

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 618 576**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61P 31/12 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.05.2010 PCT/US2010/036558**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.12.2010 WO2010138806**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.05.2010 E 10781271 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.12.2016 EP 2435571**

54 Título: **Tratamiento de enfermedades relacionadas con un gen antivirico mediante la inhibición de una transcripción antisentido natural a un gen antivirico**

30 Prioridad:

28.05.2009 US 181773 P

05.08.2009 US 231458 P

28.08.2009 US 237886 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 2 618 576 T3

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

DESCRIPCIÓN

Tratamiento de enfermedades relacionadas con un gen antivírico mediante la inhibición de una transcripción antisentido natural a un gen antivírico.

5

Los aspectos de la divulgación comprenden oligonucleótidos que modulan la expresión y/o función de un gen antivírico y moléculas asociadas.

ANTECEDENTES

10

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

15

20

El documento WO 2009/046397 describe la modulación de la expresión génica con transcritos antisentido dirigidos a agRNA y gámpmeros. Salah et al. 2009, Molecular Cell, vol. 33(4): 462-471 describen Wrap53, un transcrito antisentido de p53 natural requerido para la inducción de p53 tras un daño en el ADN.

25

El documento WO 2007/087113 describe transcritos de ARN antisentido y no codificantes naturales como dianas farmacológicas.

30

El documento CN 1904900 describe una secuencia de siRNA autógena humana, su aplicación y método de detección.

El documento US 7517644 describe un método y composiciones para la reprogramación celular.

35

El documento US 2004/023906 describe una modulación antisentido de la expresión del activador de fosfotirosilo fosfatasa.

El documento WO 2005/013901 describe compuestos oligoméricos y composiciones para su uso en la modulación de ARN pequeños no codificantes.

40

El documento WO 02/48314 describe la modulación antisentido de la expresión de RAIDD.

El documento US 2003/225256 describe la modulación antisentido de la expresión de proteína cinasa 2 de PCTAIRE.

45

El documento US 2005/186594 describe composiciones y sus usos dirigidos al crecimiento celular y las proteínas de mantenimiento.

El documento WO 00/58512 describe la modulación antisentido de la transducción de señal de interleucina-5.

50

Wahlestedt et al. 2006, Drug Discovery today, vol. 11(11-12): 503-508 describen los transcritos de ARN antisentido y no codificantes naturales como dianas farmacológicas potenciales.

RESUMEN DE LA INVENCION

55

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

RESUMEN DE LA DIVULGACION

En un aspecto, la divulgación proporciona métodos para inhibir la acción de una transcripción antisentido natural usando oligonucleótido(s) antisentido dirigido(s) a cualquier región de la transcripción antisentido natural dando como resultado la regulación por aumento del gen sentido correspondiente. También se contempla en el presente documento que la inhibición de la transcripción antisentido natural puede lograrse por siRNA, ribozimas y moléculas pequeñas, que se considera que están dentro del alcance de la presente divulgación.

Un aspecto proporciona un método de modulación de la función y/o expresión de un polinucleótido de un gen antivírico en células o tejidos de paciente *in vivo* o *in vitro* que comprende poner en contacto dichas células o tejidos con un oligonucleótido antisentido de 5 a 30 nucleótidos de longitud, donde dicho oligonucleótido tiene al menos un 50 % de identidad de secuencia con un complemento inverso de un polinucleótido que comprende de 5 a 30 nucleótidos consecutivos dentro de los nucleótidos 1 a 1267 de la SEQ ID NO: 4, 1 a 586 de la SEQ ID NO: 5, 1 a 741 de la SEQ ID NO: 6, 1 a 251 de la SEQ ID NO: 7, 1 a 681 de la SEQ ID NO: 8, y 1 a 580 de la SEQ ID NO: 9, modulando así la función y/o expresión del polinucleótido de un gen antivírico en células o tejidos de paciente *in vivo* o *in vitro*.

En otro aspecto, un oligonucleótido se dirige a una secuencia antisentido natural de un polinucleótido de un gen antivírico, por ejemplo, nucleótidos expuestos en la SEQ ID NO: 4 a 9, y cualquier variante, alelo, homólogo, mutante, derivado, fragmento y secuencia complementaria a los mismos. Los ejemplos de oligonucleótidos antisentido se exponen como las SEQ ID NO: 10 a 30.

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

Otro aspecto proporciona un método de modulación de la función y/o expresión de un polinucleótido de un gen antivírico en células o tejidos de paciente *in vivo* o *in vitro* que comprende poner en contacto dichas células o tejidos con un oligonucleótido antisentido de 5 a 30 nucleótidos de longitud, donde dicho oligonucleótido tiene al menos un 50 % de identidad de secuencia con respecto a un oligonucleótido antisentido para el oligonucleótido antisentido del gen antivírico; modulando así la función y/o expresión del polinucleótido de un gen antivírico en células o tejidos de paciente *in vivo* o *in vitro*.

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

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

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

En 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). Preferiblemente, los nucleótidos modificados son moléculas bloqueadas de ácidos nucleicos, que incluyen α -L-LNA.

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

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

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

Otros aspectos se describen más adelante.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 es un gráfico de resultados de PCR en tiempo real que muestra el cambio en veces + desviación estándar en ARNm de RIG1 después del tratamiento de células HepG2 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 RIG1 en las células HepG2 se aumentan significativamente 48 h después de tratamiento con siRNA para RIG1 antisentido hs.601664 y AK300104. Las barras indicadas como CUR-0544, CUR-0546, CUR-0548, CUR-0550, CUR-0552, CUR-0554, CUR-0556, CUR-0558 y CUR-0560 corresponden a muestras tratadas con las SEQ ID NOS: 10 a 18 respectivamente.

La figura 2 es un gráfico de resultados de PCR en tiempo real que muestra el cambio en veces + desviación estándar en ARNm de MDA5 después del tratamiento de células HepG2 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 MDA5 en las células HepG2 se aumentan significativamente 48 h después de tratamiento con dos de los oligos diseñados para MDA5 antisentido BU663736. Las barras indicadas como CUR-0908, CUR-0909, CUR-0910, CUR-0911, CUR-0912, CUR-0913, CUR-0914 y CUR-0915 corresponden a muestras tratadas con las SEQ ID NOS: 19 a 26 respectivamente.

La figura 3 es un gráfico de resultados de PCR en tiempo real que muestra el cambio en veces + desviación estándar en ARNm de IFNA1 después del tratamiento de células HepG2 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 IFNA1 en las células HepG2 se aumentan significativamente 48 h después de tratamiento con uno oligo diseñado para IFNA1 antisentido DA393812. Las barras indicadas como CUR-0916, CUR-0917, CUR-0918 y CUR-0919 corresponden a muestras tratadas con las SEQ ID NOS: 27 a 30 respectivamente.

La figura 4 es un gráfico de resultados de PCR en tiempo real que muestra el cambio en veces + desviación estándar en ARNm de IFNA1 después del tratamiento de células ZR75 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 IFNA1 en las células ZR75 se aumentan significativamente 48 h después de tratamiento con uno oligo diseñado para IFNA1 antisentido DA393812. Las barras indicadas como CUR-0916, CUR-0919, CUR-0918 y CUR-0917 corresponden a muestras tratadas con las SEQ ID NOS: 27, 30, 29 y 28 respectivamente.

La figura 5 es un gráfico de resultados de PCR en tiempo real que muestra el cambio en veces + desviación estándar en ARNm de IFNA1 después del tratamiento de células HUVEC 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 IFNA1 en las células HUVEC se aumentan significativamente 48 h después de tratamiento con uno oligo diseñado para IFNA1 antisentido DA393812. Las barras indicadas como CUR-0916, CUR-0917, CUR-0918 y CUR-0919 corresponden a muestras tratadas con las SEQ ID NOS: 27 a 30 respectivamente.

Figura 6: Los resultados del ensayo ELISA muestran que la proteína IFNA se aumentó en extractos de células MCF7 que se trataron con oligos diseñados para IFNAI antisentido DA393812. Las barras indicadas como CUR-0916, CUR-0919, CUR-0918 y CUR-0917 corresponden a muestras tratadas con las SEQ ID NOS: 27, 30, 29 y 28 respectivamente.

Descripción de la lista de secuencias

SEQ ID NO: 1: Homólogo atonal de Homo sapiens 1 (Drosophila) (ATOH1), ARNm (NCBI n.º de acceso: NM_005172).

SEQ ID NO: 2: Interferón de Homo sapiens inducido con el dominio 1 de helicasa C (IFIH1), ARNm (NCBI n.º de acceso: NM_022168.2).

SEQ ID NO: 3: NM_024013.1| Interferón de Homo sapiens, alfa 1 (IFNA1), ARNm (NCBI n.º de acceso: NM_005172).

SEQ ID NOS: 4 a 9: SEQ ID NO: 4: Secuencia antisentido de RIG1 natural (AK300104); SEQ ID NO: 5: Secuencia antisentido de RIG1 natural (hs.601664); SEQ ID NO: 6: Secuencia antisentido de RIG1 natural (hs.104091); SEQ ID NO: 7: Secuencia antisentido de MDA5 natural (Hs.692345); SEQ ID NO: 8: Secuencia antisentido de MDA5 natural (BU663736) y SEQ ID NO: 9: Secuencia antisentido de IFNA1 natural (DA393812).

SEQ ID NOS: 10 a 30: Oligonucleótidos antisentido. "r" indica ARN y * indica enlace fosfotioato.

SEQ ID NO: 31 y 39 son los complementos inversos de los oligonucleótidos antisentido de SEQ ID NO: 10 y 18 respectivamente. "r" indica ARN.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

5 Varios aspectos de la divulgación se describen a continuación con referencia a aplicaciones ejemplares para ilustración. Debe entenderse que los numerosos detalles, relaciones y métodos específicos se exponen para proporcionar un entendimiento completo de la divulgación. Un experto en la técnica relevante, sin embargo, reconocerá fácilmente que la divulgación puede ponerse en práctica sin uno o más de los detalles específicos o con
10 otros métodos. La presente divulgación no está limitada por el orden de actos o acontecimientos, ya que 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.

15 Todos los genes, nombres de genes y productos génicos descritos en el presente documento pretenden corresponderse con homólogos de cualquier especie para las que son aplicables las composiciones y métodos desvelados en el presente documento. Por lo tanto, los términos incluyen, pero sin limitación, genes y productos génicos de seres humanos y ratones. Se entiende que cuando se desvela un gen o producto génico de una especie particular, esta divulgación pretende ser ejemplar únicamente, y no debe interpretarse como una limitación, a menos
20 que el contexto en el que aparece lo indique claramente. Por lo tanto, por ejemplo, los genes desvelados en el presente documento, que en algunos casos se refieren a secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos de mamífero, pretenden incluir genes homólogos y/u ortólogos y productos génicos de otros animales incluyendo, pero sin limitación, otros mamíferos, peces, anfibios, reptiles y aves. En aspectos, los genes o secuencias de ácidos nucleicos son humanos.

25 *Definiciones*

La terminología usada en el presente documento es con el fin de describir aspectos particulares únicamente y no pretende ser limitante de la divulgación. Como se usa en el presente documento, las formas en singular "un", "una",
30 "el" y "la" pretenden incluir las formas plurales también, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Además, siempre que los términos "que incluye", "incluye", "que tiene", "tiene", "con", o variantes de los mismos, se usen en la descripción detallada y/o las reivindicaciones, tales términos pretenden ser incluyentes de un modo similar al término "que comprende".

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

45 Como se usa en el presente documento, el término "ARNm" significa la transcripción o transcripciones de ARNm actualmente conocidas de un gen elegido como diana, y cualquier transcripción adicional que pueda dilucidarse.

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

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 a modo de un patrón regular de interacciones monómero a monómero, tales como tipo Watson-Crick de apareamiento de bases, tipos Hoögsteen o Hoögsteen inversa de apareamiento de bases, o similares.

10

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 constituida de al menos una unidad de monómero, es decir, un nucleótido en el caso de un compuesto de oligonucleótidos. Estos oligonucleótidos normalmente comprenden al menos una región en la que el oligonucleótido se modifica con el fin de presentar una o más propiedades deseadas. Las propiedades deseadas del oligonucleótido incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, elevada resistencia a la degradación por nucleasas, elevada captación celular y/o elevada afinidad de unión para el ácido nucleico diana. Las diferentes regiones del oligonucleótido pueden, por lo tanto, tener diferentes propiedades. Los oligonucleótidos quiméricos de la presente divulgación pueden formarse como estructuras mixtas de dos o más oligonucleótidos, oligonucleótidos modificados, oligonucleósidos y/o análogos de oligonucleótidos, 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. Los espaciadores pretenden constituir un "puente" covalente entre las regiones y tienen en aspectos preferidos una longitud que no supera aproximadamente 100 átomos de carbono. Los espaciadores pueden llevar diferentes funcionalidades, por ejemplo, tener carga positiva o negativa, llevar propiedades de unión a ácido nucleico especiales (intercaladores, ligantes de surcos, toxinas, fluoróforos, etc.), ser lipófilos, inducir estructuras secundarias especiales como, por ejemplo, péptidos que contienen alanina que inducen hélices alfa.

30

Como se usa en el presente documento, "genes antivíricos" y "gen antivírico" son inclusivos de todos los miembros de la familia, mutantes, alelos, fragmentos, especies, secuencias codificantes y no codificantes, hebras de polinucleótidos de sentido y antisentido, etc.

Como se usan en el presente documento, las palabras RIG1, RIG-1, RIG-1, proteína de caja DEAD 58, DKFZp434J1111, DKFZp686N19181, FLJ13599, proteína del gen 1 inducible por ácido retinoico, proteína del gen I inducible por ácido retinoico, se consideran iguales en la bibliografía y se usan de forma intercambiable en la presente solicitud.

Como se usan en el presente documento, las palabras MDA5, MDA-5, proteína 5 asociada a la diferenciación de melanoma, Helicard, Helicasa con 2 dominios CARD, Hlcd, IDDM19, proteína 1 que contiene dominio de helicasa C inducida por interferón, proteína 1 inducida por interferón con dominio de helicasa C, MGC133047, proteína regulada por descenso de Murabutida, RH116, proteína de la caja RNAhelicasa-DEAD 116, se consideran iguales en la bibliografía y se usan indistintamente en la presente solicitud.

45

Como se usan en el presente documento, las palabras IFNA1, IFNA11, G10P1, GARG-16, IFI56, IFI-56, IFI-56K, IFIT-1, proteína de 56 kDa inducida por interferón, proteína inducida por interferón con repeticiones 1 de tetratricopéptido, ISG56, RNM561, se consideran iguales en la bibliografía y se usan indistintamente en la presente solicitud.

50

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 porción del gen elegido como diana, o (ii) capaz de formar un dúplex estable con una porción de una transcripción de ARNm del gen elegido como diana. La estabilidad de los complejos y dúplex puede determinarse por cálculos teóricos y/o ensayos *in vitro*. Se describen ensayos ejemplares para determinar la estabilidad de complejos y dúplex de hibridación se describen en los Ejemplos a continuación.

Como se usa en el presente documento, la expresión "ácido nucleico diana" incluye ADN, ARN (que comprende preARNm y ARNm) transcrito a partir de tal ADN, y también ADNc derivado de tal ARN, secuencias codificantes, no

codificantes, polinucleótidos sentido o antisentido. La hibridación específica de un compuesto oligomérico con su ácido nucleico diana interfiere con la función normal del ácido nucleico. Esta modulación de la función de un ácido nucleico diana por compuestos, que hibridan específicamente con éste, se denomina generalmente "antisentido". Las funciones de ADN que van a interferirse incluyen, por ejemplo, la replicación y la transcripción. Las funciones de

5 ARN que van a interferirse incluyen todas las funciones vitales tales como, por ejemplo, translocalización del ARN al sitio de traducción de proteína, traducción de proteína desde ARN, corte y empalme 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 tal interferencia con la función del ácido nucleico diana es la modulación de la expresión de un producto codificado u oligonucleótidos.

10

La interferencia de ARN "iARN" está mediada por moléculas de ARN bicatenario (dsARN) que tienen homología específica de secuencia para sus secuencias de ácidos nucleicos "diana". En ciertos aspectos de la presente divulgación, los mediadores son dúplex de ARN "interferente pequeño" (siRNA) de 5-25 nucleótidos. Los siRNA se obtienen a partir del procesamiento de dsARN por una enzima RNasa conocida como Dicer. Los productos de

15 dúplex de siRNA son reclutados en un complejo de siRNA de multi-proteína llamado RISC (complejo de silenciamiento inducido por ARN). Sin desear quedar ligado a teoría alguna en particular, se cree entonces que un RISC es guiado a un ácido nucleico diana (adecuadamente ARNm), en el que el dúplex de siRNA interacciona en una forma específica de secuencia para mediar en la escisión en un modo catalítico. Los ARN interferentes pequeños que pueden usarse de acuerdo con la presente divulgación pueden sintetizarse y usarse según

20 procedimientos que son bien conocidos en la técnica y que serán familiares para el experto en la técnica. Los ARN interferentes pequeños para su uso en los métodos de la presente divulgación comprenden adecuadamente entre aproximadamente 1 y aproximadamente 50 nucleótidos (nt). En los ejemplos de aspectos no limitantes, los siRNA pueden comprender aproximadamente de 5 a aproximadamente 40 nt, aproximadamente de 5 a aproximadamente 30 nt, aproximadamente de 10 a aproximadamente 30 nt, aproximadamente de 15 a aproximadamente 25 nt, o

25 aproximadamente 20-25 nucleótidos.

