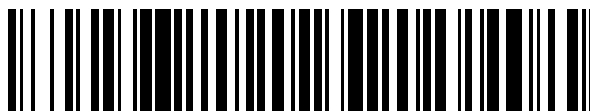


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 618 572**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

C12N 15/63 (2006.01)

A61K 31/713 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.05.2010 PCT/US2010/034026**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.11.2010 WO2010129861**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.05.2010 E 10772879 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.11.2016 EP 2427554**

54 Título: **Tratamiento de enfermedades relacionadas con la familia de la distrofina mediante inhibición de un transcrito antisentido natural para la familia de dmd**

30 Prioridad:

08.05.2009 US 176594 P

25.03.2010 US 317350 P

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

21.06.2017

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 2 618 572 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 la familia de la distrofina mediante inhibición de un transcrito antisentido natural para la familia de dmd

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente solicitud reivindica prioridad de la solicitud de patente provisional de Estados Unidos No. 61/176.594 presentada el 8 de mayo de 2009 y la solicitud de patente provisional de Estados Unidos No. 61/317.350 presentada el 25 de marzo de 2010.

Aspectos de la divulgación comprenden oligonucleótidos que modulan la expresión y/o la función de la familia de DMD y moléculas asociadas.

15 ANTECEDENTES

La hibridación ADN-ARN y ARN-ARN son importantes para muchos aspectos de la función del ácido nucleico incluyendo replicación, transcripción y traducción del ADN. La hibridación también es fundamental para una variedad de tecnologías que tanto detectan un ácido nucleico particular como alteran su expresión. Los nucleótidos antisentido, por ejemplo, alteran la expresión génica hibridándose con ARN diana, interfiriendo así con el splicing, la transcripción, la traducción y la 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 de células. Las moléculas antisentido pueden suministrarse al interior de células, como es el caso para oligodesoxinucleótidos (ODN), o pueden expresarse a partir de genes endógenos como moléculas de ARN. La FDA recientemente aprobó un fármaco antisentido, VITRAVENE™ (para el tratamiento de retinitis por citomegalovirus), que refleja que el antisentido tiene utilidad terapéutica.

RESUMEN

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

Este resumen se proporciona para presentar un resumen de la divulgación para indicar brevemente la naturaleza y sustancia de la divulgación. Se presenta con la comprensión de que no se usará para interpretar o limitar el alcance o significado de las reivindicaciones.

En un aspecto, la divulgación proporciona procedimientos de inhibición de la acción de un transcrito antisentido natural usando uno o más oligonucleótidos antisentido dirigidos a cualquier región del transcrito antisentido natural produciendo la regulación positiva del gen sentido correspondiente. También está contemplado en el presente documento que la inhibición del transcrito antisentido natural pueda conseguirse mediante siRNA, ribozimas y moléculas pequeñas, que se considera que están dentro del alcance de la presente divulgación.

Un aspecto proporciona un procedimiento de modulación de la función y/o la expresión de un polinucleótido de la familia de DMD en células o tejidos del 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 378 de la SEQ ID NO: 3, 1 a 294 de la SEQ ID NO: 4, 1 a 686 de la SEQ ID NO: 5, 1 a 480 de la SEQ ID NO: 6 y 1 a 501 de la SEQ ID NO: 7 (figura 3) modulando de este modo la función y/o la expresión del polinucleótido de la familia de DMD en células o tejidos del paciente *in vivo* o *in vitro*.

En otro aspecto preferido, un oligonucleótido se dirige a una secuencia antisentido natural de polinucleótidos de la familia de DMD, por ejemplo, nucleótidos expuestos en las SEQ ID NO: 3 a 7, y cualquier variante, alelo, homólogo, mutante, derivado, fragmento y secuencia complementaria a los mismos. Ejemplos de oligonucleótidos antisentido se exponen como las SEQ ID NO: 8 a 22 (figura 4 y 5).

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

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

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

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

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

- 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 de ácido nucleico bloqueado, que incluyen α -L-LNA.
20

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

- En otro aspecto preferido, 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 comprender múltiples dosis durante un periodo de tiempo. El tratamiento puede
30 combinarse con uno o varios de otros tipos de terapias.

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

- 35 Otros aspectos se describen más adelante.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- Figura 1: La figura 1A es un gráfico de resultados de PCR en tiempo real que muestra el cambio en veces + la desviación estándar en ARNm de la familia de DMD después del tratamiento de células 518A2 con 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 la familia de DMD en células 518A2 se incrementan significativamente 48 h después del tratamiento con dos de los siRNA diseñados para BG208074 antisentido de la familia de DMD. Las barras indicadas como CUR-0636 a CUR-0654 se corresponden con muestras tratadas con las
45 SEQ ID NO: 8 a 17 respectivamente.

- La figura 1B es un gráfico de resultados de PCR en tiempo real que muestra el cambio en veces + la desviación estándar en ARNm de la familia de DMD después del tratamiento de células 518A2 con oligonucleótidos de fosforotioato introducidos usando Lipofectamine 2000, en comparación con el control. El tratamiento con siRNA para otras moléculas antisentido, BF838561, BF768753 y BF950643, no elevó los niveles de ARNm de la familia de DMD. Las barras indicadas como CUR-0638, CUR-0648 y CUR-0652 se corresponden con muestras tratadas con las SEQ ID NO: 9, 14, 13 y 16, respectivamente.
50

- La figura 1C es un gráfico de resultados de PCR en tiempo real que muestra el cambio en veces + la desviación estándar en ARNm de UTRN después del tratamiento de células MCF-7 con oligonucleótidos de fosforotioato introducidos usando Lipofectamine 2000, en comparación con el control. Las barras indicadas como CUR-1443 a
55 CUR-1447 se corresponden con muestras tratadas con las SEQ ID NO: 18 a 22 respectivamente.

La figura 2 muestra

la SEQ ID NO: 1: familia de distrofina de Homo sapiens, variante de transcrito Dp427m, ARNm (No. de acceso del NCBI: NM_004006).

la SEQ ID NO: 2: Utrofina (UTRN) de Homo sapiens, ARNm. (No. de acceso al NCBI: NM_007124)

La figura 3 muestra

la SEQ ID NO: 3: Secuencia antisentido de la familia de DMD natural (BF838561)

la SEQ ID NO: 4: Secuencia antisentido de la familia de DMD natural (BG208074)

la SEQ ID NO: 5: Secuencia antisentido de la familia de DMD natural (BF950643)

5 la SEQ ID NO: 6: Secuencia antisentido de la familia de DMD natural (BF768753)

la SEQ ID NO: 7: Secuencia antisentido de UTRN natural (ENST00000431309).

La figura 4 muestra oligonucleótidos antisentido de DMD, SEQ ID NO: 8 a 17. 'r' indica ARN.

La figura 5 muestra los oligonucleótidos antisentido de UTRN, SEQ ID NO: 18 a 22. * indica enlace fosfotioato.

La figura 6 muestra los oligonucleótidos sentido de DMD, SEQ ID NO: 23 a 32. Los oligonucleótidos sentido SEQ ID
10 NO: 23 a 32 son los complementos inversos de los oligonucleótidos antisentido, SEQ ID NO: 8 a 17
respectivamente. 'r' indica ARN.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

15 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. La presente divulgación no está limitada por el orden de actos o acontecimientos, ya que
20 algunos actos pueden producirse en diferentes órdenes y/o simultáneamente con otros actos o acontecimientos.
Además, no todos los actos o acontecimientos ilustrados son requeridos para implementar una metodología de
acuerdo con la presente divulgación.

Todos los genes, nombres de genes, y productos génicos divulgados en el presente documento pretenden
25 corresponderse a homólogos de cualquier especie para la cual las composiciones y procedimientos divulgados en el
presente documento son aplicables. De este modo, los términos incluyen, aunque sin limitarse a, genes y productos
génicos de seres humanos y ratones. Se entiende que, cuando se divulga un gen o producto génico de una especie
particular, esta divulgación pretende ser ejemplar solamente, y no se interpreta como una limitación, a menos que el
contexto en el que aparece lo indique claramente. De este modo, por ejemplo, para los genes divulgados en el
30 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 sin limitarse a, otros mamíferos, peces, anfibios, reptiles y aves. En casos preferidos, los genes o
secuencias de ácidos nucleicos son humanos.

35 Definiciones

La terminología usada en el presente documento es con el fin de describir aspectos particulares solamente y no
pretende ser limitante de la divulgación. Tal como se usan en el presente documento, las formas en singular "un",
"una" y "el/la" pretenden comprender las formas en plural también, a menos que el contexto indique claramente lo
40 contrario. Además, siempre que las expresiones "que incluye", "incluyen", "que tiene", "tiene", "con", o variantes de
los mismos se usan en la descripción detallada y/o las reivindicaciones, dichas expresiones pretenden ser inclusivas
de una manera similar a la expresión "que comprende."

El término "aproximadamente" significa dentro de un intervalo de error aceptable para el valor particular como se ha
45 determinado por un experto habitual en la materia, que dependerá en parte de cómo se mide o determina el valor, es
decir, las limitaciones del sistema de medición. Por ejemplo, "aproximadamente" puede significar dentro de 1 o más
de 1 desviación estándar, según la práctica en la técnica. Como alternativa, "aproximadamente" puede significar un
intervalo de hasta el 20%, preferentemente hasta el 10%, más preferentemente hasta el 5%, y más preferentemente
todavía hasta el 1% de un valor dado. Como alternativa, particularmente con respecto a sistemas o procesos
50 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.

55 Tal como se usa en el presente documento, el término "ARNm" significa (el) los transcrito(s) 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 indica una molécula de ARN o de ADN que se une a
otro ARN o ADN (ARN, ADN diana). Por ejemplo, si éste 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 (Eguchi y col., (1991) Ann. Rev. Biochem. 60, 631-652). Un oligonucleótido antisentido puede regular positivamente o regular negativamente la expresión y/o función de un polinucleótido particular. La definición pretende comprender cualquier molécula de ARN o ADN extraña que es útil desde un punto de vista terapéutico, de diagnóstico u otro. Dichas moléculas incluyen, por ejemplo, moléculas de ARN o ADN antisentido, ARN de interferencia (iARN), micro ARN, moléculas de ARN señuelo, siRNA, ARN enzimático, ARN de edición terapéutica y ARN agonista y antagonista, compuestos oligoméricos antisentido, oligonucleótidos antisentido, oligonucleótidos de secuencia 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-anómeras de los mismos, ácidos nucleicos peptídicos (PNA), ácidos nucleicos bloqueados (LNA), fosforotioato, metilfosfonato y similares. Los oligonucleótidos son capaces de unirse específicamente a un polinucleótido diana por medio de un patrón regular de interacciones monómero a monómero, tales como tipo de apareamiento de bases de Watson-Crick, tipos de apareamiento de bases de Hoösteen o Hoösteen inversa, o similares.

El oligonucleótido puede ser "quimérico", es decir, estar compuesto de diferentes regiones. En el contexto de esta divulgación los compuestos "quiméricos" son oligonucleótidos, que contienen dos o más regiones químicas, por ejemplo, una o más regiones de ADN, una o más regiones de ARN, una o más regiones de PNA, etc. Cada región química está compuesta por al menos una unidad monomérica, es decir, un nucleótido en el caso de un compuesto de oligonucleótidos. Estos oligonucleótidos normalmente comprenden al menos una región donde el oligonucleótido se modifica con el fin de presentar una o más propiedades deseadas. Las propiedades deseadas del oligonucleótido incluyen, aunque sin limitarse a, por ejemplo, resistencia a la degradación por nucleasas incrementada, captación celular incrementada y/o afinidad de unión por el ácido nucleico diana incrementada. 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 oligonucleótido, tal como se ha descrito anteriormente.

El oligonucleótido puede estar compuesto de regiones que pueden enlazarse en "registro", es decir, cuando los monómeros se enlazan consecutivamente, como en ADN nativo, o se enlazan mediante espaciadores. Se pretende que los espaciadores constituyan un "puente" covalente entre las regiones y tengan, en casos preferidos, una longitud que no supere aproximadamente los 100 átomos de carbono. Los espaciadores pueden portar diferentes funcionalidades, por ejemplo, tener carga positiva o negativa, portar propiedades de unión a ácido nucleico especiales (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 usa en el presente documento, "familia de DMD" "familia de distrofina" y "familia de proteínas relacionadas con la distrofina", "familia de genes de distrofina" 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 palabras distrofina, DMD, BMD, CMD3B, DXS142, DXS164, DXS206, DXS230, DXS239, DXS268, DXS269, DXS270 y DXS272 se usan de forma intercambiable en la presente solicitud.

Tal como se usan en el presente documento, las palabras utrofina, UTRN, DMDL, DRP, DRP1, proteína 1 relacionada con distrofina, FLJ23678, se usan de forma intercambiable en la presente solicitud.

Tal como se usan en el presente documento, las palabras "proteína 2 relacionada con distrofina" y DRP2, se usan de forma intercambiable en la presente solicitud.

Tal como se usan en el presente documento, las palabras distrobrevina α -distrobrevina, β -distrobrevina, DTNA y DTNB, se usan de forma intercambiable 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 los dúplex puede determinarse mediante 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 pre-ARNm y ARNm) transcrito a partir de dicho ADN, y también ADNc derivado de dicho ARN, secuencias codificantes, no 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 se hibridan específicamente con él, se denomina generalmente "antisentido". Las funciones de ADN con las que interferirán incluyen, por ejemplo, la replicación y transcripción. Las funciones de ARN con las que interferirán incluyen todas las funciones vitales tales como, por ejemplo, translocación del ARN al sitio de traducción de proteína, traducción de proteína del 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 las funciones 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 con sus secuencias de ácido nucleico "diana" (Caplen, N. J., y col. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 98: 9742-9747). En ciertos casos 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 mediante una enzima ARNasa conocida como Dicer (Bernstein, E., y col. (2001) Nature 409: 363-366). Los productos de dúplex de siRNA son reclutados en un complejo de siRNA 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 siARN interactúa de una forma específica de secuencia para mediar en la escisión en un modo catalítico (Bernstein, E., y col. (2001) Nature 409: 363-366; Boutla, A., y col. (2001) Curr. Biol. 11: 1776-1780). Los ARN interferentes pequeños que pueden usarse de acuerdo con la presente divulgación pueden sintetizarse y usarse de acuerdo con procedimientos que son bien conocidos en la 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 5 a aproximadamente 40 nt, aproximadamente 5 a aproximadamente 30 nt, aproximadamente 10 a aproximadamente 30 nt, aproximadamente 15 a aproximadamente 25 nt, o aproximadamente 20-25 nucleótidos.

La selección de los oligonucleótidos apropiados se facilita usando programas informáticos que alinéan automáticamente secuencias de ácido nucleico 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 permite la selección de secuencias de ácidos nucleicos que muestran un grado de identidad apropiado entre especies. En el caso de genes que no han sido secuenciados, se realizan 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, tal como es muy conocido en la técnica, es posible obtener una medida aproximada de la identidad. Estos procedimientos permiten la selección de oligonucleótidos que muestran un alto grado de complementariedad con secuencias de ácido nucleico diana en un sujeto a controlar y un menor grado de complementariedad con secuencias de ácido nucleico 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.

Por "ARN enzimático" se indica 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 a través de 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 vez unido al sitio correcto, actúa enzimáticamente para cortar el ARN diana.

Por "ARN señuelo" se indica 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 mostrado que la sobreexpresión de ARN de respuesta de activación en trans (TAR) de HIV puede actuar como

un "señuelo" y se une de forma eficiente a la proteína tat de HIV, impidiendo de este modo que se una a secuencias TAR codificadas por el ARN de HIV (Sullenger y col. (1990) Cell, 63, 601- 608). Esto se indica 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.

5

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 entre unas pocas unidades monoméricas, por ejemplo, entre aproximadamente 3-4, y aproximadamente varios cientos de unidades monoméricas. Los análogos de enlaces fosfodiéster incluyen: fosforotioato, fosforoditioato, metilfosfonatos, fosforoselenoato, fosforamidoato y similares, tal como se describe más completamente más adelante.

10

El término "nucleótido" cubre nucleótidos de origen natural, así como nucleótidos no de origen natural. Debe ser evidente para el experto en la materia que diversos nucleótidos que se consideraron anteriormente "no de origen natural" se han descubierto posteriormente en la naturaleza. De este modo, "nucleótidos" incluye no solamente las moléculas que contienen heterociclos de purina y pirimidina conocidas, sino también análogos heterocíclicos y tautómeros de 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-alquinil(C3-C6)-citosina, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, seudoisocitosina, 2-hidroxi-5-metil-4-triazolopiridina, isocitosina, isoguanina, inosina y los nucleótidos "no de origen natural" descritos en Benner y col., patente de Estados Unidos No. 5.432.272. El término "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, tal como se describe en Kornberg y Baker, DNA Replication, 2ª Ed. (Freeman, San Francisco, 1992) así como sus análogos.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

70

75

80

85

90

95

100

105

110

115

120

125

130

135

140

145

150

155

160

165

170

175

180

185

190

195

200

205

210

215

220

225

230

235

240

245

250

255

260

265

270

275

280

285

290

295

300

305

310

315

320

"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) 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; 2'-O, 3'-C-linked [3.2.0] bicycloarabinonucleosides (véase por ejemplo N.K Christensen., y col, (1998) J. Am. Chem. Soc., 120: 5458-5463; Prakash TP, Bhat B. (2007) Curr Top Med Chem. 7(7): 641-9; Cho EJ, y col. (2009) Annual Review of Analytical Chemistry, 2, 241-264). Dichos análogos incluyen nucleótidos sintéticos diseñados para potenciar propiedades de unión, por ejemplo, la estabilidad especificidad del dúplex o el tríplex, 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 puentes de hidrógeno de Watson-Crick, Hoogsteen o de Hoogsteen 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 puentes de hidrógeno. La hibridación puede producirse en circunstancias variables.

