución de oligonucleótido para los controles con transfección simulada. 20 Después de 3-18 h de incubación a 37°C y CO₂ al 5% se cambió el medio por medio de crecimiento nuevo. 48 h después de la adición de oligonucleótidos antisentido se retiró el medio y se extrajo ARN de las células usando SV Total ARN Isolation System de Promega (cat# Z3105) o RNeasy Total ARN Isolation kit de Qiagen (cat# 74181) según las instrucciones de los fabricantes. Se añadieron 600 ng de ARN a la reacción de transcripción inversa realizada usando el kit de ADNc Verso de Thermo Scientific (cat# AB1453B) o High Capacity cDNA Reverse 25 Transcription Kit (cat# 4368813) tal como se describe en el protocolo del fabricante. El ADNc a partir de esta reacción de transcripción inversa se usó para monitorizar la expresión génica por PCR en tiempo real usando ABI Taqman Gene Expression Mix (cat# 4369510) y cebadores/sondas diseñados por ABI (Applied Biosystems Taqman Gene Expression Assay: Hs01005963-ml de Applied Biosystems Inc., Foster City CA). Se usó el siguiente ciclo de PCR: 50°C durante 2 min, 95°C durante 10 min, 40 ciclos de (95°C durante 15 segundos, 60°C durante 1 min) 30 usando StepOne Plus Real Time PCR Machine (Applied Biosystems).

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

35

Resultados: Los resultados de PCR en tiempo real muestran que los niveles de INS de ARNm en células MCF-7 se incrementan significativamente 48 h después del tratamiento con un oligonucleótido diseñado para HS.70779 antisentido INS y un oligonucleótido designado como HS.621165 (Fig. 1).

40 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> CuRNA, Inc.

<120> TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES RELACIONADAS CON EL GEN DE LA INSULINA (INS) POR 45 INHIBICIÓN DE TRANSCRIPCIÓN ANTISENTIDO EN UN GEN DE LA INSULINA (INS)

<130> INS

<150> US61/231,451

50 <151> 2009-08-05

<160> 11

<170> PatentIn versión 3.5

55

<210> 1

<211> 469

<212> ADN

<213> Homo sapiens

ES 2 585 360 T3

<300>
 <308> NM-000207
 <309> 2010-07-04
 5 <313> (1)..(469)

<400> 1

```

agccctccag gacaggctgc atcagaagag gccatcaagc agatcactgt ccttctgcca      60
tggccctgtg gatgcgctc ctgccctgc tggcgctgct ggccctctgg ggacctgacc      120
cagccgcagc ctttgtgaac caacacctgt gcggctcaca cctggtggaa gctctctacc      180
tagtgtgctg ggaacgaggg ttcttctaca cacccaagac ccgccgggag gcagaggacc      240
tgcaggtggg gcaggtggag ctgggcgggg gccctggtgc aggcagcctg cagcccttgg      300
ccctggaggg gtccctgcag aagcgtggca ttgtggaaca atgctgtacc agcatctgct      360
ccctctacca gctggagaac tactgcaact agacgcagcc cgcaggcagc cccacacccg      420
ccgcctcctg caccgagaga gatggaataa agcccttgaa ccagcaaaa      469
    
```

10

<210> 2
 <211> 334
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

15

<400> 2

```

cagtagttct ccagctggta gagggagcag atgctggtac agcattgttc cacaatgcca      60
cgcttctgca gggaccctc cagggccaag ggctgcaggc tgctgcacc agggcccccg      120
cccagctcca cctgccccac ctgcaggacc tctgcctttc tcgtttcttg ggagtgtaga      180
gaagcctcgt ccccgcacct aggtagagag cttccaccag gtgtgagccg cacaggtgtt      240
ggttcacaaa ggctgcggct gggtcaggtc cccagagggc cagcagcgcc agcaggggca      300
ggagggcgc atccacagggcc atggcagaag gaca      334
    
```

