

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 599 986**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.08.2010 PCT/US2010/045168**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.02.2011 WO11019815**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.08.2010 E 10808692 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.10.2016 EP 2464731**

54 Título: **Tratamiento de enfermedades relacionadas con adiponectina (ADIPOQ) mediante la inhibición de un transcrito antisentido natural de una adiponectina (ADIPOQ)**

30 Prioridad:

11.08.2009 US 232917 P
20.10.2009 US 253187 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.02.2017

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 2 599 986 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 adiponectina (ADIPOQ) mediante la inhibición de un transcrito antisentido natural de una adiponectina (ADIPOQ)

5

CAMPO DE LA INVENCION

La presente solicitud reivindica la prioridad de la solicitud de patente provisional de EE.UU. nº 61/232.917 presentada el 11 de agosto de 2009 y de la solicitud de patente provisional de EE.UU. nº 61/253.187 presentada el 20 de octubre de 2009.

10

Aspectos de la divulgación comprenden oligonucleótidos que modulan la expresión y/o función de una adiponectina (ADIPOQ) y moléculas asociadas.

15 ANTECEDENTES

Las hibridaciones de DNA-RNA y RNA-RNA son importantes en muchos aspectos de la función del ácido nucleico incluyendo la replicación, transcripción y traducción de DNA. La hibridación es también básica para una variedad de tecnologías que detectan un ácido nucleico particular o alteran su expresión. Los nucleótidos antisentido, por ejemplo, desestabilizan la expresión génica al hibridar con RNA diana, interfiriendo así con el splicing, transcripción, traducción y replicación de RNA. El DNA antisentido tiene el rasgo añadido de que los híbridos de DNA-RNA sirven como sustrato para la digestión por ribonucleasa H, una actividad que está presente en la mayoría de tipos celulares. Las moléculas antisentido pueden suministrarse a células, como en el caso de los oligodesoxinucleótidos (ODN), o pueden expresarse a partir de genes endógenos como las moléculas de RNA. La FDA aprobó recientemente un fármaco antisentido, VITRAVENE™ (para tratamiento de retinitis por citomegalovirus), reflejando que el antisentido tiene utilidad terapéutica.

20

25

RESUMEN

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

30

En un aspecto, la divulgación proporciona procedimientos para la inhibición de la acción de un transcrito antisentido natural mediante el uso de un oligonucleótido u oligonucleótidos antisentido orientados a cualquier región del transcrito antisentido natural, dando como resultado la regulación positiva del correspondiente gen con sentido. Se contempla también en la presente memoria que la inhibición del transcrito antisentido natural pueda conseguirse por siRNA, ribozimas y moléculas pequeñas, que se considera que están dentro del alcance de la presente divulgación.

35

Un aspecto proporciona un procedimiento de modulación de la función y/o expresión de un polinucleótido de adiponectina (ADIPOQ) en células o tejidos de paciente *in vivo* o *in vitro*, que comprende poner en contacto dichas células o tejidos con un oligonucleótido antisentido de 5 a 30 nucleótidos de longitud, donde dicho oligonucleótido tiene al menos un 50 % de identidad de secuencia con un complemento inverso de un polinucleótido que comprende de 5 a 30 nucleótidos consecutivos de los nucleótidos 1 a 416 de la SEQ ID NO: 3, o los nucleótidos 1 a 3591 de la SEQ ID NO: 4, o los nucleótidos 1 a 875 de la SEQ ID NO: 5, o los nucleótidos 1 a 194 de la SEQ ID NO: 6, modulando así la función y/o expresión del polinucleótido de adiponectina (ADIPOQ) en células o tejidos de paciente *in vivo* o *in vitro*.

40

45

En otro aspecto, se orienta un oligonucleótido a una secuencia antisentido natural de un polinucleótido de adiponectina (ADIPOQ), por ejemplo los nucleótidos expuestos en las SEQ ID NO: 3 a 6, y cualquier variante, alelo, homólogo, mutante, derivado, fragmento y secuencia complementaria de los mismos. Se exponen ejemplos de oligonucleótidos antisentido como las SEQ ID NOS: 7 a 31.

50

Otro aspecto proporciona un procedimiento de modulación de la función y/o expresión de un polinucleótido de adiponectina (ADIPOQ) en células o tejidos de paciente *in vivo* o *in vitro*, que comprende poner en contacto dichas células o tejidos con un oligonucleótido antisentido de 5 a 30 nucleótidos de longitud, donde dicho oligonucleótido tiene al menos un 50 % de identidad de secuencia con un complemento inverso de un compuesto antisentido de polinucleótido de adiponectina (ADIPOQ), modulando así la función y/o expresión del polinucleótido de adiponectina (ADIPOQ) en células o tejidos de paciente *in vivo* o *in vitro*.

55

Otro aspecto proporciona un procedimiento de modulación de la función y/o expresión de un polinucleótido de adiponectina (ADIPOQ) en células o tejidos de paciente *in vivo* o *in vitro*, que comprende poner en contacto dichas células o tejidos con un oligonucleótido no codificante de 5 a 30 nucleótidos de longitud, donde dicho oligonucleótido tiene al menos un 50 % de identidad de secuencia con un oligonucleótido antisentido de un polinucleótido antisentido de adiponectina (ADIPOQ), modulando así la función y/o expresión del polinucleótido de adiponectina (ADIPOQ) en células o tejidos de paciente.

En un aspecto, una composición comprende uno o más oligonucleótido antisentido que se unen a polinucleótidos de adiponectina (ADIPOQ) con sentido y/o antisentido.

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

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

En aún otro aspecto, los nucleótidos modificados comprenden bases modificadas que comprenden moléculas de fosforotioato, metilfosfonato, ácidos peptidonucleicos, 2'-O-metilo, flúor o carbono, metileno u otro ácido nucleico bloqueado (LNA). Preferiblemente, los nucleótidos modificados son moléculas de ácido nucleico bloqueadas, incluyendo α -L-LNA.

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

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

En otro aspecto, los oligonucleótidos se encapsulan en un liposoma o se enlazan con una molécula portadora (p.ej., colesterol, péptido TAT).

Se describen a continuación otros aspectos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 es una gráfica de resultados de PCR en tiempo real que muestra el cambio en veces + desviación estándar del mRNA de ADIPOQ1 después del tratamiento de células HepG2 con oligonucleótidos de fosforotioato introducidos usando Lipofectamine 2000, en comparación con control. Los resultados de PCR en tiempo real muestran que los niveles de mRNA de ADIPOQ en células HepG2 aumentan significativamente 48 h después del tratamiento con un oligonucleótido diseñado para AA515150 antisentido de ADIPOQ y un oligonucleótido diseñado para BC036509. Las barras señaladas como CUR-1023 a CUR-1029 corresponden a muestras tratadas con las SEQ ID NO: 7 a 13 respectivamente.

La Figura 2 es una gráfica de resultados de PCR en tiempo real que muestra el cambio en veces + desviación estándar del mRNA de ADIPOQ1 después del tratamiento de células HepG2 con oligonucleótidos de fosforotioato introducidos usando Lipofectamine 2000, en comparación con control. Los resultados de PCR en tiempo real muestran que los niveles de mRNA de ADIPOQ1 en células HepG2 aumentan significativamente 48 h después del tratamiento con dos oligonucleótidos diseñados para AA515150 antisentido de ADIPOQ1 (CUR-1107 y 1108) y un oligonucleótido diseñado para BC036509 (CUR-1110). Las barras señaladas como CUR-1107, CUR-1108, CUR-1106, CUR-1110 y CUR-1109 corresponden a muestras tratadas con las SEQ ID NO: 14 a 18 respectivamente.

La Figura 3 es una gráfica de resultados de PCR en tiempo real que muestra el cambio en veces + desviación estándar del mRNA de ADIPOQ1 después del tratamiento de células Vero con oligonucleótidos de fosforotioato introducidos usando Lipofectamine 2000, en comparación con control. Los resultados de PCR en tiempo real muestran que los niveles de mRNA de ADIPOQ1 en células Vero aumentan significativamente 48 h después del tratamiento con dos oligonucleótidos diseñados para AA515150 antisentido de ADIPOQ1 (CUR-1107) y un oligonucleótido diseñado para BC036509 (CUR-1110). Las barras señaladas como CUR-1107, CUR-1108, CUR-1106, CUR-1110 y CUR-1109 corresponden a muestras tratadas con las SEQ ID NO: 14 a 18 respectivamente.

La Figura 4 es una gráfica de resultados de PCR en tiempo real que muestra el cambio en veces + desviación

estándar del mRNA de ADIPOQ1 después del tratamiento de células HepG2 con oligonucleótidos de fosforotioato introducidos usando Lipofectamine 2000, en comparación con control. Los resultados de PCR en tiempo real muestran que los niveles de mRNA de ADIPOQ1 en células HepG2 aumentan significativamente 48 h después del tratamiento con dos oligonucleótidos diseñados para AA515150 antisentido de ADIPOQ1. Las barras señaladas 5 como CUR-1167 a CUR-1171 corresponden a muestras tratadas con las SEQ ID NO: 19 a 23 respectivamente.

La Figura 5 es un gráfica de resultados de PCR en tiempo real que muestra el cambio en veces + desviación estándar del mRNA de ADIPOQ2 después del tratamiento de células HepG2 con oligonucleótidos de fosforotioato introducidos usando Lipofectamine 2000, en comparación con control. Los resultados de PCR en tiempo real 10 muestran que los niveles de mRNA de ADIPOR2 en células HepG2 aumentan significativamente 48 h después del tratamiento con uno de los oligonucleótidos diseñados para ADIPOR2 Skerblarbu.aApr antisentido de ADIPOR2. Las barras señaladas como CUR-1068 a CUR-1071 y CUR-1078 a CUR-1081 corresponden a muestras tratadas con las SEQ ID NOS: 24 a 31 respectivamente.

15 La Figura 6 muestra la secuencia antisentido natural AA515150 alineada con el genoma de *Rhesus*, con las posiciones de los oligonucleótidos diseñados para AA515150 destacadas.

La Figura 7 muestra el alineamiento de la secuencia antisentido skerblarbu.aApr07 con el genoma de *Rhesus*, con las posiciones de los oligonucleótidos diseñados para skerblarbu.aApr07.

20

Descripción del listado de secuencias

SEQ ID NO: 1: Adiponectina de *Homo sapiens* que contiene C1Q y dominio de colágeno (ADIPOQ), variante de transcrito 2, mRNA (número de acceso a NCBI: NM_004797); SEQ ID NO: 2: receptor de adiponectina 2 de *Homo sapiens* (ADIPOR2), mRNA (número de acceso a NCBI: NM_024551); SEQ ID NO: 3: secuencia antisentido natural (AA515150); SEQ ID NO: 4: secuencia antisentido natural (BC036509); SEQ ID NO: 5: secuencia antisentido natural (LOC729097.aApr07); SEQ ID NO: 6: secuencia antisentido de ADIPOQ1 natural (skerblarbu.aApr07); SEQ ID NO: 7 a 31: oligonucleótidos antisentido.* indica enlace fosforotioato.

30 DESCRIPCIÓN DETALLADA

Se describen a continuación varios aspectos de la divulgación con referencia a aplicaciones ejemplares para ilustración. Debería entenderse que se exponen numerosos detalles específicos, relaciones y procedimientos para proporcionar una comprensión completa de la divulgación. Un especialista en la técnica relevante, sin embargo, 35 reconocerá fácilmente que la divulgación puede practicarse sin uno o más de los detalles específicos o con otros procedimientos. La presente divulgación no está limitada por la ordenación de actos o eventos, ya que algunos actos pueden ocurrir en diferentes órdenes y/o simultáneamente con otros actos o eventos. Además, no se requieren todos los actos o eventos ilustrados para poner en marcha una metodología de acuerdo con la presente divulgación.

40 Todos los genes, nombres de genes y productos génicos divulgados en la presente memoria se pretende que correspondan a homólogos de cualquier especie para la que sean aplicables las composiciones y procedimientos divulgados en la presente memoria. Por tanto, los términos incluyen, pero sin limitación, genes y productos génicos de seres humanos y ratones. Se entiende que, cuando se divulga un gen o producto génico de una especie particular, se pretende que esta divulgación sea solo ejemplar, y no ha de interpretarse como una limitación a menos 45 que lo indique claramente el contexto en el que aparece. Por tanto, por ejemplo, para los genes divulgados en la presente memoria, que en algunos aspectos se refieren a secuencias de ácido nucleico y aminoácidos de mamífero, se pretende que engloben genes y productos génicos homólogos y/u ortólogos de otros animales incluyendo, pero sin limitación, otros mamíferos, peces, anfibios, reptiles y aves. En aspectos, los genes o secuencias de ácido nucleico son humanos.

50

Definiciones

La terminología usada en la presente memoria es con el fin de describir aspectos particulares solo y no se pretende que sea limitante de la divulgación. Como se usan en la presente memoria, las formas singulares “uno”, “una” y 55 “el/la” se pretende que incluyan las formas plurales también, a menos que el contexto indique claramente otra cosa. Además, en la medida en que los términos “incluir”, “incluye”, “tener”, “tiene”, “con” o variantes de los mismos se usen en cualquiera de la descripción detallada y/o las reivindicaciones, dichos términos se pretende que sean inclusivos de manera similar al término “comprender”.

El término “aproximadamente” o “alrededor de” significa dentro de un intervalo de error aceptable para el valor particular como se determina por un especialista en la materia, que dependerá en parte de cómo se mida o determine el valor, es decir, de las limitaciones del sistema de medida. Por ejemplo, “aproximadamente” puede significar dentro de 1 o más 1 desviaciones estándares, según la práctica en la técnica. Como alternativa, 5 “aproximadamente” puede significar un intervalo de hasta un 20 %, preferiblemente hasta un 10 %, más preferiblemente hasta un 5 % y más preferiblemente aún hasta un 1 % de un valor dado. Como alternativa, particularmente con respecto a sistemas o procesos biológicos, el término puede significar dentro de un orden de magnitud, preferiblemente dentro de 5 veces y más preferiblemente dentro de 2 veces de un valor. Cuando se describen valores particulares en la solicitud y reivindicaciones, a menos que se indique otra cosa, debería 10 suponerse que el término “aproximadamente” significa dentro de un intervalo de error aceptable para el valor particular.

Como se usa en la presente memoria, el término “mRNA” significa el transcrito o transcritos de mRNA conocidos actualmente de un gen diana, y cualquier transcrito adicional que pueda dilucidarse.

15 Se entiende por “oligonucleótidos antisentido” o “compuesto antisentido” una molécula de RNA o DNA que se une a otro RNA o DNA (RNA, DNA diana). Por ejemplo, si es un oligonucleótido de RNA, se une a otra diana de RNA mediante interacciones RNA-RNA y altera la actividad del RNA diana. Un oligonucleótido antisentido puede regular positivamente o negativamente la expresión y/o función de un polinucleótido particular. La definición pretende incluir 20 cualquier molécula de RNA o DNA extraña que sea útil desde el punto de vista terapéutico, diagnóstico u otro. Dichas moléculas incluyen, por ejemplo, moléculas de RNA o DNA antisentido, RNA de interferencia (RNAi), microRNA, moléculas de RNA señuelo, siRNA, RNA enzimático, RNA de edición terapéutica y RNA agonista y antagonista, compuestos oligoméricos antisentido, oligonucleótidos antisentido, oligonucleótidos de secuencia de guía externa (EGS), secuencias de splicing, cebadores y sondas alternativos y otros compuestos oligoméricos que 25 hibriden con al menos una porción del ácido nucleico diana. Como tales, estos compuestos pueden introducirse en forma de compuestos oligoméricos monocatenarios, bicatenarios, parcialmente monocatenarios o circulares.

En el contexto de esta divulgación, el término “oligonucleótido” hace referencia a un oligómero o polímero de ácido ribonucleico (RNA) o ácido desoxirribonucleico (DNA) o miméticos de los mismos. El término “oligonucleótido” 30 incluye también oligómeros lineales o circulares de monómeros o ligamientos naturales y/o modificados, incluyendo desoxirribonucleósidos, ribonucleósidos, formas sustituidas y alfa-anoméricas de los mismos, ácidos peptidonucleicos (PNA), ácidos nucleicos bloqueados (LNA), fosforotioato, metilfosfonato y similares. Los oligonucleótidos son capaces de unirse específicamente a un polinucleótido diana mediante un patrón regular de interacciones de monómero a monómero, tales como apareamiento de bases de tipo Watson-Crick, apareamiento de 35 bases de tipo Hoogsteen o Hoogsteen inverso o similares.

Los oligonucleótidos pueden ser “quiméricos”, es decir, compuestos por diferentes regiones. En el contexto de esta divulgación, los compuestos “quiméricos” son oligonucleótidos que contienen dos o más regiones químicas, por 40 ejemplo, una región o regiones de DNA, una región o regiones de RNA, una región o regiones de PNA, etc. Cada región química está compuesta por al menos una unidad monomérica, es decir, un nucleótido en el caso de un compuesto oligonucleotídico. Estos oligonucleótidos comprenden típicamente al menos una región donde el oligonucleótido está modificado para exhibir una o más propiedades deseadas. Las propiedades deseadas del oligonucleótido incluyen, pero sin limitación, por ejemplo una resistencia aumentada a la degradación por nucleasa, una captación celular aumentada y/o una afinidad de unión aumentada por el ácido nucleico diana. Por lo tanto, 45 regiones diferentes del oligonucleótido pueden tener propiedades diferentes. Los oligonucleótidos quiméricos de la presente divulgación pueden formarse como estructuras mixtas de dos o más oligonucleótidos, oligonucleótidos modificados, oligonucleósidos y/o análogos oligonucleotídicos como se describen anteriormente.

El oligonucleótido puede estar compuesto por regiones que pueden ligarse “alineadas”, es decir, cuando los 50 monómeros se ligan consecutivamente, como en DNA nativo, o ligarse a través de espaciadores. Los espaciadores se pretende que constituyan un “puente” covalente entre las regiones y tienen en casos una longitud no superior a aproximadamente 100 átomos de carbono. Los espaciadores pueden portar diferentes funcionalidades, por ejemplo tener carga positiva o negativa, portar propiedades de unión a ácido nucleico especiales (intercalantes, compuestos de unión a surco, toxinas, fluoróforos, etc.), ser lipófilos o, inducir estructuras secundarias especiales como, por 55 ejemplo, péptidos que contienen alanina que inducen hélices alfa.

Como se usa en la presente memoria, las “adiponectinas (ADIPOQ)” son inclusivas de todos los miembros de la familia, mutantes, alelos, fragmentos, especies, secuencias codificantes y no codificantes, hebras polinucleotídicas con sentido y antisentido, etc.

Como se usan en la presente memoria, las palabras adiponectina1, ADIPOQ1, proteína relacionada con complemento de adipocito de 30 kDa, ACDC, ACRP30, proteína de adipocito que contiene C1q y el dominio de colágeno, proteína de adipocito de 30 kDa relacionada con el complemento, adiponectina, Adiponectina, AdipoQ
 5 proteína del transcrito génico 1 más abundante en adiposa, ADIPQTL1, ADPN, apM1, APM1, apM-1, APM-1, GBP28 y proteína de unión a gelatina se consideran iguales en la bibliografía y se usan intercambiabilmente en la presente solicitud.

Como se usan en la presente memoria, las palabras ACDCR2, proteína 2 receptora de adiponectina, FLJ21432,
 10 MGC4640, PAQR2, progesterona y miembro II de la familia del receptor adipoQ se usan intercambiabilmente en la presente solicitud.

Como se usa en la presente memoria, el término "oligonucleótido específico de" u "oligonucleótido orientado a" hace referencia a un oligonucleótido que tiene una secuencia (i) capaz de formar un complejo estable con una porción del
 15 gen diana o (ii) capaz de formar un dúplex estable con una porción de un transcrito de mRNA del gen diana. La estabilidad de los complejos o dúplex puede determinarse por cálculos teóricos y/o ensayos *in vitro*. Se describen en los Ejemplos siguientes ensayos ejemplares para determinar la estabilidad de hibridación de complejos y dúplex.

Como se usa en la presente memoria, el término "ácido nucleico diana" engloba DNA, RNA (comprendiendo pre-
 20 mRNA y mRNA) transcrito a partir de dicho DNA y también cDNA derivado de dicho RNA, secuencias codificantes y no codificantes, polinucleótidos con sentido o antisentido. La hibridación específica de un compuesto oligomérico con su ácido nucleico diana interfiere con la función normal del ácido nucleico. Se hace referencia generalmente a esta modulación de la función de un ácido nucleico diana por compuestos que hibridan específicamente con el mismo como "antisentido". Las funciones del DNA que se interfieren incluyen, por ejemplo, replicación y
 25 transcripción. Las funciones del RNA que se interfieren incluyen todas las funciones vitales tales como, por ejemplo, translocación de RNA al sitio de traducción de proteína, traducción de proteína a partir del RNA, splicing del RNA procurando una o más especies de mRNA y actividad catalítica que puede organizarse o facilitarse por el RNA. El efecto global de dicha interferencia con la función del ácido nucleico diana es la modulación de la expresión de un producto codificado u oligonucleótidos.

30 La interferencia de RNA "RNAi" está medida por moléculas de RNA bicatenario (dsRNA) que tienen homología específica de secuencia con sus secuencias de ácido nucleico "diana". En ciertos aspectos de la presente divulgación, los mediadores son dúplex de RNA "interferentes pequeños" de 5-25 nucleótidos (siRNA). Los siRNA derivan del procesamiento de dsRNA por una enzima RNAasa conocida como Dicer. Los productos dúplex de siRNA
 35 se reclutan en un complejo de siRNA multiproteico denominado RISC (complejo de silenciamiento inducido por RNA). Sin desear ligarse a teoría particular alguna, se cree entonces que el RISC está guiado a un ácido nucleico diana (adecuadamente mRNA), donde el dúplex de siRNA interacciona de modo específico de secuencia para medir la escisión en forma catalítica. Los RNA interferentes pequeños que pueden usarse de acuerdo con la presente divulgación pueden sintetizarse y usarse de acuerdo con procedimientos que son bien conocidos en la materia y que
 40 serán familiares para el especialista en la materia. Los RNA interferentes pequeños para uso en los procedimientos de la presente divulgación comprenden adecuadamente entre aproximadamente 1 y aproximadamente 50 nucleótidos (nt). En ejemplos de aspectos no limitantes, 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 aproximadamente 20-25 nucleótidos.

45 La selección de los oligonucleótidos apropiados se facilita usando programas informáticos que alinean automáticamente las secuencias de ácido nucleico e indican las regiones de identidad u homología. Dichos programas se usan para comparar las secuencias de ácido nucleico obtenidas, por ejemplo, buscando en bases de datos tales como GenBank o secuenciando productos de PCR. La comparación de las secuencias de ácido nucleico
 50 de una serie de especies permite la selección de secuencias de ácido nucleico que exhiben un grado apropiado de identidad entre especies. En el caso de genes que no se hayan secuenciado, se efectúan Southern blots para permitir la determinación del grado de identidad entre genes en especies diana y otras especies. Al efectuar Southern blots a diversos grados de astringencia, como es bien conocido en la materia, es posible obtener un grado aproximado de identidad. Estos procedimientos permiten la selección de oligonucleótidos que exhiben un alto grado
 55 de complementariedad con secuencias de ácido nucleico diana en un sujeto para controlar y un menor grado de complementariedad con las correspondientes secuencias de ácido nucleico en otras especies. Un especialista en la materia se dará cuenta de que hay una considerable laxitud en la selección de las regiones apropiadas de genes para uso en la presente divulgación.

