

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 600 356**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/113** (2010.01)

**C12N 15/63** (2006.01)

**A61K 31/7088** (2006.01)

**A61K 48/00** (2006.01)

**A61P 3/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.02.2011 PCT/US2011/025582**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.08.2011 WO11103528**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.02.2011 E 11745402 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.07.2016 EP 2539452**

54 Título: **Tratamiento de enfermedades relacionadas con pirrolin-5-carboxilato reductasa 1 (PYCR1) por inhibición de transcrito antisentido natural para PYCR1**

30 Prioridad:  
**22.02.2010 US 306748 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**08.02.2017**

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 2 600 356 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 pirrolin-5-carboxilato reductasa 1 (PYCR1) por inhibición de transcrito antisentido natural para PYCR1.

5

La presente solicitud reivindica prioridad de la solicitud provisional de EE.UU. N°. 61/306748 presentada el 22 de febrero de 2010

Ejemplos de la divulgación comprenden oligonucleótidos que modulan la expresión y/o función de PYCR1 y moléculas asociadas.

10

## ANTECEDENTES

La hibridación de ADN-ARN y ARN-ARN es importante para muchos aspectos de la función del ácido nucleico que incluyen replicación, transcripción y traducción de ADN. La hibridación también es fundamental para diversas tecnologías que tanto detectan un ácido nucleico particular como alteran su expresión. Los nucleótidos antisentido, por ejemplo, alteran la expresión génica hibridándose con el ARN diana, interfiriendo así con el splicing, transcripción, traducción y replicación de ARN. El ADN antisentido tiene la característica añadida de que los híbridos de ADN-ARN sirven de sustrato para la digestión por ribonucleasa H, una actividad que está presente en la mayoría de los tipos celulares. Las moléculas antisentido pueden administrarse a células, como es el caso de los oligodesoxinucleótidos (ODN), o pueden expresarse a partir de genes endógenos como moléculas de ARN. La FDA aprobó recientemente un fármaco antisentido, VITRAVENE™ (para el tratamiento de retinitis por citomegalovirus), que refleja que el antisentido tiene utilidad terapéutica.

15

20

## 25 RESUMEN

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

En un aspecto, la divulgación proporciona procedimientos de inhibición de la acción de un transcrito antisentido natural usando oligonucleótido(s) antisentido dirigido(s) a cualquier región del transcrito antisentido natural produciendo la regulación positiva del gen sentido correspondiente. También se contempla en el presente documento que la inhibición del transcrito antisentido natural puede lograrse 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 PYCR I 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 dentro de los nucleótidos 1 a 380 de la SEQ ID NO: 2, modulando de este modo la función y/o expresión del polinucleótido de PYCR1 en células o tejidos del paciente *in vivo* o *in vitro*.

40

En un aspecto, un oligonucleótido se dirige a una secuencia antisentido natural de polinucleótidos de PYCR1, por ejemplo, nucleótidos expuestos en la SEQ ID NO: 2, y cualquier variante, alelos, homólogos, mutantes, derivados, fragmentos y secuencias complementarias a los mismos. Ejemplos de oligonucleótidos antisentido se exponen como las SEQ ID NO: 3 a 6.

45

Otro aspecto proporciona un procedimiento de modulación de la función y/o expresión de un polinucleótido de PYCR1 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 del antisentido del polinucleótido de PYCR1; modulando de este modo la función y/o expresión del polinucleótido de PYCR1 en células o tejidos del paciente *in vivo* o *in vitro*.

50

Otro aspecto proporciona un procedimiento de modulación de la función y/o expresión de un polinucleótido de PYCR1 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 oligonucleótido antisentido para un polinucleótido de PYCR1 antisentido; modulando de este modo la función y/o expresión del polinucleótido de PYCR1 en células o tejidos del paciente *in vivo* o *in vitro*.

55

En un aspecto, una composición comprende uno o más oligonucleótidos antisentido que se unen a polinucleótidos de PYCRI sentido y/o antisentido.

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

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

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

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

20 En un 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 un aspecto, los oligonucleótidos están encapsulados en un liposoma o unidos a una molécula portadora (por ejemplo, colesterol, péptido TAT).

25 Otros aspectos se describen más adelante.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

30 La figura 1 es un gráfico de resultados de PCR en tiempo real que muestra el cambio en veces + desviación estándar en ARNm de PYCR1 después del tratamiento de células MCF-7 con los oligonucleótidos de fosforotioato introducidos usando Lipofectamine 2000, en comparación con el control. Los resultados de PCR en tiempo real muestran que los niveles de ARNm de PYCRI en células MCF-7 son significativamente incrementados 48 h después del tratamiento con uno de los oligonucleótidos diseñados para PYCR1 antisentido tecsmer.aApr07. Las barras indicadas como CUR-1424, CUR-1423, CUR-1426 y CUR-1425 se corresponden con muestras tratadas con las  
35 SEQ ID NO: 3, 4, 5 y 6, respectivamente.

40 Descripción de la lista de secuencias - SEQ ID NO: 1: pirrolin-5-carboxilato reductasa 1 (PYCR1) de Homo sapiens, transcripto variante 1, ARNm (N.º de entrada en NCBI: NM\_006907); SEQ ID NO: 2: secuencia antisentido de PYCRI natural tecsmer.aApr07-sin splicing; SEQ ID NO: 3 a 6: oligonucleótidos antisentido. \* indica enlace fosfotioato.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA

45 Varios aspectos de la divulgación se describen a continuación con referencia a aplicaciones de ejemplos para ilustración. Debe entenderse que los numerosos detalles, relaciones y procedimientos específicos se exponen para proporcionar un entendimiento completo de la divulgación. Un experto en la materia relevante, sin embargo, reconocerá fácilmente que la divulgación puede ponerse en práctica sin uno o más de los detalles específicos o con otros procedimientos.

50 Todos los genes, nombres de genes y productos génicos descritos en el presente documento pretenden corresponderse con homólogos de cualquier especie para las que son aplicables las composiciones y procedimientos descritos en el presente documento. Por lo tanto, los términos incluyen, aunque no se limitan a, genes y productos génicos de seres humanos y ratones. Se entiende que, cuando se describe un gen o producto génico de una especie particular, la presente divulgación pretende ser a modo de ejemplo solamente, y no debe interpretarse como una limitación, a menos que el contexto en el que aparece lo indique claramente. De este modo,  
55 por ejemplo, los genes descritos en el presente documento, que en algunos casos se refieren a secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos de mamífero, pretenden englobar genes homólogos y/u ortólogos y productos génicos de otros animales que incluyen, aunque no se limitan a, otros mamíferos, peces, anfibios, reptiles y aves. En un aspecto, los genes o secuencias de ácidos nucleicos son humanos.

### Definiciones

La terminología usada en el presente documento es con el fin de describir aspectos particulares solo y no pretende ser limitante de la divulgación. Tal como se usan en el presente documento, las formas en singular "un", "una", "el" y "la" pretenden incluir las formas plurales también, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Además, siempre que las expresiones "que incluye", "incluye", "que tiene", "tiene", "con", o variantes de las mismas, se usen en la descripción detallada y/o las reivindicaciones, dichas expresiones pretenden ser incluyentes de un modo similar a la expresión "que comprende".

El término "aproximadamente" o "aproximadamente" significa dentro de un intervalo de error aceptable para el valor particular como se ha determinado por un experto en la materia, lo que dependerá en parte de cómo se mide o determina el valor, es decir, de las limitaciones del sistema de medición. Por ejemplo, "aproximadamente" puede significar dentro de 1 o más de 1 desviación estándar, por la práctica en la materia. Como alternativa, "aproximadamente" puede significar un intervalo de hasta el 20%, preferentemente hasta el 10%, más preferentemente hasta el 5%, y aún más preferentemente hasta el 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, preferentemente dentro de 5 veces, y más preferentemente dentro de 2 veces, de un valor. Si se describen valores particulares en la solicitud y reivindicaciones, a menos que se establezca de otro modo, debe asumirse que el término "aproximadamente" significa dentro de un intervalo de error aceptable para el valor particular.

Tal como se usa en el presente documento, el término "ARNm" significa uno o más transcritos de ARNm actualmente conocidos de un gen elegido como diana, y cualquier transcrito adicional que pueda ser dilucidado.

Por "oligonucleótidos antisentido" o "compuesto antisentido" se entiende una molécula de ARN o de ADN que se une a otro ARN o ADN (ARN, ADN diana). Por ejemplo, si es un oligonucleótido de ARN, se une a otra diana de ARN por medio de interacciones ARN-ARN y altera la actividad del ARN diana. Un oligonucleótido antisentido puede regular positivamente o regular negativamente la expresión y/o función de un polinucleótido particular. La definición pretende incluir cualquier molécula de ARN o ADN extraña que es útil desde un punto de vista terapéutico, diagnóstico, u otro punto de vista. Dichas moléculas incluyen, por ejemplo, moléculas de ARN o ADN antisentido, ARN de interferencia (iARN), microARN, moléculas de ARN señuelo, siRNA, ARN enzimático, ARN de edición terapéutica y ARN agonista y antagonista, compuestos oligoméricos antisentido, oligonucleótidos antisentido, oligonucleótidos de secuencia de guía externa (EGS), agentes de splicing alternativos, cebadores, sondas, y otros compuestos oligoméricos que hibridan con al menos una parte del ácido nucleico diana. Por lo tanto, estos compuestos pueden introducirse en forma de compuestos oligoméricos monocatenarios, bicatenarios, parcialmente monocatenarios, o circulares.

En el contexto de esta divulgación, el término "oligonucleótido" se refiere a un oligómero o polímero de ácido ribonucleico (ARN) o ácido desoxirribonucleico (ADN) o miméticos de los mismos. El término "oligonucleótido" también incluye oligómeros lineales o circulares de monómeros o enlaces naturales y/o modificados, que incluyen desoxirribonucleósidos, ribonucleósidos, formas sustituidas y alfa-anómeros de los mismos, ácidos nucleicos peptídicos (PNA), ácidos nucleicos bloqueados (LNA), fosfortioato, metilfosfonato y similares. Los oligonucleótidos son capaces de unirse específicamente a un polinucleótido diana a modo de un patrón regular de interacciones monómero a monómero, tales como tipo Watson-Crick de apareamiento de bases, tipos Hoógsteeen o Hoógsteeen inversa de apareamiento de bases, o similares.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "complemento inverso", cuando se usa en referencia a una secuencia de ácido nucleico, se refiere a cualquier secuencia del ácido nucleico que cumple las normas de apareamiento de bases para ser complementaria con una secuencia de ácido nucleico dada, pero en orientación inversa para dar como resultado complementariedad tras la unión de las dos secuencias. La expresión abarca complementariedad parcial donde solamente algunas de las bases coinciden de acuerdo con las normas de apareamiento de bases así como complementariedad total entre las dos secuencias de ácido nucleico. El grado de complementariedad entre la primera y la segunda secuencias de ácido nucleico puede tener efectos significativos sobre la eficiencia y la intensidad de la interacción entre las dos moléculas de ácido nucleico.

El oligonucleótido puede ser "quimérico", es decir, estar compuesto por diferentes regiones. En el contexto de esta divulgación, los compuestos "quiméricos" son oligonucleótidos que contienen dos o más regiones químicas, por ejemplo, región (regiones) de ADN, región (regiones) de ARN, región (regiones) de PNA, etc. Cada región química está constituida por al menos una unidad de monómero, es decir, un nucleótido en el caso de un compuesto de

oligonucleótidos. Estos oligonucleótidos normalmente comprenden al menos una región en la que el oligonucleótido se modifica con el fin de presentar una o más propiedades deseadas. Las propiedades deseadas del oligonucleótido incluyen, aunque no se limitan a, por ejemplo, resistencia incrementada a la degradación por nucleasas, captación celular incrementada y/o afinidad de unión incrementada por el ácido nucleico diana. Las diferentes regiones del oligonucleótido pueden, por lo tanto, tener diferentes propiedades. Los oligonucleótidos quiméricos de la presente divulgación pueden formarse como estructuras mixtas de dos o más oligonucleótidos, oligonucleótidos modificados, oligonucleósidos y/o análogos de oligonucleótidos, tal como se ha descrito anteriormente.

El oligonucleótido puede estar compuesto por regiones que pueden enlazarse en "registro", es decir, cuando los monómeros se enlazan consecutivamente, como en ADN nativo, o se enlazan mediante espaciadores. Los espaciadores pretenden constituir un "puente" covalente entre las regiones y tienen, en aspectos preferidos, una longitud que no supera aproximadamente 100 átomos de carbono. Los espaciadores pueden llevar diferentes funcionalidades, por ejemplo, tener carga positiva o negativa, llevar propiedades de unión a ácido nucleico especiales (intercaladores, ligantes de surcos, toxinas, fluoróforos, etc.), ser lipófilos, inducir estructuras secundarias especiales como, por ejemplo, péptidos que contienen alanina que inducen hélices alfa.

Tal como se usan en el presente documento, "PYCR1" y "pirrolin-5-carboxilato reductasa I" incluyen todos los miembros de la familia, mutantes, alelos, fragmentos, especies, secuencias codificantes y no codificantes, cadenas de polinucleótidos sentido y antisentido, etc.

Tal como se usan en el presente documento, las expresiones 'pirrolin-5-carboxilato reductasa I', PYCRI, PYCR, P5CRI, P5C reductasa, P5C reductasa 1, proteína inductora de la proliferación 45, PIG45, pirrolin-5-carboxilato reductasa 1 y PP222, se consideran iguales en la bibliografía y se usan indistintamente en la presente solicitud.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "oligonucleótido específico para" u "oligonucleótido que se dirige a" se refiere a un oligonucleótido que tiene una secuencia (i) capaz de formar un complejo estable con una parte del gen elegido como diana, o (ii) capaz de formar un dúplex estable con una parte de un transcrito de ARNm del gen elegido como diana. La estabilidad de los complejos y dúplex puede determinarse por cálculos teóricos y/o ensayos *in vitro*. Ensayos a modo de ejemplo para determinar la estabilidad de complejos y dúplex de hibridación se describen en los ejemplos más adelante.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "ácido nucleico diana" engloba ADN, ARN (que comprende preARNm y ARNm) transcrito a partir de dicho ADN, y también ADNc derivado de dicho ARN, secuencias codificantes, polinucleótidos sentido o antisentido. La hibridación específica de un compuesto oligomérico con su ácido nucleico diana interfiere en la función normal del ácido nucleico. Esta modulación de la función de un ácido nucleico diana por compuestos que hibridan específicamente con él, se denomina generalmente "antisentido". Las funciones de ADN en las que se interferirá incluyen, por ejemplo, la replicación y la transcripción. Las funciones de ARN en las que se interferirá incluyen todas las funciones vitales tales como, por ejemplo, translocalización del ARN al sitio de traducción de proteína, traducción de proteína desde ARN, splicing del ARN para dar una o más especies de ARNm, y actividad catalítica que puede acoplarse en o facilitarse por el ARN. 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.

La interferencia de ARN "iARN" está mediada por moléculas de ARN bicatenario (dsARN) que tienen homología específica de secuencia para sus secuencias de ácidos nucleicos "diana". En ciertos aspectos de la presente divulgación, los mediadores son dúplex de ARN "interferente pequeño" (siRNA) de 5-25 nucleótidos. Los siRNA se derivan del procesamiento de dsARN por una enzima ARNasa conocida como Dicer. Los productos de dúplex de siRNA son reclutados en un complejo de siARN de multi-proteína llamado RISC (complejo de silenciamiento inducido por ARN). Sin desear ceñirse a ninguna teoría particular, se cree entonces que un RISC es guiado a un ácido nucleico diana (adecuadamente ARNm), en el que el dúplex de siRNA interactúa en una forma específica de secuencia para mediar en la escisión en un modo catalítico. Los ARN interferentes pequeños que pueden usarse según la presente divulgación pueden sintetizarse y usarse según procedimientos que son muy conocidos en la técnica y que serán familiares para el experto en la materia. Los ARN interferentes pequeños para su uso en los procedimientos de la presente divulgación comprenden adecuadamente entre aproximadamente 1 y aproximadamente 50 nucleótidos (nt). En los ejemplos de aspectos no limitantes, los siRNA pueden comprender aproximadamente de 5 a aproximadamente 40 nt, aproximadamente de 5 a aproximadamente 30 nt, aproximadamente de 10 a aproximadamente 30 nt, aproximadamente de 15 a aproximadamente 25 nt, o aproximadamente 20-25 nucleótidos.

La selección de oligonucleótidos apropiados se facilita usando programas informáticos que alinean automáticamente secuencias de ácidos nucleicos e indican regiones de identidad u homología. Dichos programas se usan para comparar secuencias de ácidos nucleicos obtenidas, por ejemplo, buscando en bases de datos tales como GenBank o secuenciando productos de PCR. La comparación de secuencias de ácidos nucleicos de un intervalo de especies 5 permite la selección de secuencias de ácidos nucleicos que muestran un grado de identidad apropiado entre especies. En el caso de genes que no se han secuenciado, se realizan Southern blots para permitir una determinación del grado de identidad entre genes en especies diana y otras especies. Realizando Southern blots a grados de astringencia variables, como es muy conocido en la técnica, es posible obtener una medida aproximada de la identidad. Estos procedimientos permiten la selección de oligonucleótidos que presentan un alto grado de 10 complementariedad con secuencias de ácidos nucleicos diana en un sujeto que va a controlarse y un menor grado de complementariedad con secuencias de ácidos nucleicos correspondientes en otras especies. Un experto en la materia se dará cuenta de que hay libertad considerable en la selección de regiones apropiadas de genes para su uso en la presente divulgación.

15 Por "ARN enzimático" se entiende una molécula de ARN con actividad enzimática (Cech, (1988) J. American. Med. Assoc. 260, 3030-3035). Los ácidos nucleicos enzimáticos (ribozimas) actúan uniéndose primero a un ARN diana. Dicha unión se produce mediante la parte de unión diana de un ácido nucleico enzimático que se mantiene en estrecha proximidad a una parte enzimática de la molécula que actúa para escindir el ARN diana. De este modo, el ácido nucleico enzimático reconoce primero y luego se une a ARN diana mediante apareamiento de bases, y una 20 vez unido al sitio correcto, actúa enzimáticamente para cortar el ARN diana.

Por "ARN señuelo" se entiende una molécula de ARN que imita el dominio de unión natural para un ligando. El ARN señuelo compite, por lo tanto, con la diana de unión natural para la unión de un ligando específico. Por ejemplo, se ha demostrado que la sobreexpresión del ARN de respuesta de activación en trans del VIH (TAR) puede actuar de 25 "señuelo" y se une eficazmente a la proteína tat del VIH, previniendo así que se una a secuencias de TAR codificadas en el ARN del VIH. Esto se entiende que es un ejemplo específico. Los expertos en la materia reconocerán que esto es solo un ejemplo, y fácilmente pueden generarse otros aspectos usando técnicas generalmente conocidas en la técnica.

30 Tal como se usa en el presente documento, el término "monómeros" normalmente indica monómeros enlazados por enlaces fosfodiéster o análogos de los mismos para formar oligonucleótidos que varían en tamaño de algunas unidades monoméricas, por ejemplo, de aproximadamente 3-4, a aproximadamente varios cientos de unidades monoméricas. Los análogos de enlaces fosfodiéster incluyen: fosforotioato, fosforoditioato, metilfosfonatos, fosforoselenoato, fosforamidato y similares, tal como se describe más completamente más adelante.