La selección de oligonucleótidos apropiados se facilita usando programas informáticos que alinean automáticamente secuencias de ácidos nucleicos e indican regiones de identidad u homología. Tales programas se usan para

30 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 se han secuenciado, se realizan Southern blots para permitir una

35 determinación del grado de identidad entre genes en especies diana y otras especies. Realizando Southern blots a grados de astringencia variables, como se sabe bien en la técnica, es posible obtener una medida aproximada de la identidad. Estos procedimientos permiten la selección de oligonucleótidos que presentan un alto grado de complementariedad con secuencias de ácidos nucleicos diana en un sujeto que va a controlarse y un menor grado de complementariedad con secuencias de ácidos nucleicos correspondientes en otras especies. Un experto en la

40 técnica se dará cuenta de que hay libertad considerable en la selección de regiones apropiadas de genes para su uso en la presente divulgación.

40

Por "ARN enzimático" se entiende una molécula de ARN con actividad enzimática. Los ácidos nucleicos enzimáticos (ribozimas) actúan uniéndose primero a un ARN diana. Tal unión se produce mediante la porción de unión de diana de un ácido nucleico enzimático que se mantiene en estrecha proximidad a una porción enzimática de la molécula que actúa para escindir el ARN diana. Así, el ácido nucleico enzimático reconoce primero y después se une a ARN

45 diana mediante apareamiento de bases, y una vez unido al sitio correcto, actúa enzimáticamente para cortar el ARN diana.

Por "ARN señuelo" se entiende una molécula de ARN que imita el dominio de unión natural para un ligando. Por lo tanto, el ARN señuelo compite con la diana de unión natural para la unión de un ligando específico. Por ejemplo, se

50 ha mostrado que la sobreexpresión del ARN de respuesta de activación en trans del VIH (TAR) puede actuar de "señuelo" y se une eficazmente a la proteína tat del VIH, previniendo así que se una a secuencias de TAR codificadas en el ARN del VIH. Esto se entiende que es un ejemplo específico. Los expertos en la técnica reconocerán que esto es únicamente un ejemplo, y fácilmente pueden generarse otros aspectos usando técnicas generalmente conocidas en la técnica.

55

Como se usa en el presente documento, el término "monómeros" normalmente indica monómeros enlazados por enlaces fosfodiéster o análogos de los mismos para formar oligonucleótidos que varían en tamaño de algunas unidades monoméricas, por ejemplo, de aproximadamente 3-4, a aproximadamente varios cientos de unidades monoméricas. Los análogos de enlaces fosfodiéster incluyen: fosforotioato, fosforoditioato, metilfosfonatos,

fosforoselenoato, fosforamido y similares, como se describe más completamente a continuación.

El término "nucleótido" incluye nucleótidos que existen de forma natural, así como nucleótidos que no existen de forma natural. Debe ser evidente para el experto en la técnica que los diversos nucleótidos que se han considerado
5 previamente "que no existen de forma natural" se han encontrado posteriormente en la naturaleza. Por lo tanto, "nucleótidos" incluye no sólo las moléculas que contienen heterociclos de purina y pirimidina conocidas, sino también análogos y tautómeros heterocíclicos de las mismas. Los 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-
10 metilcitosina, 5-alquil (C3-C6)-citosina, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, pseudoisocitosina, 2-hidroxi-5-metil-4-triazolopiridina, isocitosina, isoguanina, inosina y los nucleótidos "que no existen de forma natural" descritos en la Pat. de Estados Unidos n.º 5.432.272. El término "nucleótido" pretende incluir todos y cada uno de estos ejemplos, así como análogos y tautómeros de los mismos. Los nucleótidos especialmente interesantes son aquellos que contienen adenina, guanina, timina, citosina y uracilo, que se consideran como los nucleótidos que existen de forma
15 natural en relación con la aplicación terapéutica y diagnóstica en seres humanos. Los nucleótidos incluyen los azúcares naturales 2'-desoxi y 2'-hidroxilo, por ejemplo, como se describe en Komberg y Baker, DNA Replication, 2ª Ed. (Freeman, San Francisco, 1992), así como sus análogos.

"Análogos", en referencia a nucleótidos, incluye nucleótidos sintéticos que tienen restos de bases modificados y/o
20 restos de azúcar modificados. Tales análogos incluyen nucleótidos sintéticos diseñados para potenciar propiedades de unión, por ejemplo, la estabilidad del dúplex o tríplex, especificidad, o similares.

Como se usa en el presente documento, "hibridación" se refiere al apareamiento de hebras sustancialmente complementarias de compuestos oligoméricos. Un mecanismo de apareamiento implica el enlace de hidrógeno, que
25 puede ser enlace de hidrógeno de Watson-Crick, Hoögsteen o de Hoögsteen inverso, entre bases de nucleósidos o de nucleótidos (nucleótidos) complementarias de las hebras de compuestos oligoméricos. Por ejemplo, la adenina y la timina son nucleótidos complementarios que se aparean mediante la formación de enlaces de hidrógeno. La hibridación puede producirse bajo circunstancias variables.

Un compuesto antisentido es "específicamente hibridable" cuando la unión del compuesto al ácido nucleico diana interfiere con la función normal del ácido nucleico diana para producir una modulación de la función y/o actividad, y hay un grado suficiente de complementariedad para evitar la unión no específica del compuesto antisentido a
30 secuencias de ácidos nucleicos no diana en condiciones en las que se desea la unión específica, es decir, en condiciones fisiológicas en el caso de ensayos *in vivo* o tratamiento terapéutico, y en condiciones en las que se realizan los ensayos en el caso de ensayos *in vitro*.
35

Como se usa en el presente documento, la expresión "condiciones de hibridación rigurosas" o "condiciones rigurosas" se refiere a condiciones bajo las que un compuesto de la divulgación hibridará con su secuencia diana, pero con un número mínimo de otras secuencias. Las condiciones rigurosas son dependientes de la secuencia y
40 serán diferentes en diferentes circunstancias y en el contexto de esta divulgación, las "condiciones rigurosas" en las que hibridan los compuestos oligoméricos con una secuencia diana se determinan por la naturaleza y composición de los compuestos oligoméricos y los ensayos en los que se están investigando. En general, las condiciones de hibridación rigurosas comprenden bajas concentraciones (<0,15 M) de sales con cationes inorgánicas 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
45 compuesto oligomérico:secuencia diana, y la presencia de desnaturizantes tales como formamida, dimetilformamida, sulfóxido de dimetilo, o el detergente dodecilsulfato sódico (SDS). Por ejemplo, la velocidad de hibridación disminuye un 1,1 % por cada 1 % de formamida. Un ejemplo de una condición de hibridación de alta stringencia es 0,1 x tampón cloruro sódico-citrato sódico (SSC)/SDS al 0,1% (peso/volumen) a 60 °C durante 30 minutos.
50

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

complementariedad sobre un número suficiente de nucleótidos de forma que se produzca la unión estable específica entre el compuesto oligomérico y un ácido nucleico diana.

Se entiende en la técnica que la secuencia de un compuesto oligomérico no necesita ser complementaria al 100 % a la de su ácido nucleico diana para ser específicamente hibridable. Además, un oligonucleótido puede hibridarse sobre uno o más segmentos de forma que segmentos intermedios o adyacentes no participen en el acontecimiento de hibridación (por ejemplo, una estructura de bucle, desapareamiento o estructura de horquilla). Los compuestos oligoméricos de la presente divulgación comprenden al menos aproximadamente el 70 %, o al menos aproximadamente el 75 %, o al menos aproximadamente el 80 %, o al menos aproximadamente el 85 %, o al menos aproximadamente el 90 %, o al menos aproximadamente el 95 %, o al menos aproximadamente el 99 %, de complementariedad de secuencia con una región diana dentro de la secuencia de ácidos nucleicos diana a la que se dirigen. Por ejemplo, un compuesto antisentido en el que 18 de los 20 nucleótidos del compuesto antisentido son complementarios a una región diana, y, por 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. Como tal, un compuesto antisentido que tiene 18 nucleótidos de longitud que tiene 4 (cuatro) nucleótidos no complementarios que están flanqueados por dos regiones de complementariedad completa con el ácido nucleico diana tendría el 77,8 % de complementariedad global con el ácido nucleico diana y así entraría dentro del alcance de la presente divulgación. El porcentaje de complementariedad de un compuesto antisentido con una región de un ácido nucleico diana puede determinarse rutinariamente usando programas BLAST (herramientas de búsqueda de alineamientos locales básicos) y programas PowerBLAST conocidos en la técnica. El porcentaje de homología, la identidad de secuencias o la complementariedad pueden determinarse, por ejemplo, mediante 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).

Como se usa en el presente documento, la expresión "punto de fusión térmico (T_m)" se refiere a la temperatura, bajo fuerza iónica definida, pH y concentración de ácido nucleico, a la que el 50 % de los oligonucleótidos complementarios a la secuencia diana hibridan con la secuencia diana en equilibrio. Normalmente, condiciones rigurosas serán aquellas en las que la concentración de sales es la concentración de ión 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 rigurosas con la adición de agentes desestabilizantes, tales como formamida.

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

El término "variante", cuando se usa en el contexto de una secuencia de polinucleótidos, puede englobar incluir una secuencia de polinucleótidos relacionada con un gen no mutante. Esta definición también puede incluir, por ejemplo, variantes "alélicas", de "corte y empalme", de "especie" o "polimórficas". Una variante de corte y empalme puede tener identidad significativa con una molécula de referencia, pero generalmente tendrá un mayor o menor número de polinucleótidos debido al corte y empalme alterativo 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 no mutantes de tipo silvestre. 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. Los cambios mutacionales comunes que dan lugar a variantes se atribuyen generalmente a deleciones, adiciones o sustituciones naturales de nucleótidos. Cada uno de estos tipos de cambios puede producirse solo, o en combinación con los otros, una o más veces en una secuencia dada.

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 incluir "polimorfismos de un único nucleótido" (SNP), o mutaciones de una única base en las que la secuencia de polinucleótidos varía una base. La presencia de SNP puede ser indicativa de, por ejemplo, una cierta población con una propensión por una patología, que es susceptibilidad frente a resistencia.

Los polinucleótidos derivados incluyen ácidos nucleicos sometidos a modificación química, por ejemplo, sustitución

de hidrógeno por un grupo alquilo, acilo o amino. Los derivados, por ejemplo, oligonucleótidos derivados, pueden comprender porciones que no existen de forma natural, tales como restos de azúcar alterados o enlaces interazúcar. 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, 5 agentes fluorescentes, agentes quimioluminiscentes, agentes cromogénicos, sustratos, cofactores, inhibidores, partículas magnéticas y similares.

Un polipéptido o péptido "derivado" es uno que se modifica, por ejemplo, por glicosilación, pegilación, fosforilación, sulfatación, reducción/alquilación, acilación, acoplamiento químico o tratamiento suave con formalina. Un derivado 10 también puede modificarse para contener una etiqueta detectable, tanto directa como indirectamente, incluyendo, pero sin limitación, un radioisótopo, etiqueta fluorescente y enzimática.

Como se usa en el presente documento, el término "animal" o "paciente" pretende incluir, por ejemplo, seres humanos, ovejas, alces, venados, ciervos mulos, visones, mamíferos, monos, caballos, ganado vacuno, cerdos, 15 cabras, perros, gatos, ratas, ratones, aves, pollo, reptiles, peces, insectos y arácnidos.

"Mamífero" incluye mamíferos de sangre caliente que normalmente están bajo cuidado médico (por ejemplo, seres humanos y animales domesticados). Los ejemplos incluyen felinos, caninos, equinos, bovinos y humanos, así como únicamente humanos. 20

"Tratar" o "tratamiento" incluye el tratamiento de una patología en un mamífero, e incluye: (a) prevenir que se produzca la patología en un mamífero, en particular, cuando tal mamífero tiene predisposición a la patología, pero todavía no se ha diagnosticado que la tenga; (b) inhibir la patología, por ejemplo, detener el desarrollo; y/o (c) aliviar la patología, por ejemplo, causando la regresión de la patología hasta que se alcance un criterio de valoración 25 deseado. Tratar también incluye la mejora de un síntoma de una enfermedad (por ejemplo, reducir el dolor o molestia), en el que tal mejora puede o no afectar directamente a la enfermedad (por ejemplo, causa, transmisión, expresión, etc.).

Como se usa en el presente documento, el término "cáncer" se refiere a todos los tipos de cáncer o neoplasia o 30 tumores malignos que se encuentran en mamíferos, incluyendo, pero sin limitación: 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, pero sin limitación: fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, 35 leiomiomasarcoma, rhabdomiomasarcoma, 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 40 uterino, tumor testicular, carcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón de células pequeñas, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma y retinoblastoma. Los cánceres adicionales que pueden tratarse por la composición desvelada de acuerdo con la divulgación incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, linfoma no Hodgkin, mieloma múltiple, neuroblastoma, cáncer de mama, cáncer de 45 ovario, cáncer de pulmón, rhabdomiomasarcoma, trombocitosis primaria, tumores de pulmón de células pequeñas de macroglobulinemia primaria, tumores cerebrales primarios, cáncer de estómago, cáncer de colon, insulanoma pancreático maligno, carcinoide maligno, cáncer de vejiga urinaria, lesiones cutáneas premalignas, cáncer testicular, linfomas, cáncer de tiroides, neuroblastoma, cáncer del esófago, cáncer de tracto genitourinario, hipercalcemia maligna, cáncer del cuello uterino, cáncer endometrial, cáncer cortical adrenal y cáncer de próstata. 50

"Enfermedad o trastorno neurológico" se refiere a cualquier enfermedad o trastorno del sistema nervioso y/o del sistema visual. "Enfermedad o trastorno neurológico" incluye una enfermedad o trastornos que implican al sistema nervioso central (cerebro, tronco encefálico y cerebelo), el sistema nervioso periférico (incluyendo nervios craneales), y el sistema nervioso autónomo (partes del cual están situadas tanto en el sistema nervioso central como 55 el periférico). Los ejemplos de trastornos neurológicos incluyen, pero sin limitación, dolor de cabeza, 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, uniones musculares y neuromusculares. La enfermedad de adicción y metal, incluyen, pero sin limitación, trastorno bipolar y esquizofrenia, también se incluyen en la definición de trastorno neurológico. La siguiente es una

lista de varios trastornos neurológicos, síntomas, signos y síndromes que pueden tratarse usando composiciones y métodos de acuerdo con la presente divulgación: afasia epileptiforme adquirida; encefalomiелitis diseminada aguda; adrenoleucodistrofia; degeneración macular relacionada con la edad; agenesia del cuerpo calloso; agnosia; síndrome de Aicardi; enfermedad de Alexander; enfermedad de Alpers; hemiplejia alterna; demencia vascular;

5 esclerosis lateral amiotrófica; anencefalia; síndrome de Angelman; angiomatosis; anoxia; afasia; apraxia; quistes aracnoideos; aracnoiditis; malformación de Anronl-Chiari; malformación arteriovenosa; síndrome de Asperger; ataxia; telegiectasia; trastorno de hiperactividad por déficit de atención; autismo; disfunción autonómica; dolor de espalda; enfermedad de Batten; enfermedad de Behcet; parálisis de Bell; blefaroespasma esencial benigno; amiotrofia focal benigna; hipertensión intracraneal benigna; enfermedad de Binswanger; blefaroespasma; síndrome de Bloch

10 Sulzberger; lesión del plexo braquial; absceso del cerebro; lesión cerebral; tumores cerebrales (incluyendo glioblastoma multiforme); tumor espinal; síndrome de Brown-Séquard; enfermedad de Canavan; síndrome del túnel carpiano; causalgia; síndrome de dolor central; mielinólisis central pontina; trastorno cefálico; aneurisma cerebral; arteriosclerosis cerebral; atrofia cerebral; gigantismo cerebral; parálisis cerebral; enfermedad de Charcot-Marie-Tooth; neuropatía inducida por la quimioterapia y dolor neuropático; malformación de Chiari; corea; polineuropatía

15 desmielinizante inflamatoria crónica; dolor crónico; síndrome de dolor regional crónico; síndrome de Coffin Lowry; coma, incluyendo estado vegetativo persistente; diplejia facial congénita; degeneración corticobasal; arteritis craneal; craneosinostosis; enfermedad de Creutzfeldt-Jakob; trastornos traumáticos acumulativos; síndrome de Cushing; enfermedad por cuerpos de inclusión citomegálica; infección por citomegalovirus; síndrome de ojos y pies bailarines; síndrome de Dandy-Walker; enfermedad de Dawson; síndrome de De Morsier; parálisis de Dejerine-Klumke;