Se entiende por "RNA enzimático" una molécula de RNA con actividad enzimática. Los ácidos nucleicos enzimáticos (ribozimas) actúan en primer lugar uniéndose a un RNA diana. Dicha unión ocurre mediante la porción de unión a diana de un ácido nucleico enzimático que se mantiene en estrecha proximidad con una porción enzimática de la molécula que actúa escindiendo el RNA diana. Por tanto, el ácido nucleico enzimático reconoce en primer lugar y después se une a un RNA diana mediante apareamiento de bases, y una vez unido al sitio correcto, actúa enzimáticamente cortando el RNA diana.

Se entiende por "RNA señuelo" una molécula de RNA que imita el dominio de unión natural a un ligando. Por lo tanto, el RNA señuelo compite con la diana de unión natural por la unión de un ligando específico. Por ejemplo, se ha mostrado que la sobreexpresión de RNA de respuesta de transactivación de VIH (TAR) puede actuar como "señuelo" y se une eficientemente a la proteína tat de VIH, evitando así que se una a las secuencias de TAR codificadas en el RNA de VIH. Este pretende ser un ejemplo específico. Los especialistas en la materia reconocerán que este es solo un ejemplo, y pueden generarse fácilmente otros aspectos usando técnicas conocidas generalmente en la materia.

Como se usa en la presente memoria, el término "monómeros" indica típicamente monómeros ligados por enlaces fosfodiéster o análogos de los mismos que forman oligonucleótidos en el intervalo de tamaño de unas pocas unidades monoméricas, p.ej. aproximadamente 3-4, a aproximadamente varios cientos de unidades monoméricas. Los análogos de ligamientos fosfodiéster incluyen: fosforotioato, fosforoditioato, metilfosfonatos, fosforoseleniato, fosforamidato y similares, como se describe más detalladamente a continuación.

El término "nucleótido" cubre los nucleótidos de origen natural así como los nucleótidos de origen no natural. Debería ser evidente para el especialista en la materia que diversos nucleótidos que se habían considerado anteriormente "de origen no natural" se han encontrado posteriormente en la naturaleza. Por tanto, "nucleótidos" incluye no solo las moléculas que contienen heterociclos de purina y pirimidina conocidas, sino también análogos heterocíclicos y tautómeros de los mismos. Son ejemplos ilustrativos de otros tipos de nucleótidos las moléculas que contienen adenina, guanina, timina, citosina, uracilo, purina, xantina, diaminopurina, 8-oxo-N6-metiladenina, 7-desazaxantina, 7-desazaguanina, N4,N4-etanocitosina, N6,N6-etano-2,6-diaminopurina, 5-metilcitosina, 5-alquil (C3-C6)citosina, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, pseudoisocitosina, 2-hidroxi-5-metil-4-triazolopiridina, isocitosina, isoguanina, inosina y los nucleótidos "de origen no natural" descritos en la patente de EE.UU. nº 5.432.272. El término "nucleótido" pretende cubrir todos y cada uno de estos ejemplos, así como análogos y tautómeros de los mismos. Son nucleótidos especialmente interesantes aquellos que contienen adenina, guanina, timina, citosina y uracilo, que se consideran como los nucleótidos de origen natural en relación con la aplicación terapéutica y de diagnóstico en seres humanos. Los nucleótidos incluyen los 2'-desoxi- y 2'-hidroxiazúcares naturales, p.ej. como se describen en Kornberg y Baker, DNA Replication, 2ª Ed. (Freeman, San Francisco, 1992) así como sus análogos.

"Análogos" con referencia a nucleótidos incluye nucleótidos sintéticos que tienen restos básicos modificados y/o restos de azúcar modificados. Dichos análogos incluyen nucleótidos sintéticos diseñados para mejorar las propiedades de unión, p.ej., la estabilidad de dúplex o tríplex, la especificidad o similares.

Como se usa en la presente memoria, "hibridación" significa el apareamiento de hebras sustancialmente complementarias de compuestos oligoméricos. Un mecanismo de apareamiento implica los enlaces de hidrógeno, que pueden ser enlaces de hidrógeno de Watson-Crick, Hoögsteen o Hoögsteen inverso, entre las bases nucleosídicas o nucleotídicas (nucleótidos) de las hebras de compuestos oligoméricos. Por ejemplo, adenina y timina son nucleótidos complementarios que se aparean mediante la formación de enlaces de hidrógeno. La hibridación puede ocurrir en diversas circunstancias.

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

Como se usa en la presente memoria, la frase "condiciones de hibridación astringentes" o "condiciones astringentes" hace referencia a condiciones en las que un compuesto de la divulgación hibridará con su secuencia diana, pero con un número mínimo de otras secuencias. Las condiciones astringentes son dependientes de la secuencia y serán diferentes en circunstancias diferentes y, en el contexto de esta divulgación, las "condiciones astringentes" en las que los compuestos oligoméricos hibridan con una secuencia diana se determinan por la naturaleza y composición

de los compuestos oligoméricos y los ensayos en que se están investigando. En general, las condiciones de hibridación astringentes comprenden bajas concentraciones (<0,15 M) de sales con cationes inorgánicos tales como Na⁺⁺ o K⁺⁺ (es decir, baja fuerza iónica), temperatura más de 20-25 °C por debajo de la T_m del complejo compuesto oligomérico:secuencia diana y la presencia de desnaturalizantes tales como formamida, 5 dimetilformamida, dimetilsulfóxido o el detergente dodecilsulfato de sodio (SDS). Por ejemplo, la tasa de hibridación disminuye un 1,1 % por cada 1 % de formamida. Es un ejemplo de condición de hibridación de alta astringencia 0,1x tampón de cloruro de sodio-citrato de sodio (SSC)/0,1 % (p/v) de SDS a 60 °C durante 30 minutos.

“Complementario”, como se usa en la presente memoria, hace referencia a la capacidad de apareamiento preciso 10 entre dos nucleótidos en una o dos hebras oligoméricas. Por ejemplo, si una nucleobase en una cierta posición de un compuesto antisentido es capaz de enlace de hidrógeno con una nucleobase en una cierta posición de un ácido nucleico diana, siendo dicho ácido nucleico diana una molécula de DNA, RNA u oligonucleótido, entonces la posición del enlace de hidrógeno entre el oligonucleótido y el ácido nucleico diana se considera que es una posición complementaria. El compuesto oligomérico y la molécula de DNA, RNA u oligonucleótido adicional son 15 complementarios entre sí cuando un número suficiente de posiciones complementarias en cada molécula están ocupadas por nucleótidos que pueden tener un enlace de hidrógeno entre sí. Por tanto, “específicamente hibridable” y “complementario” son términos que se usan para indicar un grado suficiente de apareamiento preciso o complementariedad en un número suficiente de nucleótidos de tal modo que ocurra un enlace estable y específico entre el compuesto oligomérico y un ácido nucleico diana.

20 Se entiende en la materia que la secuencia de un compuesto oligomérico no tiene que ser un 100 % complementaria de la de su ácido nucleico diana para ser específicamente hibridable. Además, un oligonucleótido puede hibridar en uno o más segmentos de tal modo que los segmentos intermedios o adyacentes no estén implicados en el evento de hibridación (p.ej., una estructura de bucle, desapareamiento o estructura de horquilla). Los compuestos oligoméricos 25 de la presente divulgación comprenden al menos aproximadamente un 70 %, o al menos aproximadamente un 75 %, o al menos aproximadamente un 80 %, o al menos aproximadamente un 85 %, o al menos aproximadamente un 90 %, o al menos aproximadamente un 95 %, o al menos aproximadamente un 99 % de complementariedad de secuencia con una región diana en la secuencia de ácido nucleico diana a la que están orientados. Por ejemplo, un compuesto antisentido en que 18 de 20 nucleótidos del compuesto antisentido sean complementarios de una región 30 diana, y por lo tanto hibridarían específicamente, representaría un 90 % de complementariedad. En este ejemplo, los nucleótidos no complementarios restantes pueden agruparse o intercalarse con nucleótidos complementarios y no tienen que estar contiguos entre sí o con nucleótidos complementarios. Como tal, un compuesto antisentido que tiene 18 nucleótidos de longitud que tiene 4 (cuatro) nucleótidos no complementarios que están flanqueados por dos regiones de complementariedad completa con el ácido nucleico diana tendría un 77,8 % de complementariedad 35 global con el ácido nucleico diana y por lo tanto entraría dentro del alcance de la presente divulgación. La complementariedad porcentual de un compuesto antisentido con una región de un ácido nucleico diana puede determinarse rutinariamente usando los programas BLAST (herramientas de búsqueda de alineamiento local básico) y programas PowerBLAST conocidos en la materia. La homología porcentual, identidad de secuencia o complementariedad pueden determinarse, por ejemplo, mediante el programa Gap (Wisconsin Sequence Analysis 40 Package, versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison Wis.), usando parámetros por defecto, que usa el algoritmo de Smith y Waterman (*Adv. Appl. Math.*, (1981) 2, 482-489).

Como se usa en la presente memoria, el término “punto de fusión térmica (T_m)” hace referencia a la temperatura a 45 una fuerza iónica, pH y concentración de ácido nucleico definidos, a la que un 50 % de los oligonucleótidos complementarios de la secuencia diana hibridan con la secuencia diana en equilibrio. Típicamente, las condiciones astringentes serán aquellas en que la concentración salina sea al menos de aproximadamente 0,01 a 1,0 M de concentración de ion Na (u otras sales) a pH 7,0 a 8,3 y la temperatura sea de al menos aproximadamente 30 °C para oligonucleótidos cortos (p.ej., 10 a 50 nucleótidos). Las condiciones astringentes pueden conseguirse también con la adición de agentes desestabilizantes tales como formamida.

50 Como se usa en la presente memoria, “modulación” significa tanto un aumento (estimulación) como una disminución (inhibición) de la expresión de un gen.

El término “variante”, cuando se usa en el contexto de una secuencia polinucleotídica, pueden englobar una 55 secuencia polinucleotídica relacionada con un gen de tipo silvestre. Esta definición puede incluir también, por ejemplo, variantes “alélicas”, “de splicing”, “de especie” o “polimórficas”. Una variante de splicing puede tener una identidad significativa con una molécula de referencia, pero tendrá generalmente un número mayor o menor de polinucleótidos debido al splicing alternativo de exones durante el procesamiento de mRNA. El correspondiente polipéptido puede poseer dominios funcionales adicionales o ausencia de dominios. Los variantes de especie son

secuencias polinucleotídicas que varían de una especie a otra. Son de particular utilidad en la divulgación las variantes de productos génicos de tipo silvestre. Las variantes pueden ser el resultado de al menos una mutación en la secuencia de ácido nucleico y pueden dar como resultado mRNA alterados o polipéptidos cuya estructura o función puede o no alterarse. Cualquier gen natural o recombinante dado puede tener ninguna, una o muchas formas alélicas. Los cambios mutacionales comunes que dan lugar a variantes se atribuyen generalmente a delecciones, adiciones o sustituciones naturales de nucleótidos. Cada uno de estos tipos de cambio puede ocurrir solo, o en combinación con los demás, una o más veces en una secuencia dada.

Los polipéptidos resultantes tendrán generalmente una identidad aminoacídica significativa entre sí. Una variante polimórfica es una variación de la secuencia polinucleotídica de un gen particular entre individuos de una especie dada. Las variantes polimórficas pueden englobar también "polimorfismos de nucleótido único" (SNP) o mutaciones de base única en que la secuencia polinucleotídica varía en una base. La presencia de SNP puede ser indicativa, por ejemplo, de una cierta población con tendencia a un estado patológico, es decir, sensibilidad frente a resistencia.

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

Un polipéptido o péptido "derivado" es aquel que está modificado, por ejemplo, por glicosilación, pegilación, fosforilación, sulfatación, reducción/alquilación, acilación, acoplamiento químico o tratamiento suave con formalina. Un derivado puede modificarse también para contener un marcador detectable, directa o indirectamente, incluyendo pero sin limitación un marcador radioisotópico, fluorescente y enzimático.

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

"Mamífero" cubre los mamíferos de sangre caliente que están típicamente bajo cuidado médico (p.ej., seres humanos y animales domesticados). Los ejemplos incluyen felinos, caninos, equinos, bovinos y seres humanos, así como solo seres humanos.

"Tratar" o "tratamiento" cubre el tratamiento de un estado patológico en un mamífero e incluye: (a) prevenir que ocurra el estado patológico en un mamífero, en particular cuando dicho mamífero está predispuesto al estado patológico pero no se ha diagnosticado todavía que lo tiene; (b) inhibir el estado patológico, p.ej. detener su desarrollo y/o (c) aliviar el estado patológico, p.ej., causando la regresión del estado patológico hasta alcanzar un criterio de valoración deseado. Tratar incluye también la mejora de un síntoma de una enfermedad (p.ej., reducir el dolor o incomodidad), donde dicha mejora puede afectar o no directamente a la enfermedad (p.ej., causa, transmisión, expresión, etc.).

Como se usa en la presente memoria, "cáncer" hace referencia a todos los tipos de cáncer o neoplasias o tumores malignos encontrados en mamíferos incluyendo, pero sin limitación: leucemias, linfomas, melanomas, 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 limitación: fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesoteloma, tumor de Ewing, leiomioma, rabdomiosarcoma, carcinoma de colon, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma espinocelular, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándula sudorípara, carcinoma de glándula sebácea, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistoadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de conducto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, cáncer cervicouterino, tumor testicular, carcinoma pulmonar, carcinoma microcítico pulmonar, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma,ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma y retinoblastoma. Los cánceres adicionales que pueden tratarse con la composición divulgada de acuerdo con la divulgación incluyen, pero sin limitación, por ejemplo enfermedad de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin, mieloma múltiple, neuroblastoma, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, rabdomiosarcoma,

trombocitosis primaria, macroglobulinemia primaria, tumores microcíticos pulmonares, tumores cerebrales primarios, cáncer de estómago, cáncer de colon, insulinooma pancreático maligno, carcinoide maligno, cáncer de vejiga urinaria, lesiones cutáneas premalignas, cáncer testicular, linfomas, cáncer tiroideo, neuroblastoma, cáncer esofágico, cáncer del tracto genitourinario, hipercalcemia maligna, cáncer cervicouterino, cáncer endométrico, cáncer adrenocortical y 5 cáncer de próstata.

“Enfermedad o trastorno neurológico” hace referencia a cualquier enfermedad o trastorno del sistema nervioso y/o del sistema visual. “Enfermedad o trastorno neurológico” incluye enfermedades o trastornos que implican al sistema nervioso central (cerebro, tallo cerebral y cerebelo), sistema nervioso periférico (incluyendo nervios craneales) y 10 sistema nervioso autónomo (partes del cual están localizadas tanto en el sistema nervioso central como periférico). Los ejemplos de trastornos neurológicos incluyen, pero sin limitación, cefalea, estupor y coma, demencia, convulsiones, trastornos del sueño, traumatismo, infecciones, neoplasias, neuroftalmología, trastornos del movimiento, enfermedades desmielinizantes, trastornos de la médula espinal y trastornos de los nervios periféricos, uniones musculares y neuromusculares. Las adicciones y enfermedades mentales incluyen, pero sin limitación, 15 trastorno bipolar y esquizofrenia, y están también incluidas en la definición de trastorno neurológico. La siguiente es una lista de varios trastornos, síntomas, signos y síndromes neurológicos que pueden tratarse usando composiciones y procedimientos de acuerdo con la presente divulgación: 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 20 alternante; demencia vascular; esclerosis lateral amiotrófica; anencefalia; síndrome de Angelman; angiomatosis; anoxia; afasia; apraxia; quistes aracnoideos; aracnoiditis; malformación de Arnold-Chiari; malformación arteriovenosa; síndrome de Asperger; ataxia-telangiectasia; trastorno de déficit de atención con hiperactividad; autismo; disfunción autónoma; dolor de espalda; enfermedad de Batten; enfermedad de Behcet; parálisis de Bell; blefaroespasmo esencial benigno; amiotrofia focal benigna; hipertensión intracraneal benigna; enfermedad de Binswanger; 25 blefaroespasmo; síndrome de Bloch-Sulzberger; lesión del plexo braquial; absceso cerebral; lesión cerebral; tumores cerebrales (incluyendo glioblastoma multiforme); tumor espinal; síndrome de Brown-Sequard; enfermedad de Canavan; síndrome del túnel carpiano; causalgia; síndrome de dolor central; mielínolisis central pontina; trastorno cefálico; aneurisma cerebral; arterioesclerosis cerebral; atrofia cerebral; gigantismo cerebral; parálisis cerebral; enfermedad de Charcot-Marie-Tooth; neuropatía y dolor neuropático inducidos por quimioterapia; malformación de 30 Chiari; corea; polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica; dolor crónico; síndrome de dolor regional crónico; síndrome de Coffin-Lowry; coma, incluyendo estado vegetativo persistente; diplejía facial congénita; degeneración corticobasal; arteritis craneal; craneosinostosis; enfermedad de Creutzfeldt-Jakob; trastornos traumáticos acumulativos; síndrome de Cushing; enfermedad de cuerpos de inclusión citomegálicos; infección por citomegalovirus; síndrome de ojos y pies danzantes; síndrome de Dandy-Walker; enfermedad de Dawson; síndrome de De Morsier; parálisis de Dejerine-Klumpke; demencia; dermatomiositis; neuropatía diabética; esclerosis difusa; 35 disautonomía; disgrafía; dislexia; distonías; encefalopatía epiléptica infantil temprana; síndrome de la silla turca vacía; encefalitis; encefalocelos; angiomatosis encefalotrigeminal; epilepsia; parálisis de Erb; temblor esencial; enfermedad de Fabry; síndrome de Fahr; desmayo; parálisis espástica familiar; convulsiones febriles; síndrome de Fisher; ataxia de Friedreich; demencia frontotemporal y otras "taupatías"; enfermedad de Gaucher; síndrome de 40 Gerstmann; arteritis de células gigantes; enfermedad de inclusión de células gigantes; leucodistrofia de células globoides; síndrome de Guillain-Barre; mielopatía asociada a HTLV-1; enfermedad de Hallervorden-Spatz; lesión craneal; cefalea; espasmo hemifacial; paroplejía espástica hereditaria; heredopatía atáctica polineurítica; herpes zóster ótico; herpes zóster; síndrome de Hirayama; demencia y neuropatía asociadas a VIH (también manifestaciones neurológicas del SIDA); holoprosencefalia; enfermedad de Huntington y otras enfermedades de 45 repetición de poliglutamina; hidranencefalia; hidrocefalia; hipercortisolismo; hipoxia; encefalomiелitis inmunomediada; miositis de cuerpos de inclusión; incontinencia pigmentaria; enfermedad por almacenamiento de ácido fitánico infantil; enfermedad de Refsum infantil; espasmos infantiles; miopatía inflamatoria; quiste intracraneal; hipertensión intracraneal; síndrome de Joubert; síndrome de Keams-Sayre; enfermedad de Kennedy; síndrome de Kinsbourne; síndrome de Klippel-Feil; enfermedad de Krabbe; enfermedad de Kugelberg-Welander; kuru; enfermedad de Lafora; 50 síndrome miasténico de Lambert-Eaton; síndrome de Landau-Kleffner; síndrome medular lateral (de Wallenberg); discapacidades de aprendizaje; enfermedad de Leigh; síndrome de Lennox-Gustaut; síndrome de Lesch-Nyhan; leucodistrofia; demencia de cuerpos de Lewis; 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; macrocefalia; 55 megalencefalia; síndrome de Melkersson-Rosenthal; enfermedad de Menieres; meningitis; enfermedad de Menkes; leucodistrofia metacromática; microcefalia; migraña; síndrome de Miller-Fisher; miniapoplejías; miopatías mitocondriales; síndrome de Mobius; amiotrofia monomélica; 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 mioelástica de la infancia; mioelástico; miopatía; miotonía congénita; narcolepsia; neurofibromatosis; síndrome neuroléptico maligno; manifestaciones neurológicas del SIDA; secuelas neurológicas de lupus; neuromiotonía; lipofuscinosis neuronal cerioidea; trastornos de migración neuronal; enfermedad de Niemann-Pick; síndrome de O'Sullivan-McLeod; neuralgia occipital; secuelas de disrafismo espinal
- 5 oculto; síndrome de Ohtahara; atrofia olivopontocerebelosa; opsoclono-mioelástico; neuritis óptica; hipotensión ortoestática; síndrome por 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 a la muerte de células neuronales); paramiotonía congénita; enfermedades paraneoplásicas; ataques paroxísmicos; síndrome de Parry-Romberg; enfermedad de
- 10 Pelizaeus-Merzbacher; parálisis periódicas; neuropatía periférica; neuropatía dolorosa y dolor neuropático; estado vegetativo persistente; trastornos perversivos del desarrollo; reflejo de estornudo fótico; enfermedad por almacenamiento de ácido fitánico; enfermedad de Pick; nervio comprimido; tumores de pituitaria; polimiositis; porencefalia; síndrome postpolio; neuralgia postherpética; encefalomiélinitis postinfecciosa; hipotensión postural; síndrome de Prader-Willi; esclerosis lateral primaria; enfermedades priónicas; atrofia hemifacial progresiva;
- 15 leucoencefalopatía multifocal progresiva; poliosteoartritis progresiva esclerosante; parálisis supranuclear progresiva; pseudotumores cerebrales; síndrome de Ramsay-Hunt (tipos I y II); encefalitis de Rasmussen; síndrome de distrofia simpática refleja; enfermedad de Refsum; trastornos de movimientos repetitivos; lesiones por estrés repetitivo; síndrome de las piernas inquietas; mielopatía asociada a retrovirus; síndrome de Ren; síndrome de Reye; baile de San Vito; enfermedad de Sandhoff; enfermedad de Schilder; esquizoencefalia; displasia septo-óptica; síndrome del bebé sacudido; herpes; síndrome de Shy-Drager; síndrome de Sjogren; apnea del sueño; síndrome de Soto; espasticidad; espina bífida; lesión de médula espinal; tumores de médula espinal; atrofia muscular espinal; síndrome de Stiff-Person; apoplejía; síndrome de Sturge-Weber; panencefalitis esclerosante subaguda; encefalopatía arteriosclerótica 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
- 25 torácica; tic doloroso; parálisis de Todd; síndrome de Tourette; ataque isquémico transitorio; encefalopatías espongiiformes transmisibles; mielitis transversa; lesión cerebral traumática; temblores; neuralgia de trigémino; paraparesis espástica tropical; esclerosis tuberosa; demencia vascular (demencia multiinfarto); vasculitis incluyendo arteritis temporal; enfermedad de Von Hippel-Lindau; síndrome de Wallenberg; enfermedad de Werdnig-Hoffman; síndrome de West; latigazo cervical; síndrome de Williams; enfermedad de Wildon y síndrome de Zellweger.
- 30
- "Enfermedad metabólica" hace referencia a un amplio intervalo de enfermedades y trastornos del sistema endocrino incluyendo, por ejemplo, resistencia a insulina, diabetes, obesidad, tolerancia alterada a la glucosa, colesterol sanguíneo alto, hiperglicemia, dislipidemia e hiperlipidemia.
- 35 Una "inflamación" hace referencia a afecciones inflamatorias sistémicas y afecciones asociadas localmente a la migración y atracción de monocitos, leucocitos y/o neutrófilos. Los ejemplos de inflamación incluyen, pero sin limitación, inflamación resultante de infección con organismos patogénicos (incluyendo bacterias grampositivas, bacterias gramnegativas, virus, hongos y parásitos tales como protozoos y helmintos), rechazo de trasplante (incluyendo rechazo de órganos sólidos tales como riñón, hígado, corazón, pulmón o córnea, así como rechazo de
- 40 trasplantes de médula ósea incluyendo enfermedad del injerto contra el hospedador (GVHD)), o de reacciones autoinmunitarias o alérgicas crónicas o agudas localizadas. Las enfermedades autoinmunitarias incluyen glomerulonefritis aguda; artritis reumatoide o reactiva; glomerulonefritis crónica; enfermedades inflamatorias intestinales tales como enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y enterocolitis necrosante; síndromes asociados a la transfusión de granulocitos; dermatosis inflamatorias tales como dermatitis de contacto, dermatitis atópica, psoriasis;
- 45 lupus sistémico eritematoso (SLE), tiroiditis autoinmunitaria, esclerosis múltiple y algunas formas de diabetes, o cualquier otro estado autoinmunitario donde el ataque por el propio sistema inmunitario del sujeto dé como resultado la destrucción de tejido patológica. Las reacciones alérgicas incluyen asma alérgica, bronquitis crónica, hipersensibilidad aguda y retardada. Los estados patológicos inflamatorios sistémicos incluyen inflamación asociada a traumatismo, quemaduras, reperfusión después de eventos isquémicos (p.ej., eventos trombóticos en corazón,
- 50 cerebro, intestinos o vasos periféricos, incluyendo infarto de miocardio y apoplejía), sepsis, SDRA o síndrome de disfunción orgánica múltiple. Puede aparecer también reclutamiento inflamatorio en placas ateroscleróticas. La inflamación incluye, pero sin limitación, linfoma no de Hodgkin, granulomatosis de Wegener, tiroiditis de Hashimoto, carcinoma hepatocelular, atrofia tímica, pancreatitis crónica, artritis reumatoide, hiperplasia linfocítica reactiva, osteoartritis, colitis ulcerosa, carcinoma papilar, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, colecistitis aguda, colecistitis
- 55 crónica, cirrosis, sialadenitis crónica, peritonitis, pancreatitis aguda, pancreatitis crónica, gastritis crónica, adenomiosis, endometriosis, cervicitis aguda, cervicitis crónica, hiperplasia linfocítica, esclerosis múltiple, hipertrofia secundaria de púrpura trombocitopénica idiopática, nefropatía de IgA primaria, lupus sistémico eritematoso, psoriasis, enfisema pulmonar, pielonefritis crónica y cistitis crónica.