35 El término "nucleótido" cubre nucleótidos de origen natural, además de nucleótidos no de origen natural. Debe ser evidente para el experto en la materia que los diversos nucleótidos que se ha considerado previamente "no de origen natural" se han encontrado posteriormente en la naturaleza. Así, "nucleótidos" incluye no solo las moléculas que contienen heterociclos de purina y pirimidina conocidas, sino también análogos y tautómeros heterocíclicos de 40 las mismas. Ejemplos ilustrativos de otros tipos de nucleótidos son moléculas que contienen adenina, guanina, timina, citosina, uracilo, purina, xantina, diaminopurina, 8-oxo-N6-metiladenina, 7-deazaxantina, 7-deazaguanina, N4,N4-etanocitosina, N6,N6-etano-2,6-diaminopurina, 5-metilcitosina, 5-alquiniil(C3-C6)-citosina, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, pseudoisocitosina, 2-hidroxi-5-metil-4-triazolopiridina, isocitosina, isoguanina, inosina y los nucleótidos "que no existen de forma natural" descritos en Benner et al., patente de Estados Unidos Nº 5.432.272. El término 45 "nucleótido" pretende cubrir todos y cada uno de estos ejemplos, además de análogos y tautómeros de los mismos. Nucleótidos especialmente interesantes son 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 diagnóstica en seres humanos. Los nucleótidos incluyen los azúcares naturales 2'-desoxi y 2'-hidroxilo, por ejemplo, como se describe en Kornberg y Baker, DNA Replication, 2ª Ed. (Freeman, San Francisco, 1992), así como sus análogos

50 "Análogos", en referencia a nucleótidos, incluye nucleótidos sintéticos que tienen restos de bases modificados y/o restos de azúcar modificados (véase, por ejemplo, descrito generalmente por Scheit, Nucleotide Analogs, John Wiley, New York, 1980; Freier & Altmann, (1997) Nucl. Acid. Res., 25(22), 4429-4443, Toulmé, J.J., (2001) Nature Biotechnology 19: 17-18; Manoharan M., (1999) Biochemica et Biophysica Acta 1489: 117-139; Freier S. M., (1997) 55 Nucleic Acid Research, 25: 4429-4443, Uhlman, E., (2000) Drug Discovery & Development, 3: 203-213, Herdewin P., (2000) Antisense & Nucleic Acid Drug Dev., 10: 297-310); [3.2.0]bicycloarabinonucleósidos enlazados en 2'-O, 3'-C. Dichos análogos incluyen nucleótidos sintéticos diseñados para potenciar propiedades de unión, por ejemplo, la estabilidad del dúplex o tríplex, especificidad, o similares.

Tal como se usa en el presente documento, "hibridación" significa el apareamiento de cadenas sustancialmente complementarias de compuestos oligoméricos. Un mecanismo de apareamiento implica la formación de puentes de hidrógeno, que pueden ser enlaces de hidrógeno de Watson-Crick, Hoógsteeen o de Hoógsteeen inverso, entre bases de nucleósidos o de nucleótidos (nucleótidos) complementarias de las cadenas de compuestos oligoméricos. Por ejemplo, la adenina y la timina son nucleótidos complementarios que se aparean mediante la formación de enlaces de hidrógeno. La hibridación puede producirse en circunstancias variables.

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

Tal como se usa en el presente documento, la frase "condiciones de hibridación astringentes" o "condiciones astringentes" se refiere 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 diferentes circunstancias y en el contexto de esta divulgación, las "condiciones astringentes" en las que hibridan los compuestos oligoméricos con una secuencia diana se determinan por la naturaleza y composición de los compuestos oligoméricos y los ensayos en los que están siendo investigados. En general, las condiciones de hibridación astringentes comprenden bajas concentraciones (<0,15 M) de sales con cationes inorgánicas tales como Na<sup>++</sup> o K<sup>++</sup> (es decir, baja fuerza iónica), temperatura superior a 20°C - 25°C por debajo de la T<sub>m</sub> del complejo de compuesto oligomérico:secuencia diana, y la presencia de desnaturizantes tales como formamida, dimetilformamida, dimetilsulfóxido, o el detergente dodecilsulfato sódico (SDS). Por ejemplo, la velocidad de hibridación disminuye un 1,1% por cada 1% de formamida. Un ejemplo de una condición de hibridación de alta astringencia es 0,1X tampón cloruro sódico-citrato sódico (SSC)/0,1% (peso/volumen) de SDS a 60°C durante 30 minutos.

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

Se entiende en la técnica que la secuencia de un compuesto oligomérico no necesita ser 100% complementaria a la de su ácido nucleico diana para ser específicamente hibridable. Además, un oligonucleótido puede hibridarse sobre uno o más segmentos de forma que segmentos intermedios o adyacentes no participen en el acontecimiento de hibridación (por ejemplo, una estructura de bucle, desapareamiento o estructura de horquilla). Los compuestos oligoméricos de la presente divulgación comprenden al menos aproximadamente el 70%, o al menos aproximadamente el 75%, o al menos aproximadamente el 80%, o al menos aproximadamente el 85%, o al menos aproximadamente el 90%, o al menos aproximadamente el 95%, o al menos aproximadamente el 99%, de complementariedad de secuencia con una región diana dentro de la secuencia de ácidos nucleicos diana a la que se dirigen. Por ejemplo, un compuesto antisentido en el que 18 de los 20 nucleótidos del compuesto antisentido son complementarios a una región diana, y, por lo tanto, hibridarían específicamente, representaría el 90 por ciento de complementariedad. En este ejemplo, los nucleótidos no complementarios restantes pueden agruparse o intercalarse con nucleótidos complementarios y no necesitan ser contiguos entre sí o a nucleótidos complementarios. Por lo tanto, 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 el 77,8% de complementariedad global con el ácido nucleico diana y de este modo estaría dentro del alcance de la presente divulgación. El porcentaje de complementariedad de un compuesto antisentido con una región de un ácido nucleico diana puede determinarse rutinariamente usando programas BLAST (herramientas de búsqueda de alineamientos locales básicos) y programas PowerBLAST conocidos en la técnica. El porcentaje de homología, identidad de secuencias o complementariedad pueden determinarse por, por ejemplo, el

programa Gap (Wisconsin Sequence Analysis 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).

5 Ta como se usa en el presente documento, la expresión "punto de fusión térmico (Tm)" se refiere a la temperatura, bajo fuerza iónica definida, pH y concentración de ácido nucleico, a la que el 50% de los oligonucleótidos complementarios a la secuencia diana hibridan con la secuencia diana en equilibrio. Normalmente, condiciones astringentes serán aquellas en las que la concentración de sales es la concentración de ion Na (u otras sales) de al menos aproximadamente 0,01 a 1,0 M a pH de 7,0 a 8,3 y la temperatura es al menos aproximadamente 30°C para  
 10 oligonucleótidos cortos (por ejemplo, de 10 a 50 nucleótidos). También pueden lograrse condiciones astringentes con la adición de agentes desestabilizantes tales como formamida.

Tal como se usa en el presente documento, "modulación" significa tanto un incremento (estimulación) como una  
 15 disminución (inhibición) en la expresión de un gen.

El término "variante", cuando se usa en el contexto de una secuencia de polinucleótidos, puede englobar una  
 20 secuencia de polinucleótidos relacionada con un gen no mutante. Esta definición también puede incluir, por ejemplo, variantes "alélicas", de "splicing", de "especie" o "polimórficas". Una variante de splicing puede tener identidad significativa con una molécula de referencia, pero generalmente tendrá un mayor o menor número de polinucleótidos debido al splicing alterno de exones durante el procesamiento de ARNm. El polipéptido correspondiente puede poseer dominios funcionales adicionales o una ausencia de dominios. Las variantes de especie son secuencias de polinucleótidos que varían de una especie a otra. Son de particular utilidad en la divulgación variantes de productos  
 25 génicos de tipo silvestre (wild type). Las variantes pueden resultar de al menos una mutación en la secuencia de ácidos nucleicos y pueden producir ARNm alterados o polipéptidos cuya estructura o función puede o puede no alterarse. Cualquier gen natural o recombinante dado puede tener ninguna, una o muchas formas alélicas. Cambios mutacionales comunes que dan lugar a variantes se atribuyen generalmente a deleciones, adiciones o sustituciones naturales de nucleótidos. Cada uno de estos tipos de cambios puede producirse solo, o en combinación con los otros, una o más veces en una secuencia dada.

30 Los polipéptidos resultantes generalmente tendrán identidad significativa de aminoácidos los unos con respecto a los otros. Una variante polimórfica es una variación en la secuencia de polinucleótidos de un gen particular entre individuos de una especie dada. Las variantes polimórficas también pueden englobar "polimorfismos de un solo nucleótido" (SNP), o mutaciones de una sola base en las que la secuencia de polinucleótidos varía en una base. La presencia de SNP puede ser indicativa de, por ejemplo, una cierta población con una propensión por una patología,  
 35 que es susceptibilidad frente a resistencia.

Los polinucleótidos derivados incluyen ácidos nucleicos sometidos a modificación química, por ejemplo, sustitución de hidrógeno por un grupo alquilo, acilo o amino. Los derivados, por ejemplo, oligonucleótidos derivados, pueden comprender partes no de origen natural, tales como restos de azúcar alterados o enlaces inter-azúcar. A modo de  
 40 ejemplo, entre éstos están fosforotioato y otras especies que contienen azufre que se conocen en la técnica. Los ácidos nucleicos derivados también pueden contener etiquetas, que incluyen radionucleótidos, enzimas, agentes fluorescentes, agentes quimioluminiscentes, agentes cromógenos, sustratos, cofactores, inhibidores, partículas magnéticas y similares.

45 Un polipéptido o péptido "derivado" es uno que se modifica, por ejemplo, por glucosilación, pegilación, fosforilación, sulfatación, reducción/alquilación, acilación, acoplamiento químico o tratamiento suave con formalina. Un derivado también puede modificarse para contener una etiqueta detectable, tanto directa como indirectamente, que incluye, aunque no se limita a, un radioisótopo, etiqueta fluorescente y enzimática.

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

"Mamífero" cubre mamíferos de sangre caliente que normalmente están bajo cuidado médico (por ejemplo, seres  
 55 humanos y animales domesticados). Los ejemplos incluyen felinos, caninos, equinos, bovinos y humanos, además de solo humanos.

"Tratar" o "tratamiento" cubre el tratamiento de una patología en un mamífero, e incluye: (a) prevenir que se produzca la patología en un mamífero, en particular, cuando tal mamífero tiene predisposición a la patología, pero

todavía no se ha diagnosticado que la tenga; (b) inhibir la patología, por ejemplo, detener el desarrollo; y/o (c) aliviar la patología, por ejemplo, causando la regresión de la patología hasta que se alcance un punto final deseado. Tratar también incluye la mejora de un síntoma de una enfermedad (por ejemplo, reducir el dolor o molestia), en el que dicha mejora puede o puede no afectar directamente la enfermedad (por ejemplo, causa, transmisión, expresión, etc.).

Tal como se usa en el presente documento, "cáncer" se refiere a todo tipo de cáncer o neoplasia o tumores malignos descubiertos en mamíferos, incluyendo, aunque sin limitarse a: leucemias, linfomas, melanomas, carcinomas y sarcomas. El propio cáncer se manifiesta como un "tumor" o tejido que comprende células malignas del cáncer. Los ejemplos de tumores incluyen sarcomas y carcinomas tales como, aunque no se limitan a: fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rhabdomyosarcoma, carcinoma de colon, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de las glándulas sudoríparas, carcinoma de las glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de las vías biliares, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, cáncer de cuello uterino, tumor testicular, carcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón microcítico, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma y retinoblastoma. Cánceres adicionales que pueden ser tratados por la composición descrita de acuerdo con la divulgación incluyen, aunque no se limitan a, por ejemplo, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, mieloma múltiple, neuroblastoma, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, rhabdomyosarcoma, trombocitosis primaria, macroglobulinemia primaria, tumores de pulmón microcíticos, tumores cerebrales primarios, cáncer de estómago, cáncer de colon, insulinooma pancreático maligno, tumor carcinoide maligno, cáncer de vejiga urinaria, cáncer gástrico, lesiones de la piel premalignas, cáncer testicular, linfomas, cáncer de tiroides, neuroblastoma, cáncer de esófago, cáncer genitourinario, hipercalcemia maligna, cáncer de cuello uterino, cáncer de endometrio, cáncer de la corteza suprarrenal y cáncer de próstata.

### 30 *Composiciones y moléculas de polinucleótido y oligonucleótido*

*Dianas:* en un aspecto, las dianas comprenden secuencias de ácido nucleico de pirrolin-5-carboxilato reductasa I (PYCRI), que incluyen sin limitación secuencias no codificantes y codificantes sentido y/o antisentido asociadas con PYCR1.

La pirrolin-5-carboxilato (P5C)' reductasa (EC 1.5.1.2) cataliza la reducción de P5C a prolina en una reacción dependiente de NAD(P)H que es tanto la primera etapa emprendida como la final en la síntesis de prolina. Esta enzima también puede desempeñar un papel fisiológico en la generación de NADP(+) en algunos tipos celulares. La proteína forma un homopolímero y se localiza en la mitocondria. El splicing alternativo da como resultado dos variantes de transcripción que codifican diferentes isoformas. La actividad de P5C reductasa está presente en el citosol de prácticamente todos los tejidos y células cultivadas de mamífero. Además de su papel en la síntesis de prolina, la P5C reductasa, junto con las otras enzimas del metabolismo de P5C y prolina, puede influir en las relaciones de nucleótidos de piridina oxidados/reducidos.

En un aspecto, se usan oligonucleótidos antisentido para prevenir o tratar enfermedades o trastornos asociados con miembros de la familia de PYCRI. Enfermedades y trastornos mediados por pirrolin-5-carboxilato reductasa I (PYCRI) que pueden tratarse con células/tejidos regenerados a partir de células madre obtenidas usando los compuestos antisentido comprenden: una enfermedad o trastorno asociado con una función y/o la expresión anormal de PYCR1, una enfermedad o trastorno del tejido conectivo (por ejemplo, fibrosis quística, fibrosis miocárdica, microfibrosis, fibrosis hepática, fibrosis pulmonar intersticial, fibrosis neoplásica, fibrosis pancreática, fibrosis pulmonar, fibrosis subepidérmica, fibrosis panmural de la vejiga, fibrosis proliferativa, fibrosis de reemplazo, fibrosis retroperitoneal y fibrosis de la raíz, osteogénesis imperfecta, síndrome de Ehlers-Danlos, condrodismplasias, síndrome de Marfan, síndrome de Alport, aneurisma aórtico familiar, acondroplasia, mucopolisacaridosis, osteoporosis, osteopetrosis, enfermedad de Paget, raquitismo, osteomalacia, hiperparatiroidismo, osteodistrofia renal, osteonecrosis, osteomielitis, osteoma, osteoma osteoide, osteoblastoma, osteosarcoma, osteocondroma, condroma, condroblastoma, fibroma condromixoide, condrosarcoma, defecto cortical fibroso, fibroma no osificante, displasia fibrosa, fibrosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, sarcoma de Ewing, tumor neuroectodérmico primitivo, tumor de células gigantes, osteoartritis, artritis reumatoide, espondiloartritis anquilosante, síndrome de Rotter, artritis psoriásica, artritis enteropática, artritis infecciosa, gota, artritis gotosa, enfermedad por depósito de cristales de

pirofosfato cálcico, ganglio, quiste sinovial, sinovitis villonodular, esclerosis sistémica. contractura de Dupuytren, lupus eritematoso, enfermedad mixta del tejido conectivo, epidermolísis bullosa simple, eritroderma ictiosiforme bullosa congénita (hiperqueratosis epidermolítica), keratoderma palmoplantar no epidermolítico y epidermolítico, ictiosis bullosa de Siemens, paquioniquia congénita, nevus blanco esponjoso, etc.), una enfermedad o trastorno asociado con cambios progeroides en tejidos conectivos (por ejemplo, cutis laxa, cutis laxa tipo 1, cutis laxa tipo 2. enanismo de Walt Disney, cutis laxa autosómica recesiva (ARCL), Geroderma osteodisplástica, síndrome progeroide de tipo De Barys, síndrome de la piel arrugada, etc.) , una enfermedad o trastorno asociado con la alteración del metabolismo de la prolina, una enfermedad o trastorno asociado con la proliferación celular en el que la expresión de P5CR se reduce (por ejemplo, queratosis actínica, arteriosclerosis, aterosclerosis, bursitis, cirrosis, hepatitis, enfermedad mixta del tejido conectivo (MCTD), miclofibrosis, hemoglobinuria paroxística nocturna, policitemia vera, psoriasis, trombocitemia primaria, y cánceres, incluyendo adenocarcinoma, leucemia, linfoma, melanoma, mieloma, sarcoma, teratocarcinoma, y, en particular, cánceres de la glándula adrenal, vejiga, hueso, médula ósea, cerebro, de mama, cuello del útero, vesícula biliar, ganglios, tracto gastrointestinal, corazón, riñón, hígado, pulmón, músculo, ovario, páncreas, paratiroides, pene, próstata, glándulas salivales, piel, testículos bazo, timo, tiroides, útero, etc.), una enfermedad o trastorno neuronal (por ejemplo, acatisia, enfermedades de Alzheimer, amnesia, esclerosis lateral amiotrófica, trastorno bipolar, catatonia, neoplasias cerebrales, demencia, depresión, neuropatía diabética, síndrome de Down, discinesia tardía, distonías, epilepsia, enfermedad de Huntington, neuropatía periférica, esclerosis múltiple, neurofibromatosis, enfermedad de Parkinson, psicosis paranoides, neuralgia postherpética, esquizofrenia, trastorno de Tourette etc.), regeneración retiniana, enfermedad o trastorno asociado con la alteración de la función mitocondrial y envejecimiento prematuro de la piel.

Un aspecto preferido de la presente divulgación proporciona una composición antienvjecimiento que comprende PYCR1.

25 En un aspecto, se administra modulación de PYCRI mediante uno o más oligonucleótidos antisentido a un paciente que lo necesita, para prevenir o tratar cualquier enfermedad o trastorno relacionado con la expresión, función, actividad anormal de PYCRI, en comparación con un control normal.

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

35 Según aspectos de la divulgación, la molécula de ácido nucleico diana no se limita a polinucleótidos de PYCR1 solos, sino que se extiende a cualquiera de las isoformas, receptores, homólogos, regiones no codificantes y similares de PYCR1.

40 En un aspecto, un oligonucleótido se dirige a una secuencia antisentido natural (antisentido natural para las regiones codificantes y no codificantes) de dianas de PYCR1, que incluyen, sin limitación, variantes, alelos, homólogos, mutantes, derivados, fragmentos y secuencias complementarias a los mismos. Preferentemente, el oligonucleótido es una molécula de ARN o de ADN antisentido.

45 En un aspecto, los compuestos oligoméricos de la presente divulgación también incluyen variantes en las que una base diferente está presente en una o más de las posiciones de nucleótido en el compuesto. Por ejemplo, si el primer nucleótido es una adenina, pueden producirse variantes que contienen timidina, guanosina, citidina u otros nucleótidos naturales o no naturales en esta posición. Esto puede hacerse en cualquiera de las posiciones del compuesto antisentido. Estos compuestos se ensayan entonces usando los procedimientos descritos en el presente documento para determinar su capacidad para inhibir la expresión de un ácido nucleico diana.