20 demencia; dermatomiositis; neuropatía diabética; esclerosis difusa; disautonomía; disgrafía; dislexia; distonías; encefalopatía epiléptica infantil temprana; síndrome de silla turca vacía; encefalitis; encefalocelos; angiomatosis encefalotrigeminal; epilepsia; parálisis de Erb; temblor esencial; enfermedad de Fabry; síndrome de Fahr; desmayo; parálisis espástica familiar; convulsiones febriles; síndrome de Fisher; ataxia de Friedreich; demencia fronto-temporal y otras "tauopatías"; enfermedad de Gaucher; síndrome de Gerstmann; arteritis de células gigantes; enfermedad de

25 inclusión de células gigantes; leucodistrofia de células globoides; síndrome de Guillain-Barre; mielopatía asociada a HTLV-1; enfermedad de Hallervorden-Spatz; lesión en la cabeza; dolor de cabeza; espasmo hemifacial; paraplegia espástica hereditaria; hereditopatía atáctica polineuritiformis; herpes zoster ótico; herpes zoster; síndrome de Hirayama; demencia y neuropatía asociadas al VIH (también manifestaciones neurológicas del SIDA); holoprosencefalia; enfermedad de Huntington y otras enfermedades de repetición de poliglutamina; hidranencefalia;

30 hidrocefalia; hipercortisolismo; hipoxia; encefalomiелitis mediada inmune; miositis por cuerpos de inclusión; incontinencia pigmentaria; enfermedad por almacenamiento de ácido fitánico infantil; enfermedad de refsum infantil; espasmos infantiles; miopatía inflamatoria; quiste intracraneal; hipertensión intracraneal; síndrome de Joubert; síndrome de Keams-Sayre; enfermedad de Kennedy; síndrome de Kinsbourne; síndrome de Klippel Feil; enfermedad de Krabbe; enfermedad de Kugelberg-Welander; kuru; enfermedad de Lafora; síndrome miasténico de Lambert-Eaton; síndrome de Landau-Kleffner; síndrome medular lateral (Wallenberg); problemas de aprendizaje; enfermedad de Leigh; síndrome de Lennox-Gustaut; síndrome de Lesch-Nyhan; leucodistrofia; demencia de cuerpos de Lewy; Lisencefalia; síndrome de enclaustramiento: enfermedad de Lou Gehrig (es decir, enfermedad de neuronas motoras o esclerosis lateral amiotrófica); enfermedad lumbar del disco; secuelas neurológicas de la enfermedad de Lyme; enfermedad de Machado-Joseph; macrencefalia; megalencefalia; síndrome de Melkersson-Rosenthal; enfermedad de Menieres; meningitis; enfermedad de Menkes; leucodistrofia metacromática; microcefalia; migraña; síndrome de Miller Fisher; mini-apoplejías; miopatías mitocondriales; síndrome de Mobius; amiotrofia monomélica; enfermedad de neuronas motoras; enfermedad de Moyamoya; mucopolisacaridosis; demencia por multi-infarto; neuropatía motora multifocal; esclerosis múltiple y otros trastornos desmielinizantes; atrofia del sistema múltiple con hipotensión postural; distrofia muscular; miastenia gravis; esclerosis mielinoelástica difusa; encefalopatía mioelástica de lactantes;

45 mioclonía; miopatía; miotonía congénita; narcolepsia; neurofibromatosis; síndrome neuroléptico maligno; manifestaciones neurológicas del SIDA; secuelas neurológicas del lupus; neuromiotonía; lipofuscinosis neuronal cerioidea; trastornos de migración neuronal; enfermedad de Niemann-Pick; síndrome de O'Sullivan-McLeod; neuralgia occipital; secuencia de disrafismo espinal oculto; síndrome de Ohtahara; atrofia olivopontocerebelar; opsoclonos mioclonos; neuritis óptica; hipotensión otostática; síndrome de uso excesivo; parestesia; enfermedad o

50 trastorno neurodegenerativo (enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica (ALS), demencia, esclerosis múltiple y otras enfermedades y trastornos asociados a la muerte de las células neuronales); paramiotonía congénita; enfermedades paraneoplásicas; ataques paroxísticos; síndrome de Pary Romberg; enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher; parálisis periódicas; neuropatía periférica; neuropatía dolorosa y dolor neuropático; estado vegetativo persistente; trastornos generalizados del desarrollo;

55 reflejo del estornudo fótico; enfermedad por almacenamiento de ácido fitánico; enfermedad de Pick; nervio pellizcado; tumores pituitarios; polimiositis; pencefalia; síndrome post-polio; neuralgia posherpética; encefalomiелitis postinfecciosa; hipotensión postural; síndrome de Prader-Willi; esclerosis lateral primaria; enfermedades por priones; atrofia hemifacial progresiva; leucoencefalopatía multifocal progresiva; polidistrofia esclerosante progresiva; parálisis supranuclear progresiva; pseudotumor cerebral; síndrome de Ramsay-Hunt (tipos I

y II); encefalitis de Rasmussen; síndrome de distrofia simpática refleja; enfermedad de Refsum; trastornos de movimiento repetitivo; 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 sacudido; culebrilla; síndrome de Shy-Drager; 5 síndrome de Sjogren; apnea del sueño; síndrome de Soto; espasticidad; espina bífida; lesión de la médula espinal; tumores de la médula espinal; atrofia muscular espinal; síndrome de la persona rígida; ictus; síndrome de Sturge-Weber; panencefalitis esclerosante subaguda; encefalopatía aterosclerótica subcortical; corea de Sydenham; síncope; siringomielia; discinesia tardía; enfermedad de Tay-Sachs; arteritis temporal; síndrome de la médula espinal anclada; enfermedad de Thomsen; síndrome del opérculo torácico; neuralgia del trigémino; parálisis de Todd; 10 síndrome de Tourette; ataque isquémico transitorio; encefalopatías espongiiformes transmisibles; mielitis transversal; lesión cerebral traumática; temblor; neuralgia trigeminal; paraparesia espástica tropical; esclerosis tuberosa; demencia vascular (demencia multi-infarto); 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.

15

Una "inflamación" se refiere a afecciones y inflamatorias sistémicas y afecciones asociadas a la migración y atracción de monocitos, leucocitos y/o neutrófilos. Los ejemplos de inflamación incluyen, pero sin limitación, inflamación resultante de infección con organismos patógenos (incluyendo bacterias gram-positivas, bacterias gram-negativas, virus, hongos y parásitos, tales como protozoos y helmintos), rechazo al trasplante (incluyendo rechazo 20 de órganos sólidos, tales como riñón, hígado, corazón, pulmón o cornea, así como rechazo de trasplantes médula ósea incluyendo enfermedad de injerto contra huésped (GVHD)), o de reacciones autoinmunes o alérgicas crónicas o agudas localizadas. Las enfermedades autoinmunes incluyen glomerulonefritis aguda; artritis reumatoide o reactiva; glomerulonefritis crónica; enfermedades inflamatorias del intestino, tales como enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y enterocolitis necrotizante; síndromes asociados a la transfusión de granulocitos; dermatosis inflamatoria, 25 tales como dermatitis por contacto, dermatitis atópica, psoriasis; lupus eritematoso sistémico (SLE), tiroiditis autoinmune, esclerosis múltiple, y algunas formas de diabetes, o cualquier otro estado autoinmune en el que el ataque por el sistema inmune del propio sujeto dé como resultado una destrucción tisular patológica. Las reacciones alérgicas incluyen asma alérgica, bronquitis crónica, hipersensibilidad aguda y retardada. Las patologías inflamatorias sistémicas incluyen inflamación asociada a trauma, quemaduras, reperfusión tras eventos isquémicos 30 (por ejemplo, eventos tromboticos en corazón, cerebro, intestinos o vasculatura periférica, incluyendo infarto de miocardio e ictus), sepsis, ARDS o síndrome de disfunción orgánica múltiple. El reclutamiento de células inflamatorias también se produce en las placas ateroscleróticas. La inflamación incluye, pero sin limitación, linfoma no Hodgkin, granulomatosis de Wegener, tiroiditis de Hashimoto, carcinoma hepatocelular, atrofia del timo, pancreatitis crónicas, artritis reumatoide, hiperplasia linfoide reactiva, osteoartritis, colitis ulcerosa, carcinoma papilar, 35 enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, colecistitis aguda, colecistitis crónica, cirrosis, sialadenitis crónica, peritonitis, pancreatitis aguda, pancreatitis crónica, Gastritis crónica, adenomiosis, endometriosis, cervicitis aguda, cervicitis crónica, hiperplasia linfoide, esclerosis múltiple, hipertrofia secundaria a púrpura trombocitopénica idiopática, nefropatía IgA primaria, lupus eritematoso sistémico, psoriasis, enfisema pulmonar, pielonefritis crónica, y cistitis crónica.

40

Una enfermedad o trastorno cardiovascular incluye aquellos trastornos que pueden causar isquemia o están causados por reperfusión del corazón. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, aterosclerosis, enfermedad arterial coronaria, miocarditis granulomatosa, miocarditis crónica (no granulomatosa), cardiomiopatía hipertrófica primaria, enfermedad arterial periférica (PAD), ictus, angina de pecho, infarto de miocardio, daño del tejido cardiovascular 45 causado por parada cardiaca, daño del tejido cardiovascular causado por derivación coronaria, choque cargiogénico, y afecciones relacionadas que se conocerán por los expertos en la técnica o que implicarán una disfunción de o daño tisular al corazón o la vasculatura, especialmente, pero sin limitación, daño tisular relacionado con una activación de un gen antivírico. Las enfermedades del sistema cardiovascular incluyen, pero sin limitación, aterosclerosis, miocarditis granulomatosa, infarto de miocardio, fibrosis del miocardio secundaria a enfermedad 50 cardiaca valvular, fibrosis del miocardio sin infarto, cardiomiopatía hipertrófica primaria, y miocarditis crónica (no granulomatosa).

Los ejemplos de virus que causan enfermedades del paciente comprenden: virus del herpes, tales como, por ejemplo, alfa-herpesvirus (por ejemplo, virus simple del herpes 1 (VHS-1), virus simple del herpes 2 (VHS-2), virus 55 Varicela-Zóster (VVZ), beta-Herpesvirus (por ejemplo, Citomegalovirus (CMV), virus del Herpes 6 (HHV-6)), Gamma-herpesvirus (por ejemplo, virus de Epstein-Barr (VEB), virus del Herpes 8 (HHV-8), virus de la hepatitis (por ejemplo, virus de la hepatitis A; virus de la hepatitis B; virus de la hepatitis C; virus de la hepatitis D; virus de la hepatitis E), retrovirus (por ejemplo, virus de la inmunodeficiencia humana 1 (VIH-1)), ortomixovirus (por ejemplo, virus de la gripe A, B y C), paramixovirus, virus respiratorio sincitial (VRS), virus de Parainfluenza (PI) (por ejemplo, virus de la

parotiditis, virus del sarampión), Togavirus (por ejemplo, virus de la rubéola), Picornavirus (por ejemplo, Enterovirus, Rinovirus, Coronavirus), Papovavirus (por ejemplo, Virus del Papiloma Humano (VPH); Poliomavirus (BKV y 1CV); virus de la gastroenteritis), Filoviridae, Bunyaviridae, Rhabdoviridae, Flaviviridae.

- 5 Los ejemplos de bacterias que causan enfermedades bacterianas comprenden: *Staphylococcus aureus*: las cepas incluyen las resistentes a la meticilina (MRSA), las resistentes a la meticilina-vancomicina (VMRSA) y las resistentes a la vancomicina intermedia (VISA); *Staphylococcus epidermidis*; *Enterococcus faecalis* y *E. faecium*: las cepas incluyen las resistentes a vancomicina (VRE); *Streptococcus pneumoniae*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Burkholderia cepacia*; *Xanthomonas maltophilia*; *Escherichia coli*; *Enterobacter* spp.; *Klebsiella pneumoniae*; *Salmonella* spp.

10

Composiciones y moléculas de polinucleótidos y oligonucleótidos

Dianas

- 15 En un aspecto, las dianas comprenden secuencias de ácido nucleico de un gen antivírico, incluyendo, sin limitación, secuencias no codificantes y/o codificantes sentido y/o antisentido asociadas al gen antivírico.

En un aspecto, las dianas comprenden secuencias de ácido nucleico de RIG1, incluyendo, sin limitación, secuencias no codificantes y/o codificantes sentido y/o antisentido asociadas al gen RIG1.

20

En un aspecto, las dianas comprenden secuencias de ácido nucleico de MDA5, incluyendo, sin limitación, secuencias no codificantes y/o codificantes sentido y/o antisentido asociadas al gen MDA5.

- En un aspecto, las dianas comprenden secuencias de ácido nucleico de IFNA1, incluyendo, sin limitación, secuencias no codificantes y/o codificantes sentido y/o antisentido asociadas al gen IFNA1.

25

El producto del gen I inducible por ácido retinoico (RIG-I) se ha identificado como un sensor celular de la infección del virus de ARN que da como resultado la inducción del interferón beta (IFN-B). Sin embargo, se sabe que muchos virus codifican productos víricos que inhiben la producción de IFN-B. En el caso del virus de la influenza A, la proteína no estructural 1 vírica (NS1) evita la inducción del promotor de IFN-B inhibiendo la activación de los factores de transcripción, incluyendo IRF-3, implicados en la activación transcripcional de IFN-B. Las propiedades inhibitorias de NS1 parecen ser debidas, al menos en parte, a su unión al ARN bicatenario (dsRNA), dando como resultado el secuestro de este mediador vírico de la activación de RIG-I.

30

- 35 El gen I inducible por ácido retinoico (RIG-I) y el gen 5 asociado a la diferenciación del melanoma (MDA5) son helicasas citoplasmáticas de caja DEX(D/H) que pueden detectar productos víricos intracelulares tales como ARN genómico (ARNv) para señalar la producción de IFN- β en células infectadas. La señalización por cada uno se produce a través de las interacciones del dominio de activación de la caspasa homotípica y de reclutamiento (CARD) con la proteína adaptadora del factor estimulador del promotor de interferón 1 (IPS-1), que recluta RIG-I y MDA5 con respecto a la membrana externa de la mitocondria como parte de un complejo de señalización macromolecular que sirve para activar los factores reguladores de interferón (IRF) aguas abajo y otros factores de transcripción que inducen la expresión de IFN- β e ISG. Aunque RIG-I y MDA5 pueden compartir similares características de señalización y homología estructural, la acumulación de pruebas sugiere que las dos helicasas pueden discriminar entre diferentes ligandos para activar la respuesta inmune innata a los virus de ARN. La señalización por RIG-I se activa durante la infección por una serie de virus de ARN y por la presencia de ARN sintético transcrito *in vitro*. Más recientemente, RIG-I se ha visto implicado en el reconocimiento de restos de ARN que albergan extremos de trifosfato 5' o de ARN que asumen estructuras secundarias complejas. Por el contrario, la señalización por MDA5 se activa de manera única durante las infecciones por picornavirus o en presencia de un polímero de ARN sintético que consiste en hebras de hibridación de inosina y citosina, poli(I:C).

50

Las células de melanoma humano pueden reprogramarse para diferenciarse terminalmente y perder irreversiblemente la capacidad proliferativa mediante una manipulación farmacológica apropiada. La hibridación de sustracción identificó el gen 5 asociado a la diferenciación del melanoma (mda-5) como un gen inducido durante la diferenciación, la reversión del cáncer y la muerte celular programada (apoptosis). Este gen contiene tanto un dominio de reclutamiento de caspasa como dominios putativos de ARN helicasa del grupo DEXH. Los motivos helicasa atípicos de DMDA-5 se desvían de secuencias de consenso pero están bien conservados en un grupo potencialmente nuevo de proteínas clonadas e hipotéticas. Mda-5 es un gen de respuesta temprana inducible por IFN y factor de necrosis tumoral- α , que responde predominantemente a IFN- β . La activación de proteína cinasa C por mezereína aumenta adicionalmente la expresión de mda-5 inducida por IFN- β . La expresión de mda-5 está

55

controlada transcripcionalmente por IFN- α , y la proteína MDA-5 se localiza en el citoplasma. Mda-5 muestra actividad ATPasa dependiente de ARN, y la expresión ectópica de mda5 en células de melanoma humano inhibe la formación de colonias. En estos contextos, mda-5 puede funcionar como un mediador de la inhibición del crecimiento inducido por IFN y/o la apoptosis. MDA-5 es una ATPasa dependiente de ARN bicatenario que contiene tanto un dominio de reclutamiento de caspasa como motivos de ARN helicasa, con una asociación confirmada con el crecimiento y la diferenciación en células de melanoma humano.