Una enfermedad o trastorno cardiovascular incluye aquellos trastornos que pueden causar isquemia o están causados por reperfusión del corazón. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, aterosclerosis, enfermedad arterial coronaria, miocarditis granulomatosa, miocarditis crónica (no granulomatosa), cardiomiopatía hipertrófica primaria, enfermedad arterial periférica (PAD), apoplejía, angina de pecho, infarto de miocardio, lesión de tejido cardiovascular causada por paro cardíaco, lesión de tejido cardiovascular causada por derivación cardíaca, choque cardiogénico y afecciones relacionadas que serían conocidas por los especialistas en la materia o que implican la disfunción o la lesión de tejido del corazón o vasos especialmente, pero sin limitación, lesión de tejido relacionada con la activación de adiponectina³. Las enfermedades CVS incluyen, pero sin limitación, aterosclerosis, miocarditis granulomatosa, infarto de miocardio, fibrosis miocárdica secundaria de enfermedad cardíaca valvular, fibrosis de miocardio sin infarto, cardiomiopatía hipertrófica primaria y miocarditis crónica (no granulomatosa).

Composiciones y moléculas polinucleotídicas y oligonucleotídicas

Dianas

- 15 En un aspecto, las dianas comprenden secuencias de ácido nucleico de una adiponectina (ADIPOQ), incluyendo sin limitación secuencias con sentido y/o antisentido no codificantes y/o codificantes asociadas a una adiponectina (ADIPOQ).
- 20 En un aspecto, las dianas comprenden las secuencias de ácido nucleico de ADIPOQ1, incluyendo sin limitación las secuencias con sentido y/o antisentido no codificantes y/o codificantes asociadas al gen ADIPOQ1.
- En un aspecto, las dianas comprenden las secuencias de ácido nucleico de ADIPOQ2, incluyendo sin limitación las secuencias con sentido y/o antisentido no codificantes y/o codificantes asociadas al gen ADIPOQ2.
- 25 La adiponectina, también denominada GBP-28, apMI, AdipoQ y Acrp30, es una proteína específica de tejido adiposo novedosa que tiene homología estructural con colágeno VIII y X y el factor de complemento C1q, y que circula en el plasma humano a altos niveles. Es uno de los polipéptidos fisiológicamente activos secretados por el tejido adiposo, cuyas múltiples funciones han empezado a entenderse en los últimos años. Una reducción en la expresión de adiponectina está asociada a resistencia a insulina en algunos modelos animales. La administración de adiponectina se ha acompañado por una reducción de la glucosa plasmática y un aumento de la sensibilidad a insulina. Además, las tiazolidindionas, fármacos que mejoran la sensibilidad a insulina mediante la estimulación del receptor gamma activado por proliferador de peroxisoma, aumentan la adiponectina plasmática y los niveles de mRNA en ratones. Por otro lado, esta proteína de adipocitos parece desempeñar un papel protector en modelos experimentales de lesión vascular. En seres humanos, los niveles de adiponectina están inversamente relacionados con el grado de adiposidad y positivamente asociados a la sensibilidad a insulina tanto en sujetos sanos como en pacientes diabéticos. Se ha reseñado que los niveles plasmáticos de adiponectina disminuyen en algunos estados resistentes a insulina, tales como obesidad y diabetes sacarina de tipo 2, y también en pacientes con enfermedad arterial coronaria. Por el contrario, la insuficiencia renal crónica, diabetes de tipo 1 y anorexia nerviosa están asociadas a niveles plasmáticos aumentados de adiponectina. Se ha mostrado que las concentraciones plasmáticas de adiponectina se correlacionan negativamente con los niveles de glucosa, insulina, triglicéridos e índice de masa corporal y positivamente con los niveles de lipoproteína de alta densidad-colesterol y eliminación de glucosa estimulada por insulina. La pérdida de peso y la terapia con tiazolidindionas aumentaba la producción de adiponectina endógena en seres humanos. La adiponectina aumenta la sensibilidad a insulina al aumentar la oxidación grasa del tejido, dando como resultado niveles reducidos de ácido graso en circulación y contenidos intracelulares reducidos de triglicéridos en hígado y músculo. Esta proteína suprime también la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales vasculares y la producción de citocinas de macrófagos, inhibiendo por tanto los procesos inflamatorios que ocurren durante las fases tempranas de la aterosclerosis.
- 50 La visión clásica del tejido adiposo como un depósito pasivo de almacenamiento de energía ya no es válida. En la última década, se ha mostrado que el tejido adiposo tiene funciones endocrinas que regulan la fisiología cardiovascular. La secreción de adiponectina se inhibe por TNF-alfa y por catecolaminas y se estimula por la activación de PPAR-gamma. La adiponectina actúa a través de dos receptores principales, AdipoR1 y AdipoR2. En el hígado, la adiponectina modula el metabolismo lipídico y energético, estimulando el catabolismo de ácidos grasos y reduciendo la gluconeogénesis. En músculo esquelético, promueve la oxidación de ácido graso y la captación de glucosa. Tomadas en conjunto, las acciones metabólicas de la adiponectina mejoran la sensibilidad a insulina y reducen los niveles de lípidos en circulación. La adiponectina tiene también un efecto protector contra la aterogénesis, actuando sobre el endotelio y las células de músculo liso, no generando secreción e inhibiendo la producción de factores de adhesión. En el corazón, la adiponectina inhibe la hipertrofia de cardiomiocitos y la fibrosis

de miocardio mediante mecanismos mal entendidos. Se ha mostrado también que la producción de adiponectina se reduce en pacientes con obesidad y diabetes de tipo 2, y sus niveles en circulación tienen importancia de pronóstico en diversas enfermedades cardiovasculares.

5 El tejido adiposo no es solo un sitio de almacenamiento de triglicéridos, sino también un órgano endocrino activo que secreta muchos mediadores biológicamente activos a los que se hace referencia como "adipocinas". En contraposición con muchas adipocinas, que se sobreproducen en individuos obesos y ejercen efectos nocivos sobre la sensibilidad a insulina, el metabolismo de las lipoproteínas y el sistema cardiovascular, tales como leptina, factor de necrosis tumoral alfa, inhibidor I de activador de plasminógeno, resistina, etc., la adiponectina parece ser una
10 adipocina única que se produce en menos cantidades en sujetos obesos que en magros y posee actividades predominantemente beneficiosas, es decir, aumenta la sensibilidad a insulina, estimula la oxidación de ácidos grasos, inhibe la reacción inflamatoria e induce la vasorrelajación mediada por óxido nítrico dependiente del endotelio. La adiponectina se une a dos receptores, AdipoR1 y AdipoR2. Los ratones con desactivación génica de adiponectina exhiben diversas manifestaciones del síndrome metabólico tales como resistencia a insulina,
15 intolerancia a glucosa, hiperlipidemia, vasorrelajación dependiente de endotelio alterada e hipertensión, así como formación aumentada de capa neointima después de lesión vascular. Estudios clínicos indican que la concentración plasmática de adiponectina es menor en pacientes con hipertensión esencial y enfermedad cardíaca isquémica. Elevar el nivel de adiponectina endógena o aumentar la sensibilidad a esta hormona puede ser una estrategia terapéutica prometedora para pacientes con enfermedades metabólicas y cardiovasculares.

20 La adiponectina aumenta la sensibilidad a insulina junto con sus propiedades antiinflamatorias y antiaterogénicas. La orientación a esta molécula de oligonucleótidos antisentido que aumentan la AIPOQ en pacientes se usa en el tratamiento de diabetes, obesidad, cáncer, artroesclerosis y similares. En cáncer, la adiponectina puede funcionar como supresor tumoral, por ejemplo, niveles bajos de adiponectina en el colon conducen a cáncer colorrectal. En
25 cáncer de mama, se cree que la adiponectina es un regulador negativo del cáncer y que un aumento de los niveles de adiponectina sería terapéutico al inhibir el desarrollo o proporcionar tratamiento de cáncer de mama.

La modulación de los niveles de adiponectina en pacientes sería también importante en enfermedades o trastornos inflamatorios, incluyendo enfermedades o trastornos autoinmunitarios. La adiponectina es una adipocina con
30 potentes propiedades antiinflamatorias. Se cree que el desarrollo de enfermedad hepática alcohólica implica una actividad proinflamatoria aumentada, mediada en parte por la activación de macrófagos hepáticos (células de Kupffer). La alimentación crónica con etanol sensibiliza a los macrófagos hepáticos ante la activación por lipopolisacárido (LPS), conduciendo a una producción aumentada de especies de oxígeno reactivas y factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa). La adiponectina puede normalizar la señalización mediada por receptor 4 de tipo
35 Toll (TLR-4) en macrófagos hepáticos después de alimentación de etanol, contribuyendo probablemente al efecto hepatoprotector de la adiponectina en la progresión de enfermedad hepática alcohólica.

La aterosclerosis está considerada un proceso inflamatorio crónico que está presente en la pared arterial pero se caracteriza también por una respuesta inflamatoria sistémica en bajo grado. El tejido adiposo puede desempeñar un
40 papel importante en la mediación de este proceso inflamatorio crónico y, posteriormente, el riesgo cardiovascular y por lo tanto no puede considerarse solo como un sitio de almacenamiento para grasa. El adipocito puede tener una función endocrina activa; produce varias citocinas [entre ellas interleucina 6 (IL-6) y factor de necrosis tumoral (TNF)] y adiponectina, una proteína relacionada con el complemento de adipocitos de 30 kDa. Los niveles de adiponectina en suero se determinan principalmente por el tamaño y la cantidad de adipocitos. Se encuentran las concentraciones
45 séricas máximas en sujetos con solo poca grasa corporal. La adiponectina tiene efectos sensibilizador de insulina y antiaterogénico y se han reseñado menores niveles séricos en pacientes con enfermedad cardíaca coronaria.

En aspectos, un procedimiento de tratamiento de enfermedades o trastornos asociados a bajos niveles de adiponectina comprende administrar a un paciente un oligonucleótido o antisentido que aumenta la expresión y/o
50 función de adiponectina. Los ejemplos de oligonucleótidos comprenden las SEQ ID NO: 7 a 31.

De acuerdo con aspectos de la divulgación, la molécula de ácido nucleico diana está dirigida a adiponectina (ADIPOQ) y se extiende a cualquiera de las isoformas, receptores, familias y similares de adiponectina (ADIPOQ). Los sinónimos de ADIPOQ incluyen: proteína relacionada con complemento de adipocitos de 30 kDa, ACDC,
55 ACRP30, proteína que contiene C1q y el dominio de colágeno de adipocitos, proteína de 30 kDa relacionada con el complemento de adipocito, adiponectina, Adiponectina, AdipoQ, proteína del transcrito 1 del gen más abundante en adiposa, ADIPQTL1, APM1, apM1, APM1, apM-1, APM-1, GBP28 y proteína de unión a gelatina.

En un aspecto, la divulgación contempla todos los aspectos asociados a las moléculas descritas en la presente

memoria y engloba todos los péptidos, polipéptidos, derivados, variantes de las secuencias polinucleotídicas y oligonucleotídicas de ADIPOQ.

En otro aspecto, la divulgación comprende anticuerpos y aptámeros que pueden generarse por moléculas de
5 ADIPOQ.

En algunos aspectos, se usan oligonucleótidos antisentido para prevenir o tratar enfermedades o trastornos asociados a miembros de la familia de adiponectina (ADIPOQ). Las enfermedades y trastornos mediados por adiponectina (ADIPOQ) ejemplares que pueden tratarse con células/tejidos regenerados a partir de células madre
10 obtenidas usando los compuestos antisentido comprenden: cáncer, inflamación, aterosclerosis, una enfermedad o trastorno neurológico, una enfermedad o trastorno cardíaco, una enfermedad o trastorno autoinmunitario, una enfermedad o trastorno infeccioso o una afección causada por agentes tales como virus, bacterias, hongos, protozoos, una enfermedad o trastorno inmunodeficiente, una alergia, aterosclerosis, una enfermedad o trastorno metabólico (diabetes, neuropatía diabética, obesidad, hiperglicemia, resistencia a insulina, síndromes metabólicos
15 asociados a resistencia a insulina, síndrome metabólico, hipertensión, una enfermedad o trastorno asociado a una regulación alterada de la sensibilidad a insulina, nivel de glucosa sanguínea aberrante, etc.), una enfermedad hepática, una enfermedad renal, albuminuria y un trastorno proliferativo celular.

En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos antisentido modulan la expresión, función y actividad de ADIPOR,
20 incluyendo las moléculas con las que interacciona ADIPOR. La adiponectina inhibe fuertemente la expresión de moléculas de adhesión, incluyendo la molécula de adhesión intracelular I, la molécula de adhesión celular vascular I y E-selectina. La adiponectina inhibe también la activación del factor B nuclear inducida por TNF mediante la inhibición de la fosforilación de IE. La supresión del factor B nuclear por adiponectina podría ser un mecanismo molecular importante para la inhibición de la adhesión de monocitos a células endoteliales. La adiponectina inhibe
25 también la expresión del receptor trampa de clase A-I de macrófagos, dando como resultado una captación notablemente disminuida de lipoproteína de baja densidad oxidada por macrófagos y la inhibición de la formación de células espumosas. Además, en células de músculo liso cultivadas, la adiponectina atenuaba la síntesis de DNA inducida por factores de crecimiento que incluyen factor de crecimiento de derivado de plaquetas, factor de crecimiento de tipo factor de crecimiento epidérmico (EGF) de unión a heparina, factor de crecimiento de fibroblastos
30 básico y EGF, así como la proliferación y migración celular inducidas por el factor de crecimiento de tipo EGF de unión a heparina.

En otro aspecto, los oligonucleótidos antisentido modulan la expresión normal y/o función normal de una adiponectina (ADIPOQ) en pacientes que padecen o están en riesgo de desarrollar enfermedades o trastornos
35 asociados a adiponectina (ADIPOQ).

En un aspecto, los oligonucleótidos son específicos de polinucleótidos de una adiponectina (ADIPOQ) lo que incluye, sin limitación, regiones no codificantes. Las dianas de adiponectina (ADIPOQ) comprenden variantes de adiponectina (ADIPOQ); mutantes de adiponectina (ADIPOQ) incluyendo SNP; secuencias no codificantes de
40 adiponectina (ADIPOQ); alelos, fragmentos y similares. Preferiblemente, el oligonucleótido es una molécula de RNA antisentido.

De acuerdo con aspectos de la divulgación, la molécula de ácido nucleico diana no está limitada a un polinucleótido de adiponectina (ADIPOQ) solo, sino que se extiende a cualquiera de las isoformas, receptores, homólogos,
45 regiones no codificantes y similares de una adiponectina (ADIPOQ).

En otro aspecto, un oligonucleótido se orienta a una secuencia antisentido natural (antisentido natural de las regiones codificantes y no codificantes) de una diana de adiponectina (ADIPOQ) incluyendo, sin limitación, variantes, alelos, homólogos, mutantes, derivados, fragmentos y secuencias complementarias de la misma. Preferiblemente, el
50 oligonucleótido es una molécula de RNA o DNA antisentido.

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

En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencia o complementariedad entre el compuesto antisentido y la diana es de aproximadamente 50 a aproximadamente 60 %. En algunos aspectos, la homología, identidad de

secuencia o complementariedad es de aproximadamente 60 a aproximadamente 70 %. En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencia o complementariedad es de aproximadamente 70 a aproximadamente 80 %. En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencia o complementariedad es de aproximadamente 80 a aproximadamente 90 %. En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencia o complementariedad es de aproximadamente 90 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 %, aproximadamente 99 % o aproximadamente 100 %.

Un compuesto antisentido es específicamente hibridable cuando la unión del compuesto al ácido nucleico diana interfiere con la función normal del ácido nucleico diana causando una pérdida de actividad y hay un grado suficiente de complementariedad para evitar la unión no específica del compuesto antisentido con las secuencias de ácido nucleico no diana en condiciones en que se desee la unión específica. Dichas condiciones incluyen, concretamente, las condiciones fisiológicas en el caso de ensayos *in vivo* o tratamiento terapéutico, y las condiciones en que se efectúen los ensayos en el caso de ensayos *in vitro*.

Un compuesto antisentido, tanto DNA, RNA, quimérico o sustituido, etc. es específicamente hibridable cuando la unión del compuesto a la molécula de DNA o RNA diana interfiere con la función normal del DNA o RNA diana causando una pérdida de utilidad y hay un grado suficiente de complementariedad para evitar la unión no específica del compuesto antisentido con secuencias no diana en condiciones en que se desee unión específica, es decir, en las condiciones fisiológicas en el caso de ensayos *in vivo* o tratamiento terapéutico, y en las condiciones en que se efectúen los ensayos en el caso de ensayos *in vitro*.

En otro aspecto, la orientación a una adiponectina (ADIPOQ) de, incluyendo sin limitación, secuencias antisentido que se identifican y expanden usando, por ejemplo, PCR, hibridación, etc., de una o más de las secuencias expuestas como las SEQ ID NO: 3 a 6 y similares, modula la expresión o función de una adiponectina (ADIPOQ). En un aspecto, la expresión o función está regulada positivamente en comparación con un control. En otro aspecto, la expresión o función está regulada negativamente en comparación con un control.

En otro aspecto, los oligonucleótidos comprenden secuencias de ácido nucleico expuestas como las SEQ ID NO: 7 a 31, incluyendo secuencias antisentido que se identifican y expanden usando, por ejemplo, PCR, hibridación, etc. Estos oligonucleótidos pueden comprender uno o más nucleótidos modificados, fragmentos más cortos o más largos, enlaces modificados y similares. Los ejemplos de enlaces modificados o ligamientos internucleotídicos 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 enlazarse con el azúcar o resto análogo de azúcar en los oligonucleótidos modificados de la presente divulgación puede ser un monofosfato, difosfato, trifosfato, alquilfosfato, alcanofosfato, fosforotioato y similares. La preparación de los análogos de fosfato anteriormente señalados, y su incorporación a nucleótidos, nucleótidos modificados y oligonucleótidos *per se*, es también conocida y no tiene que describirse aquí.

La especificidad y sensibilidad de los compuestos antisentido se aprovechan también por los especialistas en la materia para usos terapéuticos. Los oligonucleótidos antisentido se han empleado como restos terapéuticos en el tratamiento de estados patológicos en animales y hombres. Los oligonucleótidos antisentido se han administrado con seguridad y efectividad a seres humanos y están actualmente en ejecución actualmente numerosos ensayos clínicos. Está por tanto establecido que los oligonucleótidos pueden ser modalidades terapéuticas útiles que pueden configurarse para ser útiles en regímenes de tratamiento para el tratamiento de células, tejidos y animales, especialmente seres humanos.

En aspectos de la presente divulgación, los compuestos antisentido oligoméricos, particularmente oligonucleótidos, se unen a moléculas de ácido nucleico diana y modulan la expresión y/o función de moléculas codificadas por un gen diana. Las funciones del DNA para interferir comprenden, por ejemplo, replicación y transcripción. Las funciones del RNA para interferir comprenden todas las funciones vitales tales como, por ejemplo, translocación del RNA al sitio de traducción de proteína, traducción de proteína a partir del RNA, splicing del RNA procurando una o más especies de mRNA y actividad catalítica que puede organizarse o facilitarse por el RNA. Las funciones pueden regularse positivamente o inhibirse dependiendo de las funciones deseadas.

Los compuestos antisentido incluyen compuestos oligoméricos antisentido, oligonucleótidos antisentido, oligonucleótidos de secuencia de guía externa (EGS), secuencias de splicing alternativas, cebadores, sondas y otros compuestos oligoméricos que hibridan con al menos una porción del ácido nucleico diana. Como tales, estos compuestos pueden introducirse en forma de compuestos oligoméricos monocatenarios, bicatenarios, parcialmente

monocatenarios o circulares.

Orientar un compuesto antisentido a una molécula de ácido nucleico particular, en el contexto de esta divulgación, puede ser un proceso multietapa. El proceso empieza habitualmente con la identificación de un ácido nucleico diana
5 cuya función se va a modular. Este ácido nucleico diana puede ser, por ejemplo, un gen celular (o mRNA transcrito a partir del gen) cuya expresión está asociada a un trastorno o estado patológico particular, o una molécula de ácido nucleico de un agente infeccioso. En la presente divulgación, el ácido nucleico diana codifica una adiponectina (ADIPOQ).

10 El proceso de orientación incluye habitualmente también la determinación de al menos una región, segmento o sitio diana en el ácido nucleico diana para que ocurra la interacción antisentido de tal modo que dé como resultado el efecto deseado, p.ej., modulación de la expresión. Dentro del contexto de la presente divulgación, el término “región” se define como una porción del ácido nucleico diana que tiene al menos una estructura, función o característica identificable. En las regiones de ácidos nucleicos diana están los segmentos. Los “segmentos” se definen como
15 regiones menores o subporciones de regiones dentro de un ácido nucleico diana. Los “sitios”, como se usa en la presente divulgación, se definen como posiciones dentro de un ácido nucleico diana.

En un aspecto, los oligonucleótidos antisentido se unen a secuencias antisentido naturales de una adiponectina (ADIPOQ) y modulan la expresión y/o función de una adiponectina (ADIPOQ). Los ejemplos de secuencias
20 antisentido incluyen las SEQ ID NO: 7 a 31.

En otro aspecto, los oligonucleótidos antisentido se unen a uno o más segmentos de un polinucleótido de adiponectina (ADIPOQ) y modulan la expresión y/o función de una adiponectina (ADIPOQ). Los segmentos comprenden al menos cinco nucleótidos consecutivos de polinucleótidos con sentido o antisentido de adiponectina
25 (ADIPOQ).