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

Un compuesto antisentido es específicamente hibridable cuando la unión del compuesto al ácido nucleico diana interfiere en la función normal del ácido nucleico diana para producir una pérdida de actividad, y hay un grado de complementariedad suficiente para evitar la unión inespecífica del compuesto antisentido a secuencias de ácidos nucleicos no diana en condiciones en las que se desea la unión específica. Dichas condiciones incluyen, es decir, 5 condiciones fisiológicas en el caso de ensayos *in vivo* o tratamiento terapéutico, y condiciones en las que se realizan los ensayos en el caso de ensayos *in vitro*.

Un compuesto antisentido, ya sea ADN, ARN, quimérico, sustituido, etc., es específicamente hibridable cuando la unión del compuesto a la molécula de ADN o de ARN diana interfiere en la función normal del ADN o ARN diana 10 para producir una pérdida de utilidad, y hay un grado de complementariedad suficiente para evitar la unión inespecífica del compuesto antisentido a secuencias no diana en condiciones en las que se desea la unión específica, es decir, en condiciones fisiológicas en el caso de ensayos *in vivo* o tratamiento terapéutico, y en el caso de ensayos *in vitro*, en condiciones en las que se realizan los ensayos.

15 En un aspecto, la elección como diana de PYCR1 que incluye, sin limitación, secuencias antisentido que se identifican y se expanden, usando por ejemplo, PCR, hibridación etc., una o más de las secuencias expuestas como SEQ ID NO: 2, y similares, modulan la expresión o función de PYCR1. En un aspecto, la expresión o función está regulada positivamente en comparación con un control. En otro aspecto preferido, la expresión o función está regulada negativamente en comparación con un control.

20 En un aspecto, los oligonucleótidos comprenden secuencias de ácidos nucleicos expuestas como SEQ ID NO: 3 a 6 que incluyen secuencias antisentido que se identifican y se expanden, usando por ejemplo, PCR, hibridación etc. Estos oligonucleótidos pueden comprender uno o más nucleótidos modificados, fragmentos más cortos o más largos, enlaces modificados y similares. Los ejemplos de enlaces modificados o enlaces internucleotídicos 25 comprenden fosforotioato, fosforoditioato o similares. En un aspecto, los nucleótidos comprenden un derivado de fósforo. El derivado de fósforo (o grupo fosfato modificado) que puede unirse al resto de azúcar o de 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 indicados anteriormente, y su incorporación en nucleótidos, nucleótidos modificados y oligonucleótidos, también es en sí 30 conocida y no es necesario describirla aquí.

La especificidad y sensibilidad de antisentido también es empleada por aquellos expertos en la materia para usos terapéuticos. Se han empleado oligonucleótidos antisentido como entidades terapéuticas en el tratamiento de patologías en animales y el ser humano. Los oligonucleótidos antisentido se han administrado con seguridad y 35 eficazmente a seres humanos y numerosos ensayos clínicos están actualmente en marcha. De este modo, se establece 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, 40 se unen a moléculas de ácidos nucleicos diana y modulan la expresión y/o función de moléculas codificadas por un gen diana. Las funciones de ADN con las que interferirán comprenden, por ejemplo, replicación y transcripción. Las funciones de ARN con las que interferirán comprenden todas las funciones vitales tales como, por ejemplo, translocalización del ARN al sitio de traducción de proteína, traducción de proteína desde ARN, splicing del ARN para dar una o más especies de ARNm, y actividad catalítica que puede acoplarse en o facilitarse por el ARN. Las 45 funciones pueden regularse positivamente o inhibirse dependiendo de las funciones deseadas.

Los compuestos antisentido incluyen compuestos antisentido oligoméricos, oligonucleótidos antisentido, oligonucleótidos de secuencia de guía externa (EGS), agentes de splicing alterno, cebadores, sondas, y otros 50 compuestos oligoméricos que hibridan con al menos una parte del ácido nucleico diana. Por lo tanto, estos compuestos pueden introducirse en forma de compuestos oligoméricos monocatenarios, bicatenarios, parcialmente monocatenarios, o circulares.

El direccionamiento de un compuesto antisentido a una molécula de ácido nucleico particular, en el contexto de la presente divulgación, puede ser un proceso multietapa. El proceso normalmente empieza con la identificación de un 55 ácido nucleico diana cuya función va a modularse. Este ácido nucleico diana puede ser, por ejemplo, un gen celular (o ARNm transcrito del gen) cuya expresión está asociada a un trastorno o patología particular, o una molécula de ácido nucleico de un agente infeccioso. En la presente divulgación, el ácido nucleico diana codifica la pirroli-5-carboxilato reductasa 1 (PYCR1).

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

En un aspecto, los oligonucleótidos antisentido se unen a las secuencias antisentido naturales de pirrolin-5-carboxilato reductasa 1 (PYCR1) y modulan la expresión y/o función de PYCR1 (SEQ ID NO: 1). Los ejemplos de secuencias antisentido incluyen las SEQ ID NO: 2 a 6.

En un aspecto, los oligonucleótidos antisentido se unen a uno o más segmentos de polinucleótidos de pirrolin-5-carboxilato reductasa 1 (PYCR1) y modulan la expresión y/o función de PYCR1. Los segmentos comprenden al menos cinco nucleótidos consecutivos de polinucleótidos sentido o antisentido de la PYCR1.

En un aspecto, los oligonucleótidos antisentido son específicos para secuencias antisentido naturales de PYCR1 donde la unión de los oligonucleótidos a las secuencias antisentido naturales de PYCR1 modula la expresión y/o función de PYCR1.

En un aspecto, los compuestos de oligonucleótido comprenden secuencias expuestas como SEQ ID NO: 3 a 6, 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 enlaces internucleotídicos comprenden fosforotioato, fosforoditioato o similares. En un aspecto, los nucleótidos comprenden un derivado de fósforo. El derivado de fósforo (o grupo fosfato modificado) que puede unirse al resto de azúcar o de 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 indicados anteriormente, y su incorporación en nucleótidos, nucleótidos modificados y oligonucleótidos, también es en sí conocida y no es necesario describirla aquí.

Ya que, tal como se conoce en la técnica, el codón de iniciación de la traducción normalmente es 5'-AUG (en moléculas de ARNm transcrito; 5'-ATG en la molécula de ADN correspondiente), el codón de iniciación de la traducción también se denomina el "codón AUG", el "codón de iniciación" o el "codón de iniciación AUG". Una minoría de genes tiene un codón de iniciación de la traducción que tiene la secuencia de ARN 5'-GUG, 5'-UUG o 5'-CUG; y se ha demostrado que 5'-AUA, 5'-ACG y 5'-CUG funcionan *in vivo*. De este modo, las expresiones "codón de iniciación de la traducción" y "codón de iniciación" pueden englobar muchas secuencias de codón, aun cuando el aminoácido iniciador en cada caso normalmente sea metionina (en eucariotas) o formilmetionina (en procariotas). Los genes eucariotas y procariotas pueden tener dos o más codones de iniciación alternativos, uno cualquiera de los cuales puede utilizarse preferencialmente para la iniciación de la traducción en un tipo particular de célula o tejido, o en un conjunto particular de condiciones. En el contexto de la divulgación, "codón de iniciación" y "codón de iniciación de la traducción" se refieren al codón o codones que se usan *in vivo* para iniciar la traducción de un ARNm transcrito de un gen que codifica la pirrolin-5-carboxilato reductasa 1 (PYCR1), independientemente de la(s) secuencia(s) 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'-UAA, 5'-UAG y 5'-UGA (las secuencias de ADN correspondientes son 5'-TAA, 5'-TAG y 5'-TGA, respectivamente).

Las expresiones "región de codón de iniciación" y "región de codón de iniciación de la traducción" se refieren a una parte de dicho ARNm o gen que engloba de aproximadamente 25 a aproximadamente 50 nucleótidos contiguos en cualquier dirección (es decir, 5' o 3') desde un codón de iniciación de la traducción. Análogamente, las expresiones "región de codón de terminación" y "región de codón de terminación de la traducción" se refieren a una parte de dicho ARNm o gen que engloba de aproximadamente 25 a aproximadamente 50 nucleótidos contiguos en cualquier dirección (es decir, 5' o 3') desde un codón de terminación de la traducción. Por consiguiente, la "región de codón de iniciación" (o "región de codón de iniciación de la traducción") y la "región de codón de terminación" (o "región de codón de terminación de la traducción") son todas las regiones que pueden ser eficazmente dirigidas como diana con los compuestos antisentido de la presente divulgación.

El marco de lectura abierto (ORF) o "región codificante", que se conoce en la técnica para referirse a la región entre el codón de iniciación de la traducción y el codón de terminación de la traducción, también es una región que puede

ser eficazmente elegida como diana. Dentro del contexto de la presente divulgación, una región elegida como diana es la región intragénica que engloba el codón de iniciación o de terminación de la traducción del marco de lectura abierto (ORF) de un gen.

5 Otra región diana incluye la región no traducida 5' (5'UTR), conocida en la técnica para referirse a la parte de un ARNm en la dirección 5' desde el codón de iniciación de la traducción, y que incluye, por lo tanto, nucleótidos entre el sitio caperuza 5' (5' *cap*) y el codón de iniciación de la traducción de un ARNm (o nucleótidos correspondientes en el gen). Otra región diana más incluye la región no traducida 3' (3'UTR), conocida en la técnica para referirse a la parte de un ARNm en la dirección 3' desde el codón de terminación de la traducción, y que incluye, por lo tanto,  
 10 nucleótidos entre el codón de terminación de la traducción y el extremo 3' de un ARNm (o nucleótidos correspondientes en el gen). El sitio caperuza 5' de un ARNm comprende un residuo de guanosina N7-metilado unido al residuo más 5' del ARNm mediante un enlace trifosfato 5'-5'. La región caperuza 5' de un ARNm se considera que incluye la propia estructura caperuza 5', además de los primeros 50 nucleótidos adyacentes al sitio caperuza. Otra región diana para la presente divulgación es la región caperuza 5'.

15 Aunque algunos ARNm transcritos eucariotas se traducen directamente, muchos contienen una o más regiones, conocidas como "intrones", que se escinden de un transcrito antes de que se traduzca. Las regiones restantes (y, por tanto, traducidas) se conocen como "exones" y se someten a splicing juntas para formar una secuencia de ARNm continua. En un aspecto, la elección como diana de sitios de splicing, es decir, empalmes intrón-exón o  
 20 empalmes exón-intrón, es particularmente útil en situaciones en las que el splicing aberrante participa en la enfermedad, o en las que una producción en exceso de un producto de splicing particular participa en la enfermedad. Un empalme de fusión aberrante debido a la transposición o delección es otro aspecto de un sitio diana. Los ARNm transcritos producidos mediante el proceso de splicing de dos (o más) ARNm de diferentes fuentes de genes se conocen como "transcritos de fusión". Los intrones pueden ser eficazmente elegidos como diana usando  
 25 compuestos antisentido dirigidos a, por ejemplo, ADN o pre-ARNm.

En un 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.

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

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

35 Pueden producirse transcritos de ARN alternativos a partir de la misma región genómica de ADN. Estos transcritos alternativos son generalmente conocidos como "variantes". Más específicamente, "variantes de pre-ARNm" son transcritos producidos a partir del mismo ADN genómico que se diferencian de otros transcritos producidos a partir del mismo ADN genómico en su posición de inicio o de parada y contienen tanto secuencia intrónica como exónica.

40 Tras la escisión de una o más regiones de exón o intrón, o partes de las mismas durante el splicing, las variantes de pre-ARNm producen "variantes de ARNm" más pequeñas. Por consiguiente, las variantes de ARNm son variantes de pre-ARNm procesadas y cada variante de pre-ARNm única siempre debe producir una variante de ARNm única como resultado del splicing. Estas variantes de ARNm también se conocen como "variantes de splicing alternativas".

45 Si no se produce splicing de la variante de pre-ARNm, entonces la variante de pre-ARNm es idéntica a la variante de ARNm.

Las variantes pueden producirse mediante el uso de señales alternativas para la transcripción de inicio o de parada. Los Pre-ARNm y ARNm pueden poseer más de un codón de iniciación o codón de terminación. Las variantes que se  
 50 originan a partir de un pre-ARNm o ARNm que usan codones de iniciación alternativos se conocen como "variantes de inicio alternativas" de ese pre-ARNm o ARNm. Aquellos transcritos que usan un codón de terminación alternativo se conocen como "variantes de parada alternativas" de ese pre-ARNm o ARNm. Un tipo específico de variante de parada alternativa es la "variante de poliA", en la que los múltiples transcritos producidos resultan de la selección alternativa de una de las "señales de parada de poliA" por la maquinaria de transcripción, produciendo de este modo  
 55 transcritos que terminan en sitios de poliA únicos. Dentro del contexto de la divulgación, los tipos de variantes descritos en el presente documento también son aspectos de ácidos nucleicos diana.

Las ubicaciones en el ácido nucleico diana con las que los compuestos antisentido hibridan se definen como al menos una parte de 5 nucleótidos de longitud de una región diana a la que se dirige un compuesto antisentido

activo.

Aunque las secuencias específicas de ciertos segmentos diana a modo de ejemplo se exponen en el presente documento, un experto en la materia reconocerá que éstas sirven para ilustrar y describir casos particulares dentro del alcance de la presente divulgación. Segmentos diana adicionales son fácilmente identificables por un experto en la materia en vista de la presente divulgación.

Se considera que segmentos diana de 5-100 nucleótidos de longitud que comprenden un tramo de al menos cinco (5) nucleótidos consecutivos seleccionados de dentro de los segmentos diana preferidos también son adecuados para el direccionamiento.

Los segmentos diana pueden incluir secuencias de ADN o ARN que comprenden al menos los 5 nucleótidos consecutivos desde el extremo 5' de uno de los segmentos diana preferidos ilustrativos (siendo los restantes nucleótidos un tramo consecutivo del mismo ADN o ARN que empieza inmediatamente cadena arriba del extremo 5' del segmento diana y que continúa hasta que el ADN o ARN contenga de aproximadamente 5 a aproximadamente 100 nucleótidos). Segmentos diana similarmente preferidos se representan por secuencias de ADN o ARN que comprenden al menos los 5 nucleótidos consecutivos desde el extremo 3' de uno de los segmentos diana preferidos ilustrativos (siendo los restantes nucleótidos un tramo consecutivo del mismo ADN o ARN que empieza inmediatamente cadena abajo del extremo 3' del segmento diana y que continúa hasta que el ADN o ARN contenga de aproximadamente 5 a aproximadamente 100 nucleótidos). Un experto en la materia armado con los segmentos diana ilustrados en el presente documento será capaz, sin excesiva experimentación, de identificar segmentos diana preferidos adicionales.

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

En aspectos de la divulgación, los oligonucleótidos se unen a una cadena antisentido de una diana particular. Los oligonucleótidos tienen al menos 5 nucleótidos de longitud y pueden sintetizarse de manera que cada oligonucleótido se dirija a secuencias solapantes de forma que los oligonucleótidos se sinteticen para cubrir toda la longitud del polinucleótido diana. Las dianas también incluyen regiones codificantes, además de no codificantes.

En un aspecto, se prefiere dirigirse a ácidos nucleicos específicos por oligonucleótidos antisentido. El direccionamiento de un compuesto antisentido a un ácido nucleico particular es un proceso multietapa. El proceso normalmente empieza con la identificación de una secuencia de ácidos nucleicos cuya función va a modularse. Ésta puede ser, por ejemplo, un gen celular (o ARNm transcrito a partir del gen) cuya expresión está asociada a un trastorno o patología particular, o un polinucleótido no codificante tal como, por ejemplo, ARN no codificante (ARNnc).

Los ARN pueden clasificarse en (1) ARN mensajeros (ARNm), que se traducen en proteínas, y (2) ARN no codificantes de proteína (ARNnc). Los ARNnc comprenden microARN, transcritos antisentido y otras unidades transcripcionales (TU) que contienen una alta densidad de codones de terminación y que carecen de cualquier amplio "marco de lectura abierto". Muchos ARNnc parecen empezar a partir de sitios de iniciación en regiones no traducidas 3' (3'UTRs) de loci codificante de proteína. Los ARNnc son frecuentemente raros y al menos la mitad de los ARNnc que se han secuenciado por el consorcio FANTOM no parecen estar poliadenilados. La mayoría de los investigadores se han basado, por motivos obvios, en ARNm poliadenilados que se procesan y se exportan al citoplasma. Recientemente, se demostró que el conjunto de ARN nucleares no poliadenilados puede ser muy grande, y que muchos de dichos transcritos surgen de las llamadas regiones intergénicas. El mecanismo por el que los ARNnc pueden regular la expresión génica es por apareamiento de bases con transcritos diana. Los ARN que funcionan por apareamiento de bases pueden agruparse en (1) ARN codificados en cis que están codificados en la misma ubicación genética, pero en la cadena opuesta a los ARN en los que actúan y, por lo tanto, muestran complementariedad perfecta con su diana, y (2) ARN codificados en trans que están codificados en una ubicación cromosómica distinta de los ARN en los que actúan y generalmente no presentan potencial de apareamiento de bases perfecto con sus dianas.

Sin desear ceñirse a ninguna teoría, la perturbación de un polinucleótido antisentido por los oligonucleótidos antisentido descritos en el presente documento puede alterar la expresión de los ARN mensajeros sentido correspondientes. Sin embargo, esta regulación puede tanto ser discordante (la inactivación antisentido produce elevación de ARN mensajero) como concordante (la inactivación antisentido produce reducción concomitante de

ARN mensajero). En estos casos, los oligonucleótidos antisentido pueden ser dirigidos a partes solapantes o no solapantes del transcrito antisentido que producen su inactivación o secuestro. El antisentido codificante, además de no codificante, puede ser dirigido de una manera idéntica y que cualquier categoría es capaz de regular los transcritos sentido correspondientes - tanto de una manera concordante como discordante. Las estrategias que se emplean en identificar nuevos oligonucleótidos para su uso contra una diana pueden basarse en la inactivación de transcritos de ARN antisentido por oligonucleótidos antisentido o cualquier otro medio de modulación de la diana deseada.

*Estrategia 1:* En el caso de regulación discordante, la inactivación del transcrito antisentido eleva la expresión del gen convencional (sentido). Si el último debe codificar un fármaco diana conocido o supuesto, entonces la inactivación de su homólogo antisentido podría imitar posiblemente la acción de un agonista receptor o una enzima estimulante.

*Estrategia 2:* En el caso de regulación concordante, podrían inactivarse de forma concomitante tanto los transcritos antisentido como sentido y así lograr una reducción sinérgica de la expresión génica (sentido) convencional. Si, por ejemplo, un oligonucleótido antisentido se usa para lograr la inactivación, entonces esta estrategia puede usarse para aplicar un oligonucleótido antisentido dirigido al transcrito sentido y otro oligonucleótido antisentido al transcrito antisentido correspondiente, o un único oligonucleótido antisentido energéticamente simétrico que se dirige simultáneamente a transcritos sentido y antisentido solapantes.