Se ha avanzado en la comprensión de las bases moleculares de las acciones antivíricas de los interferones (IFN), así como en las estrategias desarrolladas por los virus para antagonizar las acciones de los IFN. Además, los avances logrados en la elucidación del sistema de IFN han contribuido significativamente a la comprensión en múltiples áreas de virología y biología de células moleculares, desde las rutas de transducción de señal hasta los mecanismos bioquímicos de control transcripcional y traslacional a las bases moleculares de la patogénesis vírica. Los IFN son terapias aprobadas y han pasado del laboratorio de investigación básico a la clínica. Entre las proteínas inducidas por IFN importantes en las acciones antivíricas de los IFN se encuentran la proteína cinasa dependiente de ARN (PKR), la 2',5'-oligoadenilato sintetasa (OAS) y la RNasa L, y las GTPasas de proteína Mx. El ARN bicatenario desempeña un papel fundamental en la modulación de la fosforilación de proteínas y la degradación del ARN catalizada por la PKR cinasa inducible por IFN y la RNasa L dependiente de 2'-5'-oligoadenilato, respectivamente, y también en la edición de ARN por la adenosina desaminasa específica de ARN (ADAR1) inducible por IFN. IFN induce también una forma de óxido nítrico sintasa inducible (iNOS2) y las principales proteínas de complejo de histocompatibilidad de clase I y II, todas las cuales desempeñan un papel importante en la respuesta inmunitaria a las infecciones. Se han identificado varios genes adicionales cuyos perfiles de expresión se alteran en respuesta al tratamiento con IFN y la infección por virus mediante análisis de micromatrices. La disponibilidad de cDNA y clones genómicos para muchos de los componentes del sistema de IFN, incluyendo IFN- α , IFN- β e IFN- γ , sus receptores, Jak y Stat y componentes de transducción de señal IRF, y proteínas tales como PKR, 2,5'-OAS, Mx y ADAR, cuya expresión está regulada por IFN, ha permitido la generación de proteínas mutantes, células que sobreexpresan diferentes formas de las proteínas, y animales en los que su expresión se ha interrumpido por la alteración de genes dirigidos. El uso de estos reactivos del sistema de IFN, tanto en cultivo celular como en animales enteros, sigue aportando importantes contribuciones a la comprensión de la interacción virus-huésped y la respuesta antivírica celular.

Los interferones (IFN) están implicados en numerosas interacciones inmunes durante las infecciones víricas y contribuyen tanto a la inducción como a la regulación de mecanismos antivíricos innatos y adaptativos. Los IFN desempeñan un papel fundamental en el resultado de una infección vírica, como se demuestra por la resistencia deteriorada contra diferentes virus en ratones deficientes para los receptores IFNAR-2 e IFNGR. Durante las infecciones víricas, los IFN están implicados en numerosas interacciones inmunes como inductores, reguladores y efectores tanto de mecanismos antivíricos innatos como adaptativos. El IFN- α /beta se produce rápidamente cuando los factores víricos, tales como las glicoproteínas de la envoltura, ADN de CpG o el dsRNA, interactúan con receptores de reconocimiento de patrones celulares (PRR), tales como receptores de manosa, receptores de tipo toll (TLR) y receptores citosólicos. Estas interacciones huésped-virus señalan aguas abajo para activar los factores de transcripción necesarios para conseguir la expresión a partir de los genes IFN- α /beta. Estos incluyen el factor regulador de IFN 3 (IRF-3), IRF-5, IRF-7, c-Jun/ATF-2 y NF-kappaB.

Por el contrario, IFN- γ es inducido por la estimulación mediada por receptores o en respuesta a citocinas producidas tempranamente, incluyendo interleucina-2 (IL-12), IL-18 e IFN- α /beta, o por estimulación a través de receptores de linfocitos T (TCR) o receptores de células asesinas naturales (NK). Los IFN señalan a través de los receptores transmembrana, activando principalmente las rutas Jak-Stat, pero también otras rutas de transducción de señal. La expresión de IFN- γ inducida por citocinas y TCR usa distintas rutas de transducción de señal que implican tales factores de transcripción como NFAT, Stats y NF-kappaB. Esto da lugar a la inducción y activación de numerosos factores antivíricos intrínsecos, tales como la proteína cinasa activada por ARN (PKR), el sistema 2-5A, las proteínas Mx y varias rutas apoptóticas. Además, los IFN modulan distintos aspectos de la inmunidad tanto innata como adaptativa. Por lo tanto, IFN- α /beta e IFN- γ afectan a las actividades de los macrófagos, las células NK, las células dendríticas (CD) y los linfocitos T, mejorando la presentación de antígenos, el tráfico de células y la diferenciación celular y los perfiles de expresión, dando como resultado finalmente funciones efectoras antivíricas mejoradas.

En algunos aspectos, se usan oligonucleótidos antisentido para prevenir o tratar enfermedades o trastornos asociados a los miembros de la familia de un gen antivírico. Las enfermedades o trastornos mediados por un gen antivírico ejemplares que pueden tratarse con células/tejidos regenerados a partir de células madre obtenidas usando los compuestos antisentido comprenden: cáncer, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad, trastorno o

una afección causada por un agente infeccioso (por ejemplo, incluyendo virus, bacterias, hongos, protozoos, etc.), una enfermedad vírica, inflamación, artritis, psoriasis, una enfermedad o trastorno neurológico, una enfermedad o trastorno del sistema inmunitario, una enfermedad o trastorno autoinmune, una enfermedad de inmunodeficiencia, una alergia, psoriasis, enfermedades neurológicas, una enfermedad o trastorno renal, una enfermedad o trastorno cardiovascular, una enfermedad o trastorno muscular, aterosclerosis, diabetes, una enfermedad o trastorno hepático, y una enfermedad transmisible.

En otro aspecto, los oligonucleótidos antisentido modulan la expresión, cantidades *in vivo* y/o la función de un gen antivírico en pacientes que padecen o están en riesgo de desarrollar enfermedades o trastornos asociados a genes antivíricos.

En otro ejemplo, el metapneumovirus humano (HMPV) es un patógeno recientemente descubierto que causa una proporción significativa de infecciones respiratorias en bebés pequeños, ancianos y pacientes inmunocomprometidos. La modulación de la expresión y/o función de RIG-I modula la infección vírica mediante diversos mecanismos, incluyendo, por ejemplo, la destrucción de la secuencia genómica vírica. Por lo tanto, los oligonucleótidos antisentido de RIG-I tendrán un gran valor terapéutico en el desarrollo de agentes antivíricos.

En un aspecto, la modulación del gen I inducible por ácido retinoico (RIG-I) detecta y destruye los genomas víricos. En otro aspecto, la modulación del gen I inducible por ácido retinoico (RIG-I) previene o trata contra las infecciones víricas en pacientes.

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

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

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

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

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

Un compuesto antisentido es específicamente hibridable cuando la unión del compuesto al ácido nucleico diana interfiere con la función normal del ácido nucleico diana para producir una pérdida de actividad, y hay un grado de complementariedad suficiente para evitar la unión no específica del compuesto antisentido a secuencias de ácidos nucleicos no diana en condiciones en las que se desea la unión específica. Tales 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, tanto ADN, ARN, quimérico, sustituido, etc., es específicamente hibridable cuando la

unión del compuesto a la molécula de ADN o de ARN diana interfiere con 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 no específica 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, el direccionamiento de un gen antivírico que incluye, sin limitación, secuencias antisentido que se identifican y se expanden, usando por ejemplo, PCR, hibridación etc., una o más de las secuencias expuestas como SEQ ID NO: 4 a 9, y similares, modulan la expresión o función de un gen antivírico. En un aspecto, la expresión o función está regulada por aumento en comparación con un control. En otro aspecto, la expresión o función se regula por disminución en comparación con un control.

En otro aspecto, los oligonucleótidos comprenden secuencias de ácidos nucleicos expuestas como SEQ ID NO: 10 a 30 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, 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 que se han indicado anteriormente, y su incorporación en nucleótidos, nucleótidos modificados y oligonucleótidos, también se conoce *per se* y no necesita describirse aquí.

La especificidad y sensibilidad de antisentido también se emplea por aquellos expertos en la técnica para usos terapéuticos. Se han empleado oligonucleótidos antisentido como restos terapéuticos en el tratamiento de patologías en animales y el hombre. Los oligonucleótidos antisentido se han administrado con seguridad y eficazmente a seres humanos, y están actualmente en marcha numerosos ensayos clínicos. Por lo tanto, se establece que los oligonucleótidos pueden ser modalidades terapéuticas útiles que pueden configurarse para ser útiles en pautas 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 que van a interferirse comprenden, por ejemplo, replicación y transcripción. Las funciones de ARN que van a interferirse comprenden todas las funciones vitales, tales como, por ejemplo, translocalización del ARN al sitio de traducción de proteína, traducción de proteína desde ARN, corte y empalme del ARN para producir una o más especies de ARNm, y actividad catalítica que puede acoplarse en o facilitarse por el ARN. Las funciones pueden regularse por aumento 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 corte y empalme alternativos, cebadores, sondas, y otros compuestos oligoméricos que hibridan con al menos una porción del ácido nucleico diana. Como tales, estos compuestos pueden introducirse en forma de compuestos oligoméricos monocatenarios, bicatenarios, parcialmente monocatenarios, o circulares.

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

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 porción del ácido nucleico diana que tiene al menos una estructura, función o característica identificable. Dentro de las regiones de ácidos nucleicos diana se encuentran los segmentos. Los "segmentos" se definen como porciones más pequeñas o sub-porciones de regiones dentro de un ácido nucleico diana. "Sitios", como se usa en la presente divulgación, se definen como posiciones dentro de un ácido nucleico diana.

En un aspecto, los oligonucleótidos antisentido se unen a las secuencias antisentido naturales de un gen antivírico y modulan la expresión y/o función de un gen antivírico (SEQ ID NO: 1 a 3). Los ejemplos de secuencias antisentido incluyen SEQ ID NOS: 4 a 30.

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

10 En otro aspecto, los oligonucleótidos antisentido son específicos para una secuencia antisentido natural de un gen antivírico donde la unión de los oligonucleótidos a las secuencias antisentido naturales de un gen antivírico modula la expresión y/o función de un gen antivírico.

15 En otro aspecto, los compuestos de oligonucleótido comprenden secuencias expuestas como SEQ ID NO: 10 a 30, 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, 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, 20 alcanofosfato, fosforotioato y similares. La preparación de los análogos de fosfato que se han indicado anteriormente, y su incorporación en nucleótidos, nucleótidos modificados y oligonucleótidos, también se conoce *per se* y no necesita describirse aquí.

25 Ya que, como se conoce en la técnica, el codón de inicio de la traducción normalmente es 5'-AUG (en moléculas de ARNm transcrito; 5'-ATG en la molécula de ADN correspondiente), el codón de inicio de la traducción también se denomina el "codón AUG", el "codón de inicio" o el "codón de inicio AUG". Una minoría de genes tiene un codón de inicio de la traducción que tiene la secuencia de ARN 5'-GUG, 5'-UUG o 5'-CUG; y se ha mostrado que 5'-AUA, 5'-ACG y 5'-CUG funcionan *in vivo*. Por lo tanto, las expresiones "codón de inicio de la traducción" y "codón de inicio" pueden incluir 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 30 más codones de inicio alternativos, uno cualquiera de los cuales puede utilizarse preferiblemente para el inicio de la traducción en un tipo particular de célula o tejido, o bajo un conjunto particular de condiciones. En el contexto de la divulgación, "codón de inicio" y "codón de inicio 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 un gen antivírico, independientemente de la secuencia o secuencias de tales 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).

40 Las expresiones "región de codón de inicio" y "región de codón de inicio de la traducción" se refieren a una porción de tal ARNm o gen que incluye de aproximadamente 25 a aproximadamente 50 nucleótidos contiguos en cualquier dirección (es decir, 5' o 3') desde un codón de inicio de la traducción. De forma similar, las expresiones "región de codón de terminación" y "región de codón de terminación de la traducción" se refieren a una porción de un ARNm tal o gen que incluye 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 inicio" (o 45 "región de codón de inicio de la traducción") y la "región de codón de terminación" (o "región de codón de terminación de la traducción") son todas las regiones que pueden ser eficazmente dirigidas como diana con los compuestos antisentido de la presente divulgación.

50 El marco de lectura abierto (ORF) o "región codificante", que se conoce en la técnica para referirse a la región entre el codón de inicio 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 incluye el codón de inicio o de terminación de la traducción del marco de lectura abierto (ORF) de un gen.

55 Otra región diana incluye la región no traducida 5' (5'UTR), conocida en la técnica para referirse a la porción de un ARNm en la dirección 5' desde el codón de inicio de la traducción, y que incluye, por lo tanto, nucleótidos entre el sitio 5' cap y el codón de inicio de la traducción de un ARNm (o nucleótidos correspondientes en el gen). Aún otra región diana incluye la región no traducida 3' (3'UTR), conocida en la técnica para referirse a la porción 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 5' cap de un ARNm comprende un residuo de guanosina N7-metilado unido al residuo 5'-most del ARNm mediante un enlace trifosfato 5'-5'. La región 5' cap de un ARNm se considera que incluye la propia estructura 5' cap, así como los primeros 50 nucleótidos adyacentes al sitio cap. Otra región diana para la presente divulgación es la región 5' cap.

Aunque algunas transcripciones ARNm eucariotas se traducen directamente, muchas contienen una o más regiones, conocidas como "intrones", que se escinden de una transcripción antes de que se traduzca. Las regiones restantes (y, por lo tanto, traducidas) se conocen como "exones" y se cortan y empalman juntas para formar una secuencia de ARNm continua. En un caso, el direccionamiento de sitios de corte y empalme, es decir, empalmes intrón-exón o empalmes exón-intrón, es particularmente útil en situaciones en las que el corte y empalme aberrante participa en la enfermedad, o donde una producción en exceso de un producto de corte y empalme particular participa en la enfermedad. Un empalme de fusión aberrante debido a la transposición o delección es otro aspecto de un sitio diana. Las transcripciones de ARNm producidas mediante el proceso de corte y empalme de dos (o más) ARNm de diferentes fuentes de genes se conocen como "transcripciones de fusión". Los intrones pueden direccionarse eficazmente usando compuestos antisentido dirigidos a, por ejemplo, ADN o pre-ARNm.

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

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

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

Pueden producirse transcripciones de ARN alternativas a partir de la misma región genómica de ADN. Estas transcripciones alternativas se conocen generalmente como "variantes". Más específicamente, "variantes de pre-ARNm" son transcripciones producidas 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.

Tras la escisión de una o más regiones de exón o intrón, o porciones de las mismas durante el corte y empalme, las variantes de pre-ARNm producen "variantes de ARNm" más pequeñas. En consecuencia, 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 corte y empalme. Estas variantes de ARNm también se conocen como "variantes de corte y empalme alternativas". Si no se produce el corte y empalme 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 terminación. Los pre-ARNm y ARNm pueden poseer más de un codón de inicio o codón de terminación. Las variantes que se originan a partir de un pre-ARNm o ARNm que usan codones de inicio 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 terminación alternativa es la "variante de poli A", en la que las múltiples transcripciones producidas son resultado de la selección alternativa de una de las "señales de detención de poliA" por la maquinaria de transcripción, produciendo así transcripciones 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 localizaciones en el ácido nucleico diana con las que los compuestos antisentido hibridan se definen como al menos una porción 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 ejemplares se exponen en el presente documento, un experto en la técnica reconocerá que éstas sirven para ilustrar y describir casos particulares dentro del alcance de la presente divulgación. Los segmentos diana adicionales son fácilmente identificables por un experto en la técnica en vista de la presente divulgación.

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

5 Los segmentos diana pueden incluir secuencias de ADN o ARN que comprenden al menos los 5 nucleótidos consecutivos desde el extremo 5' de uno de los segmentos diana ilustrativos (siendo los restantes nucleótidos un estiramiento consecutivo del mismo ADN o ARN que empieza inmediatamente aguas arriba del extremo 5 del segmento diana y que continúa hasta que el ADN o ARN contenga aproximadamente 5 a aproximadamente 100 nucleótidos). De forma similar, se representan segmentos diana por secuencias de ADN o ARN que comprenden al
 10 menos los 5 nucleótidos consecutivos desde el extremo 3' de uno de los segmentos diana ilustrativos (siendo los restantes nucleótidos un estiramiento consecutivo del mismo ADN o ARN que empieza inmediatamente aguas abajo del extremo 3' del segmento diana y que continúa hasta que el ADN o ARN contenga 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 adicionales.

15 Una vez se han identificado una o más regiones diana, segmentos o sitios, 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.

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

25 En un aspecto, los ácidos nucleicos específicos son direccionados los 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 ácido nucleico 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
 30 (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, transcripciones antisentido y otras unidades transcripcionales (TU) que contienen una alta densidad de codones de terminación y que carecen de cualquier
 35 extenso "marco de lectura abierto". Muchos ARNnc parecen empezar a partir de sitios de inicio en regiones no traducidas 3' (3'UTRs) de loci codificante de proteína. Los ARNnc son frecuentemente raros y al menos la mitad de los ARNnc que se han secuenciado por el consorcio FANTOM no parecen estar poliadenilados. La mayoría de los investigadores se han basado por motivos obvios en ARNm poliadenilados que se procesan y se exportan al citoplasma. Recientemente, se mostró que el conjunto de ARN nucleares no poliadenilados puede ser muy grande, y
 40 que muchos de tales transcripciones surgen de las llamadas regiones intergénicas. El mecanismo por el que los ARNnc pueden regular la expresión génica es por apareamiento de bases con transcritos diana. Los ARN que funcionan por apareamiento de bases pueden agruparse en (1) ARN codificados en cis que están codificados en la misma localización genética, pero en la hebra 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 localización
 45 cromosómica distinta de los ARN en los que actúan y generalmente no presentan potencial de apareamiento de bases perfecto con sus dianas.