En otro aspecto, los oligonucleótidos antisentido son específicos de secuencias antisentido naturales de una adiponectina (ADIPOQ), donde la unión de los oligonucleótidos a las secuencias antisentido naturales de una adiponectina (ADIPOQ) modula la expresión y/o función de una adiponectina (ADIPOQ).
30

En otro aspecto, los compuestos oligonucleotídicos comprenden las secuencias expuestas como las SEQ ID NO: 7 a 31, secuencias antisentido que se identifican y expanden usando, por ejemplo, PCR, hibridación, etc. Estos oligonucleótidos pueden comprender uno o más nucleótidos modificados, fragmentos más cortos o más largos, enlaces modificados y similares. Los ejemplos de enlaces modificados o ligamientos internucleotídicos comprenden
35 fosforotioato, fosforoditioato o similares. En otro aspecto, los nucleótidos comprenden un derivado de fósforo. El derivado de fósforo (o grupo fosfato modificado) que puede enlazarse con el azúcar o resto análogo de azúcar en los oligonucleótidos modificados de la presente divulgación puede ser un monofosfato, difosfato, trifosfato, alquilfosfato, alcanofosfato, fosforotioato y similares. La preparación de los análogos de fosfato anteriormente señalados y su incorporación a nucleótidos, nucleótidos modificados y oligonucleótidos *per se*es también conocido y no tiene que
40 describirse aquí.

Puesto que, como es conocido en la materia, el codón de inicio de la traducción es típicamente 5'-AUG (en moléculas de mRNA transcritas; 5'-ATG en la correspondiente molécula de DNA), se hace también referencia al codón de inicio de la traducción como el “codón AUG”, el “codón de inicio” o “el codón de inicio AUG”. Una minoría
45 de genes tiene un codón de inicio de la traducción que tiene las secuencias de RNA5'-GUG, 5'-UUG o 5'-CUG; y se ha mostrado que 5'-AUA, 5'-ACG y 5'-CUG funcionan *in vivo*. Por tanto, los términos “codón de inicio de la traducción” y “codón de inicio” pueden englobar muchas secuencias de codón, aunque el aminoácido iniciador en cada caso es típicamente metionina (en eucariotas) o formilmetionina (en procariotas). Los genes eucarióticos y procarióticos pueden tener dos o más codones de inicio alternativos, cualquiera de los cuales puede utilizarse
50 preferiblemente para el inicio de la traducción en un tipo celular o tejido particular, o en un conjunto particular de condiciones. En el contexto de la divulgación, “codón de inicio” y “codón de inicio de la traducción” hace referencia al codón o codones que se usan *in vivo* para iniciar la traducción de un mRNA transcrito a partir de un gen que codifica una adiponectina (ADIPOQ), independientemente de la secuencia o secuencias de dichos codones. Un codón de terminación de la traducción (o “codón de terminación”) de un gen puede tener una de tres secuencias: es decir, 5'-
55 UAA, 5'-UAG y 5'-UGA (las correspondientes secuencias de DNA son 5'-TAA, 5'- TAG y 5'-TGA, respectivamente).

Los términos “región de codón de inicio” y “región de codón de inicio de la traducción” hacen referencia a una porción de dicho mRNA o gen que engloba de aproximadamente 25 a aproximadamente 50 nucleótidos contiguos en cualquier dirección (es decir, 5' o 3') a partir de un codón de inicio de la traducción. De forma similar, los términos

“región de codón de terminación” y “región de codón de terminación de la traducción” hacen referencia a una porción de dicho mRNA o gen que engloba de aproximadamente 25 a aproximadamente 50 nucleótidos contiguos en cualquier dirección (es decir, 5' o 3') a partir de un codón de terminación de la traducción. En consecuencia, la “región de codón de inicio” (o “región de codón de inicio de la traducción”) y la “región de codón de terminación” (o “región de codón de terminación de la traducción”) son todas regiones a las que pueden orientarse efectivamente los compuestos antisentido de la presente divulgación.

El marco abierto de lectura (ORF) o “región codificante”, que es conocido en la materia por hacer referencia a la región entre el codón de inicio de la traducción y el codón de terminación de la traducción, es también una región a la que pueden orientarse efectivamente. Dentro del contexto de la presente divulgación, es una región diana la región intragénica que engloba el codón de inicio o terminación de la traducción del marco abierto de lectura (ORF) de un gen.

Otra región diana incluye la región 5' no traducida (5'UTR), conocida en la materia por hacer referencia a la porción de un mRNA en dirección 5' desde el codón de inicio de la traducción, e incluyendo por tanto los nucleótidos entre el sitio de caperuza 5' y el codón de inicio de la traducción de un mRNA (o los correspondientes nucleótidos en el gen). Aún otra región diana incluye la región 3' no traducida (3'UTR), conocida en la materia por hacer referencia a la porción de un mRNA en la dirección 3' desde el codón de terminación de la traducción, e incluyendo por tanto los nucleótidos entre el codón de terminación de la traducción y el extremo 3' de un mRNA (o los correspondientes nucleótidos en el gen). El sitio de caperuza 5' de un mRNA comprende un residuo de guanosina N7-metilado unido al residuo más 5' del mRNA a través de un ligamiento trifosfato 5'-5'. La región de caperuza 5' de un mRNA se considera que incluye la estructura de caperuza 5' misma así como los 50 primeros nucleótidos adyacentes al sitio de caperuza. Otra región diana para esta divulgación es la región de caperuza 5'.

Aunque algunos transcritos de mRNA eucariótico se traducen directamente, muchos contienen una o más regiones, conocidas como “intrones”, que se escinden del transcrito antes de traducir. Las regiones restantes (y por lo tanto traducidas) son conocidas como “exones” y se someten a splicing conjuntamente formando una secuencia de mRNA continua. En un aspecto, los sitios de splicing diana, es decir las uniones intrón-exón o uniones exón-intrón, son particularmente útiles en situaciones en que está implicado en la enfermedad un splicing aberrante, o cuando está implicada en la enfermedad una sobreproducción de un producto de splicing particular. Una unión de fusión aberrante debida a transposición o deleción es otro aspecto de un sitio diana. Los transcritos de mRNA, producidos a través del proceso de splicing de dos (o más) mRNA de diferentes fuentes génicas son conocidos como “transcritos de fusión”. En los intrones puede hacerse diana efectivamente usando compuestos antisentido orientados, por ejemplo, a DNA o pre-mRNA.

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

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

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

Pueden producirse transcritos de RNA alternativos a partir de la misma región genómica de DNA. Estos transcritos alternativos son generalmente conocidos como “variantes”. Más específicamente, las “variantes de pre-mRNA” son transcritos producidos a partir del mismo DNA genómico que difieren de otros transcritos producidos a partir del mismo DNA genómico en cualquiera de su posición de inicio o terminación y contienen tanto secuencias intrónicas como exónicas.

Tras la escisión de una o más regiones exónicas o intrónicas, o porciones de las mismas, durante el splicing, las variantes de pre-mRNA producen “variantes de pre-mRNA” menores. En consecuencia, las variantes de mRNA son variantes de pre-mRNA procesadas y cada variante de pre-mRNA única debe producir siempre una única variante de mRNA como resultado del splicing. Estas variantes de mRNA son también conocidas como “variantes de splicing alternativas”. Si no aparece splicing de la variante de pre-mRNA, entonces la variante de pre-mRNA es idéntica a la variante de mRNA.

Las variantes pueden producirse mediante el uso de señales alternativas para iniciar o terminar la transcripción. Los pre-mRNA y mRNA pueden poseer más de un codón de inicio o codón de terminación. Las variantes que se originan

a partir de un pre-mRNA o mRNA que usan codones de inicio alternativos son conocidas como “variantes de inicio alternativo” de ese pre-mRNA o mRNA. Aquellos transcritos que usan un codón de terminación alternativo son conocidos como “variantes de terminación alternativa” de ese pre-mRNA o mRNA. Es un tipo específico de variante de terminación alternativa la “variante poliA”, en que los múltiples transcritos producidos son el resultado de la selección alternativa de una de las “señales de terminación poliA” por la maquinaria de transcripción, produciendo así transcritos que terminan en sitios poliA únicos. Dentro del contexto de la divulgación, los tipos de variantes descritos en la presente memoria son también aspectos de ácidos nucleicos diana.

Las localizaciones del ácido nucleico diana con las que hibridan los compuestos antisentido se definen como al menos una porción de 5 nucleótidos de largo de una región diana a la que está orientada un compuesto antisentido activo.

Aunque se exponen en la presente memoria secuencias específicas de ciertos segmentos diana ejemplares, un especialista en la materia reconocerá que estas sirven para ilustrar y describir aspectos particulares dentro del alcance de la presente divulgación. Son fácilmente identificables segmentos diana adicionales por un especialista en la materia a la vista de esta divulgación.

Los segmentos diana de 5-100 nucleótidos de longitud que comprenden un tramo de al menos cinco (5) nucleótidos consecutivos seleccionados de entre los segmentos diana ilustrativos son considerados adecuados como diana también.

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

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

En aspectos de la divulgación, los oligonucleótidos se unen a una hebra antisentido de una diana particular. Los oligonucleótidos son de al menos 5 nucleótidos de longitud y pueden sintetizarse de modo que cada oligonucleótido se oriente a secuencias superpuestas de tal modo que se sinteticen oligonucleótidos para cubrir toda la longitud del polinucleótido diana. Las dianas incluyen también regiones codificantes así como no codificantes.

En un aspecto, los oligonucleótidos antisentido se orientan a ácidos nucleicos específicos. Orientar un compuesto antisentido a un ácido nucleico particular es un proceso multietapa. El proceso empieza habitualmente con la identificación de una secuencia de ácido nucleico cuya función se ha de modular. Este puede ser, por ejemplo, un gen celular (o mRNA transcrito a partir del gen) cuya expresión esté asociada a un trastorno o estado patológico particular, o un polinucleótido no codificante tal como, por ejemplo, RNA no codificante (ncRNA).

Los RNA pueden clasificarse como (1) RNA mensajeros (mRNA), que se traducen en proteínas, y(2) RNA no codificantes de proteína (ncRNA). Los ncRNA comprenden microRNA, transcritos antisentido y otras unidades transcripcionales (TU) que contienen una alta densidad de codones de terminación y que carecen de cualquier “marco abierto de lectura” extenso. Muchos ncRNA parecen empezar a partir de los sitios de inicio en las regiones 3' no traducidas (3'UTR) de loci codificantes de proteína. Los ncRNA son a menudo escasos y al menos la mitad de los ncRNA que se han secuenciado por el consorcio FANTOM no parecen estar biotinilados. La mayoría de investigadores se han centrado por razones obvias en los mRNA poliadenilados, que se procesan y exportan al citoplasma. Recientemente, se ha mostrado que el conjunto de RNA nucleares no poliadenilados puede ser muy grande, y que muchos transcritos surgen de regiones intergénicas. El mecanismo mediante el cual los ncRNA pueden regular la expresión génica es por apareamiento de bases con transcritos diana. Los RNA que funcionan por apareamiento de bases pueden agruparse en (1) RNA codificados en cis, que están codificados en la misma localización genética, pero en la hebra opuesta de los RNA sobre los que actúan y por lo tanto exhiben una

complementariedad perfecta con su diana, y (2) RNA codificados en trans, que están codificados en una localización cromosómica distinta de los RNA sobre los que actúan, y generalmente no exhiben un potencial de apareamiento de bases perfecto con sus dianas.

- 5 Sin desear ligarse a teoría alguna, la perturbación de un polinucleótido antisentido por los oligonucleótidos antisentido descritos en la presente memoria puede alterar la expresión de los correspondientes RNA mensajero con sentido. Sin embargo, esta regulación puede ser discordante (resultados de desactivación génica antisentido con elevación del RNA mensajero) o concordante (resultados de desactivación génica antisentido con reducción concomitante del RNA mensajero). En estos casos, pueden orientarse los oligonucleótidos antisentido a partes
 10 superpuestas o no superpuestas del transcrito antisentido, dando como resultado su desactivación génica o captura. Los compuestos antisentido codificantes así como no codificantes pueden orientarse de manera idéntica y cualquier categoría es capaz de regular los correspondientes transcritos con sentido, de manera concordante o discordante. Las estrategias que se emplean en la identificación de nuevos oligonucleótidos para uso contra una diana pueden basarse en la desactivación génica de transcritos de RNA antisentido por oligonucleótidos antisentido o cualquier
 15 otro medio de modular la diana deseada.

Estrategia 1: En el caso de regulación discordante, la desactivación génica del transcrito antisentido eleva la expresión del gen convencional (con sentido). Si este último gen codifica una diana farmacológica conocida o
 20 supuesta, entonces la desactivación génica de su contrapartida antisentido podría imitar convincentemente la acción de un agonista de receptor o estimulante enzimático.

Estrategia 2: En el caso de regulación concordante, podrían desactivarse génicamente a la vez ambos transcritos antisentido y con sentido y conseguirse así una reducción sinérgica de la expresión génica (con sentido) convencional. Si se usa, por ejemplo, un oligonucleótido antisentido para conseguir la desactivación génica,
 25 entonces puede usarse esta estrategia para aplicar un oligonucleótido antisentido orientado al transcrito con sentido y otro oligonucleótido antisentido al correspondiente transcrito antisentido, o un único oligonucleótido antisentido energéticamente simétrico que se oriente simultáneamente a los transcritos con sentido y antisentido superpuestos.

De acuerdo con la presente divulgación, los compuestos antisentido incluyen oligonucleótidos antisentido, ribozimas,
 30 oligonucleótidos de guía externa (EGS), compuestos de siRNA, compuestos de interferencia de RNA mono- o bicatenarios (iRNA) tales como compuestos de siRNA y otros compuestos oligoméricos que hibridan con al menos una porción del ácido nucleico diana y modulan su función. Como tales, pueden ser DNA, RNA, de tipo DNA, de tipo RNA o mezclas de los mismos, o pueden ser miméticos de uno o más de estos. Estos compuestos pueden ser compuestos oligoméricos monocatenarios, bicatenarios, circulares o en horquilla, y pueden contener elementos
 35 estructurales tales como protuberancias, desapareamientos o bucles internos o terminales. Los compuestos antisentido se preparan rutinariamente de forma lineal, pero pueden unirse o prepararse de otro modo para ser circulares y/o ramificados. Los compuestos antisentido pueden incluir constructos tales como, por ejemplo, dos hebras hibridadas formando un compuesto total o parcialmente bicatenario o una sola hebra con suficiente autocomplementariedad para permitir la hibridación y formación de un compuesto total o parcialmente bicatenario.
 40 Las dos hebras pueden ligarse internamente dejando extremos 3' o 5' libres o pueden ligarse formando una estructura de horquilla continua o bucle. La estructura de horquilla puede contener un saliente en cualquiera de los extremos 5' o 3' que produzca una extensión de carácter monocatenario. Los compuestos bicatenarios pueden incluir opcionalmente salientes en los extremos. Modificaciones adicionales pueden incluir grupos conjugados enlazados con uno de los extremos, posiciones nucleotídicas seleccionadas, posiciones de azúcar o con uno de los
 45 ligamientos internucleosídicos. Como alternativa, las dos hebras pueden ligarse a través de un resto no de ácido nucleico o grupo ligador. Cuando se forma a partir de solo una hebra, el dsRNA puede tomar la forma de una molécula de tipo horquilla autocomplementaria que se duplica sobre sí misma formando un dúplex. Por tanto, los dsRNA pueden ser total o parcialmente bicatenarios. Puede conseguirse la modulación específica de la expresión génica mediante expresión estable de horquillas de dsRNA en líneas celulares transgénicas, sin embargo, en
 50 algunos aspectos la expresión o función génica está regulada positivamente. Cuando se forma por dos hebras, o una sola hebra que toma la forma de una molécula de tipo horquilla autocomplementaria duplicada sobre sí misma formando un dúplex, las dos hebras (o regiones formadoras de dúplex de una sola hebra) son hebras de RNA complementario que se aparean por bases de modo Watson-Crick.

55 Una vez introducidos en un sistema, los compuestos de la divulgación pueden desencadenar la acción de una o más enzimas o proteínas estructurales para efectuar la escisión u otra modificación del ácido nucleico diana o pueden funcionar a través de mecanismos basados en la ocupación. En general, los ácidos nucleicos (incluyendo oligonucleótidos) pueden describirse como "de tipo DNA" (es decir, tienen generalmente uno o más 2'-desoxiazúcares y, generalmente, bases T en lugar de U) o "de tipo RNA" (es decir, tienen generalmente uno o más

2'-hidroxiazúcares o azúcares 2'-modificados y, generalmente, bases U en lugar de T). Las hélices de ácido nucleico pueden adoptar más de un tipo de estructura, lo más comúnmente las formas A y B. Se cree que, en general, los oligonucleótidos que tienen estructura de tipo forma B son "de tipo DNA" y aquellos que tienen estructura de tipo forma A son "de tipo RNA". En algunos casos (quiméricos), un compuesto antisentido puede contener ambas regiones de forma A y B.

En otro aspecto, los oligonucleótidos o compuestos antisentido deseados comprenden al menos uno de: RNA antisentido, DNA antisentido, oligonucleótidos antisentido quiméricos, oligonucleótidos antisentido que comprenden ligamientos modificados, RNA de interferencia (RNAi), RNA interferente corto (siRNA), microRNA interferente (miRNA); un RNA temporal pequeño (stRNA) o un RNA de horquilla corto (shRNA); activación génica inducida por RNA pequeño (RNAa); RNA activadores pequeños (saRNA) o combinaciones de los mismos.

Los dsRNA pueden activar también la expresión génica, un mecanismo que se ha denominado "activación génica inducida por RNA pequeño" o RNAa. Los promotores génicos orientados a dsRNA inducen una potente activación transcripcional de los genes asociados. La RNAa se ha demostrado en células humanas usando dsRNA sintéticos denominados "RNA activadores pequeños" (saRNA).

Se ha encontrado que los RNA bicatenarios (dsRNA) pequeños, tales como RNA interferente pequeño (siRNA) y microRNA (miRNA) son el desencadenante de un mecanismo evolutivamente conservado conocido como interferencia de RNA (RNAi). La RNAi conduce invariablemente al silenciamiento génico. Sin embargo, en aspectos descritos con detalle en la sección de ejemplos siguiente, se muestran oligonucleótidos que aumentan la expresión y/o función de polinucleótidos de adiponectina (ADIPOQ) y productos codificados de los mismos. Los dsRNA pueden actuar también como RNA activadores pequeños (saRNA). Sin desear ligarse a teoría alguna, al orientar secuencias en promotores génicos, los saRNA inducirían la expresión génica diana en un fenómeno al que se hace referencia como activación transcripcional inducida por dsRNA (RNAa).

En un aspecto adicional, los "segmentos diana" identificados en la presente memoria pueden emplearse en un cribado de compuestos adicionales que modulen la expresión de un polinucleótido de adiponectina (ADIPOQ). Los "moduladores" son aquellos compuestos que disminuyen o aumentan la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica una adiponectina (ADIPOQ) y que comprenden al menos una porción de 5 nucleótidos que es complementaria de un segmento diana. El procedimiento de cribado comprende las etapas de poner en contacto un segmento diana de una molécula de ácido nucleico que codifica polinucleótidos con sentido o antisentido naturales de una adiponectina (ADIPOQ) con uno o más candidatos a moduladores; y seleccionar uno o más candidatos a modulador que disminuyan o aumenten la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica un polinucleótido de adiponectina (ADIPOQ), p.ej. las SEQ ID NO: 7 a 31. Una vez se muestra que el candidato o candidatos a modulador es capaz de modular (p.ej., disminuir o aumentar) la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica un polinucleótido de adiponectina (ADIPOQ), puede emplearse entonces el modulador en estudios de investigación adicionales de la función de un polinucleótido de adiponectina (ADIPOQ), o para uso como agente de investigación, diagnóstico o terapéutico de acuerdo con la presente divulgación.

Al orientar la secuencia antisentido natural, se modula la función del gen diana. Por ejemplo, la adiponectina (ADIPOQ) (p.ej., los números de acceso NM_004797 y NM_024551). En un aspecto, la diana es un polinucleótido antisentido de adiponectina (ADIPOQ). En un aspecto, un oligonucleótido antisentido se orienta a secuencias con sentido y/o antisentido naturales de un polinucleótido de adiponectina (ADIPOQ) (p.ej., los números de acceso NM_004797 y NM_024551), variantes, alelos, isoformas, homólogos, mutantes, derivados, fragmentos y secuencias complementarias de los mismos. Preferiblemente, el oligonucleótido es una molécula antisentido y las dianas incluyen regiones codificantes y no codificantes de polinucleótidos de adiponectina (ADIPOQ) antisentido y/o con sentido.

Los segmentos diana de la presente divulgación pueden combinarse también con sus respectivos compuestos antisentido complementarios de la presente divulgación formando oligonucleótidos bicatenarios estabilizados (dúplex).

Se ha mostrado en la materia que dichos restos oligonucleotídicos bicatenarios modulan la expresión de diana y regulan la traducción así como el procesamiento de RNA a través de un mecanismo antisentido. Además, los restos bicatenarios pueden someterse a modificaciones químicas. Por ejemplo, se ha mostrado que dichos restos bicatenarios inhiben la diana mediante la hibridación clásica de la hebra antisentido del dúplex con la diana, desencadenando así la degradación enzimática de la diana.

En un aspecto, un oligonucleótido antisentido se orienta a polinucleótidos de adiponectina (ADIPOQ) (p.ej. números de acceso NM_004797 y NM_024551), variantes, alelos, isoformas, homólogos, mutantes, derivados, fragmentos y secuencias complementarias de los mismos. Preferiblemente, el oligonucleótido es una molécula antisentido.

5 De acuerdo con aspectos de la divulgación, la molécula de ácido nucleico diana no está limitada a adiponectina (ADIPOQ) sola, sino que se extiende a cualquiera de las isoformas, receptores, homólogos y similares de una molécula de adiponectina (ADIPOQ).

10 En otro aspecto, un oligonucleótido se orienta a una secuencia antisentido natural de un polinucleótido de adiponectina (ADIPOQ), por ejemplo los polinucleótidos expuestos como las SEQ ID NO: 3 a 6, y a cualquier variante, alelo, homólogo, mutante, derivado, fragmento y secuencia complementaria de los mismos. Se exponen ejemplos de oligonucleótidos antisentido como las SEQ ID NO: 7 a 31.

15 En un aspecto, los oligonucleótidos son complementarios de o se unen a secuencias de ácido nucleico de un compuesto antisentido de adiponectina (ADIPOQ) incluyendo, sin limitación, secuencias con sentido y/o antisentido no codificantes asociadas a un polinucleótido de adiponectina (ADIPOQ) y modulan la expresión y/o función de una molécula de adiponectina (ADIPOQ).

20 En otro aspecto, los oligonucleótidos son complementarios de o se unen a secuencias de ácido nucleico de un compuesto antisentido natural de adiponectina (ADIPOQ) expuesto como las SEQ ID NO: 3 a 6, y modulan la expresión y/o función de una molécula de adiponectina (ADIPOQ).

25 En un aspecto, los oligonucleótidos comprenden secuencias de al menos 5 nucleótidos consecutivos de SEQ ID NO: 7 a 31 y modulan la expresión y/o función de una molécula de adiponectina (ADIPOQ).

30 Las dianas polinucleotídicas comprenden adiponectina (ADIPOQ), incluyendo los miembros de la familia de la misma, variantes de una adiponectina (ADIPOQ); mutantes de una adiponectina (ADIPOQ) incluyendo SNP; secuencias no codificantes de una adiponectina (ADIPOQ); alelos de una adiponectina (ADIPOQ); variantes de especie, fragmentos y similares. Preferiblemente, el oligonucleótido es una molécula antisentido.