De acuerdo con la presente divulgación, los compuestos antisentido incluyen oligonucleótidos antisentido, ribozimas, oligonucleótidos de secuencia de guía externa (EGS), compuestos de siRNA, compuestos de interferencia (iARN) de ARN mono- o bicatenario tales como compuestos de siRNA, y otros compuestos oligoméricos que hibridan con al menos una parte del ácido nucleico diana y modulan su función. Por lo tanto, pueden ser ADN, ARN, similares a ADN, similares a ARN, 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 de horquilla y pueden contener elementos estructurales tales como protuberancias internas o terminales, desapareamientos o bucles. Los compuestos antisentido se preparan de forma rutinaria linealmente, pero pueden unirse o prepararse de otro modo para ser circulares y/o ramificados. Los compuestos antisentido pueden incluir construcciones tales como, por ejemplo, dos cadenas hibridadas para formar un compuesto completa o parcialmente bicatenario o una única cadena con auto-complementariedad suficiente para permitir la hibridación y formación de un compuesto completa o parcialmente bicatenario. Las dos cadenas pueden enlazarse internamente, dejando los extremos 3' o 5' libres o pueden enlazarse para formar una estructura de horquilla continua o bucle. La estructura de horquilla puede contener un nucleótido protuberante en cualquiera de los extremos 5' o 3' que produce una extensión del carácter monocatenario. Los compuestos bicatenarios opcionalmente pueden incluir nucleótidos protuberantes en los extremos. Modificaciones adicionales pueden incluir grupos conjugados unidos a uno de los extremos, posiciones de nucleótido seleccionadas, posiciones de azúcar o a uno de los enlaces internucleosídicos. Como alternativa, las dos cadenas pueden enlazarse mediante un resto no de ácido nucleico o grupo conector. Cuando se forma a partir de solo una cadena, el dsARN puede tomar la forma de una molécula tipo horquilla auto-complementaria que se dobla sobre sí misma para formar un dúplex. De este modo, el dsARN puede ser completa o parcialmente bicatenario. Puede lograrse modulación específica de la expresión génica por expresión estable de horquillas de dsARN en líneas celulares transgénicas, sin embargo, en algunos casos, la expresión o función génica está regulada positivamente. Cuando se forma a partir de dos cadenas, o una única cadena que adopta la forma de una molécula de tipo horquilla auto-complementaria que se dobla sobre sí misma para formar un dúplex, las dos cadenas (o regiones formadoras de dúplex de una sola cadena) son cadenas de ARN complementarias que se aparean con bases en el modo de Watson-Crick.

Una vez introducidos a un sistema, los compuestos de la divulgación pueden provocar la acción de una o más enzimas o proteínas estructurales para efectuar la escisión u otra modificación del ácido nucleico diana o pueden trabajar mediante mecanismos basados en la ocupación. En general, los ácidos nucleicos (incluyendo oligonucleótidos) pueden describirse como "similares a ADN" (es decir, que generalmente tienen uno o más 2'-desoxiazúcares y, generalmente, bases T en vez de U) o "similares a ARN" (es decir, que generalmente tienen uno o más 2'-hidroxilazúcares o azúcares modificados en 2' y, generalmente bases U en vez de T). Las hélices de ácido nucleico pueden adoptar más de un tipo de estructura, más comúnmente las formas A y B. Se cree que, en general, los oligonucleótidos que tienen estructura similar a la forma B son "similares a ADN" y aquellos que tienen estructura similar a la forma A son "similares a ARN". En algunos casos (químicos), un compuesto antisentido puede contener tanto regiones en forma A como B.

En un aspecto, los oligonucleótidos deseados o compuestos antisentido comprenden al menos uno de: ARN

antisentido, ADN antisentido, oligonucleótidos antisentido quiméricos, oligonucleótidos antisentido que comprenden enlaces modificados, ARN de interferencia (iARN), ARN interferente pequeño (siRNA); un microARN interferente (miARN); un ARN temporal pequeño (ARNtp); o un ARN de horquilla corta (ARNhc); activación génica inducida por ARN pequeño (aARN); ARN activantes pequeños (ARNap), o combinaciones de los mismos.

5

Los dsARN también pueden activar la expresión génica, un mecanismo que se ha llamado "activación génica inducida por ARN pequeño" o aARN. Los promotores génicos que se dirigen a dsARN inducen la potente activación transcripcional de genes asociados. El aARN se demostró en células humanas usando dsARN sintéticos, llamados "ARN activantes pequeños" (ARNap). No se sabe actualmente si el aARN está conservado en otros organismos.

10

Se ha descubierto que el ARN bicatenario pequeño (dsARN), tal como ARN interferente pequeño (siRNA) y microARN (miARN), es el desencadenante de un mecanismo evolutivamente conservado conocido como interferencia de ARN (iARN). La iARN conduce invariablemente al silenciamiento génico mediante la remodelación de cromatina para suprimir de este modo la transcripción, degradación de ARNm complementario, o bloqueo de la traducción de proteínas. Sin embargo, en los casos descritos en detalle en la sección de ejemplos a continuación, se muestra que los oligonucleótidos aumentan la expresión y/o función de los polinucleótidos de la pirrolin-5-carboxilato reductasa 1 (PYCR1) y productos codificados por los mismos. Los dsARN también pueden actuar de ARN activantes pequeños (ARNap). Sin desear ceñirse a ninguna teoría, direccionando secuencias a promotores génicos, los ARNap inducirán la expresión de genes diana en un fenómeno denominado activación transcripcional inducida por dsARN (aARN).

20

En un aspecto adicional, los "segmentos diana preferidos" identificados en el presente documento pueden emplearse en un cribado para compuestos adicionales que modulan la expresión de polinucleótidos de la pirrolin-5-carboxilato reductasa 1 (PYCR1). "Moduladores" son aquellos compuestos que disminuyen o aumentan la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica PYCR1 y que comprenden al menos una parte de 5 nucleótidos que es complementaria a un segmento diana preferido. El procedimiento de cribado comprende las etapas de poner en contacto un segmento diana preferido de una molécula de ácido nucleico que codifica polinucleótidos sentido o antisentido naturales de PYCR1 con uno o más moduladores candidatos, y seleccionar uno o más moduladores candidatos que disminuyen o aumentan la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica polinucleótidos de PYCR1, por ejemplo, SEQ ID NO: 3 a 6. Una vez que se demuestra que el modulador o moduladores candidatos son capaces de modular (por ejemplo, tanto disminuir como aumentar) la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica polinucleótidos de PYCR1, el modulador puede entonces emplearse en estudios de investigación adicionales de la función de polinucleótidos de PYCR1, o para su uso como un agente de investigación, diagnóstico o terapéutico de acuerdo con la presente divulgación.

35

El direccionamiento de la secuencia antisentido natural modula preferentemente la función del gen diana. Por ejemplo, el gen PYCR1 (por ejemplo, número de acceso NM\_006907). En un aspecto, la diana es un polinucleótido antisentido del gen PYCR1. En un aspecto, un oligonucleótido antisentido se dirige a secuencias sentido y/o antisentido naturales de los polinucleótidos de PYCR1 (por ejemplo, número de acceso NM\_006907), variantes, alelos, isoformas, homólogos, mutantes, derivados, fragmentos y secuencias complementarias a los mismos. Preferentemente, el oligonucleótido es una molécula antisentido y las dianas incluyen regiones codificantes y no codificantes de polinucleótidos antisentido y/o sentido de PYCR1.

40

Los segmentos diana preferidos de la presente divulgación también pueden combinarse con sus compuestos antisentido complementarios respectivos de la presente divulgación para formar oligonucleótidos (duplexados) bicatenarios estabilizados.

45

Se ha demostrado en la materia que dichos restos de oligonucleótido bicatenario modulan la expresión de la diana y regulan la traducción, además del procesamiento de ARN mediante un mecanismo antisentido. Además, los restos bicatenarios pueden someterse a modificaciones químicas. Por ejemplo, se ha demostrado que dichos restos bicatenarios inhiben la diana por la hibridación clásica de la cadena antisentido del dúplex con la diana, produciendo de este modo la degradación enzimática de la diana.

50

En un aspecto, un oligonucleótido antisentido se dirige a polinucleótidos de la pirrolin-5-carboxilato reductasa 1 (PYCR1) (por ejemplo, número de acceso NM\_006907), variantes, alelos, isoformas, homólogos, mutantes, derivados, fragmentos y secuencias complementarias a los mismos. Preferentemente, el oligonucleótido es una molécula antisentido.

55

De acuerdo con aspectos de la divulgación, la molécula de ácido nucleico diana no se limita a PYCR1 sola, sino que

se extiende a cualquiera de las isoformas, receptores, homólogos y similares de las moléculas de PYCR1.

En un aspecto, un oligonucleótido se dirige a una secuencia antisentido natural de polinucleótidos de PYCR1, por ejemplo, polinucleótidos expuestos como SEQ ID NO: 2, y cualquier variante, alelo, homólogo, mutante, derivado, 5 fragmento y secuencia complementaria a los mismos. Los ejemplos de oligonucleótidos antisentido se exponen como SEQ ID NO: 3 a 6.

En un aspecto, los oligonucleótidos son complementarios a o se unen a secuencias de ácido nucleico de PYCR1 antisentido, que incluyen aunque sin limitarse a secuencias sentido y/o antisentido no codificantes asociadas con 10 polinucleótidos de PYCR1 y modulan la expresión y/o la función de moléculas de PYCR1.

En un aspecto, los oligonucleótidos son complementarios a o se unen a secuencias de ácido nucleico de PYCR1 natural antisentido, expuestas como SEQ ID NO: 2 y modulan la expresión y/o la función de moléculas de PYCR1.

15 En un aspecto, los oligonucleótidos comprenden secuencias de al menos 5 nucleótidos consecutivos de las SEQ ID NO: 3 a 6 y modulan la expresión y/o la función de moléculas de PYCR1.

Las dianas de polinucleótido comprenden PYCR1, que incluye miembros de su familia, variantes de PYCR1; mutantes de PYCR1, que incluyen SNP; secuencias no codificantes de PYCR1; alelos de PYCR1; variantes de 20 especies, fragmentos y similares. Preferentemente, el oligonucleótido es una molécula antisentido.

En un aspecto, el oligonucleótido que se dirige a polinucleótidos de PYCR1 comprende: ARN antisentido, ARN de interferencia (iARN), ARN interferente pequeño (siRNA); microARN interferente (miARN); un ARN temporal pequeño (ARNtp); o un ARN de horquilla corta (ARNhc); activación génica inducida por ARN pequeño (aARN); o, ARN 25 activante pequeño (ARNap).

En un aspecto, la elección como diana de polinucleótidos de pirrolin-5-carboxilato reductasa 1 (PYCR1), por ejemplo, SEQ ID NO: 2, modula la expresión o función de estas dianas. En un aspecto, la expresión o función está regulada 30 positivamente en comparación con un control. En un aspecto, la expresión o función se regula negativamente en comparación con un control.

En un aspecto, los compuestos antisentido comprenden secuencias expuestas como SEQ ID NO: 3 a 6. Estos oligonucleótidos pueden comprender uno o más nucleótidos modificados, fragmentos más cortos o más largos, 35 enlaces modificados y similares.

En un aspecto, las SEQ ID NO: 3 a 6 comprenden uno o más nucleótidos de LNA. La Tabla 1 muestra oligonucleótidos antisentido ejemplares útiles en los procedimientos de la divulgación.

**Tabla 1:**

ID de la secuencia	Nombre de la secuencia	Secuencia
SEQ ID NO:3	CUR-1424	A*G*T*C*C*T*G*C*T*G*T*C*T*G*G*C*T*G*A
SEQ ID NO:4	CUR-1423	A*C*A*T*C*C*T*C*C*A*C*C*G*C*A*C*T*C*T
SEQ ID NO:5	CUR-1426	G*C*C*A*G*G*A*G*T*C*A*G*G*G*T*A*T*G*C*A
SEQ ID NO:6	CUR-1425	A*C*G*A*G*T*A*C*C*C*A*C*C*A*C*A*C*C*A

40 La modulación de un ácido nucleico diana deseado puede llevarse a cabo de varias formas conocidas en la técnica. Por ejemplo, oligonucleótidos antisentido, siRNA, etc. Las moléculas de ácidos nucleicos enzimáticos (por ejemplo, ribozimas) son moléculas de ácidos nucleicos capaces de catalizar una o más de diversas reacciones, que incluyen la capacidad para escindir repetidamente otras moléculas de ácidos nucleicos separadas en un modo específico de 45 secuencia de bases de nucleótidos. Dichas moléculas de ácidos nucleicos enzimáticos pueden usarse, por ejemplo, para dirigirse prácticamente a cualquier transcrito de ARN.

Debido a su especificidad de secuencia, las moléculas de ácidos nucleicos enzimáticos que se escinden en trans muestran promesa como agentes terapéuticos para enfermedad humana. Las moléculas de ácidos nucleicos 50 enzimáticos pueden diseñarse para escindir dianas de ARN específicas dentro del fondo del ARN celular. Un acontecimiento de escisión de este tipo convierte el ARNm en no funcional y anula la expresión de proteínas de ese ARN. De este modo puede inhibirse selectivamente la síntesis de una proteína asociada a una patología.

En general, los ácidos nucleicos enzimáticos con actividad de escisión de ARN actúan uniéndose primero a un ARN

diana. Dicha unión se produce mediante la parte de unión de diana de un ácido nucleico enzimático que se mantiene en estrecha proximidad a una parte enzimática de la molécula que actúa para escindir el ARN diana. De este modo, el ácido nucleico enzimático se reconoce primero y a continuación se une a ARN diana mediante apareamiento de bases complementario, y una vez se une al sitio correcto, actúa enzimáticamente para cortar el ARN diana. La escisión estratégica de dicho ARN diana destruirá su capacidad para dirigir la síntesis de una proteína codificada. Después de unirse un ácido nucleico enzimático y escindir su ARN diana, se libera de ese ARN para buscar otra diana y puede unirse repetidamente y escindir nuevas dianas.

Se han usado varios enfoques, tales como estrategias de selección *in vitro* (evolución) (Orgel, (1979) Proc. R. Soc. London, B 205, 435), para desarrollar nuevos catalizadores de ácido nucleico capaces de catalizar diversas reacciones, tales como escisión y ligamiento de enlaces fosfodiéster y enlaces amida.

El desarrollo de ribozimas que son óptimas para la actividad catalítica contribuiría significativamente a cualquier estrategia que empleara ribozimas que escinden ARN con el fin de regular la expresión génica. La ribozima de cabeza de martillo, por ejemplo, funciona con una velocidad catalítica (kcat) de aproximadamente 1 min<sup>-1</sup> en presencia de concentraciones saturantes (10 mM) de cofactor de Mg<sup>2+</sup>. Se ha demostrado que una ribozima de "ligasa de ARN" artificial cataliza la reacción de auto-modificación correspondiente con una velocidad de aproximadamente 100 min<sup>-1</sup>. Además, se sabe que ciertas ribozimas de cabeza de martillo modificadas que tienen brazos de unión al sustrato hechos de ADN catalizan la escisión de ARN con múltiples velocidades de recuperación que se aproximan a 100 min<sup>-1</sup>. Finalmente, la sustitución de un residuo específico dentro del núcleo catalítico de la cabeza de martillo con ciertos análogos de nucleótido da ribozimas modificadas que muestran una mejora de hasta 10 veces en la velocidad catalítica. Estos descubrimientos demuestran que las ribozimas pueden promover transformaciones químicas con velocidades catalíticas que son significativamente superiores a aquellas mostradas *in vitro* por la mayoría de las ribozimas que se auto-escinden naturales. Entonces es posible que las estructuras de ciertas ribozimas que se auto-escinden puedan optimizarse para dar la máxima actividad catalítica, o que puedan prepararse motivos de ARN completamente nuevos que muestran velocidades significativamente más rápidas para la escisión de fosfodiéster de ARN.

La escisión intermolecular de un sustrato de ARN por un catalizador de ARN que se ajusta al modelo de "cabeza de martillo" se demostró por primera vez en 1987 (Uhlenbeck, O. C. (1987) Nature, 328: 596-600). Se recuperó el catalizador de ARN y se hizo reaccionar con múltiples moléculas de ARN, demostrando que era verdaderamente catalítico.

Se han usado ARN catalíticos diseñados basándose en el motivo de "cabeza de martillo" para escindir secuencias diana específicas haciendo cambios de base apropiados en el ARN catalítico para mantener apareamiento de bases necesarios con las secuencias diana. Esto ha permitido el uso del ARN catalítico para escindir secuencias diana específicas e indica que los ARN catalíticos diseñados según el modelo de "cabeza de martillo" pueden escindir posiblemente ARN de sustrato específico *in vivo*.

La interferencia de ARN (iARN) se ha convertido en una poderosa herramienta para modular la expresión génica en mamíferos y células de mamífero. Este enfoque requiere la administración de ARN interferente pequeño (siRNA) bien como el propio ARN o bien como ADN, usando un plásmido de expresión o virus y la secuencia codificante para ARN de horquilla pequeño que se procesa a siRNA. Este sistema permite el eficaz transporte de los pre-siRNA al citoplasma en el que son activos y permite el uso de promotores regulados y específicos de tejido para la expresión génica.

En un aspecto, un oligonucleótido o compuesto antisentido comprende un oligómero o polímero de ácido ribonucleico (ARN) y/o ácido desoxirribonucleico (ADN), o un mimético, quimera, análogo u homólogo de los mismos. Este término incluye oligonucleótidos compuestos de nucleótidos que existen de forma natural, azúcares y enlaces internucleosídicos covalentes (esqueleto), además de oligonucleótidos que tienen partes no de origen natural que funcionan similarmente. Dichos oligonucleótidos modificados o sustituidos son frecuentemente deseados con respecto a formas nativas debido a propiedades deseables tales como, por ejemplo, captación celular potenciada, afinidad potenciada por un ácido nucleico diana y elevada estabilidad en presencia de nucleasas.

De acuerdo con la presente divulgación, los oligonucleótidos o "compuestos antisentido" incluyen oligonucleótidos antisentido (por ejemplo, ARN, ADN, mimético, quimera, análogo u homólogo de los mismos), ribozimas, oligonucleótidos de secuencia de guía externa (EGS), compuestos de siRNA, compuestos de interferencia (iARN) de ARN mono- o bicatenario tales como compuestos de siRNA, ARN<sub>ap</sub>, ARN<sub>a</sub>, y otros compuestos oligoméricos que hibridan con al menos una parte del ácido nucleico diana y modulan su función. Por lo tanto, pueden ser ADN, ARN,

similares a ADN, similares a ARN, 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 de horquilla y pueden contener elementos estructurales tales como protuberancias internas o terminales, desapareamientos o bucles. Los compuestos antisentido se preparan de forma rutinaria linealmente, pero pueden unirse o prepararse de otro modo para ser circulares y/o ramificados. Los compuestos antisentido pueden incluir construcciones tales como, por ejemplo, dos cadenas hibridadas para formar un compuesto completa o parcialmente bicatenario o una única cadena con auto-complementariedad suficiente para permitir la hibridación y formación de un compuesto completa o parcialmente bicatenario. Las dos cadenas pueden enlazarse internamente, dejando los extremos 3' o 5' libres o pueden enlazarse para formar una estructura de horquilla continua o bucle. La estructura de horquilla puede contener un nucleótido protuberante en cualquiera de los extremos 5' o 3' que produce una extensión del carácter monocatenario. Los compuestos bicatenarios opcionalmente pueden incluir nucleótidos protuberantes en los extremos. Modificaciones adicionales pueden incluir grupos conjugados unidos a uno de los extremos, posiciones de nucleótido seleccionadas, ramificaciones de azúcar o a uno de los enlaces internucleosídicos. Como alternativa, las dos cadenas pueden enlazarse mediante un resto no de ácido nucleico o grupo conector. Cuando se forma a partir de solo una cadena, el dsARN puede tomar la forma de una molécula tipo horquilla auto-complementaria que se dobla sobre sí misma para formar un dúplex. De este modo, el dsARN puede ser completa o parcialmente bicatenario. Puede lograrse modulación específica de la expresión génica por expresión estable de horquillas de dsARN en líneas celulares transgénicas. Cuando se forma a partir de dos cadenas, o una única cadena que adopta la forma de una molécula de tipo horquilla auto-complementaria que se dobla sobre sí misma para formar un dúplex, las dos cadenas (o regiones formadoras de dúplex de una sola cadena) son cadenas de ARN complementarias que se aparean con bases en el modo de Watson-Crick.