Sin desear quedar ligado por la teoría, la perturbación de un polinucleótido antisentido por los oligonucleótidos antisentido descritos en el presente documento puede alterar la expresión de los ARN mensajero sentido
 50 correspondientes. Sin embargo, esta regulación puede ser discordante (la inactivación antisentido produce elevación de ARN mensajero) o concordante (la inactivación antisentido produce reducción concomitante de ARN mensajero). En estos casos, los oligonucleótidos antisentido pueden dirigirse a partes solapantes o no solapantes de la transcripción antisentido que producen su inactivación o secuestro. El antisentido codificante, así como no codificante, puede dirigirse de una manera idéntica y que cualquier categoría es capaz de regular las transcripciones
 55 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 transcripciones 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 de la transcripción antisentido eleva la expresión del gen convencional (sentido). Si este último debe codificar un fármaco diana conocido o supuesto, entonces la inactivación de su homólogo antisentido podría imitar posiblemente la acción de un agonista receptor o una enzima estimulante.

5

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

Según 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 porción del ácido nucleico diana y modulan su función. Como tales, 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 rutinariamente linealmente, pero pueden unirse o prepararse de otro modo para ser circulares y/o ramificados. Los compuestos antisentido pueden incluir construcciones tales como, por ejemplo, dos hebras hibridadas para formar un compuesto completa o parcialmente bicatenario o una única hebra con auto-complementariedad suficiente para permitir la hibridación y formación de un compuesto completa o parcialmente bicatenario. Las dos hebras pueden enlazarse internamente, dejando los extremos 3' o 5' libres, o pueden enlazarse para formar una estructura de horquilla continua o bucle. La estructura de horquilla puede contener un nucleótido protuberante en cualquiera de los extremos 5' o 3' que produce una extensión del carácter monocatenario. Los compuestos bicatenarios opcionalmente pueden incluir nucleótidos protuberantes en los extremos. Las modificaciones adicionales pueden incluir grupos conjugados unidos a uno de los extremos, posiciones de nucleótido seleccionadas, posiciones de azúcar o a uno de los enlaces internucleosídicos. Como alternativa, las dos hebras pueden enlazarse mediante un resto no de ácido nucleico o grupo conector. Cuando se forma a partir de solo una hebra, el dsARN puede tomar la forma de una molécula tipo horquilla auto-complementaria que se dobla sobre sí misma para formar un dúplex. Por lo tanto, el dsARN puede ser completa o parcialmente bicatenario. Puede lograrse una modulación específica de la expresión génica por expresión estable de horquillas de dsARN en líneas celulares transgénicas, sin embargo, en algunos aspectos, la expresión génica o función está regulada por aumento. Cuando se forma a partir de dos hebras, o una única hebra que adopta la forma de una molécula de tipo horquilla auto-complementaria que se dobla sobre sí misma para formar un dúplex, las dos hebras (o regiones formadoras de dúplex de una sola hebra) son hebras 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'-hidroxi azúcares o azúcares modificados en 2' y, generalmente bases U en vez de T). Las hélices de ácido nucleico pueden adoptar más de un tipo de estructura, más comúnmente las formas A y B. Se cree que, en general, los oligonucleótidos que tienen estructura similar a la forma B son "similares a ADN" y aquellos que tienen estructura similar a la forma A son "similares a ARN". En algunos casos (quiméricos), un compuesto antisentido puede contener tanto regiones en forma A como B.

50

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

dsARN también puede activar la expresión génica, un mecanismo que se ha denominado "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).

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. Sin embargo, en los aspectos 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 un gen antivírico y productos codificados de los mismos. Los dsARN también pueden actuar como ARN activantes pequeños (ARNap). Sin desear quedar ligado por la 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" identificados en el presente documento pueden emplearse en un cribado para compuestos adicionales que modulan la expresión de polinucleótidos de un gen antivírico. "Moduladores" son aquellos compuestos que disminuyen o aumentan la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica un gen antivírico y que comprenden al menos una porción de 5 nucleótidos que es complementaria a un segmento diana. El método de cribado comprende las etapas de poner en contacto un segmento diana de una molécula de ácido nucleico que codifica polinucleótidos sentido o antisentido naturales de un gen antivírico 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 un polinucleótidos de un gen antivírico, por ejemplo, SEQ ID NO: 10 a 30. Una vez se muestra que el modulador o moduladores candidatos son capaces de modular (por ejemplo, disminuir o aumentar) la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica un polinucleótido de un gen antivírico, el modulador puede entonces emplearse en estudios de investigación adicionales de la función de un polinucleótido de un gen antivírico, o para su uso como un agente de investigación, diagnóstico o terapéutico según la presente divulgación.

El direccionamiento de la secuencia antisentido natural modula preferiblemente la función del gen diana. Por ejemplo, el gen antivírico (por ejemplo, números de acceso NM_014314, NM_022168, NM_024013). En un aspecto, la diana es un polinucleótido antisentido del gen antivírico. En un aspecto, un oligonucleótido antisentido se dirige a secuencias sentido y/o antisentido naturales de un polinucleótido de un gen antivírico (por ejemplo, números de acceso NM_014314, NM_022168, NM_024013), variantes, alelos, isoformas, homólogos, mutantes, derivados, fragmentos y secuencias complementarias a los mismos. Preferiblemente, el oligonucleótido es una molécula antisentido y las dianas incluyen regiones codificantes y no codificantes de polinucleótidos antisentido y/o sentido de un gen antivírico.

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

Se ha mostrado en la técnica que dichos restos de oligonucleótido bicatenario modulan la expresión de diana y regulan la traducción, así como el procesamiento de ARN mediante un mecanismo antisentido. Además, los restos bicatenarios pueden someterse a modificaciones químicas. Por ejemplo, se ha mostrado que tales restos bicatenarios inhiben la diana por la hibridación clásica de la hebra antisentido del dúplex con la diana, activando de este modo la degradación enzimática de la diana.

En un aspecto, un oligonucleótido antisentido se dirige a polinucleótidos de un gen antivírico (por ejemplo, números de acceso NM_014314, NM_022168, NM_024013), variantes, alelos, isoformas, homólogos, mutantes, derivados, fragmentos y secuencias complementarias a los mismos. Preferiblemente, el oligonucleótido es una molécula antisentido.

Según aspectos de la divulgación, la molécula de ácido nucleico diana no se limita al gen antivírico en solitario, sino que se extiende a cualquiera de las isoformas, receptores, homólogos y similares de las moléculas de un gen antivírico.

En otro aspecto, un oligonucleótido se dirige a una secuencia antisentido natural de un polinucleótido de un gen antivírico, por ejemplo, polinucleótidos expuestos como la SEQ ID NO: 4 a 9, y cualquier variante, alelo, homólogo, mutante, derivado, fragmento y secuencia complementaria a los mismos. Los ejemplos de oligonucleótidos antisentido se exponen como las SEQ ID NO: 10 a 30.

En un aspecto, los oligonucleótidos son complementarios a o se unen a secuencias de ácidos nucleicos de

antisentido de un gen antivírico, incluyendo, sin limitación, secuencias sentido y/o antisentido no codificantes asociadas a un polinucleótido de un gen antivírico, y modulan la expresión y/o función de una molécula de un gen antivírico.

5 En otro aspecto, los oligonucleótidos son complementarios a o se unen a secuencias de ácidos nucleicos de antisentido natural de un gen antivírico, expuestas como SEQ ID NO: 4 a 9, y modulan la expresión y/o función de una molécula de un gen antivírico.

En un aspecto, los oligonucleótidos comprenden secuencias de al menos 5 nucleótidos consecutivos de las SEQ ID
10 NOs: 10 a 30, y modulan la expresión y/o función de una molécula de un gen antivírico.

Las dianas de polinucleótido comprenden un gen antivírico, incluyendo miembros de la familia del mismo, variantes de un gen antivírico; mutantes de un gen antivírico, que incluyen SNP; secuencias no codificantes de un gen antivírico; alelos de un gen antivírico; variantes de especies, fragmentos y similares. Preferiblemente, el
15 oligonucleótido es una molécula antisentido.

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

En otro aspecto, el direccionamiento de un polinucleótido de un gen antivírico, por ejemplo, SEQ ID NO: 4 a 9, modula la expresión o función de estas dianas. En un aspecto, la expresión o función está regulada por aumento en comparación con un control. En otro aspecto, la expresión o función se regula por disminución en comparación con
25 un control.

En otro aspecto, los compuestos antisentido comprenden secuencias expuestas como SEQ ID NO: 10 a 30. Estos oligonucleótidos pueden comprender uno o más nucleótidos modificados, fragmentos más cortos o más largos, enlaces modificados y similares.

30 En otro aspecto, las SEQ ID NO: 10 a 30 comprenden uno o más nucleótidos de LNA.

La modulación de un ácido nucleico diana deseado puede realizarse de varias formas conocidas en la técnica. Por ejemplo, oligonucleótidos antisentido, siRNA, etc. Las moléculas de ácidos nucleicos enzimáticos (por ejemplo,
35 ribozimas) son moléculas de ácidos nucleicos capaces de catalizar una o más de una diversidad de reacciones, incluyendo la capacidad de escindir repetidamente otras moléculas de ácidos nucleicos separadas de una manera específica de secuencia de bases de nucleótidos. Tales moléculas de ácidos nucleicos enzimáticos pueden usarse, por ejemplo, para dirigirse prácticamente a cualquier transcripción de ARN.

40 Debido a su especificidad de secuencia, las moléculas de ácidos nucleicos enzimáticos que se escinden en trans se muestran prometedores como agentes terapéuticos para una enfermedad humana. Las moléculas de ácidos nucleicos enzimáticos pueden diseñarse para escindir dianas de ARN específicas dentro del fondo del ARN celular. Tal acontecimiento de escisión 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.

45 En general, los ácidos nucleicos enzimáticos con actividad de escisión de ARN actúan uniéndose primero a un ARN diana. Tal unión se produce mediante la porción de unión de diana de un ácido nucleico enzimático que se mantiene en estrecha proximidad a una porción enzimática de la molécula que actúa para escindir el ARN diana. Por lo tanto, el ácido nucleico enzimático se reconoce primero y después se une a ARN diana mediante apareamiento de bases
50 complementario, y una vez se une al sitio correcto, actúa enzimáticamente para cortar el ARN diana. La escisión estratégica de un ARN diana tal 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.

55 Se han usado varios enfoques, tales como estrategias de selección *in vitro* (evolución) para desarrollar nuevos catalizadores de ácido nucleico capaces de catalizar una diversidad de reacciones, tales como escisión y ligación de enlaces fosfodiéster y enlaces amida.

El desarrollo de ribozimas que son óptimas para la actividad catalítica contribuirá significativamente a cualquier

- estrategia que emplea 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 de saturación (10 mM) de cofactor de Mg²⁺. Se ha mostrado que una ribozima de "ARN ligasa" artificial cataliza la reacción de auto-modificación correspondiente con una velocidad de aproximadamente 100 min⁻¹.
- 5 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 tanto como 10 veces en la velocidad catalítica. Estos hallazgos demuestran que las ribozimas pueden promover transformaciones químicas con
- 10 velocidades catalíticas que son significativamente superiores a las mostradas *in vitro* por la mayoría de las ribozimas que se auto-escinden naturales. Después, es posible que las estructuras de ciertas ribozimas de auto-escisión 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.
- 15 La escisión intermolecular de un sustrato de ARN por un catalizador de ARN que se ajusta al modelo de "cabeza de martillo" se mostró por primera vez en 1987. Se recuperó el catalizador de ARN y se hizo reaccionar con múltiples moléculas de ARN, demostrando que era verdaderamente catalítico.
- 20 Se han usado ARN catalíticos diseñados basados en el motivo de "cabeza de martillo" para escindir secuencias diana específicas haciendo cambios de base apropiados en el ARN catalítico para mantener apareamiento de bases necesarios con las secuencias diana. Esto ha permitido el uso del ARN catalítico para escindir secuencias diana específicas e indica que los ARN catalíticos diseñados según el modelo de "cabeza de martillo" pueden escindir posiblemente ARN de sustrato específico *in vivo*.
- 25 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) como el propio ARN o 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 un transporte eficaz de los pre-siRNA al citoplasma
- 30 donde son activos y permite el uso de promotores regulados y específicos de tejido para la expresión génica.
- 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 internucleósido covalentes (estructura), así como oligonucleótidos que tienen porciones que no existen de forma
- 35 natural que funcionan de forma similar. Tales oligonucleótidos modificados o sustituidos son frecuentemente deseados con respecto a formas nativas debido a propiedades deseables tales como, por ejemplo, captación celular mejorada, afinidad potenciada para un ácido nucleico diana y aumento de la estabilidad en presencia de nucleasas.
- 40 De acuerdo con la presente divulgación, los oligonucleótidos o "compuestos antisentido" incluyen oligonucleótidos antisentido (por ejemplo, ARN, ADN, mimético, quimera, análogo u homólogo de los mismos), ribozimas, oligonucleótidos de secuencia de guía externa (EGS), compuestos de siRNA, compuestos de interferencia (iARN) de ARN mono- o bicatenario tales como compuestos de siRNA, ARN_{ap}, ARN_a, y otros compuestos oligoméricos que hibridan con al menos una porción del ácido nucleico diana y modulan su función. Como tales, pueden ser ADN,
- 45 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 rutinariamente linealmente, pero pueden unirse o prepararse de otro modo para ser circulares y/o ramificados. Los compuestos antisentido pueden incluir construcciones tales como,
- 50 por ejemplo, dos hebras hibridadas para formar un compuesto completa o parcialmente bicatenario o una única hebra con auto-complementariedad suficiente para permitir la hibridación y formación de un compuesto completa o parcialmente bicatenario. Las dos hebras 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
- 55 monocatenario. Los compuestos bicatenarios opcionalmente pueden incluir nucleótidos protuberantes en los extremos. Las modificaciones adicionales pueden incluir grupos conjugados unidos a uno de los extremos, posiciones de nucleótido seleccionadas, posiciones de azúcar o a uno de los enlaces internucleosídicos. Como alternativa, las dos hebras pueden enlazarse mediante un resto no de ácido nucleico o grupo conector. Cuando se forma a partir de solo una hebra, el dsARN puede tomar la forma de una molécula tipo horquilla auto-

complementaria que se dobla sobre sí misma para formar un dúplex. Por lo tanto, el dsARN puede ser completa o parcialmente bicatenario. Puede lograrse una modulación específica de la expresión génica por expresión estable de horquillas de dsARN en líneas celulares transgénicas. Cuando se forma a partir de dos hebras, o una única hebra que adopta la forma de una molécula de tipo horquilla auto-complementaria que se dobla sobre sí misma para formar un dúplex, las dos hebras (o regiones formadoras de dúplex de una sola hebra) son hebras 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'-hidroxi azúcares o azúcares modificados en 2' y, generalmente bases U en vez de T). Las hélices de ácido nucleico pueden adoptar más de un tipo de estructura, más comúnmente las formas A y B. Se cree que, en general, los oligonucleótidos que tienen estructura similar a la forma B son "similares a ADN" y aquellos que tienen estructura similar a la forma A son "similares a ARN". En algunos casos (quiméricos), un compuesto antisentido puede contener tanto regiones en forma A como B.

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

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

En un aspecto, los compuestos antisentido o de oligonucleótidos de la divulgación tienen porciones antisentido de 12 o 13 a 30 nucleótidos de longitud. Un experto en la técnica apreciará que éstos incorporan compuestos antisentido que tienen porciones antisentido de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos de longitud, o cualquier intervalo entre los mismos.

En otro aspecto, los compuestos oligoméricos de la presente divulgación también incluyen variantes en las que una base diferente está presente en una o más de las posiciones de nucleótido en el compuesto. Por ejemplo, si el primer nucleótido es una adenosina, pueden producirse variantes que contienen timidina, guanósina o citidina en esa posición. Esto puede hacerse en cualquiera de las posiciones de los compuestos antisentido o de dsARN. Estos compuestos se prueban entonces usando los métodos 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 secuencia o complementariedad, entre el compuesto antisentido y la diana, es de aproximadamente el 40% a aproximadamente el 60 %. En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencia o complementariedad es de aproximadamente el 60 % a aproximadamente el 70 %. En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencia o complementariedad es de aproximadamente el 70% a aproximadamente el 80%. En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencia o complementariedad es de aproximadamente el 80% a aproximadamente el 90%. En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencias o complementariedad es de aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 %, o aproximadamente el 100 %.

En otro aspecto, los oligonucleótidos antisentido, tales como, por ejemplo, las moléculas de ácidos nucleicos expuestas en las SEQ ID NO: 4 a 30, comprenden una o más sustituciones o modificaciones. En un aspecto, los

nucleótidos están sustituidos con ácidos nucleicos bloqueados (LNA).

En otro aspecto, los oligonucleótidos se 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 un gen antivírico y las secuencias expuestas como SEQ ID NO: 1 a 9. Los oligonucleótidos también se dirigen a regiones solapantes de las SEQ ID NOS: 1 a 9.