45

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 causar una modulación de la función y/o la actividad, y existe un grado de complementariedad suficiente para evitar unión inespecífica del compuesto antisentido a secuencias de ácido nucleico no diana en condiciones en las que se desea unión específica, es decir, en condiciones fisiológicas en el caso de ensayos in vivo o tratamiento terapéutico, y en condiciones en las que se realizan ensayos en el caso de ensayos in vitro.

50

55

60

65

70

75

80

85

90

95

100

105

110

115

120

125

130

135

140

145

150

155

160

165

170

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 secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias y en el contexto de esta divulgación, "condiciones astringentes" en las que compuestos oligoméricos hibridan con una secuencia diana se determinan mediante la naturaleza y la 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

90

95

100

105

110

115

120

125

130

135

140

145

150

155

160

165

170

175

180

inorgánicos tales como Na⁺⁺ o K⁺⁺ (es decir, baja fuerza iónica), temperatura superior a 20 °C - 25 °C por debajo de la T_m del complejo de compuesto oligomérico: secuencia diana, y la presencia de desnaturalizantes tales como formamida, dimetilformamida, dimetilsulfóxido, o el detergente dodecilsulfato de sodio (SDS). Por ejemplo, la tasa de hibridación disminuye un 1,1% por cada 1% de formamida. Un ejemplo de una condición de hibridación de alta astringencia es 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 cierta posición de un compuesto antisentido es capaz de formar puentes de hidrógeno con una nucleobase en cierta posición de un ácido nucleico diana, siendo dicho ácido nucleico diana un ADN, ARN, o molécula de oligonucleótido, entonces la posición de la formación de puentes de hidrógeno entre el oligonucleótido y se considera que el ácido nucleico diana 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 puentes de hidrógeno entre sí. De este modo, "específicamente hibridable" y "complementariedad" son expresiones que se usan para indicar un grado suficiente de apareamiento preciso o complementariedad sobre un número suficiente de nucleótidos de modo que se produzca unión estable y específica entre el compuesto oligomérico y un ácido nucleico diana.

Se entiende en la técnica que no es necesario que la secuencia de un compuesto oligomérico sea un 100 % complementaria a la de su ácido nucleico diana para ser específicamente hibridable. Además, un oligonucleótido puede hibridarse sobre uno o más segmentos, de modo que segmentos intermedios o adyacentes no estén implicados en el acontecimiento de hibridación (por ejemplo, una estructura en 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 (Altschul y col., (1990) J. Mol. Biol., 215, 403-410; Zhang y Madden, (1997) Genome Res., 7, 649-656). 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).

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "punto de fusión térmico (T_m)" se refiere a la temperatura, bajo fuerza iónica, pH y concentración de ácido nucleico definidas, 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 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 un incremento (estimulación) o una disminución (inhibición) de la expresión de un gen.

El término "variante", cuando se usa en el contexto de una secuencia de polinucleótidos, puede englobar una secuencia de polinucleótidos relacionada con un gen de tipo silvestre. Esta definición también puede comprender, 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 alternativo 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 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 delecciones, 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.

- 10 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, es decir 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 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.

- 20 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..

- 30 Tal como se usa en el presente documento, el término "animal" o "paciente" pretende comprender, 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 atención médica (por ejemplo, seres 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 dicho 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 criterio de valoración deseado. Tratar también incluye la mejora de un síntoma de una enfermedad (por ejemplo, reducir el dolor o molestia), donde dicha mejora puede o puede no afectar directamente la enfermedad (por ejemplo, causa, transmisión, expresión, etc.).

- 45 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, rabdomiosarcoma, 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, insuloma pancreático maligno, tumor carcinoide maligno, cáncer de vejiga urinaria, 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.

Tal como se usa en el presente documento, una "enfermedad o trastorno muscular" incluye, aunque sin limitarse a, 10 distrofia muscular (MD), una enfermedad de atrofia muscular progresiva, miopatía inflamatoria o miositis (incluyendo, por ejemplo, dermatomiositis, polimiositis, miositis por cuerpos de inclusión), miopatía miotubular, miopatía nemalínica, una miopatía relacionada con desmina, miopatía de Marfan, una miopatía mitocondrial etc. Tal como se usa en el presente documento, la distrofia muscular se refiere a un grupo de enfermedades musculares genéticas, hereditarias que causan debilidad muscular progresiva y que se puede caracterizar por la debilidad progresiva del 15 músculo esquelético, defectos en las proteínas musculares, y la muerte de las células y los tejidos musculares. La distrofia muscular incluye, aunque sin limitarse a Duchenne (familia de DMD), Becker (BMD), atrofia muscular espinal, atrofia muscular espinobulbar, distrofinopatía, sarcoglicanopatía, distrofia muscular de cintura y extremidades (LGMD), distrofia muscular congénita (CMD), facioescapulohumeral (FSHD), miotónica, oculofaríngea, distal y de Emery- Dreifuss.

20 "Enfermedad o trastorno neurológico" se refiere a cualquier enfermedad o trastorno del sistema nervioso y/o sistema visual. "Enfermedad o trastorno neurológico" incluye enfermedades o trastornos que implican al sistema nervioso central (cerebro, tronco del encéfalo y cerebelo), el sistema nervioso periférico (incluyendo los nervios craneales), y el sistema nervioso autónomo (partes del cual están ubicadas en el sistema nervioso tanto central como periférico). 25 Los ejemplos de trastornos neurológicos incluyen, aunque sin limitarse a, cefalea, estupor y coma, demencia, convulsiones, trastornos del sueño, traumatismo, infecciones, neoplasias, neurooftalmología, trastornos del movimiento, enfermedades desmielinizantes, trastornos de la médula espinal, y trastornos de los nervios periféricos, el músculo y las uniones neuromusculares. La adicción y la enfermedad mental, incluyen, aunque sin limitarse a, trastorno bipolar y esquizofrenia, se incluyen también en la definición de trastorno neurológico. La siguiente es una 30 lista de varios trastornos, síntomas, signos y síndromes neurológicos que pueden ser tratados usando las composiciones y procedimientos de acuerdo con la presente divulgación: afasia adquirida epileptiforme; encefalomiелitis diseminada aguda; adrenoleucodistrofia; degeneración macular relacionada con la edad; agenesia del cuerpo calloso; agnosia; síndrome de Aicardi; enfermedad de Alexander; enfermedad de Alpers; hemiplejía alterna; demencia vascular; esclerosis lateral amiotrófica; anencefalia; síndrome de Angelman; angiomas; anoxemia; afasia; apraxia; quistes aracnoideos; aracnoiditis; malformación de Chiari Anroni; malformación arteriovenosa; síndrome de Asperger; telegiectasia ataxia; trastorno de hiperactividad y déficit de atención; autismo; disfunción autónoma; dolor de espalda; enfermedad de Batten; enfermedad de Behcet; parálisis de Bell; blefaroespasmio esencial benigno; focal benigna; amiotrofia; hipertensión intracraneal benigna; enfermedad de Binswanger; blefaroespasmio; síndrome de Bloch Sulzberger; lesión del plexo braquial; absceso cerebral; lesión 40 cerebral; tumores cerebrales (incluyendo glioblastoma multiforme); tumor medular; síndrome de Brown-Sequard; enfermedad de Canavan; síndrome del túnel carpiano; causalgia; síndrome de dolor central; mielinólisis pontina central; trastorno encefálico; aneurisma cerebral; arteriosclerosis cerebral; atrofia cerebral; gigantismo cerebral; parálisis cerebral; enfermedad de Charcot-Marie-Tooth; neuropatía inducida por quimioterapia y dolor neuropático; malformación de Chiari; corea; polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica; dolor crónico; síndrome de dolor crónico regional; síndrome de Coffin Lowry; coma, incluyendo estado vegetativo persistente; diplejía facial congénita; degeneración corticobasal; arteritis craneal; craneosinostosis; enfermedad de Creutzfeldt-Jakob; trastornos por 45 traumatismo acumulativo; síndrome de Cushing; enfermedad de cuerpos de inclusión citomegálicos; infección por citomegalovirus; síndrome de ojos danzantes y pies danzantes; síndrome DandyWalker; enfermedad de Dawson; síndrome de Morsier; parálisis de Dejerine-Klumke; demencia; dermatomiositis; neuropatía diabética; esclerosis difusa; disautonomía; disgrafía; dislexia; distonías; encefalopatía epiléptica infantil temprana; síndrome de la silla vacía; encefalitis; encefalocelos; angiomas encefalotrigeminal; epilepsia; parálisis de Erb; temblor esencial; enfermedad de Fabry; síndrome de Fahr; desmayo; parálisis espástica familiar; convulsiones febriles; síndrome de Fisher; ataxia de Friedreich; demencia fronto-temporal y otras "tauopatías"; enfermedad de Gaucher; síndrome de Gerstmann; arteritis de células gigantes; enfermedad de inclusión de células gigantes; leucodistrofia de células 50 globosas; síndrome de Guillain-Barré; mielopatía asociada HTLV-1; enfermedad Hallervorden-Spatz; traumatismo craneoencefálico; cefalea; espasmo hemifacial; paraplejía espástica; heredoopatía atáctica polineuríticoform; herpes zóster ótico; herpes zóster; síndrome de Hirayama; demencia y la neuropatía asociadas a HIV (también manifestaciones neurológicas del SIDA); holoprosencefalia; enfermedad de Huntington y otras enfermedades de repetición de poliglutamina; hidranencefalia; hidrocefalia; hipercortisolismo; hipoxia; encefalomiелitis mediada por

inmunidad; miositis por cuerpos de inclusión; incontinencia pigmentaria; enfermedad de almacenamiento de ácido
 fitánico infantil; enfermedad de Refsum infantil; espasmos infantiles; miopatía inflamatoria; quiste intracraneal;
 hipertensión intracraneal; síndrome de Joubert; síndrome de Kearns-Sayre; enfermedad de Kennedy, síndrome de
 Kinsbourne; síndrome de Klippel Feil; enfermedad de Krabbe; enfermedad Kugelberg-Welander; kuru; enfermedad
 5 de Lafora; síndrome miasténico de Lambert-Eaton; síndrome de Landau-Kleffner; síndrome lateral medular
 (Wallenberg); dificultades de aprendizaje; enfermedad de Leigh; síndrome de Lennox-Gustaut; síndrome de Lesch-
 Nyhan; leucodistrofia; demencia con cuerpos de Lewy; lisencefalia; síndrome de enclaustramiento; enfermedad de
 Lou Gehrig (es decir, enfermedad de las neuronas motoras o esclerosis lateral amiotrófica); enfermedad del disco
 lumbar; La enfermedad de Lyme - secuelas neurológicas; enfermedad de Machado-Joseph; macrocefalia;
 10 megalocéfalia; síndrome de Melkesson-Rosenthal; enfermedad de Meniere; meningitis; enfermedad de Menkes;
 leucodistrofia metacromática; microcefalia; migraña; síndrome de Miller Fisher; miniderrames; miopatías
 mitocondriales; síndrome de Moebius; amiotrofia monomérica; enfermedad de la neuronas motoras; enfermedad de
 Moyamoya; mucopolisacaridosis; demencia multiinfarto; neuropatía motora multifocal; esclerosis múltiple y otras
 enfermedades desmielinizantes; atrofia de múltiple sistemas con hipotensión postural; distrofia muscular; miastenia
 15 grave; esclerosis difusa mielinoclástica; encefalopatía mioclónica de los lactantes; mioclonía; miopatía; miotonía
 congénita; narcolepsia; neurofibromatosis; síndrome neuroléptico maligno; manifestaciones neurológicas del SIDA;
 secuelas neurológicas del lupus; neuromiotonía; lipofuscinosis ceróidea; trastornos de la migración neuronal;
 enfermedad de Niemann-Pick; síndrome de McLeod- O'Sullivan; neuralgia occipital; secuencia de espina bífida
 oculta; síndrome Ohtahara; atrofia olivopontocerebelosa; opsoclono-mioclono; neuritis óptica; hipotensión ortostática;
 20 síndrome de sobreuso; parestesia; enfermedad o trastorno neurodegenerativo (enfermedad de Parkinson,
 enfermedad de Huntington, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica (ALS), demencia, esclerosis
 múltiple y otras enfermedades y trastornos asociados con la muerte celular neuronal); paramiotonía congénita;
 enfermedades paraneoplásicas; ataques paroxísticos; Síndrome de Parry Romberg; enfermedad de Pelizaeus-
 Merzbacher; parálisis periódicas; neuropatía periférica; neuropatía dolorosa y dolor neuropático; estado vegetativo
 25 persistente; trastornos profundos del desarrollo; reflejo de estornudo fótico; enfermedad de almacenamiento de ácido
 fitánico; enfermedad de Pick; nervio pinzado; tumores de la hipófisis; polimiositis; pencefalía; síndrome post-polio;
 neuralgia postherpética; encefalomiелitis postinfecciosa; hipotensión postural; síndrome de Prader-Willi; esclerosis
 lateral primaria; enfermedades priónicas; atrofia hemifacial progresiva; leucoencefalopatía multifocal progresiva;
 poliodistrofia esclerosante progresiva; parálisis supranuclear progresiva; pseudotumor cerebral; síndrome de Ramsay-
 30 Hunt (tipos I y 11); encefalitis de Rasmussen; síndrome de distrofia simpática refleja; enfermedad de Refsum;
 trastornos por movimientos repetitivos; lesiones por esfuerzo repetitivo; síndrome de piernas inquietas; mielopatía
 asociada a retrovirus; síndrome de Rett; síndrome de Reye; baile de San Vito; enfermedad de Sandhoff; enfermedad
 de Schilder; esquizencefalia; displasia septo-óptica; síndrome del bebé zarandeado; herpes; síndrome de Shy-
 Drager; síndrome de Sjogren; apnea del sueño; síndrome de Soto; espasticidad; espina bífida; lesión de la médula
 35 espinal; tumores de la médula espinal; atrofia muscular en la columna; síndrome de Stoff-Peron; accidente
 cerebrovascular; síndrome de Sturge-Weber; panencefalitis esclerosante subaguda; encefalopatía arteriosclerótica
 subcortical; corea de Sydenham; síncope; siringomielia; discinesia tardía; enfermedad de Tay-Sachs; arteritis
 temporal; síndrome de médula espinal anclada; enfermedad de Thomsen; síndrome del opérculo torácico; Tic
 Douloureux; parálisis de Todd; Síndrome de Tourette; ataque isquémico transitorio; encefalopatías espongiiformes
 40 transmisibles; mielitis transversa; lesión cerebral traumática; temblor; neuralgia trigeminal; paraparesia espástica
 tropical; esclerosis tuberosa; demencia vascular (demencia multiinfarto); vasculitis incluyendo arteritis temporal;
 enfermedad de Von Hippel-Lindau; síndrome de Wallenberg; enfermedad de Werdnig-Hoffman; síndrome de West;
 latigazo cervical; síndrome de Williams; enfermedad de Wildon; y síndrome de Zellweger. Tal como se usa en el
 presente documento, una "enfermedad o trastorno neuromuscular" se refiere a cualquier enfermedad que afecta
 45 negativamente tanto a elementos nerviosos (cerebro, médula espinal, nervios periféricos) como musculares (estriado
 o músculo liso), incluyendo aunque sin limitarse a, trastornos del movimiento involuntarios, distonías, lesión o
 enfermedad de la médula espinal, esclerosis múltiple, miastenia grave, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral
 amiotrófica (ALS), enfermedad de Huntington, síndrome miasténico de Lambert-Eaton (LES), síndrome miasténico
 congénito (CMS), enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT), enfermedad de Dejerine-Sottas (DS), enfermedad de
 50 Creutzfeldt-Jakob, ataxia de Friedreich, distrofia muscular, espasticidad de parálisis cerebral y accidente
 cerebrovascular.

Una enfermedad o trastorno cardiovascular incluye aquellos trastornos que pueden causar isquemia o son causados
 por reperusión del corazón. Los ejemplos incluyen, aunque sin limitarse a, aterosclerosis, enfermedad de la arteria
 55 coronaria, miocarditis granulomatosa, miocarditis crónica (no granulomatosa), cardiomiopatía hipertrófica primaria,
 enfermedad arterial periférica (PAD), accidente cerebrovascular, angina de pecho, infarto de miocardio, daño tisular
 cardiovascular provocado por paro cardíaco, daño tisular cardiovascular provocado por bypass cardíaco, choque
 cardíaco, y afecciones relacionadas que serían conocidas por los expertos en la materia o que implican disfunción
 de o daño tisular al corazón o la vasculatura, especialmente, aunque sin limitarse a, daño tisular relacionado con la

activación de la familia de DMD. Las enfermedades CVS incluyen, aunque sin limitarse a, aterosclerosis, miocarditis granulomatosa, infarto de miocardio, fibrosis miocárdica secundaria a enfermedad valvular cardiaca, fibrosis miocárdica sin infarto, cardiomiopatía hipertrófica primaria, y miocarditis crónica (no granulomatosa).

- 5 Tal como se usa en el presente documento, "cardiomiopatía" se refiere a cualquier enfermedad o disfunción del miocardio (músculo cardíaco) en la que el corazón está anormalmente agrandado, engrosado y / o rigidificado. Como resultado, la capacidad del músculo cardíaco para bombear la sangre habitualmente se debilita. La enfermedad o trastorno puede ser, por ejemplo, inflamatorio, metabólico, tóxico, infiltrante, fibroplástico, hematológico, genético o de origen desconocido. Dichas cardiomiopatías pueden ser el resultado de la falta de
- 10 oxígeno. Otras enfermedades incluyen aquellas que resultan de la lesión miocárdica que implica daño al músculo o el miocardio en la pared del corazón, como resultado de enfermedad o traumatismo. Una lesión miocárdica se puede atribuir a muchas cosas tales como, aunque sin limitarse a, cardiomiopatía, infarto de miocardio o cardiopatía congénita. Los trastornos cardíacos específicos a ser tratados también incluyen insuficiencia cardíaca congestiva, defecto del tabique ventricular o auricular, defecto congénito del corazón o aneurisma ventricular. El trastorno
- 15 cardíaco puede ser de origen pediátrico. La cardiomiopatía incluye aunque sin limitarse a, cardiomiopatía (cardiomiopatía dilatada, hipertrófica, restrictiva, arritmogénica e inclasificada), cardiomiopatía dilatada esporádica, cardiomiopatía dilatada ligada al cromosoma X (XLDC), insuficiencia cardíaca aguda y crónica, insuficiencia cardíaca derecha, insuficiencia cardíaca izquierda, insuficiencia cardíaca biventricular, defectos congénitos del corazón, estenosis de la válvula mitral, insuficiencia de la válvula mitral, estenosis de la válvula aórtica, insuficiencia de la
- 20 válvula aórtica, estenosis de la válvula tricúspide, insuficiencia de la válvula tricúspide, estenosis de la válvula pulmonar, insuficiencia de la válvula pulmonar, defectos en las válvulas combinadas, miocarditis, miocarditis aguda, miocarditis crónica, miocarditis vírica, insuficiencia cardíaca diastólica, insuficiencia cardíaca sistólica, insuficiencia cardíaca diabética y acumulación de las enfermedades.