35 En otro aspecto, el oligonucleótido orientado a polinucleótidos de adiponectina (ADIPOQ) comprende: RNA antisentido, RNA de interferencia (RNAi), RNA interferente corto (siRNA); microRNA interferente (miRNA); un RNA temporal pequeño (stRNA); o un RNA de horquilla pequeño (shRNA); activación génica inducida por RNA pequeño (RNAa); o RNA activador pequeño (saRNA).

40 En otro aspecto, la orientación a un polinucleótido de adiponectina (ADIPOQ), p.ej. las SEQ ID NO: 3 a 6, modula la expresión o función de estas dianas. En un aspecto, la expresión o función está regulada positivamente en comparación con un control. En otro aspecto, la expresión o función está regulada negativamente en comparación con un control.

45 En otro aspecto, los compuestos antisentido comprenden secuencias expuestas como las SEQ ID NO: 7 a 31. Estos oligonucleótidos pueden comprender uno o más nucleótidos modificados, fragmentos más cortos o más largos, enlaces modificados y similares.

50 En otro aspecto, las SEQ ID NO: 7 a 31 comprenden uno o más nucleótidos de LNA.

55 La modulación de un ácido nucleico diana deseado puede llevarse a cabo de varios modos conocidos en la materia, por ejemplo, oligonucleótidos antisentido, siRNA, etc. Las moléculas de ácido nucleico enzimáticas (p.ej., ribozimas) son moléculas de ácido nucleico capaces de catalizar una o más de una variedad de reacciones, incluyendo la capacidad de escindir repetidamente otras moléculas de ácido nucleico separadas de manera específica de la secuencia de bases nucleotídicas. Dichas moléculas de ácido nucleico enzimáticas pueden usarse, por ejemplo, para orientarse a virtualmente cualquier transcrito de RNA.

Debido a su especificidad de secuencia, las moléculas de ácido nucleico enzimáticas de escisión en trans se muestran prometedoras como agentes terapéuticos para enfermedad humana. Las moléculas de ácido nucleico enzimáticas pueden diseñarse para escindir dianas de RNA específicas en el fondo de RNA celular. Dicho evento de escisión vuelve el mRNA no funcional y anula la expresión proteica de ese RNA. De esta manera, puede inhibirse selectivamente la síntesis de una proteína asociada a un estado patológico.

- En general, los ácidos nucleicos enzimáticos con actividad de escisión de RNA actúan uniéndose en primer lugar a un RNA diana. Dicha unión ocurre a través de la porción de unión a diana de un ácido nucleico enzimático, que se mantiene en estrecha proximidad con una porción enzimática de la molécula, que actúa escindiendo el RNA diana. Por tanto, el ácido nucleico enzimático reconoce en primer lugar y se une entonces a un RNA diana a través de
- 5 apareamiento de bases complementarias, y una vez unido al sitio correcto, actúa enzimáticamente cortando el RNA diana. La escisión estratégica de dicho RNA diana destruirá su capacidad de dirigir la síntesis de una proteína codificada. Después de que un ácido nucleico enzimático se haya unido a y escindido su diana de RNA, se libera de ese RNA para buscar otra diana y puede unirse a y escindir repetidamente nuevas dianas.
- 10 Se han usado varios enfoques, tales como estrategias de selección (evolución) *in vitro* para hacer evolucionar nuevos catalizadores de ácido nucleico capaces de catalizar una variedad de reacciones, tales como escisión y ligación de ligamientos fosfodiéster y ligamientos amida.
- El desarrollo de ribozimas que sean óptimas para la actividad catalítica contribuiría significativamente a cualquier
- 15 estrategia que emplee ribozimas de escisión de RNA con el fin de regular la expresión génica. La ribosoma de cabeza de martillo, por ejemplo, funciona con una tasa catalítica (kcat) de aproximadamente 1 min⁻¹ en presencia de concentraciones saturantes (10 mM) de cofactor Mg²⁺. Se ha mostrado que una ribozima "RNA ligasa" artificial cataliza la correspondiente reacción de automodificación con una tasa de aproximadamente 100 min⁻¹. Además, es conocido que ciertas ribozimas de cabeza de martillo modificadas que tienen brazos de unión a sustrato compuestos
- 20 por DNA catalizan la escisión de RNA con tasas de recambio múltiples que se acercan a 100 min⁻¹. Finalmente, el reemplazo de un residuo específico en el núcleo catalítico de la cabeza de martillo por ciertos análogos nucleotídicos da ribozimas modificadas que muestran tanto como 10 veces de mejora de la tasa catalítica. Estos hallazgos demuestran que las ribozimas pueden promover transformaciones químicas con tasas catalíticas que son significativamente mayores que las exhibidas *in vitro* por la mayoría de ribozimas de autoescisión naturales. Es
- 25 posible entonces que las estructuras de ciertas ribozimas de autoescisión puedan optimizarse, dando una actividad catalítica máxima, o que puedan elaborarse motivos de RNA enteramente nuevos que exhiban tasas significativamente más rápidas de escisión de RNA-fosfodiéster.
- La escisión intermolecular de un sustrato de RNA por un catalizador de RNA que se ajusta al modelo de "cabeza de
- 30 martillo" se mostró por primera vez en 1987. El catalizador de RNA se recuperó y se hizo reaccionar con múltiples moléculas de RNA, demostrando que era verdaderamente catalítico.
- Los RNA catalíticos diseñados basándose en el motivo de "cabeza de martillo" se han usado para escindir
- 35 secuencias diana específicas haciendo los cambios de base apropiados en el RNA catalítico para mantener el apareamiento de bases necesario con las secuencias diana. Esto ha permitido el uso de RNA catalítico para escindir secuencias diana específicas e indica que los RNA catalíticos diseñados de acuerdo con el modelo de "cabeza de martillo" pueden escindir posiblemente RNA sustrato específicos *in vivo*.
- La interferencia de RNA (RNAi) se ha convertido en una poderosa herramienta para modular la expresión génica en
- 40 mamíferos y células de mamífero. Este enfoque requiere el suministro de RNA interferente pequeño (siRNA) como RNA mismo o como DNA, usando un plásmido de expresión o virus, y la secuencia de codificación de RNA de horquilla pequeños que se procesan hasta siRNA. Este sistema posibilita un transporte eficiente de los pre-siRNA al citoplasma, donde son activos y permiten el uso de promotores regulados y específicos de tejido para expresión
- 45 génica.
- En un aspecto, un oligonucleótido o compuesto antisentido comprende un oligómero o polímero de ácido ribonucleico (RNA) y/o ácido desoxirribonucleico (DNA) o un mimético, quimera, análogo u homólogo del mismo. Este término incluye oligonucleótidos compuestos por nucleótidos de origen natural, azúcares y ligamientos internucleosídicos covalentes (esqueleto) así como oligonucleótidos que tienen porciones de origen no natural que
- 50 funcionan de modo similar. Dichos oligonucleótidos modificados o sustituidos se desean a menudo frente a las formas nativas debido a propiedades deseables tales como, por ejemplo, captación celular mejorada, afinidad mejorada por un ácido nucleico diana y estabilidad aumentada en presencia de nucleasas.
- De acuerdo con la presente divulgación, los oligonucleótidos o "compuestos antisentido" incluyen oligonucleótidos
- 55 antisentido (p.ej., RNA, DNA, miméticos, quimeras, análogos u homólogos de los mismos), ribozimas, oligonucleótidos de secuencia de guía externa (EGS), compuestos de siRNA, compuestos de interferencia de RNA (RNAi) mono- o bicatenarios tales como compuestos de siRNA, saRNA, aRNA y otros compuestos oligoméricos que hibridan con al menos una porción del ácido nucleico diana y modulan su función. Como tales, pueden ser DNA, RNA, de tipo DNA, de tipo RNA o mezclas de los mismos, o pueden ser miméticos de uno o más de estos. Estos

compuestos pueden ser compuestos oligoméricos monocatenarios, bicatenarios, circulares o en horquilla y pueden contener elementos estructurales tales como protuberancias, desapareamientos o bucles internos o terminales. Los compuestos antisentido se preparan rutinariamente de forma lineal, pero pueden unirse o prepararse de otro modo para ser circulares y/o ramificados. Los compuestos antisentido pueden incluir constructos tales como, por ejemplo, 5 dos hebras hibridadas formando un compuesto total o parcialmente bicatenario o una sola hebra con suficiente autocomplementariedad para permitir la hibridación y formación de un compuesto total o parcialmente bicatenario. Las dos hebras pueden ligarse internamente dejando extremos 3' o 5' libres o pueden ligarse formando una estructura de horquilla continua o bucle. La estructura de horquilla puede contener un saliente en el extremo 5' o 3' que produce una extensión de carácter monocatenario. Los compuestos bicatenarios pueden incluir opcionalmente 10 salientes en los extremos. Modificaciones adicionales pueden incluir grupos conjugados enlazados con uno de los extremos, posiciones nucleotídicas seleccionadas, posiciones de azúcar o uno de los ligamentos internucleosídicos. Como alternativa, las dos hebras pueden ligarse a través de un resto no de ácido nucleico grupo ligador. Cuando se forma a partir de solo una hebra, el dsRNA puede tomar la forma de una molécula de tipo horquilla autocomplementaria que se duplica sobre sí misma formando un dúplex. Por tanto, los dsRNA pueden ser total o 15 parcialmente bicatenarios. Puede conseguirse la modulación específica de la expresión génica mediante la expresión estable de horquillas de dsRNA en líneas celulares transgénicas. Cuando se forman a partir de dos hebras, o una sola hebra que toma la forma de una molécula de tipo horquilla autocomplementaria duplicada sobre sí misma formando un dúplex, las dos hebras (o regiones formadoras de dúplex de una sola hebra) son hebras de RNA complementarias que se aparean por bases de modo Watson-Crick.

20 Una vez introducidos en un sistema, los compuestos de la divulgación pueden desencadenar la acción de una o más enzimas o proteínas estructurales para efectuar la escisión u otra modificación del ácido nucleico diana, o pueden funcionar mediante mecanismos basados en la ocupación. En general, los ácidos nucleicos (incluyendo oligonucleótidos) pueden describirse como "de tipo DNA" (es decir, que tienen generalmente uno o más 2'-desoxiazúcares y, generalmente, bases T en lugar de U) o "de tipo RNA" (es decir, que tienen generalmente uno o 25 más 2'-hidroxiazúcares o azúcares 2'-modificados y, generalmente, bases U en lugar de T). Las hélices de ácido nucleico pueden adoptar más de un tipo de estructura, lo más comúnmente las formas A y B. Se cree que, en general, los oligonucleótidos que tienen estructura de tipo B son "de tipo DNA" y aquellos que tienen estructura de tipo A son "de tipo RNA". En algunos aspectos (quiméricos), un compuesto antisentido puede contener tanto 30 regiones de forma A como B.

Los compuestos antisentido de acuerdo con esta divulgación pueden comprender una porción antisentido de aproximadamente 5 a aproximadamente 80 nucleótidos (es decir, de aproximadamente 5 a aproximadamente 80 nucleósidos ligados) de longitud. Esto hace referencia a la longitud de la hebra antisentido o porción del compuesto 35 antisentido. En otras palabras, un compuesto antisentido monocatenario de la divulgación comprende de 5 a aproximadamente 80 nucleótidos, y un compuesto antisentido bicatenario de la divulgación (tal como un dsRNA, por ejemplo) comprende una hebra con sentido y otra antisentido o porción de 5 a aproximadamente 80 nucleótidos de longitud. Un especialista en la materia apreciará 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, 40 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 intermedio.

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

En un aspecto, los compuestos antisentido u oligonucleotídicos de la divulgación tienen porciones antisentido de 12 50 o 13 a 30 nucleótidos de longitud. Un especialista en la materia apreciará que esto representa 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 o 30 nucleótidos de longitud, o cualquier intervalo intermedio.

En otro aspecto, los compuestos oligoméricos de la presente divulgación incluyen también variantes en que está 55 presente una base diferente en una o más de las posiciones nucleotídicas en el compuesto. Por ejemplo, si el primer nucleótido es una adenosina, pueden producirse variantes que contienen timidina, guanósina o citidina en esta posición. Esto puede hacerse en cualquiera de las posiciones de los compuestos antisentido o de dsRNA. Estos compuestos se ensayan entonces usando los procedimientos descritos en la presente memoria para determinar su capacidad de inhibir la expresión de un ácido nucleico diana.

En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencia o complementariedad entre el compuesto antisentido y la diana es de aproximadamente 40 % a aproximadamente 60 %. En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencia o complementariedad entre el compuesto antisentido y la diana es de aproximadamente 60 % a aproximadamente 70 %. En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencia o complementariedad entre el compuesto antisentido y la diana es de aproximadamente 70 % a aproximadamente 80 %. En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencia o complementariedad entre el compuesto antisentido y la diana es de aproximadamente 80 % a aproximadamente 90 %. En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencia o complementariedad entre el compuesto antisentido y la diana es de aproximadamente 90 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 %, aproximadamente 99 % o aproximadamente 100%.

En otro aspecto, los oligonucleótidos antisentido, tales como por ejemplo las moléculas de ácido nucleico expuestas en las SEQ ID NO: 7 a 31, comprenden una o más sustituciones o modificaciones. En un aspecto, los nucleótidos están sustituidos con ácidos nucleicos bloqueados (LNA).

En otro aspecto, los oligonucleótidos se orientan a una o más regiones de las moléculas de ácido nucleico con sentido y/o antisentido de secuencias codificantes y/o no codificantes asociadas a adiponectina (ADIPOQ) y las secuencias expuestas como las SEQ ID NO: 1 a 6. Los oligonucleótidos se orientan también a regiones superpuestas de las SEQ ID NO: 1 a 6.

Ciertos oligonucleótidos de esta divulgación son oligonucleótidos quiméricos. "Oligonucleótidos quiméricos" o "quimeras" en el contexto de esta divulgación son oligonucleótidos que contienen dos o más regiones químicamente distintas, cada una compuesta por al menos un nucleótido. Estos oligonucleótidos contienen típicamente al menos una región de nucleótidos modificados que confiere una o más propiedades beneficiosas (tales como, por ejemplo, resistencia a nucleasa aumentada, captación aumentada en células, afinidad de unión aumentada por la diana) y una región que es un sustrato para enzimas capaces de escindir híbridos de RNA:DNA o RNA:RNA. A modo de ejemplo, la RNAasa H es una endonucleasa celular que escinde la hebra de RNA de un dúplex de RNA:DNA. La activación de la RNAasa H, por lo tanto, da como resultado la escisión de la diana de RNA, mejorando así en gran medida la eficiencia de la modulación antisentido de la expresión génica. En consecuencia, pueden obtenerse a menudo resultados comparables con oligonucleótidos más cortos cuando se usan oligonucleótidos quiméricos, en comparación con desoxi oligonucleótidos de fosforotioato que hibridan con la misma región diana. La escisión de la diana de RNA puede detectarse rutinariamente por electroforesis en gel y, si es necesario, técnicas de hibridación de ácido nucleico asociadas conocidas en la materia. En un aspecto, un oligonucleótido quimérico comprende al menos una región modificada para aumentar la afinidad de unión de la diana y, habitualmente, una región que actúa como sustrato para RNAasa H. La afinidad de un oligonucleótido por su diana (en este caso, un ácido nucleico que codifica ras) se determina rutinariamente midiendo la T_m de un par oligonucleótido/diana, que es la temperatura a la que se disocian oligonucleótido y diana; la disociación se detecta espectrofotométricamente. Cuanto mayor es la T_m, mayor es la afinidad del oligonucleótido por la diana.

Los compuestos antisentido quiméricos de la divulgación pueden formarse como estructuras compuestas de dos o más oligonucleótidos, oligonucleótidos modificados, oligonucleósidos y/o miméticos de oligonucleótidos como se describen anteriormente. Se hace referencia también a dichos compuestos en la materia como híbridos o gápmers. Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de dichos híbridos comprenden, pero sin limitación, las patentes de EE.UU. n^o 5.013.830, 5.149.797, 5.220.007, 5.256.775, 5.366.878, 5.403.711, 5.491.133, 5.565.350, 5.623.065, 5.652.355, 5.652.356 y 5.700.922.

En otro aspecto, la región del oligonucleótido que está modificada comprende al menos un nucleótido modificado en la posición 2' del azúcar, lo más preferiblemente un nucleótido modificado con 2'-O-alquilo, 2'-O-alquil-O-alquilo o 2'-fluoro. En otros aspectos, las modificaciones de RNA incluyen modificaciones de 2'-fluoro, 2'-amino y 2'-O-metilo en la ribosa de pirimidinas, residuos abásicos o una base invertida en el extremo 3' del RNA. Dichas modificaciones se incorporan rutinariamente a oligonucleótidos y se ha mostrado que estos oligonucleótidos tienen una mayor T_m (es decir, mayor afinidad de unión por diana) que los 2'-desoxi oligonucleótidos contra una diana dada. El efecto de dicha afinidad aumentada es mejorar en gran medida la inhibición por oligonucleótido de RNAi de la expresión génica. La RNAasa H es una endonucleasa celular que escinde la hebra de RNA de dúplex de RNA:DNA; la activación de esta enzima da como resultado por lo tanto la escisión del RNA diana, y por tanto puede mejorar en gran medida la eficiencia de la inhibición de RNAi. La escisión de la diana de RNA puede demostrarse rutinariamente por electroforesis en gel. En otro aspecto, el oligonucleótido quimérico se modifica también para mejorar la resistencia a nucleasa. Las células contienen una variedad de exo- y endonucleasas que pueden degradar ácidos nucleicos. Se

ha mostrado que una serie de modificaciones nucleotídicas y nucleosídicas hacen más resistente al oligonucleótido en el que se incorporan ante la digestión con nucleasa que el oligodesoxinucleótido nativo. La resistencia a nucleasa se mide rutinariamente incubando oligonucleótidos con extractos celulares o soluciones de nucleasa aislada y midiendo la extensión del oligonucleótido intacto restante con el tiempo, habitualmente por electroforesis en gel. Los oligonucleótidos que se han modificado para potenciar su resistencia a nucleasa sobreviven intactos durante más tiempo que los oligonucleótidos no modificados. Se ha demostrado que una variedad de modificaciones oligonucleotídicas mejoran o confieren resistencia a nucleasa. Los oligonucleótidos que contienen al menos una modificación fosforotioato son actualmente más preferidos. En algunos casos, las modificaciones oligonucleotídicas que mejoran la afinidad de unión a diana son también capaces, independientemente, de mejorar la resistencia a nucleasa. Pueden encontrarse algunas modificaciones deseables en De Mesmaeker *et al.* (1995) *Acc. Chem. Res.*, 28: 366-374.

Los ejemplos específicos de algunos oligonucleótidos concebidos por esta divulgación incluyen aquellos que comprenden esqueletos modificados, por ejemplo fosforotioatos, fosfotriésteres, metilfosfonatos, ligamientos entre azúcar de alquilo o cicloalquilo de cadena corta o ligamientos entre azúcar heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta. La mayoría son oligonucleótidos con esqueletos de fosforotioato y aquellos con esqueletos heteroatómicos, particularmente esqueletos de CH₂-NH-O-CH₂, CH₂-N(CH₃)-O-CH₂ [conocido como metileno(metilimino) o esqueleto de MMI], CH₂-O-N(CH₃)-CH₂, CH₂-N(CH₃)-N(CH₃)-CH₂ y O-N(CH₃)-CH₂-CH₂, donde el esqueleto de fosfodiéster nativo se representa como O-P-O-CH. Los esqueletos de amida divulgados por De Mesmaeker *et al.* (1995) *Acc. Chem. Res.* 28: 366-374 son también preferidos. También lo son los oligonucleótidos que tienen estructuras de esqueleto de morfolino (Summerton y Weller, patente de EE.UU. nº 5.034.506). En otros aspectos, tales como el esqueleto de ácido peptidonucleico (PNA), el esqueleto de fosfodiéster del oligonucleótido se reemplaza por un esqueleto de poliamida, estando unidos los nucleótidos directa o indirectamente a los átomos de nitrógeno azoicos del esqueleto de poliamida. Los oligonucleótidos pueden comprender también uno o más restos de azúcar sustituidos, oligonucleótidos que comprenden uno de los siguientes en posición 2': OH, SH, SCH₃, F, OCN, OCH₃OCH₃, OCH₃-O(CH₂)_nCH₃, O(CH₂)_nNH₂ u O(CH₂)_nCH₃ donde n es de 1 a aproximadamente 10; alquilo inferior C1 a C10, alcoxi-alcoxi, alquilo, alcarilo o aralquilo inferior sustituido; 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 RNA; un grupo reportero; un intercalante; un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un oligonucleótido y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. Una modificación incluye 2'-metoxietoxilo [2'-O-CH₂CH₂OCH₃, también conocido como 2'-O-(2-metoxietilo)]. Otras modificaciones incluyen 2'-metoxilo (2'-O-CH₃), 2'-propoxilo (2'-OCH₂CH₂CH₃) y 2'-fluoro (2'-F). Pueden hacerse también modificaciones similares en otras posiciones del oligonucleótido, particularmente la posición 3' del azúcar en el nucleótido 3' terminal y la posición 5' del nucleótido 5' terminal. Los oligonucleótidos pueden tener también miméticos de azúcar tales como ciclobutilos en lugar del grupo pentofuranosilo.

Los oligonucleótidos pueden incluir también, adicionalmente o como alternativa, modificaciones o sustituciones de nucleobase (a la que se hace referencia a menudo en la materia simplemente como "base"). Como se usa en la presente memoria, los nucleótidos "no modificados" o "naturales" incluyen adenina (A), guanina (G), timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Los nucleótidos modificados incluyen nucleótidos encontrados solo infrecuente o transitoriamente en ácidos nucleicos naturales, p.ej., hipoxantina, 6-metiladenina, 5-Me-pirimidinas, particularmente 5-metilcitosina (a la que se hace referencia también como 5-metil-2'-desoxicitosina y a la que se hace referencia a menudo en la técnica como 5-Me-C), 5-hidroximetilcitosina (HMC), glicosil-HMC y gentobiosil-HMC, así como nucleótidos sintéticos, p.ej. 2-aminoadenina, 2-(metilamino)adenina, 2-(imidazolilalquil)adenina, 2-(aminoalquilamino)adenina u otras alquiladeninas heterosustituidas, 2-tiouracilo, 2-tiotimina, 5-bromouracilo, 5-hidroximetiluracilo, 8-azaguanina, 7-desazaguanina, N₆,(6-aminohexil)adenina y 2,6-diaminopurina. Puede incluirse una base "universal" conocida en la materia, p.ej., inosina. Las sustituciones de 5-Me-C se ha mostrado que aumentan la estabilidad del dúplex de ácido nucleico 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, pág. 276-278) y son actualmente sustituciones básicas.

Otra modificación de los oligonucleótidos de la divulgación implica el ligamiento químico con el oligonucleótido de uno o más restos o conjugados que mejoren la actividad o captación celular del oligonucleótido. Dichos restos incluyen, pero sin limitación, restos lipídicos tales como un resto de colesterol, un resto de colesterilo, un tioéter, p.ej. hexil-S-tritilol, un tiocolesterol, una cadena alifática, p.ej. residuos de dodecanodiol o undecilo, un fosfolípido, p.ej. dihexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato de trietilamonio, una poliamina o una cadena de polietilenglicol, o ácido adamantanoacético. Los oligonucleótidos que comprenden restos lipófilos, y

procedimientos para preparar dichos oligonucleótidos, son conocidos en la materia, 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 estén modificadas uniformemente, y de hecho pueden incorporarse más de una de las modificaciones anteriormente mencionadas a un solo oligonucleótido o incluso en un solo nucleósido en un oligonucleótido. La presente divulgación incluye también oligonucleótidos que son oligonucleótidos quiméricos como se definen anteriormente en la presente memoria.