Ciertos oligonucleótidos de esta divulgación son oligonucleótidos quiméricos. "Oligonucleótidos quiméricos" o "quimeras", en el contexto de esta divulgación, son oligonucleótidos que contienen dos o más regiones químicamente distintas, cada una constituida por al menos un nucleótido. Estos oligonucleótidos contienen normalmente al menos una región de nucleótidos modificados que confiere una o más propiedades beneficiosas (tales como, por ejemplo, elevada resistencia a nucleasas, elevada captación en células, elevada afinidad de unión por la diana) y una región que es un sustrato para enzimas capaces de escindir híbridos de ARN:ADN o ARN:ARN. A modo de ejemplo, la RNasa H es una endonucleasa celular que escinde la hebra de ARN de un dúplex de ARN:ADN. Por lo tanto, la activación de RNasa H da como resultado la escisión del ARN diana, mejorando enormemente de esta manera la eficiencia de la modulación antisentido de la expresión génica. En consecuencia, 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, un oligonucleótido quimérico comprende al menos una región modificada para aumentar la afinidad de unión de la diana, y, normalmente, una región que actúa de sustrato para RNasa 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/o de oligonucleótidos, como se han descrito anteriormente. Tales compuestos también se han denominado en la técnica híbridos o gámperos. Las Patentes de Estados Unidos representativas que indican la preparación de tales estructuras híbridas comprenden, pero sin limitación, las patentes de Estados n.º 5.013.830; 5.149.797; 5.220.007; 5.256.775; 5.366.878; 5.403.711; 5.491.133; 5.565.350; 5.623.065; 5.652.355; 5.652.356; y 5.700.922.

En otro aspecto, la región del oligonucleótido que se modifica comprende al menos un nucleótido modificado en la posición 2' del azúcar, más preferiblemente un nucleótido modificado con 2'-Oalquilo, 2-O-alquil-O-alquilo o 2'-flúor. En otros aspectos, 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. Tales modificaciones se incorporan rutinariamente en oligonucleótidos y se ha mostrado que estos oligonucleótidos tienen una mayor T_m (es decir, mayor afinidad de unión a diana) que los 2'-desoxioligonucleótidos contra una diana dada. El efecto de tal afinidad elevada es potenciar enormemente la inhibición por oligonucleótidos de iARN de la expresión génica. La RNasa H es una endonucleasa celular que escinde la hebra de ARN del dúplex de ARN:ADN; por lo tanto, la activación de esta enzima da como resultado la escisión del ARN diana, y puede mejorar en gran medida de este modo la eficiencia de inhibición de iARN. La escisión del ARN diana puede demostrarse rutinariamente por electroforesis en gel. En otro aspecto, el oligonucleótido quimérico también se modifica para potenciar la resistencia a nucleasas. Las células contienen una diversidad de exo- y endo-nucleasas que pueden degradar ácidos nucleicos. Se ha mostrado que varias modificaciones de nucleótidos y nucleósidos hacen que el oligonucleótido en el que se incorporan sea más resistente a la digestión por nucleasa que el oligodesoxinucleótido nativo. La resistencia a nucleasas se mide rutinariamente incubando oligonucleótidos con extractos celulares o soluciones de nucleasa aisladas y midiendo el grado de oligonucleótido intacto que queda con el tiempo, normalmente por electroforesis en gel. Los oligonucleótidos que se han modificado para potenciar su resistencia a nucleasas sobreviven intactos durante más tiempo que los oligonucleótidos sin modificar. Se ha demostrado que una diversidad de modificaciones de oligonucleótidos potencia o confiere resistencia a nucleasas. Los oligonucleótidos que contienen al menos una modificación de fosforotioato son actualmente más preferidos. En algunos aspectos, las modificaciones de oligonucleótidos que mejoran la afinidad de unión a diana son, por lo tanto, independientemente capaces de potenciar la resistencia a nucleasas. Algunas modificaciones deseables pueden encontrarse en De Mesmaeker et al. (1995) Acc. Chem. Res., 28: 366-374.

Los ejemplos específicos de algunos oligonucleótidos previstos para esta divulgación incluyen aquellos que comprenden estructuras modificadas, 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. La mayor parte son oligonucleótidos con estructuras de fosforotioato y aquellos con estructuras de heteroátomo, particularmente estructuras de $\text{CH}_2\text{--NH--O--CH}_2$, CH , $\text{--N(CH}_3\text{)--O--CH}_2$ [conocido como una estructura de metilen(metilimino) o MMI], $\text{CH}_2\text{--O--N(CH}_3\text{)--CH}_2$, $\text{CH}_2\text{--N(CH}_3\text{)--N(CH}_3\text{)--CH}_2$ y $\text{O--N(CH}_3\text{)--CH}_2\text{--CH}_2$, en los que la estructura de fosfodiéster nativa se representa O--P--O--CH . También se prefieren las estructuras amida desveladas por De Mesmaeker et al. (1995) Acc. Chem. Res. 28: 366-374. También se prefieren oligonucleótidos que tienen estructuras principales de morfolino (Summerton y Weller, Pat. de Estados Unidos n.º 5.034.506). En otros aspectos, tales como la estructura de ácido nucleico peptídico (PNA), la estructura de fosfodiéster del oligonucleótido se sustituye por una estructura de poliamida, estando los nucleótidos unidos directa o indirectamente a los átomos de nitrógeno azo de la estructura poliamida. Los oligonucleótidos también pueden comprender uno o más restos de azúcar sustituidos. Los oligonucleótidos 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 u O(CH₂)_n CH₃, donde n es de 1 a aproximadamente 10; alquilo C1 a C10 inferior, alcoxicoxi, alquilo, alcarilo o aralquilo inferior sustituido; Cl; Br; CN; CF₃; OCF₃; O--, S--, o N-alquilo; 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 indicador; un intercalador; un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido; o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un oligonucleótido y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. Una modificación preferida incluye 2'-metoxietoxi [2'-O-CH₂ CH₂ OCH₃, también conocido como 2'-O-(2-metoxietilo)]. Otras modificaciones preferidas incluyen 2'-metoxi (2'-O-CH₃), 2'-propoxi (2'-OCH₂ CH₂CH₃) y 2'-fluoro (2'-F). También pueden hacerse modificaciones similares en otras posiciones sobre el oligonucleótido, particularmente la posición 3' del azúcar en el nucleótido del extremo 3' y la posición 5' del nucleótido del extremo 5'. Los oligonucleótidos también pueden tener miméticos de azúcar tales como ciclobutilos en lugar del grupo pentofuranosilo.

Los oligonucleótidos también pueden incluir, adicionalmente o como alternativa, modificaciones o sustituciones de nucleobases (frecuentemente denominadas en la técnica simplemente "base"). 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 únicamente 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, así como 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. Puede incluirse una base "universal" conocida en la técnica, por ejemplo, inosina. Se ha mostrado que las sustituciones de 5-Me-C aumentan la estabilidad del dúplex de ácido nucleico en 0,6-1,2 °C (Sanghvi, Y. S., en Crooke, S. T. y Lebleu, B., eds., Antisense Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, págs. 276-278) y son en el presente las sustituciones de base.

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. Tales restos incluyen, pero sin limitación, restos de lípido tales como un resto de colesterol, un resto colesterilo, un tioéter, por ejemplo, hexil-S-tritilol, un tiocolesterol, una cadena alifática, por ejemplo, residuos de dodecanodiol o de undecilo, un fosfolípido, por ejemplo, di-hexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-FI-fosfonato de trietilamonio, una poliamina o una cadena de polietilenglicol, o ácido adamantanoacético. Los oligonucleótidos que comprenden restos lipófilos, y métodos para preparar tales oligonucleótidos, se conocen en la técnica, por ejemplo, las Pat. de Estados Unidos n.º 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 anteriormente mencionadas 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 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, pero sin limitación, nucleótidos abásicos, poliéter, poliamina, poliamidas, péptidos, hidratos de carbono, lípido, o compuestos de polihidrocarburo. Los expertos en la técnica 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 según la presente divulgación pueden prepararse convenientemente y rutinariamente

- mediante la técnica ya conocida de síntesis en fase sólida. El equipo para tales síntesis se vende por varios proveedores, incluyendo Applied Biosystems. También puede emplearse cualquier otro medio para tal síntesis: la síntesis real de los oligonucleótidos está perfectamente dentro de las aptitudes de un experto en la técnica. También se conocen bien usar técnicas similares para preparar otros oligonucleótidos tales como los fosforotioatos y derivados alquilados. También se conoce bien 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 en Glen Research, Sterling VA) para sintetizar oligonucleótidos fluorescentemente marcados, biotinilados u otros oligonucleótidos modificados, tales como oligonucleótidos modificados con colesterol.
- 10 Según la divulgación, el uso de modificaciones tales como el uso de monómeros de LNA para potenciar la potencia, especificidad y duración de la acción y ampliar las vías de administración de oligonucleótidos comprende químicas actuales tales como MOE, ANA, FANA, PS, etc. Esto puede lograrse sustituyendo algunos de los monómeros en los oligonucleótidos actuales por monómeros de LNA. El oligonucleótido modificado con LNA puede tener un tamaño similar al compuesto precursor o puede ser más largo o preferiblemente más pequeño. Se prefiere que tales oligonucleótidos modificados con LNA contengan menos de aproximadamente el 70 %, más preferiblemente menos de aproximadamente el 60 %, más preferiblemente menos de aproximadamente el 50 % de monómeros de LNA y que sus tamaños estén entre aproximadamente 5 y 25 nucleótidos, más preferiblemente entre aproximadamente 12 y 20 nucleótidos.
- 20 Las estructuras de oligonucleótidos modificados comprenden, pero sin limitación, fosforotioatos, fosforotioatos quirales, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, metilo y otros alquil fosfonatos que comprenden 3'-alquilenfosfonatos y fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidatos que comprenden 3'-amino fosforamidato y aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionoalquilfosfonatos, tionoalquilfosfotriésteres y boranofosfatos que tienen enlaces 3'-5' normales, análogos enlazados en 2'-5' de estos, y aquellos que tienen polaridad invertida donde los pares adyacentes de unidades de nucleósidos están enlazados 3'-5' a 5'-3' o 2'-5' a 5'-2'. También se incluyen diversas sales, sales mixtas y formas de ácido libre.
- 25 Las patentes de Estados Unidos representativas que muestran la preparación de los enlaces que contienen fósforo anteriores comprenden, pero sin limitación, las patentes de Estados Unidos n.º 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.
- 35 Las estructuras de oligonucleótido modificadas que no incluyen un átomo de fósforo en las mismas tienen estructuras que se forman por enlaces internucleósido de alquilo o cicloalquilo de cadena corta, enlaces internucleósidos de heteroátomo y alquilo o cicloalquilo mixtos, o uno o más enlaces internucleósidos heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta. Estos comprenden aquellos que tienen enlaces morfolino (formados en parte a partir de la porción de azúcar de un nucleósido); estructuras de siloxano; estructuras de sulfuro, sulfóxido y sulfona; estructuras de formacetilo y tioformacetilo; estructuras de metilenformacetilo y tioformacetilo; estructuras que contienen alqueno; estructuras de sulfamato; estructuras de metiliminino y metilenhidrazino; estructuras de sulfonato y sulfonamida; estructuras de amida; y otras que tienen partes de componentes de N, O, S y CH₂ mixtos.
- 40 Las patentes de Estados Unidos representativas que muestran la preparación de los oligonucleósidos anteriores comprenden, pero sin limitación, las patentes de Estados Unidos n.º 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.
- 50 En otros miméticos de oligonucleótidos, tanto el azúcar como el enlace internucleósido, es decir, la estructura, 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. Tal compuesto oligomérico, un oligonucleótido mimético que se ha mostrado que tiene excelentes propiedades de hibridación, se denomina un ácido nucleico peptídico (PNA). En compuestos de PNA, la estructura de azúcar de un oligonucleótido se reemplaza por una estructura que contiene amida, en particular una estructura de aminoetilglicina. Las nucleobases son retenidas y se unen directa o indirectamente a átomos de nitrógeno azo de la porción de amida de la estructura. Las patentes de Estados Unidos representativas que muestran la preparación de compuestos de PNA comprenden, pero sin limitación, las patentes de Estados Unidos n.º 5.539.082; 5.714.331; y 5.719.262. Pueden encontrarse enseñanzas adicionales de
- 55

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

En otro aspecto de la divulgación, los oligonucleótidos con estructuras de fosforotioato y oligonucleósidos con estructuras de heteroátomo, y en particular CH₂-NH-O-CH₂-, -CH₂-N (CH₃)-O-CH₂-, se conocen como una estructura de metileno (metilimino) o MMI, -CH₂-O-N (CH₃)-CH₂-, -CH₂N(CH₃)-N(CH₃) CH₂-y -ON(CH₃)-CH₂-CH₂-, donde la estructura de fosfodiéster nativo se representa como -O-P-O-CH₂- de la patente de Estados Unidos n.º 5.489.677 que se ha citado anteriormente, y las estructuras de amida de la patente de Estados Unidos n.º 5.602.240. También hay oligonucleótidos que tienen estructuras principales de morfolino de la patente de Estados Unidos n.º 5.034.506 que se ha citado anteriormente.

10

Los oligonucleótidos modificados también pueden contener uno o más restos de azúcar sustituidos. Los oligonucleótidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': OH; F; O-, S- o N-alquilo; O-, S-, o N-alqueno; O-, S- o N-alquino; o O-alquil-O-alquilo, donde el alquilo, alqueno y alquino pueden ser alquilo de C a CO sustituido o sin sustituir o alqueno y alquino de C₂ a CO. Particularmente se prefieren O(CH₂)_nOmCH₃, O(CH₂)_nOCH₃, O(CH₂)_nNH₂, O(CH₂)_nCH₃, O(CH₂)_nONH₂ y O(CH₂)_nON(CH₂)_nCH₃)₂ donde n y m pueden ser de 1 a aproximadamente 10. Otros oligonucleótidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': de 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 comprende 2'-metoxietoxi (2'-O-CH₂CH₂OCH₃, también conocido como 2'-O-(2'-metoxietilo) o 2'-MOE), es decir, un grupo alcoxialcoxi. Una modificación adicional comprende 2'-dimetilaminoetoxi, es decir, un grupo O(CH₂)₂ON(CH₃)₂, también conocido como 2'-DMAOE, como se describe en los ejemplos en el presente documento a continuación, 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 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 pentofuranosil azúcar. Las patentes de Estados Unidos representativas que muestran la preparación de tales estructuras de azúcar modificadas comprenden, pero sin limitación, las patentes de Estados Unidos n.º 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"). 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-hidroxiethylcitosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, derivados de 6-metilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, derivados de 2-propilo y otros de alquilo de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracilo y citosina, 5-propiniluracilo y citosina, 6-azouracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudo-uracilo), 4-tiouracilo, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo y otras adeninas y guaninas sustituidas en 8, 5-halo, particularmente 5-bromo, 5-trifluorometilo y otros uracilos y citosinas sustituidos en 5, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-deazaguanina y 7-deazaadenina y 3-deazaguanina y 3-deazaadenina.

Además, los nucleótidos comprenden los desvelados en la patente de Estados Unidos n.º 3,687,808, los desvelados en "The Concise Encyclopedia of Polymer Science And Engineering", páginas 858-859, Kroschwitz, J.I., ed. John Wiley & Sons, 1990, los desvelados por English et al., "Angewandte Chemie, International Edition", 1991, 30, página 613, y los desvelados por Sanghvi, Y.S., Capítulo 15, "Antisense Research and Applications", páginas 289-302, Crooke, S.T. y Lebleu, B. ca., CRC Press, 1993. Algunos de estos nucleótidos son particularmente útiles para aumentar 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 mostrado que las sustituciones de 5-metilcitosina aumentan la estabilidad del dúplex de ácido nucleico en 0,6-1,2 °C (Sanghvi, Y.S., Crooke, S.T. y Lebleu, B., eds, "Antisense Research and Applications", CRC Press, Boca Raton, 1993, págs. 276-278) y son en el presente sustituciones de base, incluso

más particularmente cuando se combinan con modificaciones de 2'-O-metoxietil azúcar.

Las patentes de Estados Unidos representativas que muestran la preparación de los nucleótidos modificados que se han indicado anteriormente, así como otros nucleótidos modificados, comprenden, pero sin limitación, las patentes de Estados Unidos n.º 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

Tales restos comprenden, pero sin limitación, restos de lípido tales como un resto colesterol, ácido cólico, un tioéter, por ejemplo, hexil-S-tritilol, un tiocolesterol, una cadena alifática, por ejemplo, residuos de dodecanodiol o de undecilo, un fosfolípido, por ejemplo, di-hexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicerol-3-H-fosfonato de trietilamonio, una poliamina o una cadena de polietilenglicol, o ácido adamantanoacético, un resto palmitilo, o un resto octadecilamina o hexilamino-carbonil-oxicolesterol.