25 **Composiciones y moléculas de polinucleótidos y oligonucleótidos**

Dianas: En un aspecto, las dianas comprenden secuencias de ácido nucleico de la familia de la distrofina, incluyendo sin limitación secuencias no codificantes y/o codificantes, sentido y/o antisentido asociadas con la familia de la DMD.

- 30 Desde 1987 se sabe que la distrofina, (Hoffman y col. (1987), Cell. 51: 509-517) es la proteína que es deficiente en la distrofia muscular de Duchenne (DMD). Ésta es una proteína alargada presente en la superficie citoplasmática de la membrana de las células musculares de vertebrados (Hoffman y col. (1987), Cell. 51: 509-517). Otras tres proteínas relacionadas con distrofina, es decir, DRP₁ (proteína relacionada con distrofina de tipo 1, o utrofina),
- 35 DRP₂ (proteína relacionada con distrofina de tipo 2), y distrobrevinas, también han sido identificadas como productos de diferentes genes (Wang y col. (1998) Hum Mol Genet. 7: 581-588). Las distrofinas y la utrofina han sido detectadas en el músculo de otras especies de mamífero (Pons y col. (1994) Circulation. 90: 369-374; Wang y col. (1998) Hum Mol Genet. 7: 581-588; Rafael y col. (2000) Hum Mol Genet. 9: 1357-1367) y también en otros tejidos, tales como el órgano eléctrico, que se derivan del músculo esquelético (Chang y col. (1989) J Biol Chem. 264:
- 40 20831-20834), y en nervios (Rivier y col. (1999a) Histochem J. 31:425-432, Rivier y col. (1999b) J Muscle Res Cell Motil. 20: 305-314) de *T. marmorata*. La distrofina en el músculo esquelético de mamífero interactúa con un complejo de proteínas asociadas (DAPC) para formar un enlace entre el citoesqueleto y la matriz extracelular (Ibraghimov-Beskrovnaya y col. (1992) Nature. 355: 696-702). Este complejo consiste en dos distroglicanos (α - y β -) (Deys y col. (1995) J Biol Chem. 270: 25956-25959), sarcoglicanos (α -, β -, γ -, δ -, y ϵ) que están complejados con sarcospan
- 45 (Nigro y col. (1996) Hum Mol Genet. 5: 1179-1186; Crosbie y col. (1997) J Biol Chem. 272: 31221-31224; McNally y col. (1998) FEBS Lett. 422:27-32), y tres sintrofinas (α -, β 1-, β 2-) en tejidos musculares (Ahn y col. (1996) J Biol Chem 271: 2724-2730). Sin embargo, nuevas isoformas de sintrofinas (γ 1- y γ 2-) también se han descrito y se descubrieron expresadas como proteína específica del cerebro (Piluso y col. (2000) J Biol Chem. 275: 15851-15860). La deficiencia o variaciones en algunas proteínas asociadas generan una patología muscular diferente, pero
- 50 la patogenia de todas estas distrofias musculares relacionadas aún no está clara. Esto puede deberse a la heterogeneidad de los datos registrados, por ejemplo, debido a la existencia de cuatro proteínas relacionadas con la distrofina que comparten, todas, homología con los dominios ricos en cisteína y C-terminales de distrofina y también debido al tipo de músculo analizado.
- 55 La distrofina es una proteína citoplasmática en forma de barra, y una parte vital de un complejo de proteínas que conecta el citoesqueleto de una fibra muscular con la matriz extracelular circundante a través de la membrana celular. El complejo es conocido de diversas formas como el costamero o el complejo de proteínas asociadas a distrodina. Muchas proteínas musculares, tales como a-distrobrevina, sincoilina, sinemina, sarcoglicano, distroglicano y sarcospano, se colocan con distrofina en el costamero.

Su deficiencia es una de las causas principales de la distrofia muscular. El tejido normal contiene pequeñas cantidades de distrofina (aproximadamente el 0,002% de la proteína muscular total), pero su ausencia causa tanto la familia de DMD como fibrosis, una afección de endurecimiento muscular. Una mutación diferente del mismo gen causa distrofina defectuosa, que causa distrofia muscular de Becker (BMD). De este modo, sería de gran valor terapéutico modular la expresión y/o la función de la distrofina en células, tejidos u órganos de pacientes que necesiten dicho tratamiento.

La familia de la distrofina, el gen humano más largo conocido, codifica una proteína llamada distrofina. Existen muchas versiones diferentes de distrofina, algunas de las cuales son específicas de ciertos tipos celulares. La distrofina está ubicada principalmente en los músculos usados para el movimiento (músculos esqueléticos) y los músculos del corazón (músculos cardíacos). Pequeñas cantidades de la proteína están presentes en células nerviosas en el cerebro.

En los músculos esqueléticos y cardíacos, la distrofina es parte de un complejo de proteínas que refuerza las fibras musculares y las protege de lesiones a medida que los músculos se contraen y se relajan. El complejo de distrofina actúa como un anclaje, que conecta el marco estructural de cada célula muscular (citoesqueleto) con el entramado de proteínas y otras moléculas fuera de la célula. El complejo de distrofina también puede desempeñar un papel en la señalización celular interactuando con proteínas que envían y reciben señales químicas.

Poco se sabe acerca de la función de la distrofina en las células nerviosas y sin desear ceñirse a ninguna la teoría, la distrofina podría ser importante para la estructura y función normales de las sinapsis.

Las distrofias musculares de Duchenne y de Becker son causadas por mutaciones en la familia de genes de DMD.

Distrofia muscular (MD) se refiere a un grupo de trastornos genético cuyo síntoma principal es la atrofia muscular progresiva. Existen dos formas principales de MD, que difieren en gravedad y edad de aparición. En la distrofia muscular de Duchenne, los síntomas son perceptibles en la infancia temprana y rápidamente se vuelven debilitantes. La distrofia muscular de Becker, por otro lado, es de inicio más tardío y menos grave. Ambas formas de MD son causadas por mutaciones en el gen de distrofina, un gran (2,6 Mb) gen compuesto por 97 exones. La proteína distrofina desempeña un importante papel estructural como parte de un gran complejo en las membranas de la fibra muscular. Cuando la distrofina falta o no es funcional, todo el complejo está comprometido, lo que causa degeneración del tejido muscular. Cuando la capacidad de regenerar el músculo se ha agotado, se produce la atrofia muscular progresiva.

Las mutaciones en el gen de la familia de DMD también causan una forma de cardiopatía llamada cardiomiopatía dilatada ligada al cromosoma X. Esta afección agranda y debilita el músculo cardíaco, impidiéndole bombear la sangre de forma eficiente. Aunque la cardiomiopatía dilatada es un signo de distrofia muscular de Duchenne y de Becker, la forma ligada al cromosoma X aislada de esta afección cardíaca no está asociada con debilidad y atrofia progresiva de músculos esqueléticos.

La utrofina es una proteína de 395 kDa codificada por el gen UTRN de 1 Mb multiexónico ubicado en el cromosoma 6q24 (Pearce, y col. (1993) Hum Mol Gene. 2: 1765 1772). La estructura del gen conlleva grandes similitudes con la del gen de distrofina. En contraste con la distrofina, el gen de utrofina tiene una gran región no traducida en 5', dividida en dos exones, y está precedida por una isla HTF. En ratón, el gen mapea al cromosoma 10. La utrofina se distribuye por todo el sarcolema en músculo fetal y en regeneración, pero está regulada negativamente en músculo adulto normal y está restringida a las uniones miotendinosas y neuromusculares (Blake y col., 1996). En el ratón mdx deficiente en distrofina, los niveles de utrofina en el músculo siguen siendo elevados pronto después del nacimiento en comparación con ratones normales; una vez que los niveles de utrofina han disminuido a los niveles de adulto (aproximadamente 1 semana después del nacimiento) se detectan los primeros signos de necrosis de fibras musculares. Sin embargo, existen indicios que sugieren que en los músculos de pequeño calibre, los niveles incrementados de forma constante de utrofina pueden interactuar con el complejo DGC (o un complejo relacionado antigénicamente) en el sarcolema, impidiendo de este modo la pérdida del complejo con el resultado de que estos músculos parecen normales. También existe un cúmulo sustancial de indicios que demuestran que la utrofina es capaz de ubicarse en el sarcolema en músculo normal. Durante el desarrollo del músculo fetal, existe una expresión de utrofina incrementada, localizada en el sarcolema, hasta 18 semanas en el ser humano y 20 días de gestación en el ratón. Después de ese tiempo la tinción sarcolemal de utrofina disminuye de forma uniforme a los niveles en adulto significativamente más bajos poco antes del nacimiento donde la utrofina está localizada casi exclusivamente en las NMJ. La disminución de la expresión de utrofina coincide con la expresión incrementada de distrofina. Véase

revisiones (Ibraghimov-Beskrovnaya, y col. (1992) Nature 355, 696-702; Blake, y col. (1994) Trends in Cell Biol, 4: 19-23; Tinsley, y col. (1993) Curr Opin Genet Dev. 3: 484-90).

Se predice que DRP2 se asemeja a ciertas isoformas C-terminales cortas de distrofina y proteína 1 relacionada con distrofina (DRP1 o utrofina). La DRP2 es una proteína relativamente pequeña, codificada en el hombre por un gen de 45 kb localizado en Xq22. Se expresa principalmente en el cerebro y la médula espinal, y es similar en estructura global a la isoforma de distrofina Dp116.

La distrobrevina, un miembro de la familia de proteínas de la distrofina, se identificó originalmente a partir del órgano eléctrico de *Torpedo californica* como una fosfoproteína de 87 kDa asociada con la cara citoplasmática de la membrana postsináptica (Wagner K R. y col. (1993) Neuron. 10: 511-522; Carr C. y col. (1989) J Cell Biol. 109: 1753-1764). Se ha postulado que la proteína de 87 kDa desempeña un papel en la formación o la estabilidad de sinapsis dado que se copurifica con receptores de acetilcolina a partir de las membranas del órgano eléctrico. En el músculo esquelético de mamífero, la distrofina es descubierta en asociación con varias proteínas de membrana integrales y periféricas, formando un complejo conocido como el complejo de glucoproteína distrofina (DGC) (Ervasti J M. y col. (1991) Cell. 66: 1121-1131; Ibraghimov-Beskrovnaya O. y col. (1992) Nature (Londres). ; Yoshida M. y col. (1990) J Biochem (Tokyo). 108: 748-752).

En aspectos preferidos, se usan oligonucleótidos antisentido para prevenir o tratar enfermedades o trastornos asociados con los miembros de la familia de DMD. Enfermedades y trastornos mediados por la familia de la distrofina ejemplares que pueden ser tratados con células/tejidos regenerados a partir de células madre obtenidas usando los compuestos antisentido comprenden: una enfermedad o trastorno muscular (por ejemplo, distrofia muscular que incluye distrofia muscular de Duchenne, distrofia muscular de Becker, atrofia muscular espinobulbar, distrofinopatía, sarcoglicanopatía, distrofia muscular de cintura y extremidades, distrofia muscular congénita, miopatía congénita, miopatía distal, forma sintomática de distrofia muscular de Duchenne y Becker en mujeres portadoras, síndrome miotónico, etc.; una enfermedad que causa atrofia muscular progresiva), una enfermedad o trastorno neurológico (incluyendo una enfermedad o trastorno neuromuscular por ejemplo, distonía, síndrome de distonía micoclónica, etc.), una enfermedad o trastorno relacionado con un nivel alterado de distrofina o complejo distrofina DAPC, no compactación ventricular izquierda, cáncer, una enfermedad o trastorno cardiovascular, cardiomiopatía (por ejemplo, cardiomiopatía dilatada esporádica, cardiomiopatía dilatada ligada al cromosoma X (XLDC) etc.), aterosclerosis, un trastorno citoesquelético, ceguera nocturna estacionaria congénita y pérdida de audición.

En un aspecto preferido, los oligonucleótidos son específicos para polinucleótidos de la familia de DMD, lo que incluye, sin limitación regiones no codificantes. Las dianas de la familia de DMD comprenden variantes de la familia de DMD; mutantes de la familia de DMD, incluyendo SNP; secuencias no codificantes de la familia de DMD; alelos, fragmentos y similares. Preferentemente, el oligonucleótido es una molécula de ARN antisentido.

De acuerdo con aspectos de la divulgación, la molécula de ácido nucleico diana no está limitada a polinucleótidos de la familia de DMD en solitario, sino que se extiende a cualquiera de las isoformas, receptores, homólogos, regiones no codificantes y similares de la familia de DMD.

En otro aspecto preferido, un oligonucleótido está dirigido a una secuencia antisentido natural (antisentido natural a las regiones codificantes y no codificantes) de dianas de la familia de DMD, incluyendo, sin limitación, variantes, alelos, homólogos, mutantes, derivados, fragmentos y secuencias complementarias a estos. Preferentemente el oligonucleótido es una molécula de ARN o ADN antisentido.

En otro aspecto preferido, 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, guanósina, 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.

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%.

5

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, 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, químico, 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 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.

En otro aspecto preferido, la elección como diana de la familia de DMD incluyendo sin limitación, secuencias antisentido que se identifican y se expanden, usando por ejemplo, PCR, hibridación etc., una o más de las secuencias expuestas como las SEQ ID NO: 3 a 7, y similares, modulan la expresión o función de la familia de DMD. 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.

25

En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos comprenden secuencias de ácidos nucleicos expuestas como SEQ ID NO:8 a 22 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 comprenden fosforotioato, fosforoditioato o similares. En otro aspecto preferido, 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.

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 y el ser humano. Los oligonucleótidos 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 oligonucleótidos pueden ser modalidades terapéuticas útiles que pueden configurarse para ser útiles en regímenes de tratamiento para el tratamiento de células, tejidos y animales, especialmente seres humanos.

En aspectos de la presente divulgación, los compuestos antisentido oligoméricos, particularmente oligonucleótidos, se unen a moléculas de 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 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 alternativo, 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.

El direccionamiento de un compuesto antisentido a una molécula de ácido nucleico particular, en el contexto de esta divulgación, puede ser un proceso multietapa. El proceso normalmente empieza con la identificación de un 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 familia de la distrofina.

5

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 preferido, los oligonucleótidos antisentido se unen a las secuencias antisentido naturales de la familia de la distrofina y modulan la expresión y/o función de la familia de la distrofina (SEQ ID NO: 1 y 2). Los ejemplos de secuencias antisentido incluyen las SEQ ID NO: 3 a 22.

En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos antisentido se unen a uno o más segmentos de polinucleótidos de la familia de la distrofina y modulan la expresión y/o función de la familia de la distrofina. Los segmentos comprenden al menos cinco nucleótidos consecutivos de los polinucleótidos sentido o antisentido de la familia de la distrofina.

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

25

En otro aspecto preferido, los compuestos de oligonucleótido comprenden secuencias expuestas como SEQ ID NO: 8 a 22, 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 otro aspecto preferido, 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.

35

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 familia de la distrofina, independientemente de las una o más secuencias de dichos codones. Un codón de terminación de la traducción (o "codón de terminación") de un gen puede tener una de tres secuencias, es decir, 5'-UAA, 5'-UAG y 5'-UGA (las secuencias de ADN correspondientes son 5'-TAA, 5'-TAG y 5'-TGA, respectivamente).

50

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

55

codón de terminación de la traducción") son todas las regiones que pueden ser eficazmente elegidas 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.

- 10 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, 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 esta divulgación es la región caperuza 5'.

- 20 Aunque algunos transcritos de ARNm 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 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 compuestos antisentido dirigidos a, por ejemplo, ADN o pre-ARNm.

En otro aspecto preferido, 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.

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

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

- 40 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.

- 45 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". 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 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

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 aspectos particulares dentro del alcance de la presente divulgación. Segmentos diana adicionales son fácilmente identificables por un experto en la materia en vista de esta 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 ilustrativos también son adecuados para el direccionamiento.

Los segmentos diana pueden comprender 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 sintetizan 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 codificantes de proteínas. 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 (Cheng, J. y col. (2005) Science 308 (5725), 1149-1154; Kapranov, P. y col. (2005). Genome Res 15 (7), 987-997). 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 gen 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 comprender 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 comprender nucleótidos protuberantes en los extremos. Modificaciones adicionales pueden comprender 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.

- 5 En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos deseados o compuestos antisentido comprenden al menos uno de: ARN antisentido, ADN antisentido, oligonucleótidos antisentido químicos, 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.

10 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.

- 15 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 familia de la distrofina y productos codificados por los mismos. Los dsARN también pueden actuar como 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).

- 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 familia de la distrofina. "Moduladores" son aquellos compuestos que disminuyen o aumentan la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica la familia de la distrofina 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 la familia de la distrofina 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 la familia de la distrofina, por ejemplo, SEQ ID NO: 8 a 22. 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 la familia de la distrofina, el modulador puede entonces emplearse en estudios de investigación adicionales de la función de polinucleótidos de la familia de la distrofina, o para su uso como un agente de investigación, diagnóstico o terapéutico de acuerdo con la presente divulgación.