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

Los compuestos antisentido de acuerdo con esta divulgación pueden comprender una parte antisentido de aproximadamente 5 a aproximadamente 80 nucleótidos (es decir, de aproximadamente 5 a aproximadamente 80 nucleósidos enlazados) de longitud. Esto se refiere a la longitud de la cadena antisentido o parte del compuesto 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 dsARN, por ejemplo) comprende una cadena sentido y antisentido o parte de 5 a aproximadamente 80 nucleótidos de longitud. Un experto habitual en la materia apreciará que éste comprenda partes antisentido de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, o 80 nucleótidos de longitud, o cualquier intervalo entremedias.

En un aspecto, los compuestos antisentido de la divulgación tienen partes antisentido de 10 a 50 nucleótidos de longitud. Un experto habitual en la materia apreciará que éstos integran oligonucleótidos que tienen partes 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 entremedias. En algunos aspectos, los oligonucleótidos tienen 15 nucleótidos de longitud.

En un aspecto, los compuestos antisentido o de oligonucleótido de la divulgación tienen partes antisentido de 12 o 13 a 30 nucleótidos de longitud. Un experto en la materia apreciará que éstos integran compuestos antisentido que tienen partes 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 entremedias.

En un aspecto, los compuestos oligoméricos de la presente divulgación también incluyen variantes en las que una base diferente está presente en una o más de las posiciones de nucleótido en el compuesto. Por ejemplo, si el primer nucleótido es una adenosina, pueden producirse variantes que contienen timidina, guanosina o citidina en esa posición. Esto puede hacerse en cualquiera de las posiciones de los compuestos antisentido o de dsARN. Estos

compuestos se ensayan entonces usando los procedimientos descritos en el presente documento para determinar su capacidad para inhibir la expresión de un ácido nucleico diana.

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

En un aspecto, los oligonucleótidos antisentido, tales como, por ejemplo, las moléculas de ácidos nucleicos expuestas en las SEQ ID NO: 2 a 6, comprenden una o más sustituciones o modificaciones. En un aspecto, los nucleótidos están sustituidos con ácidos nucleicos bloqueados (LNA).

En un aspecto, los oligonucleótidos se dirigen a una o más regiones de las moléculas de ácidos nucleicos sentido y/o antisentido de secuencias codificantes y/o no codificantes asociadas a PYCR1 y las secuencias expuestas como SEQ ID NO: 1 y 2. Los oligonucleótidos también se dirigen a regiones solapantes de las SEQ ID NO: 1 y 2.

Ciertos oligonucleótidos preferidos 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 constituida por al menos un nucleótido. Estos oligonucleótidos normalmente contienen al menos una región de nucleótidos modificados que confiere una o más propiedades beneficiosas (tales como, por ejemplo, resistencia a nucleasas incrementada, captación en células incrementada, afinidad de unión por la diana incrementada) y una región que es un sustrato para enzimas capaces de escindir híbridos de ARN:ADN o ARN:ARN. A modo de ejemplo, la ARNasa H es una endonucleasa celular que escinde la cadena de ARN de un dúplex de ARN:ADN. La activación de ARNasa H, por lo tanto, produce la escisión del ARN diana, potenciando así enormemente la eficiencia de la modulación antisentido de la expresión génica. Por consiguiente, frecuentemente pueden obtenerse 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 del ARN diana puede detectarse rutinariamente por electroforesis en gel y, si fuera necesario, técnicas de hibridación de ácidos nucleicos asociadas conocidas en la técnica. En un aspecto preferido, un oligonucleótido quimérico comprende al menos una región modificada para aumentar la afinidad de unión de la diana, y, normalmente, una región que actúa de sustrato para ARNasa H. La afinidad de un oligonucleótido por su diana (en este caso, un ácido nucleico que codifica ras) se determina rutinariamente midiendo la  $T_m$  de un par de oligonucleótido/diana, que es la temperatura a la que se disocian el oligonucleótido y la diana; la disociación se detecta espectrofotométricamente. Cuanto mayor sea la  $T_m$ , mayor será la afinidad del oligonucleótido por la diana.

Los compuestos antisentido quiméricos de la divulgación pueden formarse como estructuras compuestas por dos o más oligonucleótidos, oligonucleótidos modificados, miméticos de oligonucleósidos y/o por oligonucleótidos, tal como se han descrito anteriormente. Dichos compuestos también se han denominado en la materia híbridos o gámpmeros. Patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de dichas estructuras híbridas comprenden, aunque no se limitan a, las patentes de Estados Unidos N° 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 un aspecto, la región del oligonucleótido que se modifica comprende al menos un nucleótido modificado en la posición 2' del azúcar, más preferentemente un nucleótido modificado con 2'-O-alkilo, 2'-O-alkil-O-alkilo o 2'-flúor. En otro aspecto, las modificaciones de ARN incluyen modificaciones de 2'-flúor, 2'-amino y 2'-O-metilo en la ribosa de pirimidinas, residuos abásicos o una base invertida en el extremo 3' del ARN. Dichas modificaciones se incorporan rutinariamente en oligonucleótidos y se ha demostrado que estos oligonucleótidos tienen una mayor  $T_m$  (es decir, mayor afinidad de unión a diana) que los 2'-desoxi oligonucleótidos contra una diana dada. El efecto de dicha afinidad elevada es potenciar enormemente la inhibición por oligonucleótidos de iARN de la expresión génica. La ARNasa H es una endonucleasa celular que escinde la cadena de ARN del dúplex de ARN:ADN; por lo tanto, la activación de esta enzima produce la escisión del ARN diana, y de este modo puede potenciar enormemente la eficiencia de inhibición de iARN. La escisión del ARN diana puede demostrarse rutinariamente por electroforesis en gel. En otro aspecto preferido, el oligonucleótido quimérico también se modifica para potenciar la resistencia a nucleasas. Las células contienen una variedad de exo- y endo-nucleasas que pueden degradar ácidos nucleicos. Se

ha demostrado que varias modificaciones de nucleótidos y nucleósidos hacen que el oligonucleótido en el que se incorporan sea más resistente a la digestión por nucleasa que el oligodesoxinucleótido nativo. La resistencia a nucleasas se mide rutinariamente incubando oligonucleótidos con extractos celulares o soluciones de nucleasa aisladas y midiendo el grado de oligonucleótido intacto que queda con el tiempo, normalmente por electroforesis en gel. Los oligonucleótidos que se han modificado para potenciar su resistencia a nucleasas sobreviven intactos durante más tiempo que los oligonucleótidos sin modificar. Se ha demostrado que diversas modificaciones de oligonucleótidos potencian o confieren resistencia a nucleasas. Los oligonucleótidos que contienen al menos una modificación de fosforotioato son actualmente más preferidos. En algunos aspectos, las modificaciones de oligonucleótidos que potencian la afinidad de unión a diana son, por lo tanto, independientemente capaces de potenciar la resistencia a nucleasas.

Ejemplos específicos de algunos oligonucleótidos preferidos concebidos por esta divulgación incluyen aquellos que comprenden esqueletos modificados, por ejemplo, fosforotioatos, fosfotriésteres, metilfosfonatos, enlaces entre azúcares de alquilo o cicloalquilo de cadena corta o enlaces entre azúcares heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta. Los más preferidos son oligonucleótidos con esqueletos de fosforotioato y aquellos con esqueletos de heteroátomo, particularmente esqueletos de CH<sub>2</sub>-NH-O-CH<sub>2</sub>, CH, -N(CH<sub>3</sub>)-O-CH<sub>2</sub> [conocido como un esqueleto de metilen(metilimino) o MMI], CH<sub>2</sub>-O--N(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)-N(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub> y O--N(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>, en los que el esqueleto de fosfodiéster nativo se representa como O--P--O--CH<sub>2</sub>. También se prefieren esqueletos de amida descritos por De Mesmaeker et al. (1995) Acc. Chem. Res. 28: 366-374. También se prefieren oligonucleótidos que tienen estructuras de esqueleto de morfolino (Summerton y Weller, patente de Estados Unidos N° 5.034.506). En otro aspecto, tal como el esqueleto de ácido nucleico peptídico (PNA), el esqueleto de fosfodiéster del oligonucleótido se sustituye por un esqueleto de poliamida, estando los nucleótidos unidos directamente o indirectamente a los átomos de nitrógeno azo del esqueleto de poliamida. Los oligonucleótidos también pueden comprender uno o más restos de azúcar sustituidos. Oligonucleótidos preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': OH, SH, SCH<sub>3</sub>, F, OCN, OCH<sub>3</sub> OCH<sub>3</sub>, OCH<sub>3</sub> O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> CH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH<sub>2</sub> o O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub> en los que n es de 1 a aproximadamente 10; alquilo C1 a C10 inferior, alcoxicoxi, alquilo, alcarilo o aralquilo inferior sustituido; Cl; Br; CN; CF<sub>3</sub>; OCF<sub>3</sub>; O-, S-, o N-alquilo; O-, S-, o N-alqueno; SOCH<sub>3</sub>; SO<sub>2</sub> CH<sub>3</sub>; ONO<sub>2</sub>; NO<sub>2</sub>; N<sub>3</sub>; NH<sub>2</sub>; heterocicloalquilo; heterocicloalcarilo; aminoalquilamino; polialquilamino; sililo sustituido; un grupo de escisión de ARN; un grupo indicador; un intercalador; un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido; o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un oligonucleótido y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. Una modificación preferida incluye 2'-metoxietoxi [2'-O-CH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub> OCH<sub>3</sub>, también conocido como 2'-O-(2-metoxietilo)]. Otras modificaciones preferidas incluyen 2'-metoxi (2'-O--CH<sub>3</sub>), 2'-propoxi(2'-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) y 2'-flúor (2'-F). También pueden hacerse modificaciones similares en otras posiciones sobre el oligonucleótido, particularmente la posición 3' del azúcar en el nucleótido del extremo 3' y la posición 5' del nucleótido del extremo 5'. Los oligonucleótidos también pueden tener miméticos de azúcar tales como ciclobutilos en lugar del grupo pentofuranosilo.

Los oligonucleótidos también pueden incluir, adicionalmente o como alternativa, modificaciones o sustituciones de nucleobases (frecuentemente denominadas en la técnica simplemente "base"). Tal como se usa en el presente documento, nucleótidos "no modificados" o "naturales" incluyen adenina (A), guanina (G), timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Los nucleótidos modificados incluyen nucleótidos encontrados solo poco frecuentemente o transitoriamente en ácidos nucleicos naturales, por ejemplo, hipoxantina, 6-metiladenina, 5-Me-pirimidinas, particularmente 5-metilcitosina (también denominada 5-metil-2'-desoxicitosina y frecuentemente denominada en la técnica 5-Me-C), 5-hidroximetilcitosina (HMC), glicosil HMC y gentobiosil HMC, además de nucleótidos sintéticos, por ejemplo, 2-aminoadenina, 2-(metilamino)adenina, 2-(imidazolilalquil)adenina, 2-(aminoalquilamino)adenina u otras alquiladeninas heterosustituidas, 2-tiouracilo, 2-tiotimina, 5-bromouracilo, 5-hidroximetiluracilo, 8-azaguanina, 7-deazaguanina, N<sup>6</sup>(6-aminohexil)adenina y 2,6-diaminopurina. Puede incluirse una base "universal" conocida en la técnica, por ejemplo, inosina. Se ha demostrado que las sustituciones de 5-Me-C aumentan la estabilidad del dúplex de ácido nucleico 0,6-1,2°C y son las sustituciones de base actualmente preferidas.

Otra modificación de los oligonucleótidos de la divulgación implica enlazar químicamente al oligonucleótido uno o más restos o conjugados que potencian la actividad o captación celular del oligonucleótido. Dichos restos incluyen, aunque no se limitan a, restos de lípido tales como un resto de colesterol, un resto colesterilo, una cadena alifática, por ejemplo, residuos de dodecandiol o undecilo, una poliamina o una cadena de polietilenglicol, o ácido adamantano acético. Los oligonucleótidos que comprenden restos lipófilos, y procedimientos para preparar dichos oligonucleótidos, son conocidos en la técnica, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N° 5.138.045, 5.218.105 y 5.459.255.

No es necesario que todas las posiciones en un oligonucleótido dado estén uniformemente modificadas, y de hecho

más de una de las modificaciones mencionadas anteriormente puede incorporarse en un único oligonucleótido o incluso dentro de un único nucleósido dentro de un oligonucleótido. La presente divulgación también incluye oligonucleótidos que son oligonucleótidos quiméricos, tal como se ha definido anteriormente en el presente documento.

5

En otro aspecto, la molécula de ácido nucleico de la presente divulgación está conjugada con otro resto que incluye, aunque no se limita a, nucleótidos abásicos, poliéter, poliamina, poliamidas, péptidos, hidratos de carbono, lípido, o compuestos de polihidrocarburo. Los expertos en la materia reconocerán que estas moléculas pueden enlazarse a uno o más de cualquiera de los nucleótidos que comprenden la molécula de ácido nucleico en varias posiciones en el azúcar, base o grupo fosfato.

10

Los oligonucleótidos usados de acuerdo con esta divulgación pueden prepararse cómoda y rutinariamente mediante la técnica muy conocida de síntesis en fase sólida. Equipo para dichas síntesis es comercializado por varios proveedores que incluyen Applied Biosystems. También puede emplearse cualquier otro medio para dicha síntesis; la síntesis real de los oligonucleótidos está perfectamente dentro de las aptitudes de un experto en la materia. También es muy conocido usar técnicas similares para preparar otros oligonucleótidos tales como fosforotioatos y derivados alquilados. También es muy conocido usar técnicas similares y amiditos modificados disponibles en el mercado y productos de vidrio de poro controlado (CPG) tales como biotina, fluoresceína, acridina o amiditos modificados con psoraleno y/o CPG (disponible de Glen Research, Sterling VA) para sintetizar oligonucleótidos marcados de forma fluorescente, biotinilados u otros oligonucleótidos modificados tales como oligonucleótidos modificados con colesterol.

15

20

De acuerdo con la divulgación, el uso de modificaciones tales como el uso de monómeros de LNA para potenciar la potencia, especificidad y duración de la acción y ampliar las vías de administración de oligonucleótidos comprende químicas actuales tales como MOE, ANA, FANA, PS, etc. Esto puede lograrse sustituyendo algunos de los monómeros en los presentes oligonucleótidos por monómeros de LNA. El oligonucleótido modificado con LNA puede tener un tamaño similar al compuesto parental o puede ser más largo o preferentemente más pequeño. Se prefiere que dichas oligonucleótidos modificados con LNA contengan menos de aproximadamente el 70%, más preferentemente menos de aproximadamente el 60%, más preferentemente menos de aproximadamente el 50% de monómeros de LNA y que sus tamaños estén entre aproximadamente 5 y 25 nucleótidos, más preferentemente entre aproximadamente 12 y 20 nucleótidos.

25

30

Esqueletos de oligonucleótidos modificados preferidos comprenden, pero no se limitan a, fosforotioatos, fosforotioatos quirales, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, metil y otros alquil fosfonatos que comprenden 3'-alquilenfosfonatos y fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidatos que comprenden 3'-amino fosforamidato y aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionoalquilfosfonatos, tionoalquilfosfotriésteres y boranofosfatos que tienen enlaces 3'-5' normales, análogos enlazados en 2'-5' de estos, y aquellos que tienen polaridad invertida en los que los pares adyacentes de unidades de nucleósidos están enlazados 3'-5' a 5'-3' o 2'-5' a 5'-2'. También están incluidas diversas sales, sales mixtas y formas de ácido libre.

35

40

Patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de los enlaces que contienen fósforo anteriores comprenden, aunque no se limitan a, las patentes de Estados Unidos N° 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

45

Esqueletos de oligonucleótido modificados preferidos que no incluyen un átomo de fósforo en ellos tienen esqueletos que se forman por enlaces internucleosídicos de alquilo o cicloalquilo de cadena corta, enlaces internucleosídicos de heteroátomo y alquilo o cicloalquilo mixtos, o uno o más enlaces internucleosídicos heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta. Éstos comprenden aquellos que tienen enlaces morfolino (formados en parte a partir de la parte 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 metilnimino y metilhidrazino; esqueletos de sulfonato y sulfonamida; esqueletos de amida; y otros que tienen partes de componentes de N, O, S y CH<sub>2</sub> mixtos.

50

55

Patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de los oligonucleósidos anteriores comprenden, aunque no se limitan a, las patentes de Estados Unidos N° 5.034.506; 5.166.315; 5.185.444; 5.214.134; 5.216.141; 5.235.033; 5.264.562; 5.264.564; 5.405.938; 5.434.257; 5.466.677; 5.470.967; 5.489.677; 5.541.307; 5.561.225; 5.596.086; 5.602.240; 5.610.289; 5.602.240; 5.608.046; 5.610.289; 5.618.704; 5.623.070;

5.663.312; 5.633.360; 5.677.437; y 5.677.439,

En otros miméticos de oligonucleótidos preferidos, tanto el azúcar como el enlace internucleosídico, es decir, el esqueleto, de las unidades de nucleótido se sustituyen por grupos novedosos. Las unidades de base se mantienen para la hibridación con un compuesto de ácido nucleico diana apropiado. Dicho compuesto oligomérico, un oligonucleótido mimético que se ha demostrado que tiene excelente propiedades de hibridación, se denomina ácido nucleico peptídico (PNA). En compuestos de PNA, el esqueleto de azúcar de un oligonucleótido se sustituye por un esqueleto que contiene amida, en particular un esqueleto de aminoetilglicina. Las nucleobases son retenidas y se unen directamente o indirectamente a átomos de nitrógeno azo de la parte de amida del esqueleto. Patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de compuestos de PNA comprenden, aunque no se limitan a, las patentes de Estados Unidos N° 5.539.082; 5.714.331; y 5.719.262.

Enseñanzas adicionales de compuestos de PNA pueden encontrarse en Nielsen, et al. (1991) Science 254, 1497-1500.

En un aspecto de la divulgación, los oligonucleótidos con esqueletos de fosforotioato y oligonucleósidos con esqueletos de heteroátomo, y en particular  $-\text{CH}_2\text{-NH-O-CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2\text{-N(CH}_3\text{)-O-CH}_2-$ , son conocidos como un esqueleto de metileno (metilimino) o MMI,  $-\text{CH}_2\text{-O-N(CH}_3\text{)-CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2\text{N(CH}_3\text{)-N(CH}_3\text{)CH}_2-$  y  $-\text{O-N(CH}_3\text{)-CH}_2\text{-CH}_2-$  en las que el esqueleto de fosfodiéster nativo se representa como  $-\text{O=P-O-CH}_2-$  de la patente de Estados Unidos N° 5.489.677 citada anteriormente, y los esqueletos de amida de la patente de Estados Unidos N° 5.602.240 citada anteriormente. También se prefieren oligonucleótidos que tienen estructuras de esqueleto de morfolino de la patente de Estados Unidos N° 5.034.506 citada anteriormente.