Las patentes de Estados Unidos representativas que muestran la preparación de dichos conjugados oligonucleótidos comprenden, pero sin limitación, las patentes de Estados Unidos n.º 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 identificados en el presente documento en los esfuerzos del descubrimiento de fármacos para esclarecer relaciones que existen entre un polinucleótido de un gen antivírico y una patología, fenotipo o afección. Estos métodos incluyen detectar o modular un polinucleótido de un gen antivírico que comprende poner en contacto una muestra, tejido, célula u organismo con los compuestos de la presente divulgación, medir el nivel de ácido nucleico o de proteína de un polinucleótido de un gen antivírico y/o un criterio de valoración fenotípico o químico relacionado en algún momento después del tratamiento, y opcionalmente comparar el valor medido con una muestra no tratada o muestra tratada con un compuesto adicional de la divulgación. Estos métodos 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.

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

La transferencia de un ácido nucleico exógeno en una célula huésped u organismo puede evaluarse detectando directamente la presencia del ácido nucleico en la célula u organismo. Tal detección puede lograrse por varios métodos muy 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 métodos 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 indicadora. 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 la 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 indicadora y su señal de poli(A). Estos plásmidos producirán un ARNm con un gen indicador en la porción aguas arriba del gen y una posible diana de iARN en la región no codificante 3'. La eficacia

de los oligonucleótidos antisentido individuales se ensayará por modulación del gen indicador. Los genes indicadores útiles en los métodos de la presente divulgación incluyen acetohidroxilasa (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 métodos de determinación de la modulación de un gen indicador se conocen bien en la técnica, e incluyen, pero sin limitación, métodos fluorimétricos (por ejemplo, espectroscopia de fluorescencia, clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), microscopía de fluorescencia), determinación de la resistencia a antibióticos.

La expresión de las proteínas RIG1, MDA5, IFNA1 y ARNm puede ensayarse usando métodos conocidos por los expertos en la técnica y descritos en cualquier parte en el presente documento. Por ejemplo, pueden usarse inmunoensayos tales como ELISA para medir niveles de proteína. Los anticuerpos de un gen antivírico para ELISA están disponibles en el mercado, por ejemplo, en R&D Systems (Mineápolis, MN), Abcam, Cambridge, MA.

En aspectos, la expresión de RIG1, MDA5, IFNA1 (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 un gen antivírico en una muestra de control. Por ejemplo, la expresión de la proteína o ácido nucleico puede compararse usando métodos conocidos por los expertos en la técnica con aquella en una muestra tratada con vector vacío 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 un gen antivírico en una muestra tratada frente a una muestra 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 de un gen antivírico o proteína, en una muestra tratada con un oligonucleótido antisentido de la presente divulgación, disminuye o aumenta 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 de un gen antivírico o proteína 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, productos de diagnóstico y productos 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, se usan frecuentemente por los expertos 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 productos de diagnóstico y en diversos sistemas biológicos, los compuestos de la presente divulgación, tanto en solitario como en combinación con otros compuestos o productos terapéuticos, son útiles como herramientas en análisis diferenciales y/o combinatorios para aclarar patrones de expresión de una porción o del complemento entero de genes expresados dentro de células y tejidos.

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 antivíricos. Estos incluyen, pero sin limitación, seres humanos, animales transgénicos, células, cultivos celulares, tejidos, xenoinjertos, trasplantes y combinaciones de los mismos.

Como un ejemplo no limitante, los 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.

Los ejemplos de métodos 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, et al., (2000) FEBS Lett., 480, 2-16), SAGE (análisis en serie de la expresión génica) (Madden, et al., (2000) Drug Discov. Today, 5, 415- 425), READS (amplificación por enzima de restricción de ADNc digeridos) (Prashar y Weissman, (1999) Methods Enzymol., 303, 258-72), TOGA (análisis de la expresión génica total) (Sutcliffe, et al., (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 97, 1976-81), matrices de proteínas y proteómica (Celis, et al., (2000) FEBS Lett., 480, 2-16; Jungblut, et al., Electrophoresis, 1999, 2100-10), secuenciación de etiquetas de secuencia expresada (EST) (Celis, et al., FEBS Lett., 2000, 480, 2-16; Larsson, et al., J. Biotechnol., 2000, 80, 143-57), huellas genómicas de ARN sustractivas (SuRF) (Fuchs, et al., (2000) Anal. Biochem. 286, 91-98; Larson, et al., (2000) Cytometry 41, 203-208), clonación sustractiva, expresión diferencial (DD) (Jurecic y Belmont, (2000) Curr. Opin. Microbiol. 3, 316-21), hibridación genómica comparativa (Carulli, et al., (1998) J. Cell Biochem. Suppl., 31, 286-96), técnicas de FISH (hibridación in situ fluorescente) (Going y Gusterson, (1999) Eur. J. Cancer, 35, 1895-904) y métodos 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 hibridan con ácidos nucleicos que codifican un gen antivírico. Por ejemplo, los oligonucleótidos que hibridan con tal eficiencia y bajo tales condiciones que se han desvelado en el presente documento por ser eficaces. Los moduladores de un gen antivírico son cebadores o sondas eficaces en condiciones que favorecen la amplificación génica o detección, respectivamente. Estos cebadores y sondas son útiles en métodos que requieren la detección específica de moléculas de ácidos nucleicos que codifican un gen antivírico y en la amplificación de dichas moléculas de ácidos nucleicos para la detección o para su uso en estudios adicionales de un gen antivírico. La hibridación de los oligonucleótidos antisentido, particularmente los cebadores y sondas, de la divulgación con un ácido nucleico que codifica un gen antivírico puede detectarse por medios conocidos en la técnica. Tales medios pueden incluir conjugación de una enzima con el oligonucleótido, radiomarcado del oligonucleótido, o cualquier otro medio de detección adecuado. También pueden prepararse kits que usan tales medios de detección para detectar el nivel de un gen antivírico en una muestra.

La especificidad y sensibilidad de antisentido también se emplean por los expertos en la técnica para usos terapéuticos. Se han empleado oligonucleótidos antisentido como restos terapéuticos en el tratamiento de patologías en animales, incluyendo seres humanos. Los fármacos de oligonucleótido antisentido se han administrado con seguridad y eficazmente a seres humanos y numerosos ensayos clínicos están actualmente en marcha. Por lo tanto, se establece que los compuestos antisentido pueden ser modalidades terapéuticas útiles que pueden configurarse para ser útiles en pautas de tratamiento para el tratamiento de células, tejidos y animales, especialmente seres humanos.

Para productos terapéuticos, un animal, preferiblemente un ser humano, que se sospecha que tiene una enfermedad o trastorno que puede tratarse modulando la expresión de un polinucleótido de un gen antivírico se trata administrando compuestos antisentido de acuerdo con esta divulgación. Por ejemplo, en un aspecto no limitante, los métodos comprenden la etapa de administrar al animal en necesidad de tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz del modulador de un gen antivírico. Los moduladores de un gen antivírico de la presente divulgación modulan eficazmente la actividad de un gen antivírico o modulan la expresión de una proteína de un gen antivírico. En un aspecto, la actividad o expresión de un gen antivírico en un animal se inhibe aproximadamente el 10 % en comparación con un control. Preferiblemente, la actividad o expresión de un gen antivírico en un animal se inhibe aproximadamente el 30 %. Más preferiblemente, la actividad o expresión de un gen antivírico en un animal se inhibe el 50 % o más. Por lo tanto, los compuestos oligoméricos modulan la expresión del ARNm de un gen antivírico 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.

En un aspecto, la actividad o expresión de un gen antivírico y/o en un animal se eleva aproximadamente en un 10 % en comparación con un control. Preferiblemente, la actividad o expresión de un gen antivírico en un animal se eleva

aproximadamente el 30 %. Más preferiblemente, la actividad o expresión de un gen antivírico en un animal se eleva el 50 % o más. Por lo tanto, los compuestos oligoméricos modulan la expresión del ARNm de un gen antivírico 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 un gen antivírico puede medirse en suero, sangre, tejido adiposo, hígado o cualquier otro fluido corporal, tejido u órgano del animal. Preferiblemente, las células contenidas dentro de dichos fluidos, tejidos u órganos que se analizan contienen una molécula de ácido nucleico que codifica péptidos de un gen antivírico y/o la propia proteína de un gen antivírico.

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 métodos de la divulgación también puede ser útil profilácticamente.

15

Conjugados: Otra modificación de los oligonucleótidos de la divulgación implica enlazar químicamente al oligonucleótido uno o más restos o conjugados que potencian la actividad, distribución celular o captación celular del oligonucleótido. Estos restos o conjugados pueden incluir grupos conjugados covalentemente unidos a grupos funcionales tales como grupos hidroxilo primarios o secundarios. Los grupos conjugados de la divulgación incluyen intercaladores, moléculas indicadoras, poliaminas, polietilenglicoles, poliéteres, grupos que potencian las propiedades farmacodinámicas de oligómeros, y grupos que potencian las propiedades farmacocinéticas de oligómeros. Los grupos conjugados típicos incluyen colesteroles, lípidos, fosfolípidos, biotina, fenazina, folato, fenantridina, antraquinona, acridina, fluoresceínas, rodaminas, cumarinas y colorantes. Los grupos que potencian las propiedades farmacodinámicas, en el contexto de la presente 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. Los grupos que potencian las propiedades farmacocinéticas, en el contexto de la presente divulgación, incluyen grupos que mejoran la captación, distribución, metabolismo o eliminación de los compuestos de la presente divulgación. Los grupos de conjugados representativos se desvelan en la solicitud de patente internacional n.º PCT/US92/09196, presentada el 23 de octubre de 1992, y la Pat. de Estados Unidos n.º 6.287.860. Los restos de conjugados incluyen, pero sin limitación, restos de lípidos tales como un resto colesterol, ácido cólico, un tioéter, por ejemplo, hexil-5-tritilitol, 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-glicerol-3-H-fosfonato de trietilamonio, una poliamina o una cadena de polietilenglicol, o ácido adamantanoacético, un resto palmitilo, o un resto octadecilamina o hexilamino-carbonil-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.

Las patentes de Estados Unidos representativas que muestran la preparación de tales conjugados de oligonucleótidos incluyen, pero sin limitación, las Pat. de Estados Unidos n.º 4.828.979; 4.948.882; 5.218.105; 5.525.465; 5.541.313; 5.545.730; 5.552.538; 5.578.717; 5.580.731; 5.580.731; 5.591.584; 5.109.124; 5.118.802; 5.138.045; 5.414.077; 5.486.603; 5.512.439; 5.578.718; 5.608.046; 4.587.044; 4.605.735; 4.667.025; 4.762.779; 4.789.737; 4.824.941; 4.835.263; 4.876.335; 4.904.582; 4.958.013; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.245.022; 5.254.469; 5.258.506; 5.262.536; 5.272.250; 5.292.873; 5.317.098; 5.371.241; 5.391.723; 5.416.203; 5.451.463; 5.510.475; 5.512.667; 5.514.785; 5.565.552; 5.567.810; 5.574.142; 5.585.481; 5.587.371; 5.595.726; 5.597.696; 5.599.923; 5.599.928 y 5.688.941.

Formulaciones: Los compuestos de la divulgación también pueden mezclarse, encapsularse, conjugarse o asociarse de otro modo a otras moléculas, estructuras de molécula o mezclas de compuestos, como, por ejemplo, liposomas, moléculas dirigidas a receptor, formulaciones orales, rectales, tópica u otras, para ayudar en la captación, distribución y/o absorción. Las patentes de Estados Unidos representativas que muestran la preparación de tales formulaciones que facilitan la captación, distribución y/o absorción incluyen, pero sin limitación, las Pat. de Estados Unidos n.º 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 una expresión y/o función de diana, los 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 constitutiva promotora, o una actividad de promotor 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 operativamente ligado al polinucleótido. Los ejemplos de tales vectores no virales incluyen el oligonucleótido en solitario (por ejemplo, una cualquiera o más de SEQ ID NO: 10 a 30) o en combinación con una formulación de proteína, polisacárido o lípido adecuada.

10

Los sistemas de administración de ácidos nucleicos adecuados adicionales incluyen vector viral, normalmente una secuencia de al menos uno de un adenovirus, virus asociado a adenovirus (AAV), adenovirus dependiente de cooperador, retrovirus, o complejo de virus hemaglutinante de liposoma de Japón (HVJ). Preferiblemente, el vector viral comprende un promotor de eucariota fuerte operativamente enlazado al polinucleótido, por ejemplo, un
15 promotor de citomegalovirus (CMV).

Los vectores preferidos adicionales incluyen vectores virales, proteínas de fusión y conjugados químicos. Los vectores retrovirales incluyen virus de la leucemia murina de Moloney y virus basados en el VIH. Un vector viral basado en el VIH preferido comprende al menos dos vectores donde los genes gag y pol son de un genoma del VIH
20 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 (VHS), vectores de adenovirus y vectores de virus adeno-asociados.

Los compuestos antisentido de la divulgación incluyen cualquier sal farmacéuticamente aceptable, éster o sal de
25 tales ésteres, o cualquier otro compuesto que, tras la administración a un animal, incluyendo un ser humano, es capaz de proporcionar (directa o indirectamente) el metabolito biológicamente activo o residuo del mismo.

La expresión "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales fisiológicamente y farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la divulgación: es decir, sales que conservan la actividad biológica deseada del
30 compuesto precursor y no confieren efectos toxicológicos no deseados al mismo. Para los oligonucleótidos, los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables y sus usos se describen adicionalmente en la Pat. de Estados Unidos n.º 6.287.860.

La presente divulgación también incluye composiciones farmacéuticas y formulaciones que incluyen los compuestos
35 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, incluyendo por nebulizador; intratraqueal, intranasal, epidérmica y transdérmica), oral o parenteral. La administración parenteral incluye inyección
40 o infusión intravenosa, intrarterial, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular; o administración intracraneal, por ejemplo, intratecal o intraventricular.

Para tratar tejidos en el sistema nervioso central, la administración puede hacerse por, por ejemplo, inyección o
45 infusión en el líquido cefalorraquídeo. La administración de ARN antisentido en líquido cefalorraquídeo se describe, por ejemplo, en la Pub. de Sol. de Pat. de Estados Unidos n.º 2007/0117772, "Methods for slowing familial ALS disease progression".

Si se pretende que el oligonucleótido antisentido de la presente divulgación se administre a células en el sistema
50 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 hacerse, por ejemplo, en la corteza entorrinal o el hipocampo. La administración de factores neurotróficos por administración de un vector de adenovirus a neuronas motoras en tejido muscular se describe, por ejemplo, en la Pat. de Estados Unidos n.º 6.632.427, "Adenoviral-vector-mediated gene transfer into medullary motor neurons". La administración de vectores directamente al cerebro, por ejemplo, el estriado, el tálamo, el hipocampo, o la sustancia negra, se conoce en la
55 técnica y se describe, por ejemplo, en la Pat. de Estados Unidos n.º 6.756.523, "Adenovirus vectors for the transfer of foreign genes into cells of the central nervous system particularly in brain". La administración puede ser rápida como mediante inyección o hacerse 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 realizarse, por ejemplo, por infusión de azúcares incluyendo, pero sin limitación, mesoeritritol, xilitol, D(+) galactosa, D(+) lactosa, D(+) xilosa, dulcitol, mio-inositol, L(-) fructosa, D(-) manitol, D(+) glucosa, D(+) arabinosa, D(-) arabinosa, celobiosa, D(+) maltosa, D(+) rafinosa, L(+) ramnosa, D(+) melibiosa, D(-) ribosa, adonitol, D(+) arabitol, L(-) arabitol, D(+) fucosa, L(-) fucosa, D(-) lixosa, L(+) lixosa y L(-) lixosa, o aminoácidos que incluyen, pero sin limitación, glutamina, lisina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glicina, histidina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, tirosina, valina y taurina. Los métodos y materiales para potenciar la penetración de la barrera hematoencefálica se describen, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos n.º 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 system".

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 facilitar 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 de este tipo que facilita la captación es LIPOFECTIN (disponible en 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. Las composiciones farmacéuticas y formulaciones para administración tópica pueden incluir parches transdérmicos, pomadas, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, pulverizadores, líquidos y polvos. Pueden ser necesarios o deseables vehículos farmacéuticos convencionales, bases acuosas, en polvo u oleosas, 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 según técnicas convencionales muy conocidas en la industria farmacéutica. Tales técnicas incluyen la etapa de poner en asociación los principios activos con el vehículo o vehículos farmacéuticos o uno o más excipientes. 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 después, si fuera necesario, moldeando el producto.

Las composiciones de la presente divulgación pueden formularse en cualquiera de muchas formas de dosificación posibles tales como, pero sin limitación, 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 incluyendo, por ejemplo, carboximetilcelulosa sódica, sorbitol y/o dextrano. La suspensión también puede contener estabilizadores.

Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación incluyen, pero sin limitación, soluciones, emulsiones, espumas y formulaciones que contienen liposomas. Las composiciones farmacéuticas y formulaciones de la presente divulgación pueden comprender uno o más potenciadores de la penetración, vehículos, excipientes u otros principios activos o inactivos.

Las emulsiones normalmente son sistemas heterogéneos de un líquido dispersado en otro en forma de gotitas que normalmente superan 0,1 μm de diámetro. Las emulsiones pueden contener componentes adicionales, además de las fases dispersas, y el fármaco activo que puede estar presente como una disolución en la fase acuosa, fase oleosa o por sí mismo como una fase separada. Las microemulsiones están incluidas como un aspecto de la presente divulgación. Las emulsiones y sus usos se conocen bien en la técnica y se describen adicionalmente en la Pat. de Estados Unidos n.º 6.287.860.