- El direccionamiento de la secuencia antisentido natural modula preferentemente la función del gen diana. Por ejemplo, el gen de la familia de DMD (por ejemplo, número de acceso NM_004006 y NM_007124, figura 2). En un aspecto preferido, la diana es un polinucleótido antisentido del gen de la familia de DMD. En un aspecto preferido, un oligonucleótido antisentido se dirige a secuencias sentido y/o antisentido naturales de los polinucleótidos de la familia de la distrofina (por ejemplo, número de acceso NM_004006 y NM_007124, figura 2), 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 la familia de DMD.

- 50 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.

- 55 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 (Fire y col., (1998) Nature, 391, 806-811; Timmons y Fire, (1998) Nature, 395, 854; Timmons y col., (2001) Gene, 263, 103-112; Tabara y col., (1998) Science, 282, 430-431; Montgomery y col., (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU., 95, 15502-15507; Tuschl y col., (1999) Genes Dev.,

13, 3191-3197; Elbashir y col., (2001) Nature, 411, 494-498; Elbashir y col., (2001) Genes Dev. 15, 188-200). 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 (Tijsterman y col., (2002) Science, 295, 694-697).

5

En un aspecto preferido, un oligonucleótido antisentido se dirige a polinucleótidos de la familia de la distrofina (por ejemplo número de acceso NM_004006 y NM_007124), variantes, alelos, isoformas, homólogos, mutantes, derivados, fragmentos y secuencias complementarias a los mismos. Preferentemente, el oligonucleótido es una molécula antisentido.

10

De acuerdo con aspectos de la divulgación, la molécula de ácido nucleico diana no se limita a la familia de la distrofina sola, sino que se extiende a cualquiera de las isoformas, receptores, homólogos y similares de las moléculas de la familia de la distrofina.

15 En otro aspecto preferido, un oligonucleótido se dirige a una secuencia antisentido natural de polinucleótidos de la familia de DMD, por ejemplo, polinucleótidos expuestos como SEQ ID NO: 3 a 7, y cualquier variante, alelo, homólogo, mutante, derivado, fragmento y secuencia complementaria a los mismos. Ejemplos de oligonucleótidos antisentido se exponen como las SEQ ID NO: 8 a 22.

20 En un aspecto, los oligonucleótidos son complementarios a o se unen a secuencias de ácido nucleico de la familia de la distrofina antisentido, incluyendo sin limitación secuencias sentido y/o antisentido no codificantes asociadas con polinucleótidos de la familia de la distrofina y modulan la expresión y/o función de moléculas de la familia de la distrofina.

25 En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos son complementarios a o se unen a secuencias de ácido nucleico de la familia de DMD natural antisentido, expuestas como SEQ ID NO: 3 a 7, y modulan la expresión y/o función de moléculas de la familia de DMD.

En un aspecto preferido, los oligonucleótidos comprenden secuencias de al menos 5 nucleótidos consecutivos de las
30 SEQ ID NO: 8 a 22, y modulan la expresión y/o función de moléculas de la familia de la distrofina.

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

En otro aspecto preferido, el oligonucleótido que se dirige a polinucleótidos de la familia de la distrofina 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
40 pequeño (aARN); o, ARN activante pequeño (ARNap).

En otro aspecto preferido, la elección como diana de polinucleótidos de la familia de la distrofina, por ejemplo SEQ ID NO: 3 a 7, modula la expresión o función de estas dianas. En un aspecto, la expresión o función está regulada positivamente en comparación con un control. En otro aspecto preferido, la expresión o función está regulada
45 negativamente en comparación con un control.

En otro aspecto preferido, los compuestos antisentido comprenden secuencias expuestas como SEQ ID NO: 8 a 22. Estos oligonucleótidos pueden comprender uno o más nucleótidos modificados, fragmentos más cortos o más largos, enlaces modificados y similares.

50

En otro aspecto preferido, las SEQ ID NO: 8 a 22 comprenden uno o más nucleótidos de LNA.

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 secuencia de bases de nucleótidos. Dichas moléculas de ácidos nucleicos enzimáticos pueden usarse, por ejemplo, para dirigirse prácticamente a cualquier transcrito de ARN (Zaug y col., 324, Nature 429 1986; Cech, 260 JAMA 3030, 1988; y Jefferies y col., 17 Nucleic Acids Research 1371, 1989).

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 (Usman & McSwiggen, (1995) Ann. Rep. Med. Chem. 30, 285-294; Christoffersen y Marr, (1995) J. Med. Chem. 38, 2023-2037). Las moléculas de ácidos nucleicos 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, (Joyce, (1989) Gene, 82, 83-87; Beaudry y col.,

(1992) Science 257, 635-641; Joyce, (1992) Scientific American 267, 90-97; Breaker y col., (1994) TIBTECH 12, 268; Bartel y col., (1993) Science 261: 1411- 1418; Szostak, (1993) TIBS 17, 89-93; Kumar y col., (1995) FASEB J., 9, 1183; Breaker, (1996) Curr. Op. Biotech., 7, 442).

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⁻¹ en presencia de concentraciones saturantes (10 mM) de cofactor de Mg²⁺. 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⁻¹. 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⁻¹. 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 (Haseloff y Gerlach, (1988) Nature, 334, 585; Walbot y Bruening, (1988) Nature, 334, 196; Uhlenbeck, O. C. (1987) Nature, 328: 596-600; Koizumi, M., y col. (1988) FEBS Lett., 228: 228-230). 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. (véase Haseloff y Gerlach, (1988) Nature, 334, 585; Walbot y Bruening, (1988) Nature, 334, 196; Uhlenbeck, O. C. (1987) Nature, 328: 596-600).

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 permiten el uso de promotores regulados y específicos de tejido para la expresión génica.

- 5 En un aspecto preferido, 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 de origen 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
10 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,
15 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_{ap}, ARN_a, 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
20 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 comprender 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
25 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 comprender nucleótidos protuberantes en los extremos. Modificaciones adicionales pueden comprender grupos conjugados unidos a uno de los extremos,
30 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
35 horquillas de dsARN en líneas celulares transgénicas (Hammond y col., (1991) Nat. Rev. Genet., 2, 110-119; Matzke y col., (2001) Curr. Opin. Genet. Dev., 11, 221-227; Sharp, (2001) Genes Dev., 15, 485-490). 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
40 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
45 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
50 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
55 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 u 80 nucleótidos de longitud, o cualquier intervalo entremedias.

- 5 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.

10

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.

15

En otro aspecto preferido, 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 esta posición. Esto puede hacerse en cualquiera de las posiciones de los compuestos antisentido o de dsARN.

20

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

25

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%.

30

En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos antisentido, tales como, por ejemplo, las moléculas de ácidos nucleicos expuestas en las SEQ ID NO: 3 a 22 comprenden una o más sustituciones o modificaciones. En un

35

aspecto, los nucleótidos están sustituidos con ácidos nucleicos bloqueados (LNA). En otro aspecto preferido, 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 la familia de DMD y las secuencias expuestas como SEQ ID NO: 1, 2 y 3 a 7. Los oligonucleótidos también se dirigen a regiones solapantes

40

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

45 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

50 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 desoxioligonucleótidos 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

55 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 de dos o más oligonucleótidos, oligonucleótidos modificados, miméticos de oligonucleósidos y/u oligonucleótidos, tal como se han descrito anteriormente. Dichos compuestos también se han denominado en la técnica híbridos o gápmers.

- 5 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.
- 10 En otro aspecto preferido, la región del oligonucleótido que se modifica comprende al menos un nucleótido modificado en la posición 2' del azúcar, de la forma más preferente un nucleótido modificado con 2'-O-alquilo, 2'-O-alquil-O-alquilo o 2'-flúor. En otros aspectos preferidos, 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
- 15 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 incrementada 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 de los 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
- 20 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 diversas 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
- 25 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
- 30 algunos casos, las modificaciones de oligonucleótidos que potencian la afinidad de unión a diana son, también, independientemente, capaces de potenciar la resistencia a nucleasas. Algunas modificaciones deseables pueden encontrarse en De Mesmaeker y col. (1995) Acc. Chem. Res., 28: 366-374.

- Ejemplos específicos de algunos oligonucleótidos preferidos concebidos por esta divulgación incluyen aquellos que
- 35 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 CH₂--NH--O--CH₂, CH, --N(CH₃)--O--CH₂ [conocido como un esqueleto de metilen(metilimino) o MMI], CH₂--O--N(CH₃)--CH₂, CH₂--N(CH₃)--N(CH₃)--CH₂ y O--N(CH₃)--CH₂--CH₂,
- 40 donde el esqueleto de fosfodiéster nativo se representa como O--P--O--CH₂). También se prefieren esqueletos de amida descritos por De Mesmaeker y col. (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 No. 5.034.506). En otros aspectos preferidos, 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
- 45 directamente o indirectamente a los átomos de nitrógeno azo del esqueleto de poliamida (Nielsen y col. (1991) Science 254, 1497). 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, SCH₃, F, OCN, OCH₃, OCH₃, OCH₃ O(CH₂)_n CH₃, O(CH₂)_n NH₂ o O(CH₂)_n CH₃ en los que n es de 1 a aproximadamente 10; alquilo C1 a C10 inferior, alcoxialcoxi, alquilo, alcarilo o aralquilo inferior sustituido; Cl; Br; CN; CF₃; OCF₃; O--, S--, o N-alquilo;
- 50 O--, S--, o N-alqueno; SOCH₃; SO₂ CH₃; ONO₂; NO₂; N₃; NH₂; heterocicloalquilo; heterocicloalcarilo; aminoalquilamino; polialquilamino; sililo sustituido; un grupo de escisión de ARN; un grupo reportero; un intercalador; un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido; o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un oligonucleótido y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. Una modificación preferida incluye 2'-metoxietoxi [2'-O-CH₂ CH₂ OCH₃, también conocido como 2'-O-(2-metoxietilo)]
- 55 (Martin y col., (1995) Helv. Chim. Acta, 78, 486). Otras modificaciones preferidas incluyen 2'-metoxi (2'-O--CH₃), 2'-propoxi(2'-OCH₂ CH₂CH₃) 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 comprender, 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, N6(6-aminohehexil)adenina y 2,6-diaminopurina (Kornberg, A., DNA Replication, W. H. Freeman & Co., San Francisco, 1980, págs. 75-77; Gebeyehu, G., (1987) y col. Nucl. Acids Res. 15: 4513). 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 (Sanghvi, Y. S., en Crooke, S. T. y Lebleu, B., eds., Antisense Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, págs. 276-278) 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 (Letsinger y col., (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 86, 6553), ácido cólico (Manoharan y col. (1994) Bioorg. Med. Chem. Let. 4, 1053), un tioéter, por ejemplo, hexil-S-tritilol (Manoharan y col. (1992) Ann. N.Y. Acad. Sci. 660, 306; Manoharan y col. (1993) Bioorg. Med. Chem. Let. 3, 2765), un tiocolesterol (Oberhauser y col., (1992) Nucl. Acids Res. 20, 533), una cadena alifática, por ejemplo, residuos de dodecandiol o undecilo (Saison-Behmoaras y col. EMBO J. 1991, 10, 111; Kabanov y col. (1990) FEBS Lett. 259, 327; Svinarchuk y col. (1993) Biochimie 75, 49), un fosfolípido, por ejemplo, di-hexadecil-rac-glicerol o trietilamonio 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero- 3-H-fosfonato (Manoharan y col. (1995) Tetrahedron Lett. 36, 3651; Shea y col. (1990) Nucl. Acids Res. 18, 3777), una poliamina o una cadena de polietilenglicol (Manoharan y col. (1995) Nucleosides & Nucleotides, 14, 969), o ácido adamantano acético (Manoharan y col. (1995) Tetrahedron Lett. 36, 3651). 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.

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.

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.

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. (Uhlman, y col. (2000) Current Opinions in Drug Discovery & Development Vol. 3 No 2). 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 grande 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%, de la manera más preferente 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.

Esqueletos de oligonucleótidos modificados preferidos comprenden, aunque 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 boranofosfonatos que tienen enlaces 3'-5' normales, análogos enlazados en 2'-5' de estos, y aquellos que tienen polaridad invertida, donde 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.

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.

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 metilenimino y metilenhidrazino; esqueletos de sulfonato y sulfonamida; esqueletos de amida; y otros que tienen partes de componentes de N, O, S y CH₂ mixtos.

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, y col. (1991) Science 254, 1497-1500.

En otro aspecto preferido de la divulgación, los oligonucleótidos con esqueletos de fosforotioato y oligonucleósidos con esqueletos de heteroátomo, y en particular -CH₂-NH-O-CH₂-, -CH₂-N(CH₃)-O-CH₂-, conocidos como un esqueleto de metileno (metilimino) o MMI, -CH₂-O-N(CH₃)-CH₂-, -CH₂N(CH₃)-N(CH₃)CH₂- y -O-N(CH₃)-CH₂-CH₂- donde el esqueleto de fosfodiéster nativo se representa como -O-P-O-CH₂- 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 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-alqueno; O-, S-

- o N-alquínilo; o O-alquil-O-alquilo, donde el alquilo, alquénilo y alquínilo pueden ser alquilo C a CO sustituido o sin sustituir o alquénilo y alquínilo C2 a CO. Se prefieren particularmente $O(CH_2)_n OmCH_3$, $O(CH_2)_n$, OCH_3 , $O(CH_2)_nNH_2$, $O(CH_2)_nCH_3$, $O(CH_2)_nONH_2$ y $O(CH_2)_nON(CH_2)_mCH_3$ 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) (Martin y col., (1995) *Helv. Chim. Acta*, 78, 486-504) es decir, un grupo alcóxialcoxi. Otra modificación preferida comprende 2'-dimetilaminooxietoxi, es decir, un grupo $O(CH_2)_2ON(CH_3)_2$, 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-hidroxi-metilcitosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, derivados de 6-metilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, derivados de 2-propilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracilo y citosina, 5-propiniluracilo y citosina, 6-azouracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudo-uracilo), 4-tiouracilo, 8-halógeno, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo y otras adeninas y guaninas sustituidas en 8, 5-halógeno, 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 N° 3.687.808, los descritos en 'The Concise Encyclopedia of Polymer Science And Engineering', páginas 858-859, Kroschwitz, J.I., ed. John Wiley & Sons, 1990, los descritos por Englisch y col., '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. and Lebleu, B. ea., CRC Press, 1993. Algunos de estos nucleótidos son particularmente útiles para incrementar la afinidad de unión de los compuestos oligoméricos de la divulgación. Estos comprenden pirimidinas 5-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.
- 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 N° 3.687.808, así como 4.845.205; 5.130.302; 5.134.066; 5.175.273; 5.367.066; 5.432.272; 5.457.187; 5.459.255; 5.484.908; 5.502.177; 5.525.711; 5.552.540; 5.587.469; 5.596.091; 5.614.617; 5.750.692 y 5.681.941.
- Otra modificación de los oligonucleótidos de la divulgación implica enlazar químicamente al oligonucleótido uno o más restos o conjugados, que potencian la actividad, distribución celular o captación celular del oligonucleótido

Dichos restos comprenden, aunque no se limitan a, restos de lípido tales como un resto colesterol (Letsinger y col.,

(1989) Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU., 86, 6553-6556), ácido cólico (Manoharan y col., (1994) Bioorg. Med. Chem. Lett., 4, 1053-1060), un tioéter, por ejemplo, hexil-S-tritilitol (Manoharan y col., (1992) Ann. N. Y. Acad. Sci., 660, 306-309; Manoharan y col., (1993) Bioorg. Med. Chem. Lett., 3, 2765-2770), un tiocolesterol (Oberhauser y col., (1992) Nucl. Acids Res., 20, 533-538), una cadena alifática, por ejemplo, residuos de dodecanodiol o de undecilo (Kabanov y col., (1990) FEBS Lett., 259, 327-330; Svinarchuk y col., (1993) Biochimie 75, 49-54), un fosfolípido, por ejemplo, di-hexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato de trietilamonio (Manoharan y col., (1995) Tetrahedron Lett., 36, 3651-3654; Shea y col., (1990) Nucl. Acids Res., 18, 3777-3783), una poliamina o una cadena de polietilenglicol (Mancharan y col., (1995) Nucleosides & Nucleotides, 14, 969-973), o ácido adamantano acético (Manoharan y col., (1995) Tetrahedron Lett., 36, 3651-3654), un resto palmitilo (Mishra y col., (1995) Biochim. Biophys. Acta, 1264, 229-237), o un resto octadecilamina o hexilamino-carbonil-oxicolesterol (Crooke y col., (1996) J. Pharmacol. Exp. Ther., 277, 923-937).

Patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de dichos oligonucleótidos conjugados comprenden, aunque 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.

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 familia de la distrofina y una patología, fenotipo o afección. Estos procedimientos incluyen detectar o modular los polinucleótidos de la familia de la distrofina 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 la familia de la distrofina 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 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.

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

La transferencia de un ácido nucleico exógeno a 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).

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 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 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 ampicilina, bleomicina, cloranfenicol, gentamicina, higromicina, kanamicina, lincomicina, metotrexato, fosfotricina, 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.

La expresión de proteínas y ARNm de la familia de DMD puede ensayarse usando procedimientos conocidos por los expertos en la materia y descritos en otra parte en el presente documento. Por ejemplo, pueden usarse inmunoensayos tales como ELISA para medir los niveles de proteínas. Los anticuerpos de la familia de DMD para ELISA están disponibles en el mercado, por ejemplo, de Abnova, (Walnut, CA), Abcam, Cambridge, MA.