Los oligonucleótidos modificados también pueden contener uno o más restos de azúcar sustituidos. Oligonucleótidos preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': OH; F; O-, S- o N-alquilo; O-, S-, o N-alqueniilo; O-, S- o N-alquinilo; o O-alquil-O-alquilo, en los que el alquilo, alqueniilo y alquinilo pueden ser alquilo C a CO sustituido o sin sustituir o alqueniilo y alquinilo C2 a CO. Se prefieren particularmente  $\text{O(CH}_2\text{)}_n\text{OmCH}_3$ ,  $\text{O(CH}_2\text{)}_n$ ,  $\text{OCH}_3$ ,  $\text{O(CH}_2\text{)}_n\text{NH}_2$ ,  $\text{O(CH}_2\text{)}_n\text{CH}_3$ ,  $\text{O(CH}_2\text{)}_n\text{ONH}_2$  y  $\text{O(CH}_2\text{)}_n\text{ON(CH}_2\text{)}_n\text{CH}_3$  en las que n y m pueden ser de 1 a aproximadamente 10. Otros oligonucleótidos preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': C a CO, (alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, alcarilo, aralquilo, O-alcarilo o O-aralquilo, SH, SCH3, OCN, Cl, Br, CN, CF3, OCF3, SOCH3, SO2CH3, ONO2, NO2, N3, NH2, heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, polialquilamino, sililo sustituido, un grupo de escisión de ARN, un grupo indicador, un intercalador, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido, o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un oligonucleótido, y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. Una modificación preferida comprende 2'-metoxietoxi (2'-O-CH2CH2OCH3, también conocido como 2'-O-(2-metoxietilo) o 2'-MOE) es decir, un grupo alcoxialcoxi. Otra modificación preferida comprende 2'-dimetilaminoetoxietoxi, es decir, un grupo  $\text{O(CH}_2\text{)}_2\text{ON(CH}_3\text{)}_2$ , también conocido como 2'-DMAOE, tal como se describe en los ejemplos en el presente documento más adelante, y 2'-dimetilaminoetoxietoxi (también conocido en la técnica como 2'-O-dimetilaminoetoxietilo o 2'-DMAEOE), es decir, 2'-O-CH2-O-CH2-N(CH2)2.

Otras modificaciones preferidas comprenden 2'-metoxi (2'-OCH3), 2'-aminopropoxi (2'-OCH2CH2CH2NH2) y 2'-flúor (2'-F). También pueden hacerse modificaciones similares en otras posiciones en el oligonucleótido, particularmente la posición 3' del azúcar en el nucleótido del extremo 3' o en oligonucleótidos enlazados 2'-5' y la posición 5' del nucleótido del extremo 5'. Los oligonucleótidos también pueden tener miméticos de azúcar tales como restos ciclobutilo en lugar del azúcar pentofuranosilo. Patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de dichas estructuras de azúcar modificadas comprenden, aunque no se limitan a, las patentes de Estados Unidos N° 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.

Los oligonucleótidos también pueden comprender modificaciones o sustituciones de nucleobases (frecuentemente denominadas en la técnica simplemente "base"). Tal como se usa en el presente documento, 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-hidroxiimetilcitosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, derivados de 6-metil y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, derivados de 2-propilo y otros de alquilo de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracilo y citosina, 5-propiniluracilo y citosina, 6-azouracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudo-uracilo), 4-tiouracilo, 8-halógeno, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo y otras adeninas y guaninas sustituidas en 8, 5-halo, particularmente 5-bromo, 5-trifluorometilo y otros uracilos y citosinas

sustituidos en 5, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-deazaguanina y 7-deazaadenina y 3-deazaguanina y 3-deazaadenina.

Además, los nucleótidos comprenden los descritos en la patente de Estados Unidos Nº 3.687.808, los descritos en 5 The Concise Encyclopedia of Polymer Science And Engineering, páginas 858-859, Kroschwitz, J.I., ed. John Wiley & Sons, 1990, aquellos descritos por Englisch et al., 'Angewandte Chemie, International Edition', 1991, 30, página 613, y aquellos descritos por Sanghvi, Y.S., Capítulo 15, 'Antisense Research and Applications', páginas 289-302, Crooke, S.T. y Lebleu, B. ea., 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- 10 sustituidas, 6-azapirimidinas y purinas sustituidas en N-2, N-6 y O-6, que comprenden 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. Se ha demostrado que sustituciones de 5-metilcitosina aumentan la estabilidad del dúplex de ácido nucleico en 0,6-1,2°C (Sanghvi, Y.S., Crooke, S.T. and Lebleu, B., eds, 'Antisense Research and Applications', CRC Press, Boca Raton, 1993, págs. 276-278) y son sustituciones de base actualmente preferidas, incluso más particularmente cuando se combinan con modificaciones de 2'-O-metoxietilazúcar.

15 Patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de los nucleótidos modificados indicados anteriormente, además de otros nucleótidos modificados, comprenden, aunque no se limitan a, las patentes de Estados Unidos 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 20 5.681.941.

Otra modificación de los oligonucleótidos de la divulgación implica enlazar químicamente al oligonucleótido uno o más restos o conjugados, que potencian la actividad, distribución celular o captación celular del oligonucleótido.

25 Dichos restos comprenden, aunque no se limitan a, restos de lípido tales como un resto colesterol, ácido cólico, un tioéter, por ejemplo, hexil-S-tritilitiol, un tiocolésterol, una cadena alifática, por ejemplo, residuos de dodecanodiol o de undecilo, un fosfolípido, por ejemplo, di-hexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato de trietilamonio, una poliamina o una cadena de polietilenglicol, o ácido adamantanoacético, un resto palmitilo, o un resto octadecilamina o hexilamino-carbonil-oxicolesterol.

30 Patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de dichos oligonucleótidos conjugados comprenden, aunque no se limitan a, las patentes de Estados Unidos 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; 5.591.584; 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; 35 4.789.737; 5 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.

40 *Descubrimiento de fármacos:* los compuestos de la presente divulgación también pueden aplicarse en las áreas del descubrimiento de fármacos y validación de dianas. La presente divulgación comprende el uso de los compuestos y segmentos diana preferidos identificados en el presente documento en esfuerzos de descubrimiento de fármacos para esclarecer relaciones que existen entre polinucleótidos de la pirrolin-5-carboxilato reductasa 1 (PYCR1) y una 45 patología, fenotipo o afección. Estos procedimientos incluyen detectar o modular los polinucleótidos de PYCR1 que comprenden poner en contacto una muestra, tejido, célula u organismo con los compuestos de la presente divulgación, medir el nivel de ácido nucleico o de proteína de los polinucleótidos de PYCR1 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 otro compuesto de la divulgación. Estos procedimientos también pueden realizarse en paralelo o en combinación con otros experimentos para determinar la 50 función de genes desconocidos para el proceso de validación de dianas o para determinar la validez de un producto génico particular como diana para el tratamiento o prevención de una enfermedad, afección o fenotipo particular.

*Evaluación de la regulación positiva o inhibición de la expresión génica:*

55 La transferencia de un ácido nucleico exógeno en una célula u organismo huésped puede evaluarse detectando directamente la presencia del ácido nucleico en la célula u organismo. Dicha detección puede lograrse mediante varios procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la presencia del ácido nucleico exógeno puede detectarse por Southern blot o por una técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando cebadores que amplifican específicamente secuencias de nucleótidos asociadas al ácido nucleico. La expresión de los ácidos

nucleicos exógenos también puede medirse usando procedimientos convencionales que incluyen análisis de expresión génica. Por ejemplo, el ARNm producido a partir de un ácido nucleico exógeno puede detectarse y cuantificarse usando una Northern blot y PCR con transcripción inversa (RT-PCR).

5 La expresión de ARN del ácido nucleico exógeno también puede detectarse midiendo una actividad enzimática o una actividad de proteína reportera. Por ejemplo, puede medirse la actividad moduladora antisentido indirectamente como una disminución o aumento en la expresión de ácido nucleico diana como una indicación de que el ácido nucleico exógeno está produciendo el ARN efector. Basándose en conservación de secuencias, pueden diseñarse cebadores y usarse para amplificar regiones codificantes de los genes diana. Inicialmente, la región codificante más  
10 altamente 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 ARNm con un gen reportero en la parte cadena arriba del gen y una posible diana de iARN en la región no codificante 3'. La eficacia de oligonucleótidos antisentido individuales se ensayaría por modulación del gen reportero. Genes reporteros útiles en  
15 los procedimientos de la presente divulgación incluyen acetohidroxiácido sintasa (AHAS), fosfatasa alcalina (AP), beta-galactosidasa (LacZ), beta-glucuronidasa (GUS), cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), proteína verde fluorescente (GFP), proteína roja fluorescente (RFP), proteína amarilla fluorescente (YFP), proteína cian fluorescente (CFP), peroxidasa de rábano picante (HRP), luciferasa (Luc), nopalina sintasa (NOS), octopina sintasa (OCS), y derivados de los mismos. Están disponibles múltiples marcadores de selección que confieren resistencia a  
20 ampicilina, bleomicina, cloranfenicol, gentamicina, higromicina, kanamicina, lincomicina, metotrexato, fosfomicina, puromicina y tetraciclina. Los procedimientos de determinación de la modulación de un gen reportero son muy conocidos en la técnica, e incluyen, aunque no se limitan a, procedimientos fluorimétricos (por ejemplo, espectroscopía de fluorescencia, clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), microscopía de fluorescencia), determinación de la resistencia a antibióticos.

25 La expresión de proteína y de ARNm de PYCR1 puede ensayarse usando procedimientos conocidos para los expertos en la materia y descritos en cualquier parte en el presente documento. Por ejemplo, pueden usarse inmunoensayos tales como ELISA para medir niveles de proteína. Los kits de ELISA de PYCR1 están disponible en el mercado, por ejemplo, de R&D Systems (Mineápolis, MN).

30 En aspectos, la expresión de PYCR1 (por ejemplo, ARNm o proteína) en una muestra (por ejemplo, células o tejidos *in vivo* o *in vitro*) tratada usando un oligonucleótido antisentido de la divulgación se evalúa comparando con la expresión de PYCR1 en una muestra de control. Por ejemplo, la expresión de la proteína o ácido nucleico puede compararse usando procedimientos conocidos para los expertos en la materia con aquella en una muestra tratada  
35 con vector simulado o sin tratar. Como alternativa, la comparación con una muestra tratada con un oligonucleótido antisentido de control (por ejemplo, una que tiene una secuencia alterada o diferente) puede hacerse dependiendo de la información deseada. En otro aspecto, una diferencia en la expresión de la proteína o ácido nucleico de PYCR1 en una muestra tratada frente a sin tratar puede compararse con la diferencia en la expresión de un ácido nucleico diferente (incluyendo cualquier estándar considerado apropiado por el investigador, por ejemplo, un gen de  
40 mantenimiento) en una muestra tratada frente a una muestra sin tratar.

Las diferencias observadas pueden expresarse según se desee, por ejemplo, en forma de una relación o fracción, para su uso en una comparación con control. En aspectos, el nivel de ARNm de PYCR1 o proteína, en una muestra tratada con un oligonucleótido antisentido de la presente divulgación, disminuye o aumenta de aproximadamente  
45 1,25 veces a aproximadamente 10 veces o más con respecto a una muestra sin tratar o una muestra tratada con un ácido nucleico de control. En aspectos, el nivel de ARNm o proteína de PYCR1 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,  
50 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  
55 más.

#### *Kits, reactivos de investigación, diagnósticos y terapéuticos*

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

como reactivos de investigación y componentes de kits. Además, los oligonucleótidos antisentido, que son capaces de inhibir la expresión génica con exquisita especificidad, son usados frecuentemente por los expertos en la materia para aclarar la función de genes particulares o para distinguir entre funciones de diversos miembros de una vía biológica.

5

Para su uso en kits y diagnósticos y en diversos sistemas biológicos, los compuestos de la presente divulgación, tanto solos como en combinación con otros compuestos o terapéuticos, son útiles como herramientas en análisis diferenciales y/o combinatorios para aclarar patrones de expresión de una parte o de todo el complemento de genes expresados dentro de células y tejidos.

10

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "sistema biológico" o "sistema" se define como cualquier organismo, célula, cultivo celular o tejido que expresa, o se ha hecho competente para expresar productos de genes de la pirrolin-5-carboxilato reductasa 1 (PYCR1). Estos incluyen, aunque no se limitan a, seres humanos, animales transgénicos, células, cultivos celulares, tejidos, xenoinjertos, trasplantes y combinaciones de los mismos.

15

Como un ejemplo no limitante, patrones de expresión dentro de células o tejidos tratados con uno o más compuestos antisentido se comparan con células o tejidos de control no tratados con compuestos antisentido y los patrones producidos se analizan para niveles diferenciales de expresión génica ya que están relacionados, por ejemplo, con asociación de enfermedad, vía de señalización, localización celular, nivel de expresión, tamaño, estructura o función de los genes examinados. Estos análisis pueden realizarse en células estimuladas o sin estimular y en presencia o ausencia de otros compuestos que afectan los patrones de expresión.

20

Ejemplos de procedimientos de análisis de la expresión génica conocidos en la técnica incluyen matrices o micromatrices de ADN, SAGE (análisis en serie de la expresión génica), READS (amplificación por enzima de restricción de ADN digeridos), TOGA (análisis de la expresión génica total), matrices de proteínas y proteómica, secuenciación de marcadores de secuencia expresada (EST), huellas genómicas de ARN sustractivas (SuRF), clonación sustractiva, expresión diferencial (DD), hibridación genómica comparativa, técnicas de FISH (hibridación *in situ* fluorescente) y procedimientos de espectrometría de masas .

25

Los compuestos de la divulgación son útiles para investigación y diagnóstico, debido a que estos compuestos hibridan con ácidos nucleicos que codifican pirrolin-5-carboxilato reductasa 1 (PYCR1). Por ejemplo, los oligonucleótidos que hibridan con dicha eficiencia y en dichas condiciones que se han descrito en el presente documento como moduladores de PYCR1 eficaces son cebadores o sondas eficaces en condiciones que favorecen la amplificación génica o detección, respectivamente. Estos cebadores y sondas son útiles en procedimientos que requieren la detección específica de moléculas de ácidos nucleicos que codifican PYCR1 y en la amplificación de dichas moléculas de ácidos nucleicos para la detección o para su uso en estudios adicionales de PYCR1. La hibridación de los oligonucleótidos antisentido, particularmente los cebadores y sondas, de la divulgación con un ácido nucleico que codifica PYCR1 puede detectarse por medios conocidos en la técnica. Dichos medios pueden incluir conjugación de una enzima con el oligonucleótido, radiomarcado del oligonucleótido, o cualquier otro medio de detección adecuado. También pueden prepararse kits que usan dichos medios de detección para detectar el nivel de PYCR1 en una muestra.

35

40

La especificidad y sensibilidad de antisentido también es empleada por los expertos en la materia para usos terapéuticos. Se han empleado oligonucleótidos antisentido como restos terapéuticos en el tratamiento de patologías en animales, que incluyen seres humanos. Los fármacos de oligonucleótido antisentido se han administrado con seguridad y eficazmente a seres humanos y numerosos ensayos clínicos están actualmente en marcha. De este modo, se establece 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.

45

50

Para terapéuticos, un animal, preferentemente un ser humano, que se sospecha que tiene una enfermedad o trastorno que puede tratarse modulando la expresión de PYCR1 se trata administrando compuestos antisentido de acuerdo con esta divulgación. Por ejemplo, en un aspecto no limitante, los procedimientos comprenden la etapa de administrar al animal que necesita tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz del modulador de PYCR1. Los moduladores de PYCR1 de la presente divulgación modulan eficazmente la actividad de PYCR1 o modulan la expresión de la proteína de PYCR1. En un aspecto, la actividad o expresión de PYCR1 en un animal se inhibe aproximadamente el 10% en comparación con un control. Preferentemente, la actividad o expresión de PYCR1 en un animal se inhibe aproximadamente el 30%. Más preferentemente, la actividad o expresión de PYCR1 en un animal se inhibe el 50% o más. De este modo, los compuestos oligoméricos modulan la expresión del ARNm de

55

PYCR1 al menos el 10%, al menos el 50%, al menos el 25%, al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 98%, al menos el 99%, o el 100% en comparación con un control.

- 5 En un aspecto, la actividad o expresión de pirrolin-5-carboxilato reductasa 1 (PYCR1) y/o en un animal se incrementa aproximadamente el 10% en comparación con un control. Preferentemente, la actividad o expresión de PYCR1 en un animal se incrementa aproximadamente el 30%. Más preferentemente, la actividad o expresión de PYCR1 en un animal se incrementa el 50% o más. De este modo, los compuestos oligoméricos modulan la expresión del ARNm de PYCR1 al menos el 10%, al menos el 50%, al menos el 25%, al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 98%, al menos el 99%, o el 100% en comparación con un control.

Por ejemplo, la reducción de la expresión de pirrolin-5-carboxilato reductasa I (PYCR1) puede medirse en suero, sangre, tejido adiposo, hígado o cualquier otro líquido corporal, tejido u órgano del animal. Preferentemente, las células contenidas dentro de dichos líquidos, tejidos u órganos que se analizan contienen una molécula de ácido nucleico que codifica péptidos de PYCR1 y/o la propia proteína de PYCR1.

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

#### Conjugados

Otra modificación de los oligonucleótidos de la divulgación implica enlazar químicamente al oligonucleótido uno o más restos o conjugados que potencian la actividad, distribución celular o captación celular del oligonucleótido. Estos restos o conjugados pueden incluir grupos conjugados covalentemente unidos a grupos funcionales tales como grupos hidroxilo primarios o secundarios. Grupos conjugados de la divulgación incluyen intercaladores, moléculas reporteras, poliaminas, poliamidas, polietilenglicoles, poliéteres, grupos que potencian las propiedades farmacodinámicas de oligómeros, y grupos que potencian las propiedades farmacocinéticas de oligómeros. Grupos conjugados típicos incluyen colesterol, lípidos, fosfolípidos, biotina, fenazina, folato, fenantridina, antraquinona, acridina, fluoresceínas, rodaminas, cumarinas y colorantes. Grupos que potencian las propiedades farmacodinámicas, en el contexto de esta divulgación, incluyen grupos que mejoran la captación, potencian la resistencia a la degradación y/o fortalecen la hibridación específica de secuencia con el ácido nucleico diana. Grupos que potencian las propiedades farmacocinéticas, en el contexto de esta divulgación, incluyen grupos que mejoran la captación, distribución, metabolismo o eliminación de los compuestos de la presente divulgación. Grupos conjugados representativos se desvelan en la solicitud de patente internacional N°. PCT/US92/09196, presentada el 23 de octubre de 1992, y la patente de Estados Unidos N° 6.287.860.

Restos conjugados incluyen, aunque no se limitan a, restos de lípido tales como un resto colesterol, ácido cólico, un tioéter, por ejemplo, hexil-5-tritilol, un tiocolesterol, una cadena alifática, por ejemplo, residuos de dodecanodiol o undecilo, un fosfolípido, por ejemplo, di-hexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato de trietilamonio, una poliamina o una cadena de polietilenglicol, o ácido adamantanoacético, un resto palmitilo, o un resto octadecilamina o hexilamino-carbonil-oxicolesterol. Los oligonucleótidos de la divulgación también pueden conjugarse con principios activos, por ejemplo, aspirina, warfarina, fenilbutazona, ibuprofeno, suprofen, fenbufeno, ketoprofeno, (S)-(+)-pranoprofeno, carprofeno, dansilsarcosina, ácido 2,3,5-triyodobenzoico, ácido flufenámico, ácido fólico, una benzotiadiazida, clorotiazida, una diazepina, indometacina, un barbitúrico, una cefalosporina, un fármaco sulfa, un antidiabético, un antibacteriano o un antibiótico.

Patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de dichos oligonucleótidos conjugados incluyen, pero no se limitan a, las patentes de Estados Unidos N° 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 también pueden mezclarse, encapsularse, conjugarse o asociarse de otro modo a otras moléculas, estructuras de molécula o mezclas de compuestos, como, por ejemplo, liposomas, moléculas dirigidas a receptor, formulaciones orales, rectales, tópica u otras, para ayudar en la captación, distribución y/o absorción. Patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de dichas formulaciones que ayudan en la captación, distribución y/o absorción incluyen, pero no se limitan a, las patentes de Estados Unidos N° 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.
- 10 Aunque los oligonucleótidos antisentido no necesitan administrarse en el contexto de un vector con el fin de modular la expresión y/o función de una diana, aspectos de la divulgación se refieren a construcciones de vector de expresión para la expresión de oligonucleótidos antisentido, que comprende promotores, secuencias de genes promotores híbridos y poseen una fuerte actividad promotora constitutiva, o una actividad promotora que puede inducirse en el caso deseado.
- 15 En un aspecto, la práctica de la divulgación implica administrar al menos uno de los oligonucleótidos antisentido anteriores con un sistema de administración de ácidos nucleicos adecuado. En un aspecto, ese sistema incluye un vector no viral enlazado operativamente al polinucleótido. Ejemplos de dichos vectores no virales incluyen el oligonucleótido solo (por ejemplo, una cualquiera o más de SEQ ID NO: 3 a 6) o en combinación con una formulación de proteína, polisacárido o lípido adecuada.
- 20 Sistemas de administración de ácidos nucleicos adecuados adicionales incluyen vector viral, normalmente secuencia de al menos uno de un adenovirus, virus asociado a adenovirus (AAV), adenovirus dependiente de cooperador, retrovirus, o complejo de virus hemaglutinante de Japón-liposoma (HVJ). Preferentemente, el vector viral comprende un promotor de eucariota fuerte operativamente enlazado al polinucleótido, por ejemplo, un promotor del citomegalovirus (CMV).
- 25 Vectores preferidos adicionales incluyen vectores virales, proteínas de fusión y conjugados químicos. Los vectores retrovirales incluyen virus de la leucemia murina de Moloney y virus basados en el VIH. Un vector viral basado en el VIH preferido comprende al menos dos vectores en los que los genes gag y pol son de un genoma del VIH y el gen env es de otro virus. Se prefieren vectores virales de ADN. Estos vectores incluyen vectores de pox tales como vectores de ortopox o avipox, vectores del virus del herpes tales como un vector del virus del herpes simple I (HSV), vectores de adenovirus y vectores de virus adenoasociados.
- 30 Los compuestos antisentido de la divulgación engloban cualquier sal, éster o sal de dichos ésteres farmacéuticamente aceptables, o cualquier otro compuesto que, tras la administración a un animal, que incluye un ser humano, es capaz de proporcionar (directa o indirectamente) el metabolito biológicamente activo o residuo del mismo.
- 35 La expresión "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales fisiológicamente y farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la divulgación: es decir, sales que retienen la actividad biológica deseada del compuesto parental y no confieren efectos toxicológicos no deseados al mismo. Para oligonucleótidos, ejemplos preferidos de sales farmacéuticamente aceptables y sus usos se describen adicionalmente en la patente de Estados Unidos N° 6.287.860.
- 40 La presente divulgación también incluye composiciones y formulaciones farmacéuticas que incluyen los compuestos antisentido de la divulgación. Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación pueden administrarse en varias formas que dependen de si se desea tratamiento local o sistémico y del área que va a tratarse. La administración puede ser tópica (incluyendo oftálmica y a membranas mucosas que incluyen administración vaginal y rectal), pulmonar, por ejemplo, por inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, que incluye por nebulizador; 45 intratraqueal, intranasal, epidérmica y transdérmica), oral o parenteral. La administración parenteral incluye inyección o infusión intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular; o administración intracraneal, por ejemplo, intratecal o intraventricular.
- 50 Para tratar tejidos en el sistema nervioso central, la administración puede realizarse por, por ejemplo, inyección o infusión en el líquido cefalorraquídeo. La administración de ARN antisentido en el líquido cefalorraquídeo se describe, por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N°. 2007/0117772, "Methods for slowing familial ALS disease progression".
- 55

5 Cuando se pretende que el oligonucleótido antisentido de la presente divulgación se administre a células en el sistema nervioso central, la administración puede ser con uno o más agentes capaces de promover la penetración del oligonucleótido antisentido objeto a través de la barrera hematoencefálica. La inyección puede realizarse, por ejemplo, en la corteza entorrinal o hipocampo. La administración de factores neurotróficos por administración de un vector de adenovirus a neuronas motoras en tejido muscularse se describe en, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 6.632.427, "Adenoviral-vector-mediated gene transfer into medullary motor neurons". La administración de vectores directamente al cerebro, por ejemplo, el estriado, el tálamo, el hipocampo, o la sustancia negra, se conoce en la técnica y se describe, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos N° 6.756.523, "Adenovirus vectors for the transfer of foreign genes into cells of the central nervous system particularly in brain".

10

La administración puede ser rápida como mediante inyección o realizarse durante un periodo de tiempo como por infusión o administración lenta de formulaciones de liberación lenta.

15 Los oligonucleótidos antisentido objeto también puede enlazarse o conjugarse con agentes que proporcionan propiedades farmacéuticas o farmacodinámicas deseables. Por ejemplo, el oligonucleótido antisentido puede acoplarse a cualquier sustancia, conocida en la técnica para promover la penetración o transporte a través de la barrera hematoencefálica, tal como un anticuerpo para el receptor de transferrina, y administrarse mediante inyección intravenosa. El compuesto antisentido puede enlazarse con un vector viral, por ejemplo, que hace al compuesto antisentido más eficaz y/o aumenta el transporte del compuesto antisentido a través de la barrera hematoencefálica. La rotura osmótica de la barrera hematoencefálica también puede llevarse a cabo por, por ejemplo, infusión de azúcares que incluyen, aunque no se limitan a, 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(+) arabitól, L(-) arabitól, D(+) fucosa, L(-) fucosa, D(-) lixosa, L(+) lixosa y L(-) lixosa, o aminoácidos que incluyen, aunque no se limitan a, glutamina, lisina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glicina, histidina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, tirosina, valina y taurina. Procedimientos y materiales para potenciar la penetración de la barrera hematoencefálica se describen, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos N° 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 delivery systems".

30

Los compuestos antisentido objeto pueden mezclarse, encapsularse, conjugarse o asociarse de otro modo a otras moléculas, estructuras de molécula o mezclas de compuestos, por ejemplo, liposomas, moléculas dirigidas a receptor, formulaciones orales, rectales, tópica u otras, para ayudar en la captación, distribución y/o absorción. Por ejemplo, pueden incluirse lípidos catiónicos en la formulación para facilitar la captación de oligonucleótidos. Se mostró que una composición tal que facilitaba la captación es LIPOFECTIN (disponible de GIBCO-BRL, Bethesda, MO).

35

Se cree que los oligonucleótidos con al menos una modificación de 2'-O-metoxietilo son particularmente útiles para administración por vía oral. Composiciones y formulaciones farmacéuticas para administración tópica pueden incluir parches transdérmicos, pomadas, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, espráis, líquidos y polvos. Pueden ser necesarios o deseables vehículos farmacéuticos convencionales, bases acuosas, en polvo o aceitosas, espesantes y similares. También pueden ser útiles preservativos recubiertos, guantes y similares.

40

Las formulaciones farmacéuticas de la presente divulgación, que pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria, pueden prepararse de acuerdo con técnicas convencionales muy conocidas en la industria farmacéutica. Dichas técnicas incluyen la etapa de poner en asociación los principios activos con el (los) vehículo(s) farmacéutico(s) o excipiente(s). En general, las formulaciones se preparan poniendo en asociación uniforme e íntimamente los principios activos con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos, o ambos, y luego, si fuera necesario, moldeando el producto.

50

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

55

Composiciones farmacéuticas de la presente divulgación incluyen, aunque no se limitan a, soluciones, emulsiones, espumas y formulaciones que contienen liposomas. Las composiciones farmacéuticas y formulaciones de la

presente divulgación pueden comprender uno o más potenciadores de la penetración, vehículos, excipientes u otros principios activos o inactivos.

Las emulsiones normalmente son sistemas heterogéneos de un líquido dispersado en otro en forma de gotitas que normalmente superan 0,1  $\mu\text{m}$  de diámetro. Las emulsiones pueden contener componentes adicionales, además de las fases dispersas, y el fármaco activo que puede estar presente como una solución en o bien la fase acuosa, fase oleosa o bien él mismo como una fase independiente. Las microemulsiones están incluidas como un aspecto de la presente divulgación. Las emulsiones y sus usos son muy conocidos en la técnica y se describen adicionalmente en la patente de Estados Unidos N° 6.287.860.

10 Formulaciones de la presente divulgación incluyen formulaciones liposomales. Tal como se usa en la presente divulgación, el término "liposoma" significa una vesícula compuesta de lípidos anfifílicos dispuestos en una bicapa o bicapas esféricas. Los liposomas son vesículas unilaminares o multilaminares que tienen una membrana formada por un material lipófilo y un interior acuoso que contiene la composición que va a administrarse. Los liposomas  
15 catiónicos son liposomas positivamente cargados que se cree que interaccionan con moléculas de ADN negativamente cargadas para formar un complejo estable. Se cree que los liposomas que son sensibles al pH o están cargados negativamente atrapan el ADN en vez de complejarse con él. Se han usado tanto liposomas catiónicos como no catiónicos para administrar ADN a células.

20 Los liposomas también incluyen liposomas "estéricamente estabilizados", una expresión que, tal como se usa en el presente documento, se refiere a liposomas que comprenden uno o más lípidos especializados. Cuando se incorporan en liposomas, estos lípidos especializados producen liposomas con vidas en circulación mejoradas con respecto a los liposomas que carecen de dichos lípidos especializados. Ejemplos de liposomas estéricamente estabilizados son aquellos en los que parte de la parte de lípido formado de vesícula del liposoma comprende uno o  
25 más glucolípidos o se derivatiza con uno o más polímeros hidrófilos, tales como un resto de polietilenglicol (PEG). Los liposomas y sus usos se describen adicionalmente en la patente de Estados Unidos N° 6.287.860.

Las formulaciones y composiciones farmacéuticas de la presente divulgación también pueden incluir tensioactivos. El uso de tensioactivos en medicamentos, formulaciones y en emulsiones es muy conocido en la técnica.  
30 Tensioactivos y sus usos se describen adicionalmente en la patente de Estados Unidos N° 6.287.860.

En un aspecto, la presente divulgación emplea diversos potenciadores de la penetración para efectuar la eficaz administración de ácidos nucleicos, particularmente oligonucleótidos. Además de ayudar en la difusión de fármacos no lipófilos a través de membranas celulares, los potenciadores de la penetración también potencian la permeabilidad de fármacos lipófilos. Los potenciadores de la penetración pueden clasificarse como pertenecientes a una de cinco amplias categorías, es decir, tensioactivos, ácidos grasos, sales biliares, agentes quelantes y no tensioactivos no quelantes. Los potenciadores de la penetración y sus usos se describen adicionalmente en la patente de Estados Unidos N° 6.287.860

40 Un experto en la materia reconocerá que las formulaciones se diseñan rutinariamente según su uso previsto, es decir, su vía de administración.

Formulaciones preferidas para administración tópica incluyen aquellas en las que los oligonucleótidos de la divulgación están en mezcla con un agente de administración tópica tal como lípidos, liposomas, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, esteroides, agentes quelantes y tensioactivos. Lípidos y liposomas preferidos incluyen neutros (por ejemplo, dioleoil-fosfatidiletanolamina DOPE, dimiristoilfosfatidilcolina DMPC, diestearoilfosfatidilcolina) negativos (por ejemplo, dimiristoilfosfatidilglicerol DMPG) y catiónicos (por ejemplo, dioleoil-tetrametilaminopropilo DOTAP y dioleoil-fosfatidiletanolamina DOTMA).

50 Para administración tópica u otra, los oligonucleótidos de la divulgación pueden encapsularse dentro de liposomas o pueden formar complejos con los mismos, en particular con liposomas catiónicos. Como alternativa, los oligonucleótidos pueden estar complejados con lípidos, en particular con lípidos catiónicos. Ácidos grasos y ésteres preferidos, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, y sus usos se describen adicionalmente en la patente de Estados Unidos N° 6.287.860.

55 Las composiciones y formulaciones para administración por vía oral incluyen polvos o gránulos, micropartículas, nanopartículas, suspensiones o soluciones en agua o medios no acuosos, cápsulas, cápsulas de gel, sobres, comprimidos o minicomprimidos. Pueden ser deseables espesantes, aromatizantes, diluyentes, emulsionantes, adyuvantes de dispersión o aglutinantes. Formulaciones orales preferidas son aquellas en las que los

oligonucleótidos de la divulgación se administran conjuntamente con uno o más potenciadores de la penetración, tensioactivos y quelantes. Tensioactivos preferidos incluyen ácidos grasos y/o ésteres o sales de los mismos, ácidos biliares y/o sales de los mismos. Ácidos biliares/sales y ácidos grasos preferidos y sus usos se describen adicionalmente en la patente de Estados Unidos N° 6.287.860. También se prefieren combinaciones de 5 potenciadores de la penetración, por ejemplo, ácidos grasos/sales en combinación con ácidos biliares/sales. Una combinación particularmente preferida es la sal de sodio de ácido láurico, ácido cáprico y UDCA. Potenciadores de la penetración adicionales incluyen éter polioxietileno-9-laurílico, éter polioxietileno-20-cetílico. Los oligonucleótidos de la divulgación pueden administrarse por vía oral, en forma granulada que incluye partículas secadas por pulverización, o complejados para formar micro o nanopartículas. Los agentes de complejantes de oligonucleótidos y 10 sus usos se describen adicionalmente en la patente de Estados Unidos N° 6.287.860.

Las composiciones y formulaciones para administración parenteral, intratecal o intraventricular pueden incluir soluciones acuosas estériles que también pueden contener tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados tales como, aunque no se limitan a, potenciadores de la penetración, compuestos portadores y otros vehículos o 15 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 por un mecanismo no antisentido. Ejemplos de dichos agentes quimioterapéuticos incluyen, aunque no se limitan a, fármacos quimioterapéuticos para 20 el cáncer tales como daunorrubicina, daunomicina, dactinomicina, doxorubicina, epirubicina, idarrubicina, esorubicina, bleomicina, mafosfamida, ifosfamida, citosina arabinósido, biscloroetil-nitrosurea, busulfano, mitomicina C, actinomicina D, mitramicina, prednisona, hidroxiprogesterona, testosterona, tamoxifeno, dacarbazina, procarbazona, hexametilmelamina, pentametilmelamina, mitoxantrona, amsacrina, clorambucilo, metilciclohexilnitrosurea, mostazas de nitrógeno, melfalan, ciclofosfamida, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, 25 citarabina, 5-azacitidina, hidroxurea, desoxicoformicina, 4-hidroxiperoxiciclo-fosforamida, 5-fluorouracilo (5-FU), 5-fluorodesoxiuridina (5-FUdR), metotrexato (MTX), colchicina, taxol, vincristina, vinblastina, etopósido (VP-16), trimetrexato, irinotecán, topotecán, gemcitabina, tenipósido, cisplatino y dietilestilbestrol (DES). Cuando se usan con los compuestos de la divulgación, dichos agentes quimioterapéuticos pueden usarse individualmente (por ejemplo, 5-FU y oligonucleótido), secuencialmente (por ejemplo, 5-FU y oligonucleótido durante un periodo de tiempo seguido 30 de MTX y oligonucleótido), o en combinación con uno o más de otros de dichos agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, 5-FU, MTX y oligonucleótido, o 5-FU, radioterapia y oligonucleótido). Fármacos antiinflamatorios, que incluyen, aunque no se limitan a, fármacos antiinflamatorios no esteroideos y corticosteroides, y fármacos antivirales, que incluyen, aunque no se limitan a, ribivirina, vidarabina, aciclovir y ganciclovir, también pueden combinarse en composiciones de la divulgación. Las combinaciones de compuestos antisentido y otros fármacos no antisentido 35 también están dentro del alcance de la presente divulgación. Pueden usarse dos o más compuestos combinados juntos o secuencialmente.

En otro aspecto relacionado, las composiciones de la divulgación pueden contener uno o más compuestos antisentido, particularmente oligonucleótidos, dirigidos a un primer ácido nucleico y uno o más compuestos 40 antisentido adicionales dirigidos a un segundo ácido nucleico diana. Por ejemplo, la primera diana puede ser una secuencia antisentido particular de pirrolin-5-carboxilato reductasa 1 (PYCR1), y la segunda diana puede ser una región de otra secuencia de nucleótidos. Como alternativa, las composiciones de la divulgación pueden contener dos o más compuestos antisentido dirigidos a diferentes regiones del mismo ácido nucleico diana de pirrolin-5-carboxilato reductasa 1 (PYCR1). Se ilustran numerosos ejemplos de compuestos antisentido en el presente 45 documento y otros pueden seleccionarse de entre compuestos adecuados conocidos en la técnica. Pueden usarse dos o más compuestos combinados juntos o secuencialmente.

#### *Dosificación:*

50 Se cree que la formulación de composiciones terapéuticas y su posterior administración (dosificación) están dentro de la experiencia de los expertos en la materia. La dosificación depende de la gravedad y sensibilidad de la patología que va a tratarse, durando el ciclo de tratamiento de varios días a varios meses, o hasta que se efectúe una cura o se logre una disminución de la patología. Pueden calcularse programas de dosificación óptimos a partir de mediciones de acumulación de fármaco en el cuerpo del paciente. Los expertos pueden determinar fácilmente 55 dosificaciones óptimas, metodologías de dosificación y tasas de repetición. Las dosificaciones óptimas pueden variar dependiendo de la potencia relativa de oligonucleótidos individuales, y generalmente pueden estimarse basándose en las CE50 que se encuentra que son eficaces 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 administrarse una vez o más diariamente, semanalmente, mensualmente o anualmente, o incluso una vez cada 2 a 20 años. Los expertos en la materia pueden estimar

fácilmente tasas de repetición para la dosificación basándose en tiempos de residencia medidos y concentraciones del fármaco en fluidos corporales o tejidos. Tras el tratamiento satisfactorio, puede desearse que el paciente reciba terapia de mantenimiento para prevenir la reaparición de la patología, en el que el oligonucleótido se administra en dosis de mantenimiento, que oscilan de 0,01 µg a 100 g por kg de peso corporal, una vez o más diariamente, a una vez cada 20 años.

En aspectos, un paciente se trata con una dosificación de fármaco que es 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, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos N° 7.563.884, "Antisense modulation of PTP1B expression".

Aunque diversos aspectos de la presente divulgación se han descrito anteriormente, debe entenderse que se han presentado a modo de ejemplo solamente, y no de limitación.