En otro aspecto, la molécula de ácido nucleico de la presente divulgación está conjugada con otro resto incluyendo, pero sin limitación, nucleótidos abásicos, compuestos de poliéter, poliamina, poliamidas, péptidos, carbohidratos, lípidos o polihidrocarburos. Los especialistas en la materia reconocerán que estas moléculas pueden ligarse con uno más de cualquier nucleótido que comprenda la molécula de ácido nucleico en varias posiciones en el azúcar, base o grupo fosfato.

Los oligonucleótidos usados de acuerdo con esta divulgación pueden elaborarse conveniente y rutinariamente mediante la técnica bien conocida de síntesis en fase sólida. El equipo de dicha síntesis se vende por varios vendedores, incluyendo Applied Biosystems. Puede emplearse también cualquier otro medio para dicha síntesis; la síntesis real de los oligonucleótidos está dentro de las capacidades de un especialista en la materia. Es también bien conocido usar técnicas similares para preparar otros oligonucleótidos tales como los fosforotioatos y derivados alquilados. Es también bien conocido usar técnicas similares y amiditas modificadas comercialmente disponibles y productos de vidrio de poro controlado (CPG) tales como amiditas modificadas con biotina, fluoresceína, acridina o psoraleno y/o CPG (disponible en Glen Research, Sterling VA) para sintetizar oligonucleótidos marcados fluorescentemente, biotinilados u otros modificados tales como oligonucleótidos modificados con colesterol.

De acuerdo con la divulgación, el uso de modificaciones tales como el uso de monómeros de LNA para mejorar la potencia, especificidad y duración de la acción y ampliar las vías de administración de oligonucleótidos comprendía químicas actuales tales como de MOE, ANA, FANA, PS, etc. Esto puede conseguirse sustituyendo algunos de los monómeros en los oligonucleótidos actuales por monómeros de LNA. El oligonucleótido modificado de LNA puede tener un tamaño similar al compuesto original o puede ser mayor o preferiblemente menor. Es que dichos oligonucleótidos modificados con LNA contienen menos de aproximadamente un 70 %, más preferiblemente menos de aproximadamente un 60 %, lo más preferiblemente menos de aproximadamente un 50 % de monómeros de LNA y que sus tamaños están entre aproximadamente 5 y 25 nucleótidos, más preferiblemente entre aproximadamente 12 y 20 nucleótidos.

Los esqueletos oligonucleotídicos modificados comprenden, pero sin limitación, fosforotioatos, fosforotioatos quirales, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, metilfosfonatos y otros alquilfosfonatos comprendiendo 3'-alquilenfosfonatos y fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidatos comprendiendo 3'-aminofosforamidato y aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionalquilfosfonatos, tionalquilfosfotriésteres y boranofosfonatos que tienen ligamientos 3'-5' normales, análogos ligados 2'-5' de estos y aquellos que tienen una polaridad invertida donde los pares adyacentes de unidades nucleosídicas están ligadas de 3'-5' a 5'-3' o de 2'-5' a 5'-2'. Se incluyen también diversas sales, sales mixtas y formas de ácido libre.

Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de los ligamientos que contienen fósforo anteriores comprenden, pero sin limitación, 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.

Los esqueletos oligonucleotídicos modificados que no incluyen un átomo de fósforo en los mismos tienen esqueletos que están formados por ligamientos internucleosídicos de alquilo o cicloalquilo de cadena corta, ligamientos internucleosídicos heteroatómicos mixtos y de alquilo o cicloalquilo o uno o más ligamientos internucleosídicos heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta. Estos comprenden aquellos que tienen ligamientos morfolino (formados en parte a partir de la porción de azúcar de un nucleósido); esqueletos de siloxano; esqueletos de sulfuro, sulfóxido y sulfona; esqueletos de formacetilo y tioformacetilo; esqueletos de metilenformacetilo y tioformacetilo; esqueletos que contienen alqueno; esqueletos de sulfamato; esqueletos de metilenimino y metilenhidrazino; esqueletos de sulfona y sulfonamida; esqueletos de amida y otros que tienen partes componentes de N, O, S y CH₂ mixtas.

Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de los oligonucleótidos anteriores

comprenden, pero sin limitación, 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.

5

En otros miméticos de oligonucleótidos, tanto el azúcar como el ligamiento internucleosídico, es decir el esqueleto, de las unidades nucleotídicas se reemplaza por grupos novedosos. Las unidades básicas se mantienen para hibridación con un compuesto diana de ácido nucleico apropiado. Se hace referencia a uno de dichos compuestos oligoméricos, un mimético de oligonucleótido que se ha mostrado que tiene excelentes propiedades de hibridación, como un ácido peptidonucleico (PNA). En los compuestos de PNA, el esqueleto de azúcar de un oligonucleótido se reemplaza por un esqueleto que contiene amida, en particular un esqueleto de aminoetilglicina. Las nucleobases se retienen y se unen directa o indirectamente a los átomos de nitrógeno azoicos de la porción amida del esqueleto. Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de compuestos de PNA comprenden, pero sin limitación, las patentes de EE.UU. nº5.539.082, 5.714.331 y 5.719.262. Pueden encontrarse enseñanzas adicionales de compuestos de PNA en Nielsen, *et al.* (1991) *Science* 254,1497-1500.

En otro aspecto de la divulgación, los oligonucleótidos con esqueletos de fosforotioato y oligonucleósidos con esqueletos heteroatómicos y, en particular, -CH₂-NH-O-CH₂-, -CH₂-N(CH₃)-O-CH₂-, conocido como metilimino (metilimino) o esqueleto de MMI, -CH₂-O-N(CH₃)-CH₂-, -CH₂N(CH₃)-N(CH₃)CH₂- y -ON(CH₃)-CH₂-CH₂- donde el esqueleto de fosfodiéster nativo se representa como -O-P-O-CH₂- de la patente de EE.UU. anteriormente referenciada nº 5.489.677 y los esqueletos de amida de la patente de EE.UU. anteriormente referenciada nº 5.602.240. También son oligonucleótidos que tienen estructuras de esqueleto de morfolino de la patente de EE.UU. anteriormente referenciada nº 5.034.506.

Los oligonucleótidos modificados pueden contener también uno o más restos de azúcar sustituidos. 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-alquino u O-alquil-O-alquilo, donde alquilo, alqueno y alquino pueden ser alquilo C a CO o alqueno y alquino C₂ a CO no sustituidos o sustituidos. Particularmente, son O(CH₂)_nO_mCH₃, 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 posición 2': (alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, alcarilo, aralquilo, O-alcarilo u O-aralquilo) C a CO, 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 RNA, un grupo reportero, un intercalante, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un oligonucleótido, y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. Una modificación comprende 2'-metoxietoxilo (2'-O-CH₂CH₂OCH₃, también conocido como 2'-O-(2-metoxietilo) o 2'-MOE), es decir, un grupo alcóxialcoxilo. Una modificación adicional comprende 2'-dimetilaminoxietoxilo, es decir un grupo O(CH₂)₂ON(CH₃)₂, también conocido como 2'-DMAOE, como se describe en los ejemplos siguientes de la presente memoria, y 2'-dimetilaminoetoxietoxilo (también conocido en la materia como 2'-O-dimetilaminoetoxietilo o 2'-DMAEOE), es decir 2'-O-CH₂-O-CH₂-N(CH₂)₂.

Otras modificaciones comprenden 2'-metoxilo (2'-OCH₃), 2'-aminopropoxilo (2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂) y 2'-fluoro (2'-F). Pueden hacerse también modificaciones similares en otras posiciones del oligonucleótido, particularmente la posición 3' en el azúcar del nucleótido 3' terminal o en oligonucleótidos ligados 2'-5' y en la posición 5' del nucleótido 5' terminal. Los oligonucleótidos pueden tener también miméticos de azúcar tales como restos de ciclobutilo en lugar de azúcar de pentofuranosilo. Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de dichas estructuras de azúcar modificadas comprenden, pero sin limitación, 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.

50

Los oligonucleótidos pueden comprender también modificaciones o sustituciones de nucleobase (a la que se hace referencia a menudo en la materia simplemente como "base"). Como se usa en la presente memoria, los nucleótidos "no modificados" o "naturales" comprenden las bases de purina adenina (A) y guanina (G), y las bases de pirimidina timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Los nucleótidos modificados comprenden otros nucleótidos sintéticos y naturales tales como 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetilcitosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, derivados de 6-metil y otros alquilos de adenina y guanina, derivados de 2-propilo y otros alquilos de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halogenouracilo y 5-halogenocitosina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina, 6-azouracilo, 6-azocitosina y 6-azotimina, 5-uracilo (seudouracilo), 4-tiouracilo, adeninas y guaninas sustituidas con 8-halógeno, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo y otras 8-sustituidas, uracilos y citosinas sustituidos con 5-

55

halógeno, particularmente 5-bromo, 5-trifluorometilo y otros 5-sustituídos, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 8-azaguanina y 8-azadenina, 7-desazaguanina y 7-desazadenina y 3-desazaguanina y 3-desazadenina.

Además, los nucleótidos comprenden aquellos divulgados en la patente de Estados Unidos nº 3.687.808, aquellos divulgados en "The Concise Encyclopedia of Polymer Science And Engineering", páginas 858-859, Kroschwitz, J.I., ed. John Wiley & Sons, 1990, aquellos divulgados por Englisch *et al.*, "Angewandte Chemie, International Edition", 1991, 30, página 613, y aquellos divulgados por Sanghvi, Y.S., capítulo 15, "Antisense Research and Applications", páginas 289-302, Crooke, S.T. y Lebleu, B. *et al.*, CRC Press, 1993. Ciertos de estos nucleótidos son particularmente útiles para aumentar la afinidad de unión de los compuestos oligoméricos de la divulgación. Estos comprenden pirimidinas 5-sustituídas, 6-azapirimidinas y purinas sustituidas en N-2, N-6 y 0-6, que comprenden 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. Las sustituciones de 5-metilcitosina se ha mostrado que aumentan la estabilidad de dúplex de ácido nucleico 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, pág. 276-278) y son actualmente sustituciones básicas, aún más particularmente cuando se combinan con modificaciones de azúcar 2'-Ometoxietilo.

Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de los nucleótidos modificados anteriormente señalados, así como otros nucleótidos modificados, comprenden, pero sin limitación: 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 divulgación implica ligar químicamente al oligonucleótido uno o más restos o conjugados que mejoren la actividad, distribución celular o captación celular del oligonucleótido.

Dichos restos comprenden, pero sin limitación, restos lipídicos tales como un resto de colesterol, ácido cólico, un tioéter, p.ej. hexil-S-tritilol, un tiocolesterol, una cadena alifática, p.ej., residuos de dodecanodiol o undecilo, un fosfolípido, p.ej., dihexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato de trietilamonio, una poliamina o una cadena de polietilenglicol, o ácido adamantanoacético, un resto palmitilo o un resto octadecilamina o hexilaminocarboniltoxicolesterol.

Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de dichos conjugados oligonucleotídicos comprenden, pero sin limitación, 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 divulgación pueden aplicarse también a las áreas del descubrimiento de fármacos y validación de dianas. La presente divulgación comprende el uso de los compuestos y segmentos diana identificados en la presente memoria en esfuerzos de descubrimiento de fármacos para dilucidar las relaciones que existen entre un polinucleótido de adiponectina (ADIPOQ) y un estado, fenotipo o afección patológica. Estos procedimientos incluyen detectar o modular un polinucleótido de adiponectina (ADIPOQ), que comprende poner en contacto una muestra, tejido, célula u organismo con los compuestos de la presente divulgación, medir el nivel de ácido nucleico o proteína de un polinucleótido de adiponectina (ADIPOQ) y/o un criterio de valoración fenotípico o químico relacionado en algún momento después del tratamiento y, opcionalmente, comparar el valor medido con una muestra no tratada o muestra tratada con un compuesto adicional de la divulgación. Estos procedimientos pueden efectuarse también en paralelo o en combinación con otros experimentos para determinar la función de genes desconocidos para el proceso de validación de fármacos o para determinar la validez de un producto génico particular como diana para el tratamiento o la prevención de una enfermedad, afección o fenotipo particular.

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

Puede valorarse la transferencia de un ácido nucleico exógeno a una célula u organismo hospedador detectando directamente la presencia de un ácido nucleico en la célula u organismo. Dicha detección puede conseguirse mediante varios procedimientos bien conocidos en la materia. Por ejemplo, la presencia de un ácido nucleico exógeno puede detectarse por Southern blot o por una técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que usa cebadores que amplifican específicamente secuencias nucleotídicas asociadas al ácido nucleico. La expresión

de los ácidos nucleicos exógenos puede medirse también usando procedimientos convencionales, incluyendo análisis de expresión génica. Por ejemplo, el mRNA producido por un ácido nucleico exógeno puede detectarse y cuantificarse usando una Northern blot y PCR de transcripción inversa (RT-PCR).

5 La expresión de RNA del ácido nucleico exógeno puede detectarse también midiendo una actividad enzimática o una actividad de enzima reportera. Por ejemplo, la actividad moduladora antisentido puede medirse indirectamente como una disminución o aumento de la expresión de ácido nucleico diana como una indicación de que el ácido nucleico exógeno produce el RNA efector. Basándose en la conservación de secuencia, pueden diseñarse cebadores y usarse para amplificar regiones codificantes de los genes diana. Inicialmente, la región codificante más expresada de cada gen puede usarse para construir un gen de control modelo, aunque puede usarse cualquier región codificante o no codificante. Cada gen de control se ensambla insertando cada región codificante entre una región codificante reportera y su señal de poli(A). Estos plásmidos producirían un mRNA con un gen reportero en la porción en dirección 5' del gen y una diana de RNAi potencial en la región 3' no codificante. La efectividad de los oligonucleótidos antisentido individuales se ensayaría mediante la modulación del gen reportero. Los genes reporteros útiles en los procedimientos de la presente divulgación incluyen acetohidroxiácido sintasa (AHAS), fosfatasa alcalina (AP), beta-galactosidasa (LacZ), beta-glucoronidasa (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. Están disponibles marcadores seleccionables múltiples que confieren resistencia a ampicilina, bleomicina, cloranfenicol, gentamicina, higromicina, kanamicina, lincomicina, metotrexato, fosfotricina, puromicina y tetraciclina. Los procedimientos para determinar la modulación de un gen reportero son bien conocidos en la materia e incluyen, pero sin limitación, procedimientos fluorométricos (p.ej., espectroscopia de fluorescencia, clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), microscopia de fluorescencia) y determinación de la resistencia a antibióticos.

25 Las proteínas ADIPOQ1 y ADIPOQ2 y la expresión de mRNA pueden ensayarse usando procedimientos conocidos por los especialistas en la materia y descritos en otro lugar de la presente memoria. Por ejemplo, pueden usarse inmunoensayos tales como ELISA para medir niveles de proteína. Los anticuerpos de adiponectina (ADIPOQ) para ELISA están disponibles comercialmente, p.ej. en R&D Systems (Mineápolis, MN) y Abeam, Cambridge, MA.

30 En aspectos, se evalúa para comparación la expresión de ADIPOQ1 y ADIPOQ2 (p.ej., mRNA o proteína) en una muestra (p.ej., células o tejidos *in vivo* o *in vitro*) tratada usando un oligonucleótido antisentido de la divulgación con la expresión de adiponectina (ADIPOQ) en una muestra de control. Por ejemplo, puede compararse la expresión de la proteína o ácido nucleico, usando procedimientos conocidos por los especialistas en la materia, con la de una muestra tratada ficticiamente o no tratada. Como alternativa, puede hacerse la comparación con una muestra tratada con un oligonucleótido antisentido de control (p.ej., uno que tiene una secuencia alterada o diferente) dependiendo de la información deseada. En otro aspecto, puede compararse una diferencia en la expresión de la proteína o ácido nucleico de adiponectina (ADIPOQ) en una muestra tratada frente a no tratada con la diferencia en expresión de un ácido nucleico diferente (incluyendo cualquier patrón considerado apropiado por el investigador, p.ej. un gen doméstico) en una muestra tratada frente a una muestra no tratada

Las diferencias observadas pueden expresarse como se desee, p.ej., en forma de una relación o fracción, para uso en una comparación con control. En aspectos, el nivel de un mRNA o proteína de adiponectina (ADIPOQ) en una muestra tratada con un oligonucleótido antisentido de la presente divulgación aumenta o disminuye de aproximadamente 1,25 veces a aproximadamente 10 veces o más respecto a una muestra no tratada o muestra tratada con un ácido nucleico de control. En aspectos, el nivel de un mRNA o proteína de adiponectina (ADIPOQ) aumenta o disminuye al menos aproximadamente 1,25 veces, al menos 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 terapia

Los compuestos de la presente divulgación pueden utilizarse para diagnóstico, terapia y profilaxis y como agentes

de investigación y componentes de kits. Además, los oligonucleótidos antisentido, que son capaces de inhibir la expresión génica con exquisita especificidad, se usan a menudo por los especialistas en la materia para dilucidar la función de genes particulares o para distinguir entre las funciones de varios miembros de una ruta biológica.

- 5 Para uso en kits y diagnóstico y en diversos sistemas biológicos, los compuestos de la presente divulgación, solos o en combinación con otros compuestos o terapias, son útiles como herramientas en análisis diferenciales y/o combinatorios para dilucidar los patrones de expresión de una porción o del complemento completo de genes expresados en células y tejidos.
- 10 Como se usa en la presente memoria, 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 de adiponectina (ADIPOQ). Estos incluyen, pero sin limitación, seres humanos, animales transgénicos, células, cultivos celulares, tejidos, xenoinjertos, trasplantes y combinaciones de los mismos.
- 15 Como ejemplo no limitante, se comparan patrones de expresión en células o tejidos tratados con uno o más compuestos antisentido con células o tejidos de control no tratados con compuestos antisentido y se analizan en los patrones producidos los niveles diferenciales de expresión génica según atañan, por ejemplo, a asociación patológica, ruta de señalización, localización celular, nivel de expresión, tamaño, estructura o función de los genes examinados. Estos análisis pueden efectuarse en células estimuladas o no estimuladas y en presencia o ausencia de otros compuestos que afecten a los patrones de expresión.
- 20

Los ejemplos de procedimientos de análisis de expresión génica conocidos en la materia incluyen matrices o micromatrices de DNA (Brazma y Vilo, (2000) *FEBS Lett.*, 480, 17-24; Celis, *et al.*, (2000) *FEBS Lett.*, 480, 2-16), SAGE (análisis en serie de la expresión génica) (Madden, *et al.*, (2000) *Drug Discov. Today*, 5, 415-425), READS (amplificación por enzimas de restricción de cDNA digeridos) (Prashar y Weissman, (1999) *Methods Enzymol.*, 303, 258-72), TOGA (análisis de expresión génica total) (Sutcliffe, *et al.*, (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 97, 1976-81), matrices proteicas y proteómica (Celis, *et al.*, (2000) *FEBS Lett.*, 480, 2-16; Jungblut, *et al.*, *Electrophoresis*, 1999, 20, 2100-10), secuenciación de marcador de secuencia expresada (EST) (Celis, *et al.*, *FEBS Lett.*, 2000, 480, 2-16; Larsson, *et al.*, *J. Biotechnol.*, 2000, 80, 143-57), identificación de RNA sustractiva (SuRF) (Fuchs, *et al.*, (2000) *Anal. Biochem.* 286, 91-98; Larson, *et al.*, (2000) *Cytometry* 41, 203-208), clonación sustractiva con exposición diferencial (DD) (Jurecic y Belmont, (2000) *Curr. Opin. Microbiol.* 3, 316-21), hibridación genómica comparativa (Carulli, *et al.*, (1998) *J. Cell. Biochem. Suppl.*, 31, 286-96), técnicas de FISH (hibridación fluorescente *in situ*) (Going y Gusterson, (1999) *Eur. J. Cancer*, 35, 1895-904) y procedimientos de espectrometría de masas (To, Comb. (2000) *Chem. High ThroughputScreen*, 3, 235-41).

35

Los compuestos de la divulgación son útiles para investigación y diagnóstico porque estos compuestos hibridan con ácidos nucleicos que codifican una adiponectina (ADIPOQ). Por ejemplo, los oligonucleótidos que hibridan con dicha eficiencia y en dichas condiciones como se divulgan en la presente memoria por ser moduladores efectivos de adiponectina (ADIPOQ), son cebadores o sondas efectivos en condiciones que favorezcan la amplificación o detección génica, respectivamente. Estos cebadores y sondas son útiles en procedimientos que requieren la detección específica de moléculas de ácido nucleico que codifican una adiponectina (ADIPOQ) y en la amplificación de dichas moléculas de ácido nucleico para la detección o para el uso en estudios adicionales de una adiponectina (ADIPOQ). La hibridación de los oligonucleótidos antisentido, particularmente cebadores y sondas, de la divulgación con un ácido nucleico que codifica una adiponectina (ADIPOQ) puede detectarse mediante medios conocidos en la materia. Dichos medios pueden incluir conjugación de una enzima con el oligonucleótido, radiomarcaje del oligonucleótido o cualquier otro medio de detección adecuado. Pueden prepararse también kits que usan dichos medios de detección para detectar el nivel de una adiponectina (ADIPOQ) en una muestra.

40

45

La especificidad y sensibilidad de los compuestos antisentido son también aprovechados por los especialistas en la materia para usos terapéuticos. Los compuestos antisentido se han empleado como restos terapéuticos en el tratamiento de estados patológicos en animales, incluyendo seres humanos. Los fármacos oligonucleotídicos antisentido se han administrado segura y efectivamente a seres humanos y están actualmente en ejecución numerosos ensayos clínicos. Está por tanto establecido que los compuestos antisentido pueden ser modalidades terapéuticas útiles que pueden configurarse para ser útiles en regímenes de tratamiento para el tratamiento de células, tejidos y animales, especialmente seres humanos.

50

55

Para terapia, se trata un animal, preferiblemente un ser humano, sospechoso de tener una enfermedad o trastorno que pueda tratarse modulando la expresión de un polinucleótido de adiponectina (ADIPOQ) mediante la administración de compuestos antisentido de acuerdo con esta divulgación. Por ejemplo, en un aspecto no limitante,

los procedimientos comprenden la etapa de administrar al animal necesitado de tratamiento una cantidad terapéuticamente efectiva de un modulador de adiponectina (ADIPOQ). Los moduladores de adiponectina (ADIPOQ) de la presente divulgación modulan efectivamente la actividad de una adiponectina (ADIPOQ) o modulan la expresión de una proteína de adiponectina (ADIPOQ). En un aspecto, se inhibe la actividad o expresión de una adiponectina (ADIPOQ) en un animal en aproximadamente un 10 % en comparación con un control. Preferiblemente, se inhibe la actividad o expresión de una adiponectina (ADIPOQ) en un animal en aproximadamente un 30 %. Más preferiblemente, se inhibe la actividad o expresión de una adiponectina (ADIPOQ) en un animal en un 50 % o más. Por tanto, los compuestos oligoméricos modulan la expresión de un mRNA de adiponectina (ADIPOQ) en al menos un 10 %, en al menos un 50 %, en al menos un 25 %, en al menos un 30 %, en al menos un 40 %, en al menos un 50 %, en al menos un 60 %, en el menos un 70 %, en al menos un 75 %, en al menos un 80 %, en al menos un 85 %, en al menos un 90 %, en al menos un 95 %, en al menos un 98 %, en al menos un 99 % o en al menos un 100 % en comparación con un control.