En aspectos, la expresión de la familia de DMD (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 la familia de DMD 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 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 la familia de DMD 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 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 o proteína de la familia de DMD, en una muestra tratada con un oligonucleótido antisentido de la presente divulgación, disminuye o aumenta de aproximadamente 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 la familia de DMD aumenta o disminuye al menos aproximadamente 1,25 veces, al menos aproximadamente 1,3 veces, al menos aproximadamente 1,4 veces, al menos aproximadamente 1,5 veces, al menos aproximadamente 1,6 veces, al menos aproximadamente 1,7 veces, al menos aproximadamente 1,8 veces, al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 2,5 veces, al menos aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 3,5 veces, al menos aproximadamente 4 veces, al menos aproximadamente 4,5 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 5,5 veces, al menos aproximadamente 6 veces, al menos aproximadamente 6,5 veces, al menos aproximadamente 7 veces, al menos aproximadamente 7,5 veces, al menos aproximadamente 8 veces, al menos aproximadamente 8,5 veces, al menos aproximadamente 9 veces, al menos aproximadamente 9,5 veces, o al menos aproximadamente 10 veces o más.

Kits, reactivos de investigación, 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.

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.

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 familia de la distrofina. Éstos incluyen, aunque no se limitan a, seres humanos, animales transgénicos, células, cultivos celulares, tejidos, xenoinjertos, trasplantes y combinaciones de los mismos.

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.

- 5 Ejemplos de procedimientos de análisis de la expresión génica conocidos en la técnica incluyen matrices o micromatrices de ADN, (Brazma y Vilo, (2000) FEBS Lett., 480, 17-24; Celis, y col., (2000) FEBS Lett., 480, 2-16), SAGE (análisis en serie de la expresión génica) (Madden, y col., (2000) Drug Discov. Today, 5, 415- 425), READS (amplificación por enzima de restricción de ADNc digeridos) (Prashar y Weissman, (1999) Methods Enzymol., 303, 258-72), TOGA (análisis de la expresión génica total) (Sutcliffe, y col., (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU., 97, 10 1976-81), matrices de proteínas y proteómica (Celis, y col., (2000) FEBS Lett., 480, 2-16; Jungblut, y col., Electrophoresis, 1999, 20, 2100-10), secuenciación de marcadores de secuencia expresada (EST) (Celis, y col., FEBS Lett., 2000, 480, 2-16; Larsson, y col., J. Biotechnol., 2000, 80, 143-57), huellas genómicas de ARN sustractivas (SuRF) (Fuchs, y col., (2000) Anal. Biochem. 286, 91-98; Larson, y col., (2000) Cytometry 41, 203-208), clonación sustractiva, expresión diferencial (DD) (Jurecic y Belmont, (2000) Curr. Opin. Microbiol. 3, 316-21), 15 hibridación genómica comparativa (Carulli, y col., (1998) J. Cell Biochem. Supl., 31, 286-96), técnicas de FISH (hibridación in situ fluorescente) (Going y Gusterson, (1999) Eur. J. Cancer, 35, 1895-904) y procedimientos de espectrometría de masas (To, Comb. (2000) Chem. High Throughput Screen, 3, 235-41).

- Los compuestos de la divulgación son útiles para investigación y diagnóstico, debido a que estos compuestos 20 hibridan con ácidos nucleicos que codifican la familia de la distrofina. Por ejemplo, los oligonucleótidos que hibridan con dicha eficiencia y en dichas condiciones que se han descrito en el presente documento como moduladores de la familia de la distrofina 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 la familia de la distrofina y en la amplificación 25 de dichas moléculas de ácidos nucleicos para la detección o para su uso en estudios adicionales de la familia de la distrofina. La hibridación de los oligonucleótidos antisentido, particularmente los cebadores y sondas, de la divulgación con un ácido nucleico que codifica la familia de la distrofina puede detectarse por medios conocidos en la técnica. Dichos medios pueden comprender conjugación de una enzima con el oligonucleótido, radiomarcado del oligonucleótido, o cualquier otro medio de detección adecuado. También pueden prepararse kits que usan dichos 30 medios de detección para detectar el nivel de la familia de la distrofina en una muestra.

- 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 35 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.

- Para terapéuticos, un animal, preferentemente un ser humano, que se sospecha que tiene una enfermedad o trastorno que puede tratarse modulando la expresión de la familia de la distrofina 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 la familia de la distrofina. Los moduladores de la familia de la distrofina de la presente divulgación 45 modulan eficazmente la actividad de la familia de la distrofina o modulan la expresión de la proteína de la familia de la distrofina. En un aspecto, la actividad o expresión de la familia de la distrofina en un animal se inhibe aproximadamente el 10% en comparación con un control. Preferentemente, la actividad o expresión de la familia de la distrofina en un animal se inhibe aproximadamente el 30%. Más preferentemente, la actividad o expresión de la familia de la distrofina en un animal se inhibe el 50% o más. De este modo, los compuestos oligoméricos modulan la 50 expresión del ARNm de la familia de la distrofina 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.

- 55 En un aspecto, la actividad o expresión de la familia de la distrofina en un animal aumenta aproximadamente el 10% en comparación con un control. Preferentemente, la actividad o expresión de la familia de la distrofina en un animal aumenta aproximadamente el 30%. Más preferentemente, la actividad o expresión de la familia de la distrofina en un animal aumenta el 50% o más. De este modo, los compuestos oligoméricos modulan la expresión del ARNm de la familia de la distrofina 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 la familia de la distrofina 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 la familia de la distrofina y/o la propia proteína la familia de la distrofina.

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

15 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 comprender 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.

20 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 describen en la solicitud de patente internacional N°. PCT/US92/09196, presentada el 23 de octubre de 1992, y la patente de Estados Unidos No. 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 adamantano acético, un resto palmitilo, o un resto octadecilamina o hexilamino-carbonil-oxicoolesterol. 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 folínico, 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, aunque 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

50 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, aunque 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.

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.

5

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: 8 to 22) o en combinación con una

10 formulación de proteína, polisacárido o lípido adecuada.

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

15 un promotor de eucariota fuerte operativamente enlazado al polinucleótido, por ejemplo, un promotor del citomegalovirus (CMV).

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 HIV. Un vector viral basado en el HIV preferido comprende al menos dos vectores en los que los genes gag y pol son de un genoma del HIV 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)[Geller, A.I. y col., (1995) J. Neurochem, 64: 487; Lim, F., y col., en DNA Cloning: Mammalian Systems, D. Glover, Ed. (Oxford Univ. Press, Oxford England) (1995); Geller, A.I. y col., (1993) Proc Natl. Acad. Sci.: EE. UU.: 90

20 7603; Geller, A.I., y col., (1990) Proc Natl. Acad. Sci EE. UU.: 87: 1149], vectores de adenovirus (LeGal LaSalle y col., Science, 259: 988 (1993); Davidson, y col., (1993) Nat. Genet. 3: 219; Yang, y col., (1995) J. Virol. 69: 2004) y vectores de virus adenoasociados (Kaplitt, M.G., y col., (1994) Nat. Genet. 8: 148).

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.

30

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.

35

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; 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.

40 45

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 solicitudde patentede Estados UnidosN°. 2007/0117772, "Methods for slowing familial ALS disease progression".

50

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 muscular 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

55

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 Nº 6.756.523, "Adenovirus vectors for the transfer of foreign genes into cells of the central nervous system particularly in brain".

- 5 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.

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 Nº 4.866.042, "Method for the delivery of genetic material across the blood brain barrier," 6.294.520, "Material for passage through the blood-brain barrier," y 6.936.589, "Parenteral delivery systems".

- 25 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, MD).

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 comprender 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.

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.

- 45 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.

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

- 5 Formulaciones de la presente divulgación incluyen formulaciones liposomales. Tal como se usa en la presente divulgación, el término "liposoma" significa una vesícula compuesta por lípidos anfífilos dispuestos en una bicapa o bicapas esféricas. Los liposomas son vesículas 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 catiónicos son liposomas positivamente cargados que se cree que interactúan 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.

- 15 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 más glucolípidos o se derivatiza con uno o más polímeros hidrófilos, tales como un resto de polietilenglicol (PEG).
- 20 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 comprender tensioactivos. El uso de tensioactivos en medicamentos, formulaciones y en emulsiones es muy conocido en la técnica. Tensioactivos y sus usos se describen adicionalmente en la patente de Estados Unidos N°6.287.860.

- 25 En un aspecto, la presente divulgación emplea diversos potenciadores de la penetración para efectuar la administración eficiente 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.

- 35 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).

- 45 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.

- 50 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 minicompimidos. 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 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 polioxietilen-9-laurílico, éter polioxietilen-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 complejantes de oligonucleótidos y sus usos se describen adicionalmente en la patente de Estados Unidos N°6.287.860.

5

Las composiciones y formulaciones para administración parenteral, intratecal o intraventricular pueden comprender 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 excipientes farmacéuticamente aceptables

10

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 el cáncer tales como daunorrubicina, daunomicina, dactinomicina, doxorrubicina, epirubicina, idarrubicina, esorrubicina, 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, citarabina, 5-azacitidina, hidroxiurea, desoxicoformicina, 4-hidroxiperoxíciclo-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 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 también están dentro del alcance de la presente divulgación. Pueden usarse dos o más compuestos combinados juntos o secuencialmente.

30

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 antisentido adicionales dirigidos a un segundo ácido nucleico diana. Por ejemplo, la primera diana puede ser una secuencia antisentido particular de la familia de la distrofina, 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 la familia de la distrofina. Se ilustran numerosos ejemplos de compuestos antisentido en el presente documento y otros pueden seleccionarse de entre compuestos adecuados conocidos en la técnica. Pueden usarse dos o más compuestos combinados juntos o secuencialmente.

40

Dosificación:

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 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 ha descubierto que son eficaces en modelos animales in vitro e in vivo. En general, la dosificación es de 0,01 μ g 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 μ g a 100 g por kg de peso corporal, una vez o más diariamente, a una vez cada 20 años.

50

55

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," incorporada en el presente documento como referencia en su totalidad.

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. Pueden realizarse numerosos cambios a los aspectos descritos de acuerdo con la divulgación en el presente documento sin alejarse del espíritu o alcance de la divulgación. Por lo tanto, la amplitud y el alcance de la presente divulgación no deben estar limitados por ninguno de los aspectos descritos anteriormente.

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

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos no limitantes sirven para ilustrar realizaciones seleccionadas de la invención. 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 familia de la distrofina y/o una cadena sentido de un polinucleótido de la familia de la distrofina*

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 los oligonucleótidos apropiados se facilita usando programas informáticos que alinéan automáticamente secuencias de ácido nucleico 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 permite la selección de secuencias de ácidos nucleicos que muestran un grado de identidad apropiado entre especies. En el caso de genes que no han sido secuenciados, se realizan 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, tal como es muy conocido en la técnica, es posible obtener una medida aproximada de la identidad. Estos procedimientos permiten la selección de oligonucleótidos que muestran un alto grado de complementariedad con secuencias de ácido nucleico diana en un sujeto a controlar y un menor grado de complementariedad con secuencias de ácido nucleico 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 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 causar una modulación de la función y/o la actividad, y existe un grado de complementariedad suficiente para evitar unión inespecífica del compuesto antisentido a secuencias de ácido nucleico no diana en condiciones en las que se desea unión específica, es decir, en condiciones fisiológicas en el caso de ensayos in vivo o tratamiento terapéutico, y en condiciones en las que se realizan ensayos 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.

5

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.

- 10 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.
- 15

- 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 recopilación 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).
- 20
- 25

- 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.
- 30

35 **Ejemplo 2: Modulación de polinucleótidos de la familia de DMD**

Tratamiento de células 518A2 con oligonucleótidos antisentido

- Se cultivaron células 518A2 obtenidas del Albert Einstein-Montefiore Cancer Center, NY en medio de cultivo (MEM/EBSS (Hyclone nº de cat SH30024, o Mediatech nº de cat MT-10-010-CV) +10% FBS (Mediatech nº de cat MT35-011-CV)+ penicilina/estreptomina (Mediatech nº de cat MT30-002-CI)) a 37°C y el 5% de CO₂. Un día antes del experimento, las células volvieron a sembrarse a la densidad de 1,5 x 10⁵/ml en placas de 6 pocillos y se incubaron a 37°C y el 5% de CO₂. El día del experimento, el medio en las placas de 6 pocillos se cambió a medio de cultivo fresco. Todos los oligonucleótidos antisentido se diluyeron a la concentración de 20 µM. Se incubaron dos µl de esta solución con 400 µl de medio Opti-MEM (Gibco, nº de cat 31985-070) y 4 µl de Lipofectamine 2000 (Invitrogen, nº de cat 11668019) a temperatura ambiente durante 20 min y se aplicaron a cada pocillo de las placas de 6 pocillos con células 518A2. 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 CO₂, el medio se cambió a medio de cultivo fresco 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 (nº de cat Z3105) o el kit de aislamiento de ARN total RNeasy de Qiagen (nº de cat 74181) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se añadieron 600 ng de ARN a la reacción de transcripción inversa realizada usando el kit de ADNc Verso de Thermo Scientific (nº de cat AB 1453B) o el kit High Capacity ADNc Reverse Transcription (nº 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 (nº de cat 4369510) y cebadores/sondas diseñados por ABI (ensayo de expresión génica Taqman de Applied Biosystems: Hs00187805_m1 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).
- 40
- 45
- 50
- 55

El cambio de veces en la expresión génica después del tratamiento con 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.

- 5 **Resultados:** Los resultados de PCR en tiempo real muestran que los niveles de ARNm de la familia de DMD en células 518A2 se incrementan significativamente 48 h después del tratamiento con dos de los siRNA diseñados para BG208074 antisentido de la familia de DMD. El tratamiento con siRNA para otras moléculas antisentido, BF838561, BF768753 y BF950643, no elevó los niveles de ARNm de la familia de DMD (figuras 1A y B).

10 **Tratamiento de células MCF-7 con oligonucleótidos antisentido**

- Se cultivaron células MCF-7 de ATCC (nº de cat HTB-22) en medio de cultivo (MEM/EBSS (Hyclone nº de cat SH30024, o Mediatech nº de cat MT-10-010-CV) +10% FBS (Mediatech nº de cat MT35- 011-CV)+ penicilina/estreptomicina (Mediatech nº de cat MT30-002-CI)) a 37°C y el 5% de CO₂. Un día antes del experimento, las células volvieron a sembrarse a la densidad de $1,5 \times 10^5$ /ml en placas de 6 pocillos y se incubaron a 37°C y el 5% de CO₂. El día del experimento, el medio en las placas de 6 pocillos se cambió a medio de cultivo fresco. Todos los oligonucleótidos antisentido se diluyeron a la concentración de 20 µM. Se incubaron dos µl de esta solución con 400 µl de medio Opti-MEM (Gibco, nº de cat 31985-070) y 4 µl de Lipofectamine 2000 (Invitrogen, nº de cat 11668019) a temperatura ambiente durante 20 min y se aplicaron a cada 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 CO₂, el medio se cambió a medio de cultivo fresco 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 (nº de cat Z3105) o el kit de aislamiento de ARN total RNeasy de Qiagen (nº de cat 74181) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se añadieron 600 ng de ARN a la reacción de transcripción inversa realizada usando el kit de ADNc Verso de Thermo Scientific (nº de cat AB1453B) o el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (nº 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 (nº de cat 4369510) y cebadores/sondas diseñados por ABI (ensayo de expresión génica Taqman de Applied Biosystems: Hs01126016_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 el termociclador Mx4000 (Stratagene) o la máquina de PCR en tiempo real StepOne Plus (Applied Biosystems).

- El cambio de veces en la expresión génica después del tratamiento con 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.

- Resultados:** Los resultados de PCR en tiempo real muestran que los niveles de ARNm de UTRN en células MCF-7 se incrementan significativamente 48 h después del tratamiento con dos de los siRNA diseñados para ENST00000431309 antisentido de la familia de UTRN.

- 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.