20

<210> 3
 <211> 582
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

25

<400> 3

ES 2 585 360 T3

```

gcacgagttt ttttttggct ggttcaaggg ctttattcca tctctctcgg tgcaggaggc      60
ggcgggtgtg ggctgcctgc gggctgcgtc tagttgcagt agttctccag ctggtagagg      120
gagcagatgc tggtagacga ttgttccaca atgccacgct tctgcaggga cccctccagg      180
gccaaagggct gcaggctgcc tgcaccaggg cccccgccca gctccacctg ccccacctgc      240
aggtcctctg cctcccggcg ggtcttgggt gtgtagaagc tcgtgccgaa ttcggcacga      300
gcaaaggtgt tccacggaaa cacagacatg ttttctatcc caccttttct ttttaaaatg      360
aagtatTTTT gataaagtga attttaaaac acaaaatagc aatccccaaa gcacaagcta      420
acaatagtaa ttataatcat aattggcact tgtatataat gtcattttgc agggggttca      480
gccattttca caggcatcac ctagtctcag cagacacggt tgagtttctt aggtcgtaaa      540
tctcattgtc tgtattctaa ggatataaaa tatgaaagtg aa                          582

```

<210> 4

<211> 20

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido antisentido

10

<400> 4

gcttctcta cactccaag 20

15 <210> 5

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Oligonucleótido antisentido

<400> 5

catctgctcc ctctaccag 19

25

<210> 6

<211> 20

<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido antisentido

35 <400> 6

ctctctacct agtgtcggg 20

<210> 7
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 7
 10 ctctctacct agtgtgcggg 20

 <210> 8
 <211> 19
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido
 20
 <400> 8

 catctgctcc ctctaccag 19

 25 <210> 9
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 9

 35 tctacacacc caagaccgac 20

 <210> 10
 <211> 19
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

 45 <400> 10

 tctgctccct ctaccagct 19

 <210> 11
 50 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 55 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 11

gcagaagcgt ggcattgtgg a 21

REIVINDICACIONES

1. Un oligonucleótido que se dirige a una transcripción antisentido natural de un gen de la insulina (INS) para su uso como un compuesto terapéutico, donde el oligonucleótido aumenta la expresión del gen de la insulina 5 (INS).
2. Un oligonucleótido que se dirige a una transcripción antisentido natural de un gen de la insulina (INS) para su uso en la prevención o tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado a un gen de la insulina (INS), donde el oligonucleótido aumenta la expresión del gen de la insulina (INS), donde la enfermedad o trastorno se 10 selecciona de entre el grupo que consiste en diabetes o trastornos relacionados con ella (por ejemplo, diabetes de tipo I, de tipo II, diabetes gestacional, cetoacidosis diabética, coma hiperosmolar no cetósico, coma diabético, diabetes mellitus neonatal, diabetes mellitus neonatal permanente, resistencia a la insulina, obesidad, etc.), una enfermedad o trastorno metabólico (por ejemplo, un estado no diabético resistente a la insulina, obesidad, 15 disminución de la tolerancia a la glucosa (DTG), síndrome metabólico, síndrome de MODY, retinopatía diabética, diabetes del adulto, nefropatía diabética, hiperglucemia, hipercolesterolemia, dislipidemia, hiperlipidemia y una enfermedad metabólica relacionada con la edad, etc.), neuropatía (por ejemplo, neuropatía sensorial, neuropatía autónoma, neuropatía motora, retinopatía).
3. Uso de un oligonucleótido que se dirige a una transcripción antisentido natural de un gen de la insulina 20 (INS) para la fabricación de un medicamento para la prevención o tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado a un gen de la insulina (INS) donde dicho oligonucleótido aumenta la expresión del gen de la insulina (INS), donde la enfermedad o trastorno se selecciona de entre el grupo que consiste en diabetes o trastornos relacionados con ella (por ejemplo, diabetes de tipo I, de tipo II, diabetes gestacional, cetoacidosis diabética, coma hiperosmolar no cetósico, coma diabético, diabetes mellitus neonatal, diabetes mellitus neonatal permanente, resistencia a la 25 insulina, obesidad, etc.), una enfermedad o trastorno metabólico (por ejemplo, un estado no diabético resistente a la insulina, obesidad, disminución de la tolerancia a la glucosa (DTG), síndrome metabólico, síndrome de MODY, retinopatía diabética, diabetes del adulto, nefropatía diabética, hiperglucemia, hipercolesterolemia, dislipidemia, hiperlipidemia y una enfermedad metabólica relacionada con la edad, etc.), neuropatía (por ejemplo, neuropatía sensorial, neuropatía autónoma, neuropatía motora, retinopatía). 30
4. Un procedimiento *in vitro* de aumento de la expresión de un gen de la insulina (INS) en células o tejidos de pacientes que comprende: la puesta en contacto de dichas células o tejidos con un oligonucleótido que se dirige a una transcripción antisentido natural de un gen de la insulina (INS); aumentando así la expresión del gen de la insulina (INS). 35
5. Uso de acuerdo con la reivindicación 3, o un oligonucleótido para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, o un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, donde la transcripción antisentido natural tiene la secuencia de ácidos nucleicos tal como se describe en la SEQ ID NO: 2 ó 3.
- 40 6. Uso de acuerdo con la reivindicación 3 ó 5, o un oligonucleótido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 ó 5, o un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4 ó 5, donde el oligonucleótido es monocatenario.
7. Uso de acuerdo con la reivindicación 3 ó 5, o un oligonucleótido para su uso de acuerdo con una 45 cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 ó 5, o un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4 ó 5, donde el oligonucleótido es un compuesto siRNA.
8. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3, 5 a 7, o un oligonucleótido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 5 a 7, o un procedimiento de acuerdo con una cualquiera 50 de las reivindicaciones 4 a 7, donde el oligonucleótido comprende al menos una de las SEQ ID NO: 4-6, 8 u 11.
9. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3, 5 a 8, o un oligonucleótido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 5 a 8, o un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, donde la expresión del gen de la insulina (INS) se incrementa en al menos el 10%. 55
10. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3, 5 a 9, o un oligonucleótido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 5 a 9, o un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 9, donde el oligonucleótido comprende además una o más modificaciones que comprenden:

- a. al menos una unión internucleosídica modificada seleccionada de entre: un fosforotioato, un alquilfosfonato, un fosforoditioato, un alquilfosfonotioato, un fosforamidato, un carbamato, un carbonato, un triéster de fosfato, un acetamidato, un éster carboximetílico, y combinaciones de los mismos;
- 5 b. al menos un nucleótido modificado seleccionado de entre: un ácido nucleico peptídico (PNA), un ácido nucleico bloqueado (LNA), un ácido arabino-nucleico (FANA), un análogo, un derivado, y combinaciones de los mismos; o
- c. al menos una fracción de azúcar modificada seleccionada de entre: una fracción de azúcar modificada en posición 2'-fluoro, una fracción de azúcar modificada en posición 2'-O-metoxietilo, una fracción de azúcar modificada en posición 2'-metoxi, una fracción de azúcar modificada en posición a 2'-O-alquilo, una fracción de azúcar bicíclica y
- 10 combinaciones de las mismas.
11. Un oligonucleótido que se dirige a una transcripción antisentido natural de un gen de la insulina (INS), donde el oligonucleótido aumenta la expresión del gen de la insulina (INS), y donde la transcripción antisentido natural tiene la secuencia de ácidos nucleicos tal como se describe en la SEQ ID NO: 2 ó 3.
- 15 12. El oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 11, donde el oligonucleótido es monocatenario.
13. El oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 11, donde el oligonucleótido es un compuesto siRNA.
- 20 14. El oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, donde el oligonucleótido comprende al menos una de las SEQ ID NO: 4-6, 8 u 11.
15. El oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, donde la expresión del gen de la insulina (INS) se incrementa en al menos el 10%.
- 25 16. El oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15, donde el oligonucleótido comprende además una o más modificaciones que comprenden:
- 30 a. al menos una unión internucleosídica modificada seleccionada de entre: un fosforotioato, un alquilfosfonato, un fosforoditioato, un alquilfosfonotioato, un fosforamidato, un carbamato, un carbonato, un triéster de fosfato, un acetamidato, un éster carboximetílico y combinaciones de los mismos;
- b. al menos un nucleótido modificado seleccionado de entre: un ácido nucleico peptídico (PNA), un ácido nucleico bloqueado (LNA), un ácido arabino-nucleico (FANA), un análogo, un derivado, y combinaciones de los mismos; o
- 35 c. al menos una fracción de azúcar modificada seleccionada de entre: una fracción de azúcar modificada en posición 2'-fluoro, una fracción de azúcar modificada en posición 2'-O-metoxietilo, una fracción de azúcar modificada en posición 2'-metoxi, una fracción de azúcar modificada en posición a 2'-O-alquilo, una fracción de azúcar bicíclica y combinaciones de las mismas.
- 40 17. El oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 16, donde el oligonucleótido tiene una longitud de entre 10 y 30 nucleótidos.
18. El oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 17, donde el oligonucleótido tiene al menos el 90% de complementariedad de secuencia con una región diana en dicha
- 45 transcripción antisentido natural de un gen de la insulina (INS).
19. Una composición farmacéutica que comprende al menos un oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 18 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

FIGURA 1