Por su citación de diversas referencias en este documento, los solicitantes no admiten que ninguna referencia particular sea "técnica anterior" a su invención. Casos de composiciones y procedimientos inventivos se ilustran en los siguientes ejemplos.

## 25 EJEMPLOS

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

*Ejemplo 1: Diseño de oligonucleótidos antisentido específicos para una molécula de ácido nucleico antisentido para una pirrolin-5-carboxilato reductasa 1 (PYCR1) y/o una cadena sentido de un polinucleótido de PYCR1*

Tal como se ha indicado anteriormente, la expresión "oligonucleótido específico para" o "dianas de oligonucleótido" se refiere a un oligonucleótido que tiene una secuencia (i) capaz de formar un complejo estable con una parte del gen elegido como diana, o (ii) capaz de formar un dúplex estable con una parte de un transcrito de ARNm del gen elegido como diana.

La selección de oligonucleótidos apropiados se facilita usando programas informáticos (por ejemplo IDT AntiSense Design, IDT OligoAnalyzer) que identifican automáticamente en cada secuencia dada, subsecuencias de 19-25 nucleótidos que formarán híbridos con una secuencia de polinucleótidos diana con una temperatura de fusión deseada (habitualmente 50-60°C) y no formarán auto-dímeros u otras estructuras secundarias complejas.

La selección de oligonucleótidos apropiados se facilita adicionalmente usando programas informáticos que alinean automáticamente secuencias de ácidos nucleicos e indican regiones de identidad u homología. Dichos programas se usan para comparar secuencias de ácidos nucleicos obtenidas, por ejemplo, buscando en bases de datos tales como GenBank o secuenciando productos de PCR. La comparación de secuencias de ácidos nucleicos de un intervalo regiones intergénicas de un genoma dado permite la selección de secuencias de ácidos nucleicos que muestran un grado de especificidad con el gen de interés. Estos procedimientos permiten la selección de oligonucleótidos que presentan un alto grado de complementariedad con secuencias de ácidos nucleicos diana y un menor grado de complementariedad con otras secuencias de ácidos nucleicos en un genoma dado. Un experto en la materia se dará cuenta de que hay libertad considerable en la selección de regiones apropiadas de genes para su uso en la presente invención.

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

ensayos se realizan en el caso de ensayos *in vitro*.

Las propiedades de hibridación de los oligonucleótidos descritos en el presente documento pueden determinarse por uno o más ensayos *in vitro*, tal como se conoce en la técnica. Por ejemplo, las propiedades de los oligonucleótidos descritos en el presente documento pueden obtenerse por determinación de la intensidad de unión entre el antisentido natural diana y una posible molécula de fármaco usando el ensayo de la curva de fusión.

La intensidad de unión entre el antisentido natural diana y una posible molécula de fármaco (Molécula) puede estimarse usando cualquiera de los procedimientos establecidos de medición de la intensidad de interacciones intermoleculares, por ejemplo, un ensayo de la curva de fusión.

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

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

Para realizar el ensayo, el ADNc o un oligonucleótido correspondiente se mezclan con la molécula en concentraciones definidas por los protocolos del fabricante particulares. La mezcla se calienta a 95°C para disociar todos los complejos de dsADN previamente formados, luego se enfría lentamente a temperatura ambiente u otra temperatura menor definida por el fabricante del kit para permitir que se hibriden las moléculas de ADN. Entonces, los complejos recientemente formados se calientan lentamente a 95°C con recogida de datos continua simultánea sobre la cantidad de fluorescencia que se produce por la reacción. La intensidad de fluorescencia es inversamente proporcional a las cantidades de dsADN presentes en la reacción. Los datos pueden recogerse usando un instrumento de PCR en tiempo real compatible con el kit (por ejemplo, sistema de PCR en tiempo real StepOne Plus de ABI o el instrumento LightTyper, Roche Diagnostics, Lewes, Reino Unido).

Los picos de fusión se construyen representando la derivada negativa de la fluorescencia con respecto a la temperatura ( $-d(\text{Fluorescencia})/dT$ ) sobre el eje y) contra la temperatura (eje x) usando software apropiado (por ejemplo, LightTyper (Roche) o SDS Dissociation Curve, ABI). Los datos se analizan para identificar la temperatura de la rápida transición del complejo de dsADN a moléculas monocatenarias. Esta temperatura se llama  $T_m$  y es directamente proporcional a la intensidad de la interacción entre las dos moléculas. Normalmente, la  $T_m$  superará los 40°C.

*Ejemplo 2: Modulación de polinucleótidos de PYCR1*

*Tratamiento de células MCF-7 con oligonucleótidos antisentido*

Todos los oligonucleótidos antisentido usados en el ejemplo 2 fueron diseñados tal como se describe en el ejemplo 1. El fabricante (IDT Inc. de Coralville, IA) fue instruido para la fabricación de los oligonucleótidos unidos a fosfotioato diseñados y proporcionó los análogos de fosfotioato diseñados mostrados en la Tabla 1. La designación asterisco entre nucleótidos indica la presencia de enlace fosfotioato. Los oligonucleótidos requeridos para el experimento en el ejemplo 2 se pueden sintetizar utilizando cualquier estado apropiado del procedimiento de la técnica, por ejemplo el procedimiento utilizado por IDT: sobre un soporte sólido, tal como una perla de vidrio con poro controlado (CPG) de 5 micrómetros, usando de monómeros de fosforamidita (nucleótidos normales con todos los grupos activos protegidos con grupos de protección, por ejemplo, grupo tritilo sobre el azúcar, benzoílo en A y C y N-2-isobutirilo en G). Los grupos de protección evitan las reacciones no deseadas durante la síntesis de oligonucleótidos. Los grupos de protección se eliminan al final del proceso de síntesis. El nucleótido inicial está enlazado al soporte sólido a través del carbono 3' y la síntesis avanza en la dirección 3' a 5'. La adición de una nueva base a una cadena de oligonucleótidos en crecimiento tiene lugar en cuatro etapas: 1) se elimina el grupo de protección del oxígeno 5' del nucleótido inmovilizado usando ácido tricloroacético; 2) Los nucleótidos inmovilizado y el próximo en la secuencia se acoplan entre sí usando tetrazol; la reacción avanza a través de un intermedio de tetrazolilo fosforamidita; 3) los nucleótidos libres sin reaccionar y subproductos de reacción se eliminan por lavado y los oligonucleótidos

- inmovilizados sin reaccionar que quedan son cubiertos para impedir su participación en la próximas rondas de síntesis; el cubrimiento (*capping*) se logra mediante la acetilación del hidroxilo 5' libre usando anhídrido acético y N-metilimidazol; 4) para estabilizar el enlace entre los nucleótidos, el fósforo se oxida usando yodo y agua, si se va a producir un enlace fosfodiéster, o reactivo de Beaucage (3H-1,2-benzoditiol-3-ona-1,1-dióxido), si se desea un enlace fosfotioato. Alternando los dos agentes oxidantes, puede construirse una cadena principal quimérica. El ciclo de cuatro etapas descrito anteriormente se repite para cada nucleótido en la secuencia. Cuando se sintetiza la secuencia completa, el oligonucleótido se escinde del soporte sólido y se desprotege usando hidróxido de amonio a alta temperatura. Los grupos de protección son arrastrados por desalación y los oligonucleótidos restantes ARC se liofilizan. Para realizar el experimento diseñado en el ejemplo 2, las células MCF-7 de la ATCC (n° de cat HTB-22) se cultivaron en medio de crecimiento (MEM/EBSS (Hyclone n° de cat SH30024, o Mediatech n° de cat MT-10-010-CV) + 10% (Mediatech n° de cat. MT35- 011-CV) FBS + penicilina / estreptomycin (Mediatech n° de cat MT30-002-C1)) a 37°C y el 5% de CO<sub>2</sub>. Un día antes del experimento, las células volvieron a sembrarse a la densidad de 1,5 x 10<sup>5</sup>/ml en placas de 6 pocillos y se incubaron a 37°C y el 5% de CO<sub>2</sub> durante una noche. El día del experimento, el medio en las placas de 6 pocillos se cambió a medio de crecimiento nuevo. Los oligonucleótidos enviados por el fabricante en forma liofilizadas se diluyeron a la concentración de 20 µM en agua desionizada libre de ARNasa/ADNasa. Se incubaron dos µl de esta solución con 400 µl de medio OptiMEM (Gibco, n° de cat 31985-070) y 4 µl de Lipofectamine 2000 (Invitrogen, n° de cat 11668019) a temperatura ambiente durante 20 min y a continuación se aplicó gota a gota a un pocillo de las placas de 6 pocillos con células MCF-7. Se usó una mezcla similar que incluye 2 µl de agua en lugar de la solución de oligonucleótido para los controles transfectados con vector simulado. Después de 3-18 h de incubación a 37°C y el 5% de CO<sub>2</sub>, el medio se cambió a medio de crecimiento nuevo. 48 h después de la adición de oligonucleótidos antisentido, el medio se eliminó y se extrajo ARN de las células usando el sistema de aislamiento de ARN total SV de Promega (n° de cat Z3105) o el kit de aislamiento de ARN total RNeasy de Qiagen (n° de cat 74181) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se añadieron 600 ng de ARN extraído a la reacción de transcripción inversa realizada usando el kit de ADNc Verso de Thermo Scientific (n° de cat AB1453B) o el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (n° de cat 4368813) tal como se describe en el protocolo del fabricante. El ADNc de esta reacción de transcripción inversa se usó para monitorizar la expresión génica por PCR en tiempo real usando la mezcla de expresión génica Taqman de ABI (n° de cat 4369510) y cebadores/sondas diseñados por ABI (ensayo de expresión génica Taqman de Applied Biosystems: Hs01048016\_ml por 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 en tiempo real StepOne Plus (Applied Biosystems). El cambio de veces en la expresión génica después del tratamiento oligonucleótidos antisentido se calculó basándose en la diferente de valores de dCt normalizados contra 18S entre las muestras tratadas y las transfectadas de forma simulada
- 35 **Resultados:** los resultados de PCR en tiempo real muestran que los niveles de PYCRI ARNm en células MCF-7 se incrementan significativamente 48 h después del tratamiento con uno de los oligonucleótidos diseñados para teesmer.aApr07 antisentido de PYCR1 (figura 1).

Además, aunque se ha descrito una característica particular de la divulgación con respecto a solo una de varias implementaciones, dicha característica puede combinarse con una o más de otras características de las otras implementaciones, ya que puede desearse y ser ventajoso para cualquier aplicación dada o particular.

#### LISTA DE SECUENCIAS

45 <110> OPKO CURNA LLC

<120> TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES RELACIONADAS CON PIRROLIN-5-CARBOXILATO REDUCTASA 1 (PYCR1) POR INHIBICIÓN DE TRANSCRITO ANTISENTIDO NATURAL PARA PYCR1

50 <130> PYCR1

<150> US61/306748

<151> 22-0-2010

55 <160> 6

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

ES 2 600 356 T3

<211> 2059  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

5 <300>  
 <308> NM\_006907  
 <309> 12-02-2011  
 <313> (1) .. (2059)

10 <400> 1

agtcatttct tctgcggaac ctccaccct ccagtgggtg cgggacccta ggcagcaggc	60
caggcaccgc cgctctgact gggggccccg aagcagtaa cgggccggac agcaaagtgg	120
aaagttagac cagctgggac caggggaggt gggcaccgg ctgcgggagg agcggccagg	180
ctggcactgc cccctaact tgctctgat cctgccggtc tegtcccgca gagccggtgc	240
catctgtggg ggctttgggc caggggtctc cggacagcat gagcgtgggc ttcacgggc	300
ctggccagct ggcttttgcc ctggccaagg gcttcacagc agcaggcgtc ttggtgccc	360
acaagataat ggctagctcc ccagacatgg acctggccac agtttctgct ctcaggaaga	420
tgggggtgaa gttgacaccc cacaacaagg agacggtgca gcacagtgat gtgctcttcc	480
tggctgtgaa gccacacatc atccccctca tcctggatga aataggcgcc gacattgagg	540
acagacacat tgtggtgtcc tgccggccg gcgtcacat cagctccatt gagaagaagc	600
tgtcagcgtt tcggccagcc ccagggtca tccgctgcat gaccaacact ccagtcgtgg	660
tgcgggaggg ggccaccgtg tatgccacag gcacgcacgc ccagggtggag gacgggaggg	720
tcatggagca gctgctgagc agcgtgggct tctgcacgga ggtggaagag gacctgattg	780
atgccgtcac ggggctcagt ggcagcggcc ccgcctacgc attcacagcc ctggatgccc	840
tggctgatgg ggggtggaag atgggacttc caaggcgcct ggcagtccgc ctcggggccc	900
aggccctcct gggggctgcc aagatgctgc tgcactcaga acagcaccga ggccagctca	960
aggacaacgt cagctctcct ggtggggcca ccatccatgc cttgcatgtg ctggagagtg	1020
ggggcttccg ctccctgctc atcaacgctg tggaggcctc ctgcatccgc acacgggagc	1080
tgcagtcctat ggctgaccag gagcaggtgt caccagccgc catcaagaag accatcctgg	1140

ES 2 600 356 T3

acaaggtgaa gctggactcc cctgcagggga ccgctctgtc gccttctggc cacaccaagc 1200  
 tgctcccccg cagcctggcc ccagcgggca aggattgaca cgtcctgcct gaccaccatc 1260  
 ctgccaccac cttctcttct cttgtcacta gggggactag ggggtcccca aagtggccca 1320  
 ctttctgtgg ctctgatcag cgcaggggccc agccagggac atagccaggg aggggccaca 1380  
 tcacttccca ctggaaatct ctgtggtctg caagtgcttc ccagcccaga acaggggtgg 1440  
 attccccaac ctcaacctcc tttcttctct gctcccaaac catgtcagga ccaccttct 1500  
 ctagagctcg ggagcccgga gggctctcac ccactcctac tccagtatca gctggcacgg 1560  
 gctccttctc gagagcaaag gtcaaggacc ccctctgtga aggctcagca gaggtgggat 1620  
 cccacgcccc ctcccggccc ctccctgccc tccattcagg gagaaacctc tccttcccgt 1680  
 gtgagaaggc ccagagggtc caggcatccc aagtccagcg tgaagggccca cagcccctct 1740  
 tggctgccaa gcacgcagat cccatggaca tttggggaaa gggctccttg ggctgctggt 1800  
 gaacttctgt gggcaccacc tcctgctcct gacctccctg ggaggggtgct atcagttctg 1860  
 tcctggccct ttcagtttta taagttggtt tccagcccc agtgcctga cttctgtctg 1920  
 ccacatgagg agggaggccc tgcctgtgtg ggaggggtggt tactgtgggt ggaatagtg 1980  
 aggccttcaa ctgattagac aaggcccgcc cacatcttgg agggcatctg cttactgat 2040  
 taaaatgtca atgtaatct 2059

<210> 2  
 <211> 380  
 5 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 2

cagatctcag ccagacagca gggactcacc ccacctaccg tcccctttgt gcctgggtgt 60  
 ggtgggtact cgttttatgg ggagtggcca ggactcttgc cagggggaga gtggcgggtg 120  
 aggatgtacc catgccatct gccctgccgc agcgtttcct ccctgttccc ctgcatgtct 180  
 tcctccctc gggggaaacg caggattctg tccccaaagc gccctctaca cggcccatat 240  
 ataccaagca tggttctgca gtgagcctat ggggtctctg gaaatgagtt cccgggataa 300  
 gttccagaaa gttgctcagc tctcctaacc cctgcacacc ctggagcccc ctgcataccc 360  
 10 tgactcctgg cgcacctggg 380

<210> 3  
 <211> 20

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 5 <223> Oligonucleótido antisentido  
  
 <400> 3  
 agtccctgct gtctggctga 20  
  
 10 <210> 4  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 15 <220>  
 <223> Oligonucleótido antisentido  
  
 <400> 4  
 acatcctcca ccgccactct 20  
 20  
 <210> 5  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 25  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido antisentido  
  
 <400> 5  
 30 gccaggagtc agggtatgca 20  
  
 <210> 6  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido antisentido  
  
 40 <400> 6  
 acgagtaccc accacacca 20

## REIVINDICACIONES

1. Un oligonucleótido que se dirige a un transcrito antisentido natural de pirrolin-5-carboxilato reductasa 1 (PYCR1) para uso como un compuesto terapéutico, donde el oligonucleótido modula la expresión de pirrolin-5-carboxilato reductasa 1 (PYCR1).
2. Un procedimiento *in vitro* de modulación de la expresión de pirrolin-5-carboxilato reductasa 1 (PYCR1) en células o tejidos del paciente que comprende: poner en contacto dichas células o tejidos con un oligonucleótido que se dirige a un transcrito antisentido natural de pirrolin-5-carboxilato reductasa 1 (PYCR1); modulando de este modo la expresión de pirrolin-5-carboxilato reductasa 1 (PYCR1).
3. Un oligonucleótido para uso de acuerdo con la reivindicación 1, o un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, donde el oligonucleótido incrementa la expresión de pirrolin-5-carboxilato reductasa 1 (PYCR1).
4. Un oligonucleótido para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 3, o un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2 o 3, donde el transcrito antisentido natural tiene la secuencia de ácido nucleico como se expone en una de la SEQ ID NO: 2.
5. Un oligonucleótido para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 o 4, o un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, donde el oligonucleótido es un oligonucleótido antisentido monocatenario.
6. Un oligonucleótido para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 o 4, o un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, donde el oligonucleótido es un compuesto de siRNA.
7. Un oligonucleótido para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 6, o un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, donde el oligonucleótido comprende al menos una de las SEQ ID NO: 6, 3, 4 y 5.
8. Un oligonucleótido para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 7, o un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, donde la expresión de pirrolin-5-carboxilato reductasa 1 (PYCR1) se incrementa en al menos un 10%.
9. Un oligonucleótido para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 8, o un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, donde el oligonucleótido es un oligonucleótido antisentido que comprende además una o más modificaciones que comprenden:
  - a. al menos un enlace internucleosídico modificado seleccionado entre: un fosforotioato, 2'-Ometoxietilo (MOE), 2'-fluoro, alquilfosfato, fosforoditioato, alquilfosfonotioato, fosforamidato, carbamato, carbonato, triéster de fosfato, acetamidato, éster carboximetílico, y combinaciones de los mismos;
  - b. al menos un nucleótido modificado seleccionado entre: un ácido nucleico peptídico (PNA), un ácido nucleico bloqueado (LNA), un ácido arabino-nucleico (FANA), un análogo, un derivado, y combinaciones de los mismos; o
  - c. al menos un resto de azúcar modificado seleccionado entre: un resto de azúcar modificado con 2'-O-metoxietilo, un resto de azúcar modificado con 2'-metoxi, un resto de azúcar modificado con 2'-O-alquilo, un resto de azúcar bicíclico, y combinaciones de los mismos.
10. Un oligonucleótido que tiene las características de un oligonucleótido definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
11. Un oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 10, donde el oligonucleótido es un oligonucleótido antisentido que tiene entre 10 y 30 nucleótidos de longitud.
12. Un oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 10 o la reivindicación 11, donde el oligonucleótido es un oligonucleótido antisentido que tiene al menos el 90% de identidad de secuencia con un complemento de un transcrito antisentido natural de pirrolin-5-carboxilato reductasa 1 (PYCR1).
13. Una composición farmacéutica que comprende al menos un oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

FIGURA 1