- El resumen de la divulgación permitirá al lector determinar rápidamente la naturaleza de la divulgación técnica. Ésta se presenta con la comprensión de que no se usará para interpretar o limitar el alcance o el significado de las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

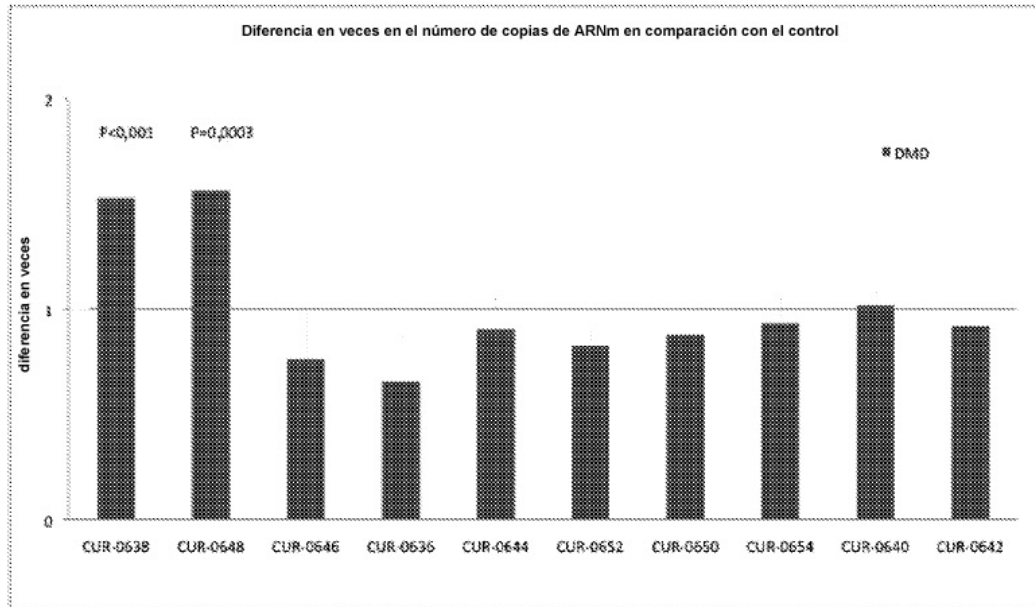
1. Un oligonucleótido que se dirige a un transcrito antisentido natural de la familia de la distrofina para uso como un compuesto terapéutico, donde el oligonucleótido modula la expresión del gen de la familia de la distrofina y donde el transcrito antisentido natural tiene la secuencia de ácido nucleico tal como se expone en una de las SEQ ID NO: 3-7.
2. Un oligonucleótido que se dirige a un transcrito antisentido natural de la familia de la distrofina para uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado a la familia de la distrofina, donde el oligonucleótido modula la expresión del gen de la familia de la distrofina y donde el transcrito antisentido natural tiene la secuencia de ácido nucleico tal como se expone en una de las SEQ ID NO: 3-7.
3. Uso de un oligonucleótido que se dirige a un transcrito antisentido natural de la familia de la distrofina para la fabricación de un medicamento para uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad o afección asociada a la familia de la distrofina, donde el oligonucleótido modula la expresión del gen de la familia de la distrofina y donde el transcrito antisentido natural tiene la secuencia de ácido nucleico tal como se expone en una de las SEQ ID NO: 3-7.
4. El oligonucleótido para uso de acuerdo con la reivindicación 2 o el uso de acuerdo con la reivindicación 3, donde la enfermedad o trastorno asociado a la familia de la distrofina se selecciona de entre el grupo que consiste en una enfermedad o trastorno muscular (por ejemplo, distrofia muscular que incluye distrofia muscular de Duchenne, distrofia muscular de Becker, atrofia muscular espinobulbar, distrofinopatía, sarcoglicanopatía, distrofia muscular de cintura y extremidades, distrofia muscular congénita, miopatía congénita, miopatía distal, forma sintomática de distrofia muscular de Duchenne y Becker en mujeres portadoras, síndrome miotónico, etc.; una enfermedad que causa atrofia muscular progresiva), una enfermedad o trastorno neurológico (incluyendo una enfermedad o trastorno neuromuscular por ejemplo, distonía, síndrome de distonía micoclónica, etc.), una enfermedad o trastorno asociado a un nivel alterado de distrofina o complejo distrofina DAPC, no compactación ventricular izquierda, cáncer, una enfermedad o trastorno cardiovascular, cardiomiopatía (por ejemplo, cardiomiopatía dilatada esporádica, cardiomiopatía dilatada ligada al cromosoma X (XLDC) etc.), aterosclerosis, un trastorno citoesquelético, ceguera nocturna estacionaria congénita y pérdida de audición.
5. Un procedimiento *in vitro* de modulación de la expresión de un gen de la familia de la distrofina en células o tejidos de un paciente que comprende: poner en contacto dichas células o tejidos con un oligonucleótido que se dirige a un transcrito antisentido natural de la familia de la distrofina; modulando de este modo la expresión del gen de la familia de la distrofina, donde el transcrito antisentido natural tiene la secuencia de ácido nucleico tal como se expone en una de las SEQ ID NO: 3-7.
6. Un oligonucleótido que se dirige a un transcrito antisentido natural de la familia de la distrofina, donde el oligonucleótido modula la expresión del gen de la familia de la distrofina y donde el transcrito antisentido natural tiene la secuencia de ácido nucleico tal como se expone en una de las SEQ ID NO: 3-7.
7. El oligonucleótido para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 4, o el uso de acuerdo con la reivindicación 3 o la reivindicación 4, o el procedimiento *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 5, o el oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 6, donde el oligonucleótido tiene entre 10 y 30 nucleótidos de longitud.
8. El oligonucleótido para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4 o 7, o el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3, 4 o 7 o el procedimiento *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 5 o la reivindicación 7, o el oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 6 o la reivindicación 7, donde el oligonucleótido tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con un complemento de un transcrito antisentido natural de la familia de la distrofina.
9. El oligonucleótido para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4, 7 u 8, o el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3, 4, 7 u 8 o el procedimiento *in vitro* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5, 7 u 8, o el oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, donde el oligonucleótido es monocatenario.
10. El oligonucleótido para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4, 7 u 8, o el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3, 4, 7 u 8 o el procedimiento *in vitro* de acuerdo con una

cualquiera de las reivindicaciones 5, 7 u 8, o el oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, donde el oligonucleótido es un compuesto de siRNA.

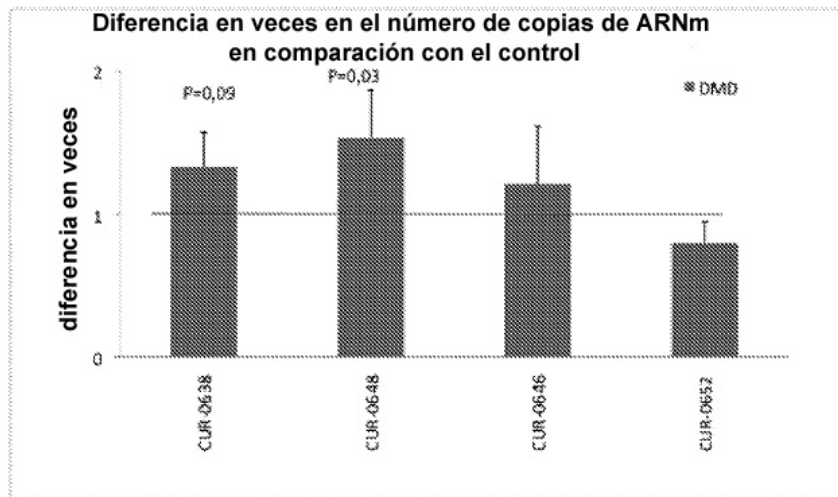
11. El oligonucleótido para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4 o 7 a 10, o el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3, 4, o 7 a 10 o el procedimiento *in vitro* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 o 7 a 10, o el oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, donde el oligonucleótido comprende al menos una de las SEQ ID NO: 8-22.
12. El oligonucleótido para uso de acuerdo con la reivindicación 10, o el uso de acuerdo con la reivindicación 10, o el procedimiento *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 10, o el oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 10, donde el compuesto de siRNA comprende al menos un oligonucleótido seleccionado de entre las SEQ ID NO: 8 a 17 y una secuencia complemento inversa de dicho oligonucleótido seleccionado de entre las SEQ ID NO: 23 a 32.
13. El oligonucleótido para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4 o 7 a 12, o el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3, 4, o 7 a 12 o el procedimiento *in vitro* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 o 7 a 12, o el oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 12, donde el oligonucleótido incrementa la expresión del gen de la familia de la distrofina.
14. El oligonucleótido para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4 o 7 a 12, o el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3, 4, o 7 a 12 o el procedimiento *in vitro* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 o 7 a 12, o el oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 12, donde el oligonucleótido disminuye la expresión del gen de la familia de la distrofina.
15. El oligonucleótido para uso de acuerdo con la reivindicación 13, o el uso de acuerdo con la reivindicación 13, o el procedimiento *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 13, o el oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 13, donde la expresión del gen de la familia de la distrofina se incrementa en al menos un 10%.
16. El oligonucleótido para uso de acuerdo con la reivindicación 14, o el uso de acuerdo con la reivindicación 14, o el procedimiento *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 14, o el oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 14, donde la expresión de un gen de la familia de la distrofina disminuye en al menos un 10%.
17. El oligonucleótido para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4 o 7 a 16, o el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3, 4, o 7 a 16 o el procedimiento *in vitro* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 o 7 a 16, o el oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 16, donde el oligonucleótido comprende, además, una o más modificaciones que comprenden
 - a. al menos un enlace internucleosídico modificado seleccionado de entre: un fosforotioato, 2'- O-metoxietilo (MOE), 2'-fluoro, alquilfosfonato, fosforoditioato, alquilfosfonotioato, fosforamidato, carbamato, carbonato, triéster de fosfato, acetamidato, éster carboximetílico, y combinaciones de los mismos;
 - b. al menos un nucleótido modificado seleccionado de entre: un ácido nucleico peptídico (PNA), un ácido nucleico bloqueado (LNA), un ácido arabino-nucleico, un análogo, un derivado, y combinaciones de los mismos; o
 - c. al menos un resto de azúcar modificado seleccionado de entre: un resto de azúcar modificado con 2'-O-metoxietilo, un resto de azúcar modificado con 2'-metoxi, un resto de azúcar modificado con 2'-O-alkilo, un resto de azúcar bicíclico, y combinaciones de los mismos.
18. Una composición farmacéutica que comprende al menos un oligonucleótido que tiene las características de un oligonucleótido definido en cualquiera de las reivindicaciones 6 a 17 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

FIGURA 1

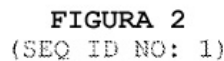
A



B



C



TCCTGGCATCAGTTACTGTGTTGACCTCACTCAGTGTGGGATCACTCACTTTCCCCCTACAGGACTCAGATCTGGGAGCAATTACCTTCGGA
GAAAACGAATAGAAAACCTGAAGTGTTTACTTTTTTAAAGCTGCTGAAGTTTGTGGTTTCTCAATTGTGTTTTAAGCTCTAGGACATAAA
AGTTTGAAGACATTTTACAGGTTTTTTTATGCTGCTTGATATCAAGCTTTTCAAAGTCTTTGTTGGGAAGATAGAGCACTGTATGA
AAGAGAAGATGTTCAAAGAAAACATTTCACAAAATGGGTAATGACAAATTTTCTAAGTTTGGGAAGCAGCATATTGAGAACCTCTTCACTGA
CTACAGGATGGGAGGGCCCTCTAGACCTCTCTCGAAGGCTTGACAGGGCAAAAACGCCAAAAGAAAAGAGATCCACAGAGTTTCATGCCCT
GAACAATGTCAACAGGCACTGCGGGTTTTGCAGAAACAATAATGTTGATTAGTGAAATATTGGAAGTACTGCATCTGTAGATTGGAATCAATA
ACTGACTCTTGGTTTGATTGGAATATAATCTCCACITGGGAGGTCAAAATGTAAATGAAAATATCATGGCTGGATTGCAACAAACCAACAG
TGAAGAATTCTCTGAGCTGGGTCGCACATCAACTCGTAATTTATCCACAGGTTAATGTAATCACTTCACCACACCTGGCTCTGATGGCCCT
GGCTTTGAATGCTCTATCCATAGCTATAGGCGCAAGCTTTTGGACTGGAAATAGTGTGGTTTTGCCACAGCTCAGCCACACACAGCACTGGAAC
TGCATTCACATCTCGCAGATATCAATTAGGCATAGAAACATCTGATCTCGAAGATCTTGATACCACTATCAGATAGAAAGTCCATCTT
AATGTACATCACAATCACTCTTCCAAAGTTTGGCTCAACAAGTGAGCATTTGAAGCCATCCAGGAAGTGAATATTGGCAAGGCCACCTAAGT
GACTTAAGAGAGACATTTTCAGTTTACATCTCAAAATGCAATTTCTCAACAGCACTCAGGTCACTGTACACAGGGATATGAGAGAACTTCTTC
CCCTAAGCTCTGATTCAAGAGTATGCTTACACACAGGCTGTTATGTCACCACTCTGACCTCAGCCAGGAGGCTTCTTCTTACAGCAATTT
GGAAGCTCTCGAAGACAAGTCATTTGGCAGTTCATTGATGGAGAGTGAAGTAAACCTGGACCGTTATCAACACAGCTTTAGAAGAAGTATTATC
GTGCTCTGTTTCTCTCGTGAAGACATTTGCAAGCACAAGGAGAGATTTCTAATTGATGTGGAAGTGGTGAAGACCAAGTTTCATCTCATGAGGG
CTAGCTATGGAATTGACAGCCCATCAGGCGGGGTTGTAATATTCTAATTTGGGAAGTGAATGAGTGAAGACAGGAATTTATCAAGAAG
TGAAGAACTGAAGTACAAGGACAGATGAATCTCTAAATTCAGAGTGGGAATGCTCAGGGTGTGCTAGCATGTGAAAACCAAGAACTTTACA
TAGACTTTTAATGGATCTECAGAACTCAGAACTGAAGAATTTGAATCACTGTCTACAAAAACAGAGAAGAACAGAGAAATGGAGAGAG
GCTCTTTGAGACCTGATCTTGAAGACCTAAAAGCGCAAGTACACACATTAAGGTGCTTTCAAGAAGTCTAGAAACAAGTCAAGCTAGGTTCA
TCTCTCACTCACTAGCTGGTGGTGGTGTGATTAATCTAGTGGAGATCAAGCAAGTGTCTTTTGAAGAACAATTAAGGATTTGGGAGATCG
ATGGCGCAACATCTGTGATGGAAGAGAGCGCTGGGTTCTTTACAAGACATCTCTTCAAATGGCAACGCTCTTACTGAAGAAGATGTGCT
TTTTAGTGCATGCTCTTCAGAAAAGAAGATCGAGTGAACAAGATTACACAACACTGGCTTTAAAGTCAAAATGAATGTTTATCAAGTCTCA
AAACCTGGCGTTTAAAGAGCGGATCTAGAAAAGAAAGCAATCCATGGCGAACTGTATTCTCAACAACAGATCTCTTCTCAACACTGAA
GAATAAGTCAGTGACCCAGAAGACGGAAGCATGGCTGGATAACTTTGCCCGGTGTTGGGATAATTTAGTCCAAAACCTTGAAAAGAGTACAGC
ACAGATTTTCAAGCTGTGCTACCCCACTCAGCCATCACTAAGACAGACATGTAATTGAAAACAGTACTACGTTGACCAAGGAGACAGAT
CTGGTGAAGCATGCTCAAGAGCAATTTCAACATCACTCCCAACCTCCCAAAAAGAGGCGAGATTACTGTGAACTTGAATTTGAAAAGGTTTGA
TGTGATATAACTGAACTTCACAGCTGGATTACTCGCTCAGAAGCTGTGTTGCGAGAGTCTGAAATTTGCAATCTTTTCGGAAGGAAGGCAACTT
CTCAGACTTAAGAAAAGAAAGTCAATGCCATTAGAGCGAGAAAAGCTCAGAGATTTCAGAAAACCTGCAGAGATCGGCGAGATCTAGCTCAGGCCCT
GGTGAACAGATGGTGAATAGGGCTTTAATGCAAGTAGCATCAAAACAGCTCAGAACACTGAACAGCCGCTGAGATCGAATTTCTGCCACTT
GCTAAGTAGAGACTTAAGTGGCTGGAGTATCAGAACACATCACTGCTTTCTATAATCAGCTTACACAATTTGGAGCAGATGACAACTACTGC
TGAAGAATCTGGTTGAAATTCACCCACACCCCTCAGAGCCCAACAGCAATTTAAAGTCAGTTTAAATTTGTAAAGGATGAAGTCAACCGGCT
ATCAGGTTCTCAACCTCAAATTTGAACGATTTAAAAATTTCAAAGTCATGCCCTGGAAGAGAAAAGGACAGGACCCATGTCTCTGATGCAAGCTT
TGTGGCCTTTACAAATCAATTTTAAAGCAATTTTCTGATGTGAGCGCGTGAAGAGAAAGAGCTACAGACAATTTTGACACTTTGGCACCAAT
GCTCTATCAGGAGACCTGAGTGGCATCAGGACATGGGTCTCAGCAGTCAGAAACCAAACTTCTCATCTCAACTTAGTGTCCACGACTGAG
AATCATGGAGCAGAGACTCGGGGAATTTGAGGCTTTACAAAGTTCTCTGCAAGAGCAACAAAGTGGGCTATACTATCTCAGCACCACCTGTA
AGAGATCTCGAAGAAAGCGCCCTCTGAATTTAGCGGAAATATCAATTCAGAAATTTGAAGAAATTTGGGGGCGCTGGAAGAGGCTCTCTCCCA