En un aspecto, la actividad o expresión de una adiponectina (ADIPOQ) y/o en un animal aumenta en aproximadamente un 10 % en comparación con un control. Preferiblemente, la actividad o expresión de una adiponectina (ADIPOQ) en un animal aumenta en aproximadamente un 30 %. Más preferiblemente, la actividad o expresión de una adiponectina (ADIPOQ) en un animal aumenta en un 50 % o más. Por tanto, los compuestos oligoméricos modulan la expresión de un mRNA de adiponectina (ADIPOQ) en al menos un 10 %, en al menos un 50 %, en al menos un 25 %, en al menos un 30 %, en al menos un 40 %, en al menos un 50 %, en al menos un 60 %, en al menos un 70 %, en al menos un 75 %, en al menos un 80 %, en al menos un 85 %, en al menos un 90 %, en al menos un 95 %, en al menos un 98 %, en al menos un 99 % o en al menos un 100 % en comparación con un control.

Por ejemplo, la reducción de la expresión de una adiponectina (ADIPOQ) puede medirse en suero, sangre, tejido adiposo, hígado o cualquier otro fluido corporal, tejido u órgano del animal. Preferiblemente, las células contenidas en dichos fluidos, tejidos u órganos que se están analizando contienen una molécula de ácido nucleico que codifica péptidos de adiponectina (ADIPOQ) y/o la proteína adiponectina (ADIPOQ) misma.

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

Conjugados: Otra modificación de los oligonucleótidos de la divulgación implica ligar químicamente con el oligonucleótido uno o más restos o conjugados que mejoren la actividad, distribución celular o captación celular del oligonucleótido. Estos restos o conjugados pueden incluir grupos conjugados unidos covalentemente con grupos funcionales tales como grupos hidroxilo primario o secundario. Los grupos conjugados de la divulgación incluyen intercalantes, moléculas reporteras, poliaminas, poliamidas, polietilenglicoles, poliéteres, grupos que mejoran las propiedades farmacodinámicas de oligómeros y grupos que mejoran las propiedades farmacocinéticas de oligómeros. Los grupos conjugados típicos incluyen colesterolos, lípidos, fosfolípidos, biotina, fenazina, folato, fenantridina, antraquinona, acridina, fluoresceínas, rodaminas, cumarinas y tintes. Los grupos que mejoran las propiedades farmacodinámicas, en el contexto de esta divulgación, incluyen grupos que mejoran la captación, mejoran la resistencia a la degradación y/o refuerzan la hibridación específica de secuencia con el ácido nucleico diana. Los grupos que mejoran las propiedades farmacocinéticas, en el contexto de esta divulgación, incluyen grupos que mejoran la captación, distribución, metabolismo o excreción de los compuestos de la presente divulgación. Se divulgan grupos conjugados representativos en la solicitud de patente internacional nº PCT/US92/09196, presentada el 23 de octubre de 1992 y la patente de EE.UU. nº 6.287.860. Los restos conjugados incluyen, pero sin limitación, restos lipídicos tales como un resto de colesterol, ácido cólico, un tioéter, p.ej. hexil-5-tritiltiol, un tiocolesterol, una cadena alifática, p.ej. residuos de dodecanodiol o undecilo, un fosfolípido, p.ej. dihexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato de trietilamonio, una poliamina o una cadena de polietilenglicol, o ácido adamantanoacético, un resto palmitilo o un resto octadecilamino o hexilaminocarboniloxicoesterol. Los oligonucleótidos de la divulgación pueden conjugarse también con sustancias farmacológicas activas, por ejemplo, aspirina, warfarina, fenilbutazona, ibuprofeno, suprofen, fenbufeno, ketoprofeno, (S)-(+)-pranoprofeno, carprofeno, dansilsarcosina, ácido 2,3,5-triyodobenzoico, ácido flufenámico, ácido folínico, una benzotiadiazida, clorotiazida, una diazepina, indometicina, un barbiturato, una cefalosporina, un fármaco de sulfonamida, un antidiabético, un antibacteriano o un antibiótico.

Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de dichos conjugados oligonucleotídicos incluyen, pero sin limitación, 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.

Formulaciones: Los compuestos de la divulgación pueden también mezclarse, encapsularse, conjugarse o asociarse de otro modo con otras moléculas, estructuras moleculares o mezclas de compuestos como, por ejemplo, liposomas, moléculas orientadas a receptor, formulaciones orales, rectales, tópicas u otras, para ayudar a la captación, distribución y/o absorción. Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de dichas formulaciones de ayuda a la captación, distribución y/o absorción incluyen, pero sin limitación, 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, 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 tienen que administrarse en el contexto de un vector para modular una expresión y/o función diana, aspectos de la divulgación se refieren a constructos de vector de expresión para la expresión de oligonucleótidos antisentido que comprenden promotores, secuencias génicas promotoras híbridas y poseen una fuerte actividad promotora constitutiva, o una actividad promotora que puede inducirse en el caso deseado.

En un aspecto, la práctica de la divulgación implica administrar al menos uno de los oligonucleótidos antisentido anteriores con un sistema de suministro de ácido nucleico adecuado. En un aspecto, ese sistema incluye un vector no vírico ligado operativamente con el polinucleótido. Los ejemplos de dichos vectores no víricos incluyen el oligonucleótido solo (p.ej., cualquiera o más de las SEQ ID NO: 7 a 31) o en combinación con una formulación proteica, polisacárida o lipídica adecuada.

Adicionalmente, los sistemas de suministro de ácido nucleico adecuados incluyen vectores víricos, típicamente una secuencia de al menos uno de un adenovirus, virus adenoasociado (AAV), adenovirus dependiente de auxiliar, retrovirus o complejo de virus hemaglutinante de Japón (HVJ)-liposoma. Preferiblemente, el vector vírico comprende un promotor eucariótico fuerte ligado operativamente con el polinucleótido, p.ej. un promotor de citomegalovirus (CMV).

Adicionalmente, los vectores incluyen vectores víricos, proteínas de fusión y conjugados químicos. Los vectores retrovíricos incluyen virus de leucemia de murino de Moloney y virus basados en VIH. Un vector vírico basado en VIH comprende al menos dos vectores donde los genes gag y pol son de un genoma de VIH y el gen env es de otro virus. Se prefieren vectores víricos de DNA. Estos vectores incluyen vectores de poxvirus tales como vectores de ortopoxvirus o avipoxvirus, vectores de herpesvirus tales como vector de herpesvirus simple I (HSV), vectores de adenovirus y vectores de virus adenoasociados.

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

El término "sales farmacéuticamente aceptables" hace referencia a sales fisiológica y farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la divulgación: es decir, sales que retienen la actividad biológica deseada del compuesto original y no confieren efectos toxicológicos indeseados al mismo. Para oligonucleótidos, los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables y sus usos se describen adicionalmente en la patente de EE.UU. nº 6.287.860.

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

Para tratar tejidos en el sistema nervioso central, puede hacerse la administración, p.ej., por inyección o infusión en

el líquido cefalorraquídeo. La administración de RNA antisentido al líquido cefalorraquídeo se describe, p.ej., en la solicitud de patente de EE.UU. nº de pub. 2007/0117772, "Methods for slowing familial ALS disease progression".

5 Cuando se pretende administrar el oligonucleótido antisentido de la presente divulgación a células en el sistema nervioso central, la administración puede ser con uno o más agentes capaces de promover la penetración de los oligonucleótidos antisentido en cuestión a través de la barrera hematoencefálica. La inyección puede hacerse, p.ej., en la corteza entorrinal o hipocampo. El suministro de factores neurotróficos por administración de un vector adenovirico a neuronas motoras en tejido muscular se describe, p.ej., en la patente de EE.UU. nº 6.632.427, "Adenoviral-vector-mediated gene transfer into medullary motor neurons". El suministro de vectores directamente al
10 cerebro, p.ej., el cuerpo estriado, tálamo, hipocampo o sustancia negra, es conocido en la materia y se describe, p.ej., en la patente de EE.UU. nº 6.756.523, "Adenovirus vectors for the transfer of foreign genes into cells of the central nervous system particularly in brain". La administración puede ser rápida como por inyección o hacerse durante un periodo de tiempo como por infusión lenta o administración de formulaciones de liberación lenta.

15 Los oligonucleótidos antisentido en cuestión pueden también ligarse o conjugarse con agentes que proporcionen propiedades farmacéuticas o farmacodinámicas deseables. Por ejemplo, el oligonucleótido antisentido puede acoplarse con cualquier sustancia conocida en la materia por promover la penetración o el transporte a través de la barrera hematoencefálica, tal como un anticuerpo del receptor de transferrina, y administrarse por inyección intravenosa. El compuesto antisentido puede ligarse con un vector vírico, por ejemplo, que haga al compuesto
20 antisentido más efectivo y/o aumente el transporte del compuesto antisentido a través de la barrera hematoencefálica. La rotura osmótica de la barrera hematoencefálica puede lograrse también, p.ej., por infusión de azúcares incluyendo, pero sin limitación, mesoeritritol, xilitol, D(+) galactosa, D(+) lactosa, D(+) xilosa, dulcitol, mioinositol, L(-) fructosa, D(-) manitol, D(+) glucosa, D(+) arabinosa, D(-)arabinosa, celobiosa, D(+) maltosa, D(+) rafinosa, L(+) ramnosa, D(+) melibiosa, D(-) ribosa, adonitol, D(+)arabitol, L(-) arabitol, D(+) fucosa, L(-) fucosa, D(-)
25 lixosa, L(+) lixosa y L(-) lixosa, o aminoácidos, incluyendo pero sin limitación, glutamina, lisina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glicina, histidina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, tirosina, valina y taurina. Los procedimientos y materiales para mejorar la penetración de la barrera hematoencefálica se describen, p.ej. en las patentes de EE.UU. nº 4.866.042, "Method for the delivery of genetic material across the blood brain barrier", 6.294.520, "Material for passage through the blood-brain barrier" y 6.936.589, "Parenteral
30 delivery systems".

Los compuestos antisentido en cuestión pueden mezclarse, encapsularse, conjugarse o asociarse de otro modo con otras moléculas, estructuras moleculares o compuestos, por ejemplo, liposomas, moléculas orientadas a receptor, formulaciones orales, rectales, tópicas u otras, para ayudar a la captación, distribución y/o absorción. Por ejemplo,
35 pueden incluirse lípidos catiónicos en la formulación para facilitar la captación de oligonucleótidos. Una de dichas composiciones que se ha mostrado que facilita la captación es LIPOFECTIN (disponible en GIBCO-BRL, Bethesda, MD).

Los oligonucleótidos con al menos una modificación de 2'-O-metoxietilo se cree que son particularmente útiles para
40 administración oral. Las composiciones y formulaciones farmacéuticas para administración tópica pueden incluir parches transdérmicos, pomadas, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, pulverizadores, líquidos y polvos. Los vehículos farmacéuticos convencionales, bases acuosas en polvo u oleosas, espesantes y similares pueden ser necesarios o deseables. Pueden ser también útiles condones y guantes recubiertos y similares.

45 Las formulaciones farmacéuticas de la presente divulgación, que pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria, 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 un vehículo o vehículos o un excipiente o excipientes farmacéuticos. En general, las formulaciones se preparan poniendo en asociación uniforme e íntima los ingredientes activos con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos o
50 ambos y entonces, si es necesario, conformando el producto.

Las composiciones de la presente divulgación pueden formularse en cualquiera de muchas posibles formas de dosificación tales como, pero sin limitación, comprimidos, cápsulas, cápsulas de gel, jarabes líquidos, geles blandos, supositorios y enemas. Las composiciones de la presente divulgación pueden formularse también como
55 suspensiones en medio acuoso, no acuoso o mixto. Las suspensiones acuosas pueden contener además sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión incluyendo, por ejemplo, carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol y/o dextrano. La suspensión puede contener también estabilizantes.

Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación incluyen, pero sin limitación, soluciones, emulsiones,

espumas y formulaciones que contienen liposomas. Las composiciones y formulaciones farmacéuticas de la presente divulgación pueden comprender uno o más mejoradores de la penetración, vehículos, excipientes u otros ingredientes activos o inactivos.

- 5 Las emulsiones son típicamente sistemas heterogéneos de un líquido dispersado en otro en forma de gotitas que habitualmente superan 0,1 μm de diámetro. Las emulsiones pueden contener componentes adicionales además de las fases dispersadas y el fármaco activo que puede estar presente como solución en cualquiera de la fase acuosa, fase oleosa o por sí mismo como fase separada. Las microemulsiones se incluyen como un aspecto de la presente divulgación. Las emulsiones y sus usos son bien conocidos en la materia y se describen además en la patente de
10 EE.UU. nº 6.287.860.

Las formulaciones de la presente divulgación incluyen formulaciones liposómicas. Como se usa en la presente divulgación, el término "liposoma" significa una vesícula compuesta por lípidos anfífilos dispuestos en una bicapa o bicapas esféricas. Los liposomas son vesículas unilamelares o multilamelares que tienen una membrana formada
15 por un material lipófilo y un interior acuoso que contiene la composición para suministrar. Los liposomas catiónicos son liposomas cargados positivamente que se cree que interactúan con moléculas de DNA cargadas negativamente formando un complejo estable. Los liposomas que son sensibles al pH o cargados negativamente se cree que atrapan el DNA en lugar de complejarse con él. Se han usado tanto liposomas catiónicos como no
20 catiónicos para suministrar DNA a células.

Los liposomas incluyen también liposomas "estéricamente estabilizados", un término que, como se usa en la presente memoria, hace referencia a liposomas que comprenden uno o más lípidos especializados. Cuando se incorporan a liposomas, estos lípidos especializados dan como resultado liposomas con tiempos de circulación mejorados respecto a liposomas que carecen de dichos lípidos especializados. Los ejemplos de liposomas
25 estéricamente estabilizados son aquellos en que parte de la porción lipídica formadora de vesícula del liposoma comprende uno o más glicolípidos o se derivatiza con uno o más polímeros hidrófilos, tales como un resto polietilenglicol (PEG). Los liposomas y sus usos se describen además en la patente de EE.UU. nº6.287.860.

Las formulaciones y composiciones farmacéuticas de la presente divulgación pueden incluir también tensioactivos.
30 El uso de tensioactivos en productos farmacológicos, formulaciones y en emulsiones es bien conocido en la materia. Los tensioactivos y sus usos se describen además en la patente de EE.UU. nº6.287.860.

En un aspecto, la presente divulgación emplea diversos mejoradores de la penetración para efectuar el suministro efectivo de ácidos nucleicos, particularmente oligonucleótidos. Además de ayudar a la difusión de fármacos no
35 lipofílicos a través de membranas celulares, los mejoradores de la penetración mejoran también la permeabilidad de fármacos lipofílicos. Los mejoradores de la penetración pueden clasificarse como pertenecientes a una de cinco categorías amplias, es decir, tensioactivos, ácidos grasos, sales biliares, agentes quelantes y tensioactivos no quelantes. Los mejoradores de la penetración y sus usos se describen además en la patente de EE.UU. nº
40 6.287.860.

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

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

50 Para administración tópica u otras, los oligonucleótidos de la divulgación pueden encapsularse en liposomas o pueden formar complejos con los mismos, en particular con liposomas catiónicos. Como alternativa, los oligonucleótidos pueden complejarse con lípidos, en particular con lípidos catiónicos, ácidos y ésteres grasos, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, y sus usos se describen además en la patente de EE.UU. nº
55 6.287.860.

Las composiciones y formulaciones para administración oral incluyen polvos o gránulos, micropartículas, nanopartículas, suspensiones o soluciones en agua o medio no acuoso, cápsulas, cápsulas de gel, saquitos, comprimidos o minicomprimidos. Los espesantes, agentes aromatizantes, diluyentes, emulsionantes, auxiliares de

dispersión o aglutinantes pueden ser deseables. Son formulaciones orales aquellas en que los oligonucleótidos de la divulgación se administran junto con uno o más mejoradores de la penetración, tensioactivos y quelantes. 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 ácidos grasos y sus usos se describen además en la patente de EE.UU. nº 6.287.860. Son también combinaciones de mejoradores de la penetración, por ejemplo, ácidos/sales grasas en combinación con ácidos/sales biliares. Es una combinación particular la sal de sodio de ácido láurico, ácido cáprico y UDCA. Mejoradores de la penetración adicionales incluyen polioxietileno-9-lauriléter y polioxietileno-20-cetiléter. Los oligonucleótidos de la divulgación pueden suministrarse por vía oral, en forma granular incluyendo partículas secadas por pulverización o complejarse formando micropartículas o nanopartículas. Los agentes complejantes de oligonucleótidos y sus usos se describen además en la patente de EE.UU. nº 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 limitación, mejoradores de la penetración, compuestos portadores y otros vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables.

Ciertos aspectos de la divulgación proporcionan composiciones farmacéuticas que contienen uno o más compuestos oligoméricos y uno o más de otros agentes quimioterapéuticos que funcionan mediante un mecanismo no antisentido. Los ejemplos de dichos agentes quimioterapéuticos incluyen, pero sin limitación, fármacos quimioterapéuticos de cáncer tales como daunorubicina, daunomicina, dactinomacina, doxorubicina, epirubicina, idarubicina, esorubicina, bleomicina, mafosfamida, ifosfamida, citosina arabinósido, biscloroetilnitrosourea, busulfán, mitomicina C, actinomicina D, mitramicina, prednisona, hidroxiprogesterona, testosterona, tamoxifeno, dacarbazina, procarbazona, hexametilmelamina, pentametilmelamina, mitoxantrona, amsacrina, cloranbucilo, metilciclohexilnitrosourea, mostazas nitrogenadas, melfalán, ciclofosfamida, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-azacitidina, hidroxurea, desoxicoformicina, 4-hidroxiperoxiciclofosforamida, 5-fluorouracilo (5-FU), 5-fluorodesoxiuridina (5-FUdR), metotrexato (MTX), colchicina, taxol, vincristina, vinblastina, etopósido (VP-16), trimetrexato, irinotecán, topotecán, gemcitabina, tenipósido, cisplatino y dietilestilbestrol (DES). Cuando se usan con los compuestos de la divulgación, dichos agentes quimioterapéuticos pueden usarse individualmente (p.ej., 5-FU y oligonucleótido), secuencialmente (p.ej., 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 (p.ej., 5-FU, MTX y oligonucleótido, o 5-FU, radioterapia y oligonucleótido). Los fármacos antiinflamatorios, incluyendo pero sin limitación fármacos antiinflamatorios no esteroideos y corticosteroides, y los fármacos antivíricos, incluyendo pero sin limitación ribavirina, vidarabina, aciclovir y ganciclovir, pueden combinarse también en composiciones de la divulgación. Las combinaciones de compuestos antisentido y otros fármacos no antisentido están también dentro del alcance de esta divulgación. Pueden usarse dos o más compuestos combinados conjunta o secuencialmente.

En otro caso aspecto, las composiciones de la divulgación pueden contener uno o más compuestos antisentido, particularmente oligonucleótidos, orientados a un primer ácido nucleico y uno o más compuestos antisentido adicionales orientados a una segunda diana de ácido nucleico. Por ejemplo, la primera diana puede ser una secuencia antisentido particular de una adiponectina (ADIPOQ) y la segunda diana puede ser una región de otra secuencia nucleotídica. Como alternativa, las composiciones de la divulgación pueden contener dos o más compuestos antisentido orientados a diferentes regiones de la misma diana de ácido nucleico de adiponectina (ADIPOQ). Se ilustran en la presente memoria numerosos ejemplos de compuestos antisentido y pueden seleccionarse otros de entre los compuestos adecuados conocidos en la materia. Pueden usarse dos o más compuestos combinados conjunta o secuencialmente.

Dosificación:

La formulación de composiciones terapéuticas y su posterior administración (dosificación) se cree que están dentro de las habilidades de los especialistas en la materia. La dosificación depende de la gravedad y sensibilidad del estado patológico que se trate, durando el curso de tratamiento de varios días a varios meses, o hasta efectuar una cura o conseguir una disminución del estado patológico. Los programas de dosificación óptimos pueden calcularse a partir de las medidas de acumulación de fármaco en el cuerpo del paciente. Los especialistas en la materia pueden determinar fácilmente las dosificaciones óptimas, las metodologías de dosificación y las tasas de repetición. Las dosificaciones óptimas pueden variar dependiendo de la potencia relativa de los oligonucleótidos individuales, y pueden estimarse generalmente basándose en las CE50 que se ha encontrado que son efectivas en modelos animales *in vitro* e *in vivo*. En general, la dosificación es de 0,01 µg a 100 g por kg de peso corporal, y puede procurarse una vez o más al día, a la semana, al mes o al año, o incluso una vez cada 2 a 20 años. Los especialistas en la materia pueden estimar fácilmente las tasas de repetición para dosificación basándose en los

tiempos de residencia y concentraciones del fármaco medidos en fluidos o tejidos corporales. Después de un tratamiento exitoso, puede ser deseable someter al paciente a terapia de mantenimiento para prevenir la recurrencia del estado patológico, donde el oligonucleótido se administra en dosis de mantenimiento en el intervalo de 0,01 µg a 100 g por kg de peso corporal, una o más veces al día hasta una vez cada 20 años.

5

En aspectos, se trata un paciente con una dosificación de fármaco que es de al menos aproximadamente 1, al menos aproximadamente 2, al menos aproximadamente 3, al menos aproximadamente 4, al menos aproximadamente 5, al menos aproximadamente 6, al menos aproximadamente 7, al menos aproximadamente 8, al menos aproximadamente 9, al menos aproximadamente 10, al menos aproximadamente 15, al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 25, al menos aproximadamente 30, al menos aproximadamente 35, al menos aproximadamente 40, al menos aproximadamente 45, al menos aproximadamente 50, al menos aproximadamente 60, al menos aproximadamente 70, al menos aproximadamente 80, al menos aproximadamente 90 o al menos aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal. Ciertas dosificaciones inyectadas de oligonucleótidos antisentido se describen, p.ej. en la patente de EE.UU. nº 7.563.884, "Antisense modulation of PTP1B expression".

15

Aunque se han descrito anteriormente diversos aspectos de la presente divulgación, debería entenderse que se han presentado solo a modo de ejemplo y no de limitación. Pueden hacerse numerosos cambios a los aspectos divulgados de acuerdo con la divulgación de la presente memoria sin apartarse del espíritu o alcance de la divulgación. Por tanto, la amplitud y alcance de la presente divulgación no debería limitarse por ninguno de los casos anteriormente descritos.

20

Al citar diversas referencias en este documento, los solicitantes no admiten que ninguna referencia particular sea "técnica anterior" de su invención. Se ilustran en los siguientes ejemplos realizaciones de composiciones y procedimientos de la invención.

25

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos no limitantes sirven para ilustrar realizaciones seleccionadas de la invención. Se apreciará que las variaciones en proporciones y las alternativas a elementos de los componentes mostrados resultarán evidentes para los especialistas en la materia y están dentro del alcance de aspectos de la presente divulgación.

30

Ejemplo 1: Diseño de oligonucleótidos antisentido específicos de una molécula antisentido de ácido nucleico de una adiponectina (ADIPOQ) y/o una hebra con sentido de un polinucleótido de adiponectina (ADIPOQ)

Como se indica anteriormente, el término "oligonucleótido específico de" o "oligonucleótido orientado a" hace referencia 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 un transcrito de mRNA del gen diana.