GCTGGTTGAGCATTGTCAAAGCTAGAGGAGCAATGAATAAACTCCGAAAAATTTCGAATCACATACAAACCTTGAAGAAATGGATGGCTGA
 AGTTGATGTTTTTCTGAAGGAGGAATGGCTGCCCTTGGGGATTTCAGAAATCTTAAAAAGCAGCTGAAACAGTGCAGACTTTTAGTCAGTGA
 TATTTCAGACAAATTCAGCCAGTCTAAACAGTGTCAATGAAGGTGGGAGAGATGAAGCAATGAAGCAGAGCCAGAGTTTGGCTTCAGAGCTGA
 GACAGAACTCAAAGAACTTAACACTCAGTGGGATCACATGTGCCAACAGGTCTATGCCAGAAAGGAGGCTTGAAGGGAGGTTTGGAGAAAAC
 TGTAAAGCCTCCAGAAAGATCTATCAGAGATGCAAGCAATGGATGACACAGCTGAAGAGAGTATCTTGAGAGAGATTTTGAATATAAAACCTCC
 AGATGAATTACAGAAAGCAGTTGAAGAGATGAAGAGAGCTAAAGAGAGGCCCAACAAAAAGAAAGCGAAAGTGAAACTCCTTACTGAGTCTGT
 AATAGTGTCTAGCTCAAGCTCCACCTGTAGCACAAGAGGCCCTTAAAAAGGAACCTTGAAGCTCTAACCCCACTACAGCTGGCTCTGCAC
 TAGGCTGAATGGGAATGCAAGACTTTGGAAGAACTTTGGGCATGTTGGCATGAGTTATTGTCATACCTTGGAGAAAGCAACAACTGGCTAAA
 TGAAGTAGAATTTAACTTTAAACCACTGAAACATTTCTGGCGGAGCTGAGGAAATCTCTGAGGTGCTAGATTCACTTGAAAAATTTGATGCG
 ACATTTCAGAGGATAACCCAAATCAGATTGCGATATTGGCACAGACCTTAACAGATGGCGGAGTCAATGGATGAGCTAATCAATGAGGAACCTGA
 GACATTTAATCTCGTTGGAGGGAATACATGAAGAGGCTGTAAAGGAGCAAAAGTTGCTTGAACAGAGCATCCAGTCTGCCAGGAGACTGA
 AAAATCCTTACACTTAATCCAGGAGTCCCTPCACATTCATTGACAAAGCATTTGGCAGCTTATATTTGCAGACAAAGGTGGACGAGCTCAATGGCC
 TCGGAAGGCCAGAAATCCAAATCTGATTGACAAAGTCATGAGATCAGTTTGAAGAAATGAAGAAACATAATCAGGGGAGGAGGCTGCCCA
 AAGAGTCTCTCTCAGATGATGTTGTCACAGAAATAATACAGATGCTCCATGAAGTTTTCGATTATTCAGAAACCAAGCTCAATTTTGAGCA
 GCGCTCACAAGAAAGTAAGATGATTTAGATGAAGTGAAGTGCATTTGCCCTGCATTGCAACAAAGAGTGTGGAACAGGAAGTACTACACTC
 ACAGCTAAATCATTGTGTGAATCTGTATAAAAGTCTGAGTGAAGTGAAGTCTGAAGTGAAGTGTGGAAGTGAAGTGTGGAAGTGAAGTGTGGA
 GAAAAAGCAGAGCGGAAATCCCAAGAACTTGAATGAAGAGTACAGCTTTTGAATTTGCAATTAATGAGCTGGGAGCAAGGTAACAGAAAG
 AAAGCAACAGTTGGAAGAAATGCTTGAATTTGCTCCGTGAAGTSCGAAGGAAATGAATGCTTTCAGAGAAATGGCTGCCAGCTACAGATATGGA
 ATTGACAAAGAGATCAGCAGTTGAAGGAATGCCATAGTAATTTGGATTCTGAAGTGGCTTGGGAAAGGCTACTCAAAAGAGATTGAGAAACA
 GAGGCTGCACCTGAAGAGTATCACAGAGGTAGGAGAGGCCCTTGAACACAGTTTGGGCAAGAGGAGAGCTTGGTGGAGATBAATCAGTCT
 TCTGAATAGTAACTGGATAGCTGTCACTTCCGAGCAGAGAGAGTGGTTAAATCTTTTGGTGGAAATCCAGAAACACATGGAAGAACTTTGACCA
 GAATGTGGACCATCACAAGAGTGGATCATTGAGGCTGACACACTTTTGGATGAATCAGAGAAAAAGAAACCCAGCAAAAGAGAGAGCTGTCT
 TRAGCGTTTAAAGGCAAGACTGAATGACATACGCCCAAGAGTGGACTCTACAGCTGACCAAGCAGCAAACTTGAATGGCAAAACCCGGGTGACCA
 CTGCAGGAATTTAGTAGAGCCCAATCTCAGAGCTCAACCATCGATTTCAGGCCATTTCACACAGAATTAAGACTGGAAGAGGCCCTCCATTCC
 TTTGAAGGAATTTGGAGCAGTTTAACTCAGATATACAAATTTGCTTGACCACTGGAGGCTGAAATTCAGCAGGGGCTGAATCTGAAAGAGGA
 AGACTTCAATTAAGATATGAATGAAGCAATGAGGCTACTGTAAAGAAATGTTGCAAGAGGAGAGCAACTTACACAAAGAAATCAGATGA
 GAGAAAGCGAGAGGAAATGAAGATTAAGAAACAGCAGCTGTACAGACAAACATTAATGCTCTCAAGGATTTGAGGCTCTCAAGAAAGAAAGGCT
 TCTAGAAATTTCTCACTAGTGGTATCAGTACAAGAGGCGAGCTGATGATCTCTGAAATGCTTGGATGACATTGAAAAAAATTTAGCCAGCCT
 ACCTGAGGCCAGAGATGAAGAGGAAATTAAGAGAAATGATCGGGAATTTGCAGAGAGAGAGAGAGAGGCTGAATGCAAGTGGCTAGGCCAGGCTGA
 GGGCTTGTCTGAGGATGGGGCCCAATGGCAGTGGAGCCCACTCAGATCCAGCTCAGCAAGGCTGGCGGAAATTTGACAGCAAAATTTGCTCA
 GTTTGGAAGACTCAACTTTGACCAAAATTCACACTGTCCGTGAAGAAACAGATGATGGTGAATGCTGAGAGACATGCTTTGGAATTTCTTATGT
 GCTTCTACTTATTGACTGAAATCACTCATGTCTCAGAGCCCTATTGAAAGTGGAAACACTTCTCAATGCTCTGACCTCTGTGCTAAGGA
 CTTTGAAGATCTCTTAAAGCAAGAGGATCTCTGAAGAAATTAAGAAATAGTCTACACAAACCTCAGGCTCGGATTGACATTATTCAATAGCAA
 GAAGACAGCAGCATTGCAAGAGTGCACAGCTGTGGAAGAGGCTGTGGAAGAGCTGTCTGCCAGCTTGAATTTCCAAATGAAGAAATTTAA
 CAAATGTACAGGAGCCGACAGAGGCCGATTTGACAGATCTGTTGAGAAATGGCGGCTTTTCATTATGATATAAGATATTTAATCAGTGGCT
 AACAGAGCTGAACAGTTTCTCAGAAAGACACAAATTCCTGAGAAATTTGGAAACATGCTAAATACAAATGGTATCTTAAAGGAACCTCAGGATGG
 CATTTGGGAGCGGCAAACTGTTGTGCAAGCAATTTGAATGCAACTGGGGAAGAAATTAATTCAGCAATCTCAAAACAGATGCCAGTATTCTACA
 GAAAAAATTTGGGAAGCTTGAATCTGCGGTGGCAGGAGGCTGTGCAACAGCTGTGACAGAGAAAAAGAGGCTAGAGCAACAAAGATATCTT
 GTCAGAAATTTCAAGAGATTTAAATGAATTTGTTTTATGGTTGGAGGAGAGCAGATAACATTGCTAGTATCCCACTTTGAACCTGGAAAGAGCA
 GCAACTTAAAGAAAGCTTGAAGCAGTCAAGTTACTGGTGAAGAGAGTTGCCCTGCGCCAGGGAATTTCTCAACCAATTAATGAAGAACTGGAGG
 ACCCGTGTCTTGAAGGCTCCCATAGCCAGAGAGCAAGATTAACCTTGAATTAAGCTCAAGCAGACAAATCTCCAGCTGGATAAGAGTTTC
 CAGAGCTTTTACTTGAGAAACAGGAGAAATTTGAAGCTCAAAATGAAGAGCTTGGGAGCTTGAAGAAAGGCTTGAAGACTTTGAAGAGAGTT
 AATCATCTGCTGCTGTGTTATCTCTTATTAGGAATCAGTTTGAATTTATAACCAACCAACCAAGAGGAGCAATTTGACGTTTCAGGAAC
 TGAATTAGCAGTTCAAGCTAAACACAGGATTTGGAAGAGATTTGTTTAAAGGGGAGCATTGTTCAAGGAAAGAAACAGGCACTCAGCCAGT
 GAAGAGGAGTTTGAAGATCTGAGCTCTGAGTGGAGGCGGTAACCGTTTACTTCAAGAGCTGAGGCGCAAGCAGCTGACCTGACCTCTGAG
 ACTGACCBCTATTGGAGCTCTCTTACTCTGCTGACACAACTGTGTTTACTTAAAGGAACTGCCATCTCCAACTAGAAAT
 GCCATCTTCTTGTGTTGGAGGTACTGCTCTGGCAGATTTTCAACCGGCTTGGACAGAACTTACCGACTGGCTTTCTTGTCTGATCAAGT
 TATAAATCAGAGGCTGATGTTGGGTGACCTTGAGGATATCAACGAGATGATCATCAGCAGAGGCAACAAATGAGGATTTGGAACAGAG
 GCGTCCCACTTTGGAAGAACTCAATACCCCTGCCCAAAATTTGAAGAAACAGAGCAAGCAATCAAGAGGCTAGAAACAACTATTACGATCGAAT
 TGAAGAAATTCAGAACTCAGTGGGTGAAGTACAGAAACACCTTCAGAACCGGAGGCAACAGTGAATGAATGTTAAAGGATTTCAACACAAATG
 GCTGGAGCTTAAAGGAAGAGCTGAGCAGCTCTTGGACAGGCGCAGAGCCAAGCTTGAATGATGGAAGAGGCTCCCTATACAGTATGATGCAAT
 CCAAGAGAAATCAGAGAAACCAAGCAGTTGGCCAAAGACCTCCGCAAGTGGCAGACAAATGTAGATGTTGGCAATGACTTGGCCCTGAACT
 TCTCCGGGATTAATCTGCGAGATGTACCAAGAAAGTCCACATGATAACAGAGAAATCAATGCCCTCTGGAGAGAGATTCATAAAGGGTGGAG
 TGAGCGAGAGGCTGCTTTGGAAGAACTCATAGATTACTGCAACAGTTTCCCTTGGACCTGGAAGAGTTTCTTGTCTGGCTTACAGAGCTGA
 AACACTGCCAATGCTTACAGGATGCTACCCGTAAGGAAGGCTCTTGAAGAGCTCCAAGGAGTAAAGAGCTGATGAACAAATGGCAGGA
 CCTCCAAGGTGAATTTGAAGCTCACACAGATGTTTATCACAACTGGATGAAGAAAGCAGCAAAATCCTGAGATCCCTGGAAGGTTCCGATGA
 TGCAGTCTGTATCAAGAGCTTTGGATACATGAATTCAGTGGAGTGAATTCGGAAGAAATCTCTCAACATTAGGTTCCATTGGAAGC
 CAGTTCTGACCACTGGAAGGCTCTGCACCTTTCTCTGAGGAATCTTGGTGGCTACAGCTGAAGATGATGAATTAAGCCGGCAGGCACT
 TATTGGAGGCGACTTTCCAGCAGTTTCAGAGCAGAAAGATGATACATAGGGCTTCAAGAGGGAATTTGAAGAACTTAAAGAACTGTATCATGAG
 TACTCTTGAGACTGTACAAATTTCTGACAGAGCACTTTTGAAGGACTAGAGAACTCTACAGGAGCCAGAGAGCTGCTCTGAGGAG
 GAGAGCCAGAAATGTCAGCTCGGCTTCAAGAAAGCAGGCTGAGAGGTCATGATGAGTGGGAAAGAAATTTGAAGCTGCACTCCGAGCTGCA
 GAGAAATTAGATGAGAGCTTGAAGACTTCCAGCACTTTCAGAGGCGCAGGATGAGCTGAGCTCAAGCTTCCGCAAGCTGAGCTGATCAA
 GGGATCTCTGGAGCCGCTGGGCGATCTCTCATTGACTCTCTCAAGATCACTCTGAGAAAGTCAAGGCACTTTCAGAGGAGAAATTTGCGCTCT
 GAAGAGAACTGAGGCGCTCAATGAGCTTGGTGGCAGCTTACACTTACACTTGGGCTGAGCTCTCAGCTTACAGCTTACAGCTTGAAGAG
 CTTGAACCCAGATGGAAGCTTCTGAGGTTGGCGCTGAGGAGCAGCTGAGGAGCTGATGAAGCCACAGGAGCTTTGGTCCAGCTCTCA

(SEQ ID NO: 2)

>gi|110611227|ref:NM_007124| Utrofina de Homo sapiens (UTRN), ARNm

GTATTGATGTCAAGCTGAACCATCGTAGCAAGTTGAAAGCCCTTAGAAGAGGAGCTTGGTAAAGTTTGTGATTATCTTGAAACTCTGGCAAGA
TGGCCAAAGTATGGAGAACATGAAGCCAGTCCCTGCACATGGGGCAGAACGAATTCACTGATATCATTAAGTCCAGATCTGATGAACACAAATGACG
TACAGAAGAAAACCTTTACCAAATGGATAAATGCTCGATTTTCAAAGAGTGGGAAACCCCCATCAATGATATGTTCCACAGACCTCAAAGATG
GAAGGAAGCTATTGGATCTTCTAGAAAGCCCTCACAGGAACATCACTGCCAAAGGAACGTTGTTCCACAAGGGGTACATGCTTTAAATAACGTCAC
ACAGAGTGTCTCGAGGTCTTACATCAGAAACAATGTGGAATTAGTGAATATAGGGGGAACATGCACATTTGTGGATTGGAAATCACAAACTGACTCTTGG
GGTTACTTTTGCAGCATCAATTTTGCACCTGGCCAGGTGAAGAAGTGTCAATGAAGATGTGCATCTCGGACCTGCAGCAGACGGAACAGTGAAGAATCTC
TGCTCAGCTGGGTGCGCTCAGACCAACAGGCCCTTACAGCCCAAGTCAACGTCCTCAACTTCACCACCAGCTGGACAGATGGACTCGCCCTTTAATG
CTGCTCTCCACCGACATAAACTGATCTCTTCAGCTGGGATAAAGTTGTCCAAATGTGTCACCAATTTGAGAGACTTGAACATGCGCTTCAGCAGGG
CTCAACTCTTATTTGGGAATTTGAAAGCTGTGTAGATCTCTGAAGATGTTGCCCTTCAGCTCTCTCGACAGAAATCCATAATTTATGTTTAACT
CTTTGTTTGAAGGTGCTACCTCAGCAAGTCCACCATAGACGCCATCCGGTAGAGGTAGAGACACTCCCAAGGAAATATAAAAAAGAAATGTGAAGGAG

[|gi|110611227|ref|NM_007124|](#) Utrofina de Homò sapiens (UTRN), ARNm

GTATTGATGTC AAGCTGA ACCATCGTACGGAAGTTGAAAGCCCTTAGAAGAGGAGACTTGGTAAAGTTTTTGGATTATCTTGAAGACTCTGGCAAGA
TGGCCAAGTATGAGAGAACATGAAGCCAGTCTCTGCACATGGGCAGAACGAAATTCAGTGATATCATTAAAGTCCAGATCTGATGAACACAAATGAGC
TACAGAAGAAACCTTTACCAAATGGATAAATGCTCGATTTTCAAAGAGTGGGAAACCACCCATTCATATGATGTGTTACACAGACCTTCAAGAGATG
GAAGGAAGCTATTGGATCTTTCTAGAAGCCCTCACAGGAACATCACTGCCAAAGGAACGTGGTTCCACAGGGTGATCTGCCTTAATAACGTCA
ACAGAGTGTCTCAGGTTTTCATACAGAAACAACTGTGGAATTAGTGAAATATAGGGGGAACGTGACATTTGTGGATGGGAATACCAAACTGACTCTTGG
GGTTACTTTGGAGCATCAATTTTGCACCTGGCAGGTGAAAGATGTCTATGAAGGATGTCTATGTCGGACCTGCAGCAGACGAACAGTGAGABGATCC
TGCTCAGCTGGGTGCGCTCAGACCAACAGGCCCTACAGCCAAAGTCAAAGCTCCTCAACTCACCACCAAGCTGGACAGATGGACTCGCCTTTAATG
CTGTCTCTCCACGCACATAAACCTGATCTCTTCAGCTGGGATAAAGTTGTCAAATAATCTCAACAAATGAGAGACTTGAACATGCCCTTCAGCAAGG
CTCAAACTTATTTGGGAATGTGAAGAGCTGTAGATCTTGAAGATGTTGCCCTTCAGCTCTCTGACAGAAATCCATAATATGTATTAACT
CHTTGTTTGAAGTGTCTACCTCAGCAAGTCCACATAGACGCCATCCGTGAGGTTAGAGACACTCCCAAGGAAATATAAAAAAGAATGTGAAGAA