35

La selección de los oligonucleótidos apropiados se facilita usando programas informáticos que alinean automáticamente las secuencias de ácido nucleico e indican las regiones de identidad u homología. Dichos programas se usan para comparar secuencias de ácido nucleico obtenidas, por ejemplo, buscando en bases de datos tales como GenBank o secuenciando productos de PCR. La comparación de secuencias de ácido nucleico de una serie de especies permite la selección de secuencias de ácido nucleico que exhiben un grado apropiado de identidad entre especies. En el caso de genes que no se hayan secuenciado, se efectúan Southern blots para permitir la determinación del grado de identidad entre genes en la especie diana y otras especies. Al efectuar las Southern blots a grados variables de astringencia, como es bien conocido en la materia, es posible obtener una medida aproximada de la identidad. Estos procedimientos permiten la selección de oligonucleótidos que exhiben un alto grado de complementariedad con las secuencias de ácido nucleico diana en un sujeto para controlar y un menor grado de complementariedad con las correspondientes secuencias de ácido nucleico de otras especies. Un especialista en la materia se dará cuenta de que hay una considerable laxitud en la selección de las regiones apropiadas de genes para uso en la presente invención.

45

50

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

55

Las propiedades de hibridación de los oligonucleótidos descritos en la presente memoria pueden determinarse mediante uno o más ensayos *in vitro* conocidos en la materia. Por ejemplo, las propiedades de los oligonucleótidos descritos en la presente memoria pueden obtenerse mediante la determinación de la fuerza de unión entre el compuesto antisentido natural diana y moléculas farmacológicas potenciales usando el ensayo de curva de fusión.

5

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

10 El ensayo de curva de fusión determina la temperatura a la que ocurre una transición rápida de conformación bicatenaria a monocatenaria para el complejo de compuesto antisentido natural/molécula. Esta temperatura es ampliamente aceptada como una medida fiable de la fuerza de interacción entre las dos moléculas.

Puede efectuarse un ensayo de curva de fusión usando una copia de cDNA de la molécula de RNA antisentido natural real o un nucleótido de DNA o RNA sintético correspondiente al sitio de unión de la molécula. Están disponibles múltiples kits que contienen todos los reactivos necesarios para efectuar este ensayo (p.ej., Applied Biosystems Inc., kit MeltDoctor). Estos kits incluyen una solución tampón adecuada que contiene uno de los tintes de unión a DNA bicatenario (dsDNA) (tal como tintes ABI HRM, SYBR Green, SYTO, etc.). Las propiedades de los tintes de dsDNA son tales que casi no emiten fluorescencia en forma libre pero son altamente fluorescentes cuando se unen a dsDNA.

Para efectuar el ensayo, se mezclan el cDNA o el correspondiente oligonucleótido con la molécula a concentraciones definidas por los protocolos del fabricante particular. Se calienta la mezcla a 95 °C para disociar todos los complejos de dsDNA preformados y se enfría entonces lentamente a temperatura ambiente u otra temperatura menor definida por el fabricante del kit para permitir que se reasocien las moléculas de DNA. Se calientan lentamente entonces a 95 °C los complejos recién formados con recogida continua simultánea de datos sobre la cantidad de fluorescencia que se produce por la reacción. La intensidad de fluorescencia es inversamente proporcional a las cantidades de dsDNA presente en la reacción. Los datos pueden recogerse usando un instrumento de PCR en tiempo real compatible con el kit (p.ej. StepOne Plus Real Time PCRSystem de ABI o el instrumento LightTyper, Roche Diagnostics, Lewes, RU).

Se construyen los picos de fusión representando la derivada negativa de la fluorescencia con respecto a la temperatura (-d(fluorescencia)/dT) en el eje y) frente a la temperatura (eje x) usando el software apropiado (por ejemplo, LightTyper (Roche) o SDS Dissociation Curve, ABI). Se analizan los datos para identificar la temperatura de transición rápida del complejo de dsDNA a moléculas monocatenarias. Esta temperatura se denomina T_m y es directamente proporcional a la fuerza de interacción entre las dos moléculas. Típicamente, la T_m superará los 40 °C.

Ejemplo 2: Modulación de polinucleótidos de ADIPOQ

40 Tratamiento de células HepG2 con oligonucleótidos antisentido

Se hicieron crecer células HepG2 de ATCC (nº cat., HB-8065) en medio de crecimiento (MEM/EBSS (Hyclone nº cat SH30024, o Mediatech nº cat MT-10-010-CV) +10 % de FBS (Mediatech nº cat. MT35-011-CV) + penicilina/estreptomycin (Mediatech nº cat. MT30-002-CI) a 37 °C y 5 % de CO₂. Un día antes del experimento, se sembraron las células a una densidad de 1,5 x 10⁵/ml en placas de 6 pocillos y se incubaron a 37 °C y 5% de CO₂. El día del experimento, se cambió el medio en las placas de 6 pocillos por medio de crecimiento reciente. Se diluyeron todos los oligonucleótidos antisentido a una concentración de 20 µM. Se incubaron 2 µl de esta solución con 400 µl de medio Opti-MEM (Gibco nº cat. 31985-070) y 4 µl de Lipofectamine 2000 (Invitrogen nº cat. 11668019) a temperatura ambiente durante 20 min y se aplicaron a cada pocillo de la placa de 6 pocillos con células HepG2. Se usó una mezcla similar que incluye 2 µl de agua en lugar de la solución de oligonucleótido para los controles transfectados ficticiamente. Después de 3-18 h de incubación a 37 °C y 5 % de CO₂, se cambió el medio a medio de crecimiento reciente. 48 h después de la adición de los oligonucleótidos antisentido, se retiró el medio y se extrajo el RNA de las células usando el sistema de aislamiento de RNA total SV de Promega (nº cat. Z3105) o el kit de aislamiento de RNA total RNeasy de Qiagen (nº cat. 74181) siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Se añadieron 600 ng de RNA a la reacción de transcripción inversa efectuada usando el kit de cDNA Verso de Thermo Scientific (nº cat. AB1453B) o el kit de transcripción inversa de cDNA de alta capacidad (nº cat. 4368813) como se describe en el protocolo del fabricante. Se usó el cDNA de esta reacción de transcripción inversa para monitorizar la expresión génica por PCR en tiempo real usando la mezcla de expresión génica ABI Taqman (nº cat. 4369510) y cebadores/sondas diseñados por ABI (ensayo de expresión génica Applied Biosystems Taqman: Hs02564413_s1 y

Hs01047563_m1 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 minuto) usando la máquina de PCR StepOne Plus Real Time (Applied Biosystems). Se calculó el cambio en veces de la expresión génica después del tratamiento con oligonucleótidos antisentido basándose en la diferencia en los valores de dCt normalizados a 5 18S entre las muestras tratadas y transfectadas ficticiamente.

Resultados:

Los resultados de PCR en tiempo real muestran que los niveles de mRNA de ADIPOQ en células HepG2 aumentan significativamente 48 h después del tratamiento con un oligonucleótido diseñado para AA515150 antisentido de ADIPOQ y un oligonucleótido diseñado para BC036509 (Fig. 1).

Los resultados de PCR en tiempo real muestran que los niveles de mRNA de ADIPOQ en células Hepg2 aumentan significativamente 48 h después del tratamiento con dos oligonucleótidos diseñados para AA515150 antisentido de ADIPOQ (CUR-1107 y 1108) y un oligonucleótido diseñado para BC036509 (CUR-1110) (Fig. 2).

Los resultados de PCR en tiempo real muestran que los niveles de mRNA de ADIPOQ en células HepG2 aumentan significativamente 48 h después del tratamiento con dos oligonucleótidos diseñados para AA515150 antisentido de ADIPOQ (Fig. 4).

Los resultados de PCR en tiempo real muestran que los niveles de mRNA de ADIPOR2 en células HepG2 aumentan significativamente 48 h después del tratamiento con uno de los oligonucleótidos diseñados para ADIPOR2 Skerblarbu.aApr antisentido de ADIPOR2. Los oligonucleótidos diseñados para LOC729097 (CUR-1078-CUR-1081) no aumentaban la expresión de ADIPOR2 (Fig. 5).

Tratamiento de células Vero76 con oligonucleótidos antisentido:

Se hicieron crecer células Vero76 de ATCC (nº cat. CRL-1587) en medio de crecimiento (MEM/EBSS (Hyclone nº cat. SH30024, o Mediatech (nº cat. MT-10-010-CV) +10 % de FBS (Mediatech nº cat.MT35-011-CV) + penicilina/estreptomina (Mediatech nº cat. MT30-002-CI)) a 37 °C y 5 % de CO₂. El día antes del experimento, se sembraron las células a una densidad de $1,5 \times 10^5$ /ml en placas de 6 pocillos y se incubaron a 37 °C y 5 % de CO₂. El día del experimento, se cambió el medio en las placas de 6 pocillos por medio de crecimiento reciente. Se diluyeron todos los oligonucleótidos antisentido en agua a una concentración de 20 µM. Se incubaron 2 µl de esta solución con 400 µl de medio Opti-MEM (Gibco nº cat.31985-070) y 4 µl de Lipofectamine 2000 (Invitrogen nº cat. 11668019) a temperatura ambiente durante 20 min y se aplicaron a cada pocillo de las placas de 6 pocillos con células Vero76. Se usó una mezcla similar que incluía 2 µl de agua en lugar de la solución de oligonucleótido para los controles transfectados ficticiamente. Después de 3-18 h de incubación a 37 °C y 5 % de CO₂, se cambió el medio a medio de crecimiento reciente. 48 h después de la adición de oligonucleótidos antisentido, se retiró el medio y se extrajo el RNA de las células usando el sistema de aislamiento de RNA total SV de Promega (nº cat. Z3105) o el kit de aislamiento de RNA total RNeasy (nº cat. 74181), siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Se añadieron 600 ng de RNA a la reacción de transcripción inversa efectuada usando el kit de cDNA Verso de Thermo Scientific (nº cat.AB1453B) como se describe en el protocolo del fabricante. Se usó el cDNA de esta reacción de transcripción inversa para monitorizar la expresión génica por PCR en tiempo real usando la mezcla de expresión génica ABI Taqman(nº cat.4369510) y cebadores/sondas diseñados por ABI (ensayo de expresión génica Taqman de Applied Biosystems: Hs02564413_s1 y Hs01047563_m1 de Applied Biosystems Inc., Foster .City CA). Se usó el siguiente ciclo de PCR: 50 °C durante 2 min, 95 °C durante 10 min, 40 ciclos de (95 °C durante 15 segundos, 60 °C durante 1 min) usando la máquina de PCR StepOne Plus Real Time (Applied Biosystems). Se calculó el cambio en veces de la expresión génica después del tratamiento con oligonucleótidos antisentido basándose en la diferencia en los valores de dCt normalizados a 18S entre las muestras tratadas y transfectadas ficticiamente.

Resultados: Los resultados de PCR en tiempo real muestran que los niveles de mRNA de ADIPOQ en células Vero aumentan significativamente 48 h después del tratamiento con un oligonucleótido diseñado para AA515150 antisentido de ADIPOQ (CUR-1107) y un oligonucleótido diseñado para BC036509 (CUR-1110) (Fig. 3).

REIVINDICACIONES

1. Un oligonucleótido que se orienta a un transcrito antisentido natural de adiponectina (ADIPOQ) para uso como compuesto terapéutico, donde el oligonucleótido modula la expresión de adiponectina (ADIPOQ) y donde el transcrito antisentido natural tiene la secuencia de ácido nucleico expuesta en una de las SEQ IDNO: 3-6.
2. Un oligonucleótido que se orienta a un transcrito antisentido natural de adiponectina (ADIPOQ) para uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado a adiponectina (ADIPOQ), donde el oligonucleótido modula la expresión de adiponectina (ADIPOQ) y donde el transcrito antisentido natural tiene la secuencia de ácido nucleico expuesta en una de las SEQ IDNO: 3-6.
3. Uso de un oligonucleótido que se orienta a un transcrito antisentido natural de adiponectina (ADIPOQ) para la fabricación de un medicamento para uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad o afección asociada a adiponectina (ADIPOQ), donde el oligonucleótido modula la expresión de adiponectina (ADIPOQ) y donde el transcrito antisentido natural tiene la secuencia de ácido nucleico expuesta en una de las SEQ IDNO: 3-6.
4. El oligonucleótido para uso de acuerdo con la reivindicación 2 o el uso del oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 3, donde la enfermedad o trastorno asociado a adiponectina (ADIPOQ) se selecciona de entre el grupo consistente en cáncer, inflamación, aterosclerosis, una enfermedad o trastorno neurológico, una enfermedad o trastorno cardíaco, una enfermedad o trastorno autoinmunitario, una enfermedad o trastorno infeccioso o una afección causada por agentes tales como virus, bacterias, hongos o protozoos, una enfermedad o trastorno de inmunodeficiencia, una alergia, aterosclerosis, una enfermedad o trastorno metabólico (diabetes, neuropatía diabética, obesidad, hiperglicemia, resistencia a insulina, síndromes metabólicos asociados a resistencia a insulina, síndrome metabólico, hipertensión, una enfermedad o trastorno asociado a una regulación alterada de la sensibilidad a insulina, nivel de glucosa sanguínea aberrante, etc.), una enfermedad hepática, una enfermedad renal, albuminuria y un trastorno proliferativo celular.
5. Un procedimiento *in vitro* de modulación de la expresión de adiponectina (ADIPOQ) en células o tejidos de pacientes que comprende: poner en contacto dichas células o tejidos con un oligonucleótido que se orienta a un transcrito antisentido natural de adiponectina (ADIPOQ); modulando así la expresión de adiponectina (ADIPOQ), donde el transcrito antisentido natural tiene la secuencia de ácido nucleico expuesta en una de las SEQ IDNO: 3-6.
6. Un oligonucleótido que se orienta a un transcrito antisentido natural de adiponectina (ADIPOQ), donde el oligonucleótido modula la expresión de adiponectina (ADIPOQ) y donde el transcrito antisentido natural tiene la secuencia de ácido nucleico expuesta en una de las SEQ IDNO: 3-6.
7. El oligonucleótido para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 4, o el uso del oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 3 o la reivindicación 4, o un procedimiento *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 5, o un oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 6, donde el oligonucleótido es de entre 10 y 30 nucleótidos de longitud.
8. El oligonucleótido para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4 o 7, o el uso del oligonucleótido de acuerdo cualquiera de la reivindicación 3, 4 o 7, o un procedimiento *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 5 o la reivindicación 7, o un oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 6 o la reivindicación 7, donde el oligonucleótido tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con un complemento de un transcrito antisentido natural de adiponectina (ADIPOQ).
9. El oligonucleótido para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4, 7 u 8, o el uso del oligonucleótido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3, 4, 7 u 8, o un procedimiento *in vitro* de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5, 7 u 8, o un oligonucleótido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, donde el oligonucleótido es monocatenario.
10. El oligonucleótido para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4, 7 u 8, o el uso del oligonucleótido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3, 4, 7 u 8, o un procedimiento *in vitro* de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5, 7 u 8, o un oligonucleótido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, donde el oligonucleótido es un compuesto de siRNA.
11. El oligonucleótido para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4 o 7 a 10, o el uso

del oligonucleótido de acuerdo cualquiera de las reivindicaciones 3, 4, 7 o 10, o un procedimiento *in vitro* de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 o 7 a 10, o un oligonucleótido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, donde el oligonucleótido comprende al menos una de las SEQ IDNO: 7-31.

- 5 12. El oligonucleótido para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4 o 7 a 11, o el uso del oligonucleótido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3, 4 o 7 a 11, o un procedimiento *in vitro* de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 o 7 a 11, o un oligonucleótido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11, donde el oligonucleótido aumenta la expresión de adiponectina (ADIPOQ).
- 10 13. El oligonucleótido para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4 o 7 a 11, o el uso del oligonucleótido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3, 4 o 7 a 11, o un procedimiento *in vitro* de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 o 7 a 11, o un oligonucleótido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11, donde el oligonucleótido disminuye la expresión de adiponectina (ADIPOQ).
- 15 14. El oligonucleótido para uso de acuerdo con la reivindicación 12, o el uso del oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 12, o un procedimiento *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 12, o un oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 12, donde la expresión de adiponectina (ADIPOQ) aumenta en al menos un 10 %.
- 20 15. El oligonucleótido para uso de acuerdo con la reivindicación 13, o el uso del oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 13, o un procedimiento *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 13, o un oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 13, donde la expresión de adiponectina (ADIPOQ) disminuye en al menos un 10 %.
- 25 16. El oligonucleótido para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4 o 7 a 15, o el uso del oligonucleótido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3, 4 o 7 a 15, o un procedimiento *in vitro* de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 o 7 a 15, o un oligonucleótido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 15, donde el oligonucleótido comprende además una o más modificaciones que comprenden
- 30 a. al menos un ligamiento internucleosídico modificado seleccionado de entre: un fosforotioato, 2'-Ometoxietilo (MOE), 2'-fluoro, alquilfosfonato, fosforoditioato, alquilfosfonotioato, fosforamidato, carbamato, carbonato, triéster fosfato, acetamitado, éster de carboximetilo y combinaciones de los mismos;
- b. al menos un nucleótido modificado seleccionado de entre: un ácido peptidonucleico (PNA), un ácido nucleico bloqueado (LNA), un ácido arabinonucleico (FANA), un análogo, un derivado y combinaciones de los mismos; o
- 35 c. al menos un resto de azúcar modificado seleccionado de entre: un resto de azúcar modificado con 2'-O-metoxietilo, un resto de azúcar modificado con 2'-metoxilo, un resto de azúcar modificado con 2'-O-alquilo, un resto de azúcar bicíclico y combinaciones de los mismos.
17. Una composición farmacéutica que comprende al menos un oligonucleótido que tiene los rasgos de un oligonucleótido definido en cualquiera de las reivindicaciones 6 a 16 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 40

FIGURA 1

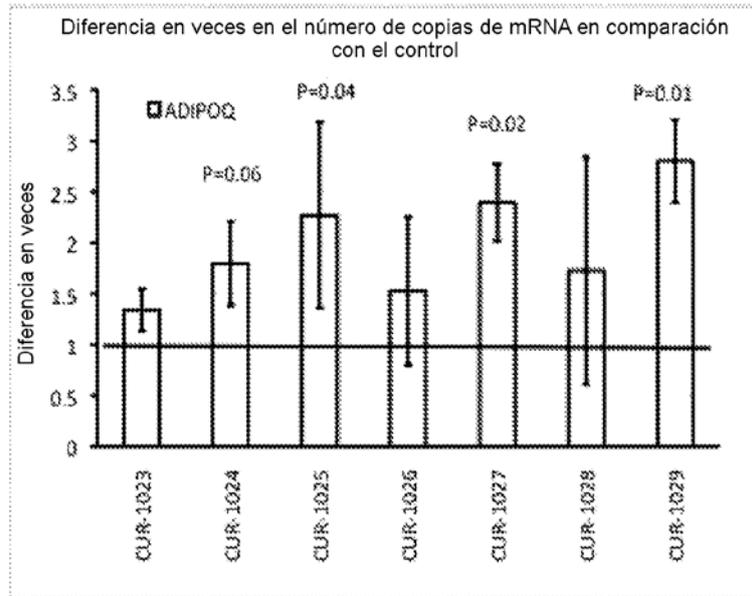


FIGURA 2

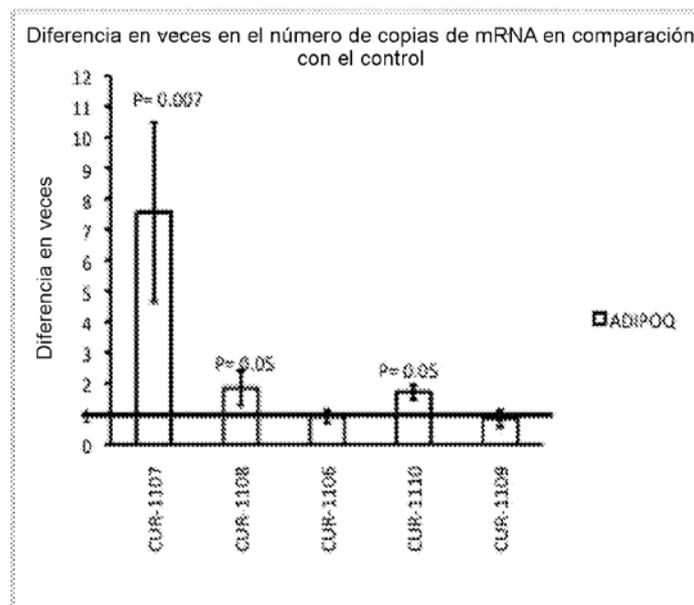


FIGURA 3

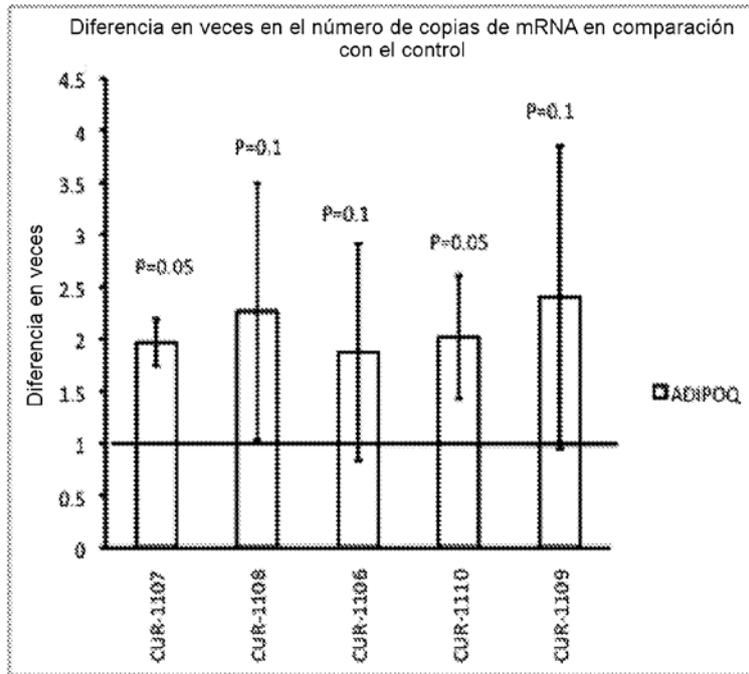


FIGURA 4

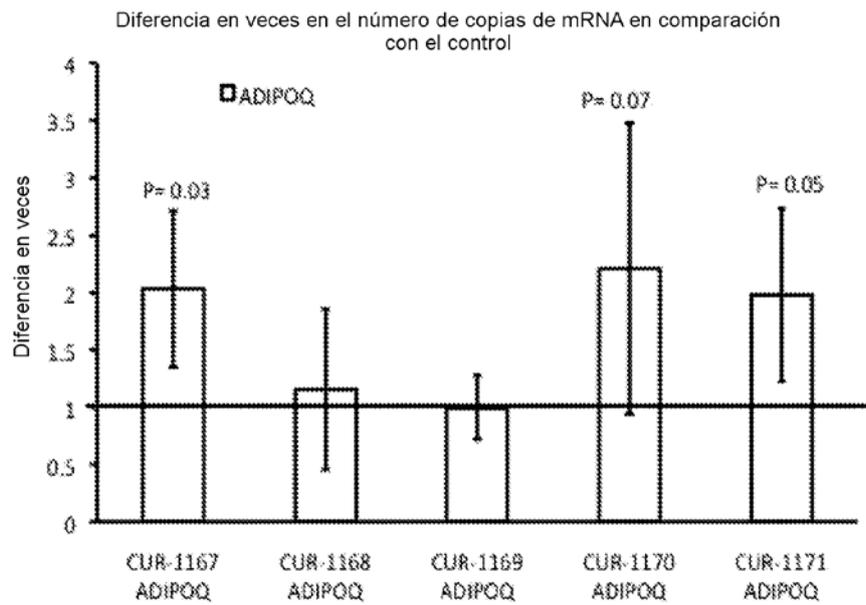


FIGURA 5