ATAAAGCTTCCAGTTCAGATATGAAACACGCAATTACAGAAAAAATTGGAAAAGGGTCAAGAACCAAGTGGGATGGCACCCAGCATGGCGTTGAGG
 TAAGACAGCAGCAGCTTGGAGGACATGATATTGTGACAGTCTTCAGTGGGATGACCATAGGGAGGAGACTGAGAACTGATGAGAAAAATATGGTAGG
 CTGCACTTATATTCTTCAGCAAGCCGAGGGGACTCACTCAACAAATTTCTGATAACCAATBCTGTTCAAGAACTGGGCTCGGAG
 ATGGTATCGTCATGGCGTTTCGATBAGCTCTTCAGAAACTCTGGAGGAATATGEGGAGTGATGACACAGAGBATGTGAAGAAGAACACAGAGT
 ACTTAAAAACATCATGGATCAATCTCAAACAAAGTATTGCTGACAGACAGAACGCCCTTGGAGGCTGAGTGGAGGACGGTGCAGGCCCTCTCGCA
 GAGATCTGGAAAACTTCTCTGAAGTGGATCCAGAGACGAGAGACCAAGTGAATGTGCTTGTGGATGGCTCTCATCGGAGAAATGTCTTTCAGG
 ATAGTATCTTGGCCAGGGAATCAAACAGCAAGTCAGGACATCCAGGACGAATATGATGGCCCAATGACATATTTAAAAAGCATTGACGGAA
 ACAGCGCAGAGATGTTAAAAAGCTTTGGGAAATCTGAGAGAGGCTCATATGCTTCAACATCGATCGATGATATGAACCAAGAGATGGAATGACT
 TAAAAAGCAAAATCTGCTAGCATCAGGGCCCAFTTGGAGGGCAGCGCTGAGAAGTGGAAACAGGTTGCTGATGTCTTAGAAGAACTGATCAAAAT
 GGCTGAATATGAAGATGAAGAGCTTAAAGAACCAATGGCTTATGGAGGAGATGTTCCAGCTTTCAGCTCCAGTATGACCAATTGTAAAGGCC
 TGAGACCGGGATTTAAAGGAGAGAATATTTCTGTCTGTAATGCTGTGCGACAGGCCGAGTTTCTTGGGTGATGACCAATGAGGCCCT
 AAGAGCCAAAGAGAAACCTACAATCAAAAACGAAATTAACCTCTGAGGAGAGAGCCCAAAGATGGCCAAAGCATGGCCAAACAGCTCTTCT
 AAGTCAAGAAAAATGGGAAAGTCTAAATGCTGTATCTAGCAATTTGCCAAAGCAAGTGGACAAAGGCTTTGGAGAACTCAGAGACCTGCAGG
 TAGCTATGGATGACCTGGACGCTGACATGAAGGAGGAGAGATCCGTCGGGAATGGCTGGAGGCCCTGGGAGAGCTTACTCATGTGACTCGCTGC
 AGGATCACATGGAATAATCATGGCAFTTACAGAGAAATTCACCAATCACTTTAAATTAAGACCGTGATGATTTACAGCTCACTGCT
 CTCCACTTGACCTGATCTCTCTCTAAAGATGTCTCGCCAGCTAGATGATCTTAATGCGATGGAAACTTTTACAGGTTTCTGTGGATGATC
 GCCTTAAACAGCTTCAGGAAGCCACAGAGATTTGGACCATCTCTCAGCATTTTCTCTCTACGTGAGTCCAGCTCGCGTGGCCAAAGATCCA
 TTTCCATATAATAAGGTGGCTTATTACATCAACCATCAAAACAGAGACCACTGTTGGGACCATTCATAAATGACGCCAATCTTCATGCTCTG
 CTGACCTGAATAAGTGACGTTTCTGCTCCCTACCGTACAGCAATCAAAATCCGAAGACTACAAAAGCACTATGTTGGATCTCTATAGGTTGA
 GTCAACCAATGAATTTTCAAACAGCACAAGTTGACCAAAATGACAGCTCTCCAGTGTTCAGATGTCTCACTCACTGTCTGCAACCAACTT
 ATGATGGACTTGAGCAAAATGCAATAAGGACCTGGTCAACGTTCCACTCTGTGTTGATATGTGTCTCAATGGTTGCTCAATGTCTATGACACGG
 CTGCAACTGGAAAAATTAGAGTGCAGAGCTGTGAGAGATGGATTAATGTCTCTCTCAAAGGCTCTCTGGAGAAAAATACAGATATCTCTTTA
 AGGAAGTTGCAAGGGCAACAGAAATGTGTGACAGAGGCGAGCTGGCGCTGTACTTCATGATGGCCATCAAGTCTCCCGGACGCTATGTGGAAG
 TAGCAGCTTTTGGAGGCAGTAATTTGAGCGCTAGTGTTCGCACTGCTTCCACAGCAATACAATAAACCGAAATAAGTGTGAAGAGTTTA
 TAGATTTGGATGCAATTTGGAACCCACAGCTCCATGGTTGGCTCCCGATTTTACATGAGTGGCAGCAGCGGAGACTGCAAAACATCAGGCCAAAT
 GCAATCTCTGAAGAAATGTCCAAATTTGTGGGTTCCAGGTATAGAAGCTTAAAGCTTTTAACTATGATGTTCTGCCAGAGTGTGTTTCTTTGG
 TCGCAACAGCAAAAGTCAAAATTCACATTAACCAATGGTGAATTTGATATCTCAACACTCTGGAGGAAGTGTACAGAGACTTCAAAAGG
 TACTTAAAGAACAGTTTCAAGTTCGAAGAGTACTTTGCCAAACACCCGCACTTGGTTACCTGCTGTCAGACAGTCTCTGAAGGTGCAACCT
 TAGAGACTCTTATCACACTCATCAGTATGTGGCCAGAGCACTATGACCCCTCAAAATCTCTCAACTGTGTTCTATGATGACACCCATTCAAGAA
 TAGAACAAATCTGCCACAGCACTGGCCGACGTGGAAAGGCAATAGGCTCTTTCTCCTGATGAGCAGCTCCACACAGGAAGTGTGGGAAGCAG
 AGCAACCCCTCATCAGCAGTATGTGTCRAACACTCGAGGAGAGTCCCAAGTGAGCGAGCGCCAGAGCCCACTCAGATCTGAAGTCAAGTAG
 AGAGGGAAGAACCTGGAGAACTGGAGAGGATCATTGCTGACCTGGAGGAAGAACAAAGAAATCTACAGGTGGAGTATGAGCAGCTGAAGGACC
 AGCACTCTCAAGGGGGCTCTCTGTCGGTTCAACCGCCAGAGTCGATTAATCTCCCAATCACACGCTCGAGGATTCAGAACTTTATAGCAGAG
 CAAAACCTCTCAGGCGAGCAAAAGTCCGGCTGGAGGCTAGGATGCAATTTAGAAGATACAAATACAGCAGTGGAGTCTCAGCTCCACCGCC
 TCGCAGAGCTCTGGAGCAGCTGATCTGATTTCCGGAATCAATGGTGTTCCTCCATGGGCTTCTCCTCAGCACTCTGCACAGCTGAGCTCGG
 TTGATCCAGATGGCTCCGSCCCACAGTTCCACAGGAGCGCGGAGAGGACCTGCTGGCCCCACCGCACCGACCCAGCAGCGGATCTCAGCGAGG
 TCATGGAGCAGATTCACAGCAGCTTTCCATCTTCTGCTGCCAAATGTCTCCAGCAGGCGCACAGGCAATGTGAAGTATCTCCGCCCCAACCAAT
 GTTCTCTGACGTACAGTGTGTCCTTTTCAGCAAAATGCCAAATTCGAATTCCTCAATTAATCAGAAAGCTCCATGGCTCTCTGGCCCCAGATGTG
 AGTGTCTAGCTGTGTGTTCTTACTGAAGAGATAAACCTGACTATCCAAGAGAAATGATATTTTGTGTTTATAATATCATATATATTGTT
 TTCTTCTTCCCTTTCTATGCAAGTGTAAATTAATGAACAGAGAGGATATTGGAAATGGTAATACATTTGTTCAGCGATTTGTATATATGATACA
 GCATTTGGGAAGAGTGGGTGGGGGCTTTCTAATATGATACCGTCTTTTAACTACTATGACAAAGCTTACATAGAATATAGAAGACCACTTTTACA
 TTTTTACATCTCTCTGCTGTTCTATATTAACCTTGCACAATTAACCTTTTTTCTTGACTCTTTTACAGCAATGTTTGGTTATTTATAAT
 TTATCAGCCATATGTTTATCAGCCATATAACCAACTAGATCCCAATAGATCCATGATTTGTTTCCGTGATTTGGCCACATTAATAATATCA
 TAAATTTCAATCAAAATCTTATATATACACACATATGGTTTAAAGCTACAGCCCTGTGTATGCCGTTTAACTTTATTTGACGTTGCCCACTTA
 CTCTCTTGTCGACCACTTGGATAACCGTAATAAAAATCTCTATAAGCCTAAATGGCGATTCTTTTGGGATATTTTCTCTGCATTTTATTCCTCT
 TTTATATAGATAGGAATTAATTTATTTATTTATGTCTTAATCTTATTTGAATAAGGACACTACATTTATAATATCTCAAGAGATCATATBCCAA
 AGGTTGCCCACTTGACATATTTTCAATTTGACACAGAAACAAATTTAGTACAAAGCTTCTCAGTGGCAGTCTGATTTTCATCTATTTACATATACA
 TGCACAGCAGACCTTCACTTATTTGTATACCGAACACATCAATTGTCTTTGGTTCCCTTCAAAGAGAAATTTTATGTTGTTTTGATTTTTCAA
 GTCTCTAATAGTCTCTGAAACTCTGATGTTTCTGTTTGAAGAGCAGACACATTTAGTGCACGGCTTATTTTACTCTTCCGGTGAAGAT
 CAGATGTTTTTATACCTCTCACTTGATCAATATATTTGGAAGAAATGTTTATCAAAGTCTTATGCTACTGCTTCAAGAGAAATGAATTAAG
 TCGTATAGGTGATGGTACCTCCACCTACATCTTTTGAAGTCAATCAATATGATTTGTTTATGCTTCTGATTTAAACATTTAATGATTCAG
 TTTAAACBTGTTACTTAAATYAGCAATGTAGAGGAACCAAAAAAGGTGAATAATATGTTTTGATTCAAACCTAAAGACATAAAACATAA
 AGACATTTTAACTTTTGGGTTCTCTTTAGCTGGGATCTGGCCAGAAAGAGGCTTAAAGTTAGAATGCGTATATTTTGAAGATAGGTTGGGTGG
 GTTGGGGGGGAGGGGTGCTATTTTGCAGCAGAGATTTTGAAGAGAGAGAAATGTTTATATAAAGAGAGAGGATGACCACTTTCTAC
 CTCAGATCCATCTTCACTCCATTGCAATTGGAACACTGTTTATGCTGCTGACGCTGCAAGCTTAGAGCTTTTATCAGGCCATGTCTATCCACAA
 GAAAGCACCTATTTAAAGAAAAACAATTCCTTGAGCTCTCAACTCCAAGTTGTAGATTTGGTGTCTTCTTGTCTTACTTTAAAAAGTCAT
 GTGTTAATTTTCTTCTGCTGTATTTGATGCAAAATGTCTCTATCTGCTATTAAGAAAACTACGTAAACACTACATGTATACCTTCT
 AAGTAAATATAAATAAAAAAGAAATATATTCAGTAAACAAATGGGAAGTAAGTATGTAGTCTTTTGAATATGTGGTAAAGAACTAATCACAGA
 CTATCATCTAATCTGTGTTACATATTTGATTTTCTATCTGATTAAGAGTAAATTTTAAACACAAAAA

FIGURA 3

Secuencia antisentido natural (BF838561): SEO ID NO: 3

AGGTTAGAGAATCGCTTGAACACAGGGAGGAGGAGGTGCGAGCAGCTGAGATCGGGCCACTGCCTCCACCTGGGTGAGAGAGTGAGACTCC
ATCTCAAAAAACAACAAACAAAAATTAATAAGAAAAAACAGTGGCTCAAAATGCATAATGCTTGGCTAGAGCATAACAGGGGAAAAAGG
AAATCAGATGCTTTTGAAGACTGATACACTGAAAACATTTTGAGCGTCTCTGTTAATCAATAATCTTAACCTACCAATACAAATGGAACT
TATCATGCGAGCCAATCCASTAAATAATGGTAGCTGGAAGTAATGATAGTGATTGTAATAACTATGGCTGGGCATGGTGGCTCATGCTGTAAAT
CTGAGC

Secuencia antisentido natural(BG208074): SEO ID NO: 4

ctcaggTTCTCTGCGCTGCACATctctcTTTCATCTGGCTCCTTTACATGTGCAGAtGAAAGAATTATCTCACCATTCCGGCTCAACAAGAAATTTCAGTCCCGAAGCAGACAAAAAGTTTAAAAATATTTTATAACATTAACTGGACTTTTCGTAGAAGAAATAAGAGCTGAGAACGTTCATATTTACAGCAGCTTCATACTTGTTTTCTGATTGAATCATAAAATTTATTACTTTTATACTTGCTTCTACATGACAAAGTACCCAAAGCTAAATGTGAATCTCTAGTAGGTCGAAAA

Secuencia antisentido natural(BF950643): SEO ID NO: 5

ggtcgaagctcatcAAAATATTgATTGAATGACAGTTAAAGAGCCTTTACTGTATTTTAAATTTCCAAATAACATATATGTGTCACATATTTT
 TAAAAATATGGAGAAGTTCAGCGTTTGTGTTTGGCTTTTACTTTGGTAGGTAAATGCCTGATGTTCATCTTTTCAGTTCAACAGGCTGGGTG
 CTGGTATGGTACCAATAAAAGGATGATCAGCTGGAAATCAAGACCTTCAATCTCTCATCTCCCTCTCAACAAAGCCATGGCATGTGTG
 GATTAAATCTCAGAGAGAGCTTCATTTCACATCTTCAGAAAGCAGAAACAATGCTAGATGTACTGTTCAGTGATTCCAATAGTGAATGGCTCTT
 AGACCTTCCTCTCTCTCCCATTTGAATAGACATTAGCCCTCATGAGTGACCTCCGACACCTGTACTCTCCCCATACAGGATTCTGCATATAGCCAC
 CAAATCTAACTTTCTAATATCGCAAAACATAAAAAAAACTTCCTGGTTTTTGAACACATTCATCTCAATTGAGCAAGGAATCATCCATCCA
 CATTGTATCCCCAGCTCCACCTTTCCCGCATCTCTTCAATTTTTGCCAAATTTGCCATATCCCCAAACCTCCAAatgagcttgggaagtggggt
 agactcgaattcctatctggcatagtgctctcga

Secuencia antisentido natural(BF768753): SEO ID NO: 6

ctcaacgcttTATACTCACATCCARTTATACTTGGCATCCAATTATACTTCATATACAAAGTATAAGCTCTCCAGTTTGGTGTAGTCCCTCATC
ACTCCCTATCCTCTTTTATACCAACCACTCATCCTACTCTTATGTTATGTTCTTGGCTCTCATACATAGGCATTGGATTGGTGGCCCCCGGG
GTCTTGATCACAGCTCTCAAATCTAAATATGGATACAGCCCACTGGTGATTTCTGATTTAATTCACGGGGTTGGGTGCAAGATTTAGTTCT
TAACCAGCTTCCAGGTGAACCAATGTTGCTGGGTCTATGGATCACACTTTGAATGCAACgTTCAGGTGAAGAATATTATTATTATTGAAACC
ACTGCTAGTCTACTTAAGGTATGTGTCTGATCTATTAGTTACTACTGCTgAAACTCAGAAGATATAGATTTATGTGACACTGGCAGGGAAGTA
TAAAGCctctgagggg

Secuencia antisentido natural(ENST000000431309): SEO ID NO: 7

GCCCATCAATGGGAGAGGGTCTGTTATGGGAAGACTGTATTGAATTAAAGGTTAATATCAGGCTGAGCTCAGTGGCTCATACCTGTAATCCC
 AGCATTCTGGGAGGTTGATGCTATTACTTATCTCTCTTACTCAGGCACAGACAGCTCAAGCCATTTGTCGAGGTTCCACAGAGTACGACGGT
 GGCATGCTTACACCCACAGCAGCTGTACTGCTGTAACCATCCCTAAAGTATTCTACAGAGAGACTCAATAAGATATTTTAACTCTGCGAG
 GATTTTCTTATTTATCTCTTTTCAAATATGTGTAAATCTAATACCATGCCATCCTTGATATCTAACTCATTTTAGAGATAAAATGCTTACCTT
 AAATACCATCATATATATCTATATTTCTATAACCCCAACAGCAATATTGCAAGGTTAGAAATCCAGTGTGAGCAAGATATTTGTGAAGATCAGTGTA
 GATAATACTGAAATGACAGTGTATGAGGAGCAAGGTA

FIGURA 4

ID de la secuencia	Nombre de la secuencia antisentido	Secuencia
SEQ ID NO:8	CUR-0636	rUxCrUxCrArCeUxCrUxCrUxCrArCeCrCxAAGGGrGrUfGrGrArGrUxG
SEQ ID NO:9	CUR-0638	zArGrCeUxGrCfUxGrArArArUxArUxGrArCrGrUxUxCrUxCrArGrCfU
SEQ ID NO:10	CUR-0640	zArGrGrCzArUxUfArArCrCfUxArCxCzArArArGrUxArArArGrCzArA
SEQ ID NO:11	CUR-0642	rGrArArArGrUxUfArCeArUxUxUfGrGrGrGrCfUfArUfArGrGrCfA
SEQ ID NO:12	CUR-0644	rUfArCfArGrCzArArArCfUxGrGrArGrArGrCfUxUfArUfArCfUxUxU
SEQ ID NO:13	CUR-0646	rUfUxCrCzArUfUxUfGrUxArUxUfGrGrUfArGrGrUfUfUfArGrGrArU
SEQ ID NO:14	CUR-0648	rCrGrGrArArUxGrGrUxGrArGrArUxArArArUfCfUxUfUfUxCrArUxCfU
SEQ ID NO:15	CUR-0650	rCrGrUxGrArArUfUxArArArUfCfArGrArArUfCfArCfArGrGrU
SEQ ID NO:16	CUR-0652	rGrUfArArCrUfArArUfArGrArUfCfGrArArCfArCfArUfArCfCfUxU
SEQ ID NO:17	CUR-0654	zArGrGrGrArArUxGrGrArArGrUxArGrArGrArGrArUfUfGrArArGrGrUxC

FIGURA 5

ID de la secuencia	Nombre de la secuencia antisentido	Secuencia
SEQ ID NO:18	CUR-1443	G*C*C*A*C*C*T*G*C*T*A*G*C*T*C*T*G*T*G*A
SEQ ID NO:19	CUR-1444	T*A*C*C*T*T*C*T*T*C*C*T*C*A*T*C*A*C*T
SEQ ID NO:20	CUR-1445	G*G*G*A*T*T*A*C*A*G*G*T*A*T*G*A*G*C*C*A*C
SEQ ID NO:21	CUR-1446	G*G*T*T*C*A*G*A*C*A*G*T*A*T*C*A*G*G*T*G*C
SEQ ID NO:22	CUR-1447	T*A*C*C*A*T*A*A*C*A*G*A*C*C*T*T*C*T*C*A*C

FIGURA 6

ID de la secuencia	Nombre de la secuencia sentido	Secuencia
SEQ ID NO:23	CUR-0636	rCrUrCrCrArCrCrCrUrGrGrGrUrGrArGrArGrArGrUrGrAGA
SEQ ID NO:24	CUR-0638	xCrUrGrArGrArArCrGrUrCrArUrArUrUrCrArGrCrArGCT
SEQ ID NO:25	CUR-0640	rGrCrUrUrUrArCrUrUrUrGrGrUrArGrGrUrUrArArUrGrCCT
SEQ ID NO:26	CUR-0642	rCrArUrArUrArGrCrCrArCrCrArArArUrGrUrArArCrUrUTC
SEQ ID NO:27	CUR-0644	rArGrUrArUrArArGrCrUrCrUrCrCrArGrUrUrGrCrUrGTA
SEQ ID NO:28	CUR-0646	xCrCrUrArArArCrCrUrArCrCrArArUrArCrArArUrGrGAA
SEQ ID NO:29	CUR-0648	rArUrGrArArArGrArArUrArUrCrUrCrArCrCrArUrUrCCG
SEQ ID NO:30	CUR-0650	rCrUrGrGrUrGrArUrUrCrUrGrArUrUrUrArArUrUrCrACG
SEQ ID NO:31	CUR-0652	rGrGrUrArUrGrUrGrUrUrCrGrArUrCrUrArUrUrArGrUrUAC
SEQ ID NO:32	CUR-0654	rCrCrUrUrCrArArUrCrUrCrUrArCrUrUrCrCrArUrUrCrCCT