Las formulaciones de la presente divulgación incluyen formulaciones liposomales. Como se usa en la presente divulgación, el término "liposoma" significa una vesícula compuesta de lípidos anfílicos dispuestos en una bicapa o bicapas esféricas. Los liposomas son vesículas unilaminares o multilaminares que tienen una membrana formada de

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 5 catiónicos como no catiónicos para administrar ADN a células.

Los liposomas también incluyen liposomas "estéricamente estabilizados", una expresión que, 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 mejoradas con respecto a los 10 liposomas que carecen de tales lípidos especializados. Los ejemplos de liposomas estéricamente estabilizados son aquellos en los que parte de la porción de lípido que forma la vesícula del liposoma comprende uno o más glicolípidos o se derivatiza con uno o más polímeros hidrófilos, tales como un resto de polietilenglicol (PEG). Los liposomas y sus usos se describen adicionalmente en la Pat. de Estados Unidos n.º 6.287.860.

15 Las formulaciones farmacéuticas y composiciones de la presente divulgación también pueden incluir tensioactivos. El uso de tensioactivos en medicamentos, formulaciones y en emulsiones es muy conocido en la técnica. Los tensioactivos y sus usos se describen adicionalmente en la Pat. de Estados Unidos n.º 6.287.860.

En un aspecto, la presente divulgación emplea diversos potenciadores de la penetración para efectuar la eficaz 20 administración de ácidos nucleicos, particularmente oligonucleótidos. Además de ayudar en la difusión de fármacos no lipófilos a través de membranas celulares, los potenciadores de la penetración también potencian la permeabilidad de fármacos lipófilos. Los potenciadores de la penetración pueden clasificarse como pertenecientes a una de cinco amplias categorías, es decir, tensioactivos, ácidos grasos, sales biliares, agentes quelantes y no tensioactivos no quelantes. Los potenciadores de la penetración y sus usos se describen adicionalmente en la Pat. 25 de Estados Unidos n.º 6.287.860.

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

30 Las formulaciones 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. Los lípidos y liposomas 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). 35

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 40 preferidos, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, y sus usos se describen adicionalmente en la Pat. de Estados Unidos n.º 6.287.860.

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, 45 comprimidos o minicompimidos. Pueden ser deseables espesantes, aromatizantes, diluyentes, emulsionantes, adyuvantes de dispersión o aglutinantes. Las formulaciones orales son aquellas en las que los oligonucleótidos de la divulgación se administran conjuntamente con uno o más potenciadores de la penetración, tensioactivos y quelantes. Los tensioactivos incluyen ácidos grasos y/o ésteres o sales de los mismos, ácidos biliares y/o sales de los mismos. Los ácidos biliares/sales y ácidos grasos y sus usos se describen adicionalmente en la Pat. de Estados Unidos n.º 50 6.287.860. También son combinaciones de potenciadores de la penetración, por ejemplo, ácidos grasos/sales en combinación con ácidos biliares/sales. Una combinación particular es la sal de sodio de ácido láurico, ácido cáprico y UDCA. Los potenciadores de la penetración adicionales incluyen éter polioxietileno-9-laurílico, éter polioxietileno-20-cetílico. Los oligonucleótidos de la divulgación pueden administrarse por vía oral, en forma granulada que incluye partículas secadas por pulverización, o complejados para formar micro o nanopartículas. Los agentes de 55 complejantes de oligonucleótidos y sus usos se describen adicionalmente en la Pat. de Estados Unidos n.º 6.287.860.

Las composiciones y formulaciones para administración parenteral, intratecal o intraventricular pueden incluir soluciones acuosas estériles que también pueden contener tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados tales

como, pero sin limitación, potenciadores de la penetración, compuestos portadores y otros vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables.

- Ciertos aspectos de la divulgación proporcionan composiciones farmacéuticas que contienen uno o más compuestos oligoméricos y uno o más agentes quimioterapéuticos diferentes que funcionan por un mecanismo no antisentido. Los ejemplos de tales agentes quimioterapéuticos incluyen, pero sin limitación, 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-hidroxiperóxido-ciclofosfamida, 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, tales 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 varios de otros de tales agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, 5-FU, MTX y oligonucleótido, o 5-FU, radioterapia y oligonucleótido). Los fármacos antiinflamatorios, que incluyen, pero sin limitación, fármacos antiinflamatorios no esteroideos y corticosteroides, y fármacos antivirales, que incluyen, pero sin limitación, 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.
- 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 un gen antivírico, 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 de la misma diana de ácido nucleico de un gen antivírico. 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.

35 *Dosificación:*

- Se cree que la formulación de composiciones terapéuticas y su posterior administración (dosificación) están dentro de la experiencia de los expertos en la técnica. 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 encuentra que son eficaces en modelos animales *in vitro* e *in vivo*. En general, la dosificación es de 0,01 μg a 100 g por kg de peso corporal, y puede administrarse una vez o más diariamente, semanalmente, mensualmente o anualmente, o incluso una vez cada 2 a 20 años. Los expertos en la técnica pueden estimar fácilmente tasas de repetición para la dosificación basándose en tiempos de residencia medidos y concentraciones del fármaco en los fluidos o tejidos corporales. Tras el tratamiento satisfactorio, puede desearse que el paciente reciba terapia de mantenimiento para prevenir la reaparición de la patología, donde el oligonucleótido se administra en dosis de mantenimiento, que oscilan de 0,01 μg a 100 g por kg de peso corporal, una vez o más diariamente, a una vez cada 20 años.

- En aspectos, un paciente se trata con una dosificación de fármaco que es al menos aproximadamente 1, al menos aproximadamente 2, al menos aproximadamente 3, al menos aproximadamente 4, al menos aproximadamente 5, al menos aproximadamente 6, al menos aproximadamente 7, al menos aproximadamente 8, al menos aproximadamente 9, al menos aproximadamente 10, al menos aproximadamente 15, al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 25, al menos aproximadamente 30, al menos aproximadamente 35, al menos aproximadamente 40, al menos aproximadamente 45, al menos aproximadamente 50, al menos aproximadamente 60, al menos aproximadamente 70, al menos aproximadamente 80, al menos aproximadamente 90, o al menos

aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal. Ciertas dosificaciones inyectadas de oligonucleótidos antisentido se describen, por ejemplo, en la Pat. de Estados Unidos n.º 7.563.884, "Antisense modulation of PTP1B expression".

Aunque se han descrito anteriormente diversos aspectos de la presente divulgación, debe entenderse que se han presentado únicamente a modo de ejemplo, y no de limitación. Pueden hacerse numerosos cambios a los aspectos descritos de acuerdo con la divulgación en el presente documento sin apartarse del espíritu o alcance de la divulgación. Por lo tanto, la amplitud y alcance de la presente divulgación no debe limitarse por ninguno de los aspectos que se han descrito anteriormente.

10 Por la mención de diversas referencias en este documento, los Solicitantes no admiten que ninguna referencia particular sea "técnica anterior" a su invención. Los aspectos de las composiciones y métodos inventivos se ilustran en los siguientes ejemplos

EJEMPLOS

15

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

20 *Ejemplo 1: Diseño de oligonucleótidos antisentido específicos para una molécula de ácido nucleico antisentido a un gen antivírico y/o una hebra sentido de un polinucleótido de un gen antivírico*

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

La selección de oligonucleótidos apropiados se facilita usando programas informáticos que alinean automáticamente secuencias de ácidos nucleicos e indican regiones de identidad u homología. Tales 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 se han secuenciado, se realizan Southern blots para permitir una determinación del grado de identidad entre genes en especies diana y otras especies. Realizando Southern blots a grados de astringencia variables, como se sabe bien en la técnica, es posible obtener una medida aproximada de la identidad. Estos procedimientos permiten la selección de oligonucleótidos que presentan un alto grado de complementariedad con secuencias de ácidos nucleicos diana en un sujeto que va a controlarse y un menor grado de complementariedad con secuencias de ácidos nucleicos correspondientes en otras especies. Un experto en la técnica se dará cuenta de que hay libertad considerable en la selección de regiones apropiadas de genes para su uso en la presente divulgación.

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

Las propiedades de hibridación de los oligonucleótidos descritos en el presente documento pueden determinarse por uno o más ensayos *in vitro* 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 métodos establecidos de medición de la intensidad de interacciones intermoleculares, por ejemplo, un ensayo de la curva de fusión.

El ensayo de la curva de fusión determina la temperatura a la que se produce una rápida transición de conformación bicatenaria a monocatenaria para el complejo de antisentido natural/molécula. Esta temperatura es ampliamente

aceptada como una medida fiable de la intensidad de interacción entre las dos moléculas.

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

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

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

Ejemplo 2: Modulación de un polinucleótido de un gen antivírico

30 Tratamiento de células HepG2 con oligonucleótidos antisentido

Se cultivaron células HepG2 de ATCC (cat. n.º HB-8065) en medio de crecimiento (MEM/EBSS (Hyclone, cat. n.º SH30024 o Mediatech, cat. n.º MT-10-010-CV) + FBS al 10 % (Mediatech, cat. n.º MT35-011-CV) + penicilina/estreptomina (Mediatech, cat. n.º MT30-002-Cl)) a 37 °C y CO₂ al 5 %. 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 CO₂ al 5 %. El día del experimento, el medio en las placas de 6 pocillos se cambió a medio de crecimiento nuevo. 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, cat. n.º 31985-070) y 4 µl de Lipofectamine 2000 (Invitrogen, cat. n.º 11668019) a temperatura ambiente durante 20 min y se aplicó a cada pocillo de las placas de 6 pocillos con células HepG2. Se usó una mezcla similar que incluía 2 µl de agua en lugar de la solución de oligonucleótido para los controles transfectados con vector vacío. Después de 3-18 h de incubación a 37 °C y CO₂ al 5 %, el medio se cambió a medio de crecimiento nuevo. 48 h después de la adición de oligonucleótidos antisentido, el medio se eliminó y se extrajo ARN de las células usando el sistema de aislamiento de ARN total SV de Promega (cat. n.º Z3105) o el kit de aislamiento de ARN total RNeasy de Qiagen (cat. n.º 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 (cat. n.º AB1453B) o el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (cat. n.º 4368813) 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 mezcla de expresión génica Taqman de ABI (cat. n.º 4369510) y cebadores/sondas diseñados por ABI (ensayo de expresión génica Taqman de Applied Biosystems: Hs00204833_ml, Hs00223420_ml, Hs00855471_gl 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 ciclador térmico Mx4000 (Stratagene).

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

Resultados

Los resultados de PCR en tiempo real muestran que los niveles de ARNm de RIG1 en las células HepG2 se aumentan significativamente 48 h después de tratamiento con siRNA para RIG1 antisentido hs.601664 y AK300104 (Fig. 1).

- 5 Los resultados de PCR en tiempo real muestran que los niveles de ARNm de MDA5 en las células HepG2 se aumentan significativamente 48 h después de tratamiento con dos de los oligos diseñados para MDA5 antisentido BU663736. (Fig. 2).

- 10 Los resultados de PCR en tiempo real muestran que los niveles de ARNm de IFNA1 en las células HepG2 se aumentan significativamente 48 h después de tratamiento con uno oligo diseñado para IFNA1 antisentido DA393812 (Fig. 3).

Tratamiento de células ZR75 con oligonucleótidos antisentido:

- 15 Se cultivaron células ZR75 de ATCC (cat. n.º CRL-1500) en medio de crecimiento (MEM/EBSS (Hyclone, cat. n.º SH30024 o Mediatech, cat. n.º MT-10-010-CV) + FBS al 10 % (Mediatech, cat. n.º MT35-011-CV) + penicilina/estreptomycin (Mediatech, cat. n.º MT30-002-CI)) a 37 °C y CO2 al 5 %. Un día antes del experimento, las células volvieron a sembrarse a la densidad de 1,5 x 5/ml en placas de 6 pocillos y se incubaron a 37 °C y CO2 al 5 %.
- 20 El día del experimento, el medio en las placas de 6 pocillos se cambió a medio de crecimiento nuevo. 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, cat. n.º 31985-070) y 4 µl de Lipofectamine 2000 (Invitrogen, cat. n.º 11668019) a temperatura ambiente durante 20 min y se aplicó a cada pocillo de las placas de 6 pocillos con células ZR75. Se usó una mezcla similar que incluía 2 µl de agua en lugar de la solución de oligonucleótido para los controles transfectados con vector vacío. Después de 3-18 h de incubación a 37 °C y CO2 al 5 %, el medio se cambió a medio
- 25 de crecimiento nuevo. 48 h después de la adición de oligonucleótidos antisentido, el medio se eliminó y se extrajo ARN de las células usando el sistema de aislamiento de ARN total SV de Promega (cat. n.º Z3105) o el kit de aislamiento de ARN total RNeasy de Qiagen (cat. n.º 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 (cat. n.º AB1453B) o el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (cat. n.º 4368813) como se describe en el
- 30 protocolo del fabricante. El ADNc de esta reacción de transcripción inversa se usó para monitorizar la expresión génica por PCR en tiempo real usando mezcla de expresión génica Taqman de ABI (cat. n.º 4369510) y cebadores/sondas diseñados por ABI (ensayo de expresión génica Taqman de Applied Biosystems: Hs00855471_g1. 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
- 35 Biosystems).

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

- 40 **Resultados:** Los resultados de PCR en tiempo real muestran que los niveles de ARNm de IFNA1 en las células ZR75 se aumentan significativamente 48 h después de tratamiento con uno oligo diseñado para IFNA1 antisentido DA393812 (Fig. 4).

Tratamiento de células HUVEC con oligonucleótidos antisentido

- 45 Las células HUVEC de la ATCC (Promo Cell cat. n.º C-12253) se cultivaron en medio de crecimiento epitelial (Promo Cell cat n.º C-22010) a 37 °C y CO2 al 5 %. Un día antes del experimento, las células volvieron a sembrarse usando el kit Promo Cell Detach (cat n.º C-41200) a la densidad de 1,5 x 10⁴/ml en placas de 6 pocillos y se incubaron a 37 °C y CO2 al 5 %. El día del experimento, el medio en las placas de 6 pocillos se cambió a medio de crecimiento
- 50 epitelial nuevo. 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, cat. n.º 31985-070) y 4 µl de Lipofectamine 2000 (Invitrogen, cat. n.º 11668019) a temperatura ambiente durante 20 min y se aplicó a cada pocillo de las placas de 6 pocillos con células HUVEC. Se usó una mezcla similar que incluía 2 µl de agua en lugar de la solución de oligonucleótido para los controles transfectados con vector vacío. Después de 3-18 h de incubación a 37 °C y CO2 al 5 %, el medio se
- 55 cambió a medio de crecimiento nuevo. 48 h después de la adición de oligonucleótidos antisentido, el medio se eliminó y se extrajo ARN de las células usando el sistema de aislamiento de ARN total SV de Promega (cat. n.º Z3105) o el kit de aislamiento de ARN total RNeasy de Qiagen (cat. n.º 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 (cat. n.º AB1453B) 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 mezcla de expresión génica Taqman de ABI (cat. n.º 4369510) y cebadores/sondas diseñados por ABI (ensayos de expresión génica Taqman de Applied Biosystems: Hs00153340_m1 y Hs00855471_g1 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 Inc.) o un ciclador térmico Mx4000 (Stratagene).

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

Resultados: Los resultados de PCR en tiempo real muestran que los niveles de ARNm de IFNA1 en las células HUVEC se aumentan significativamente 48 h después de tratamiento con uno oligo diseñado para IFNA1 antisentido DA393812 (Fig. 5).

15 *Tratamiento de células MCF-7 con oligonucleótidos antisentido:*

Se cultivaron células MCF-7 de ATCC (cat. n.º HTB-22) en medio de crecimiento (MEM/EBSS (Hyclone, cat. n.º SH30024 o Mediatech, cat. n.º MT-10-010-CV) + FBS al 10 % (Mediatech, cat. n.º MT35-011-CV) + penicilina/estreptomicina (Mediatech, cat. n.º MT30-002-CI)) a 37 °C y CO2 al 5 %. Un día antes del experimento, las células volvieron a sembrarse a la densidad de 1,5 x 5/ml en placas de 6 pocillos y se incubaron a 37 °C y CO2 al 5 %. El día del experimento, el medio en las placas de 6 pocillos se cambió a medio de crecimiento nuevo. 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, cat. n.º 31985-070) y 4 µl de Lipofectamine 2000 (Invitrogen, cat. n.º 11668019) a temperatura ambiente durante 20 min y se aplicó a cada pocillo de las placas de 6 pocillos con células MCF-7. Se usó una mezcla similar que incluía 2 µl de agua en lugar de la solución de oligonucleótido para los controles transfectados con vector vacío. Después de 3-18 h de incubación a 37 °C y CO2 al 5 %, el medio se cambió a medio de crecimiento nuevo. 48 h después de la adición de oligonucleótidos antisentido, el medio se eliminó y se extrajo ARN de las células usando el sistema de aislamiento de ARN total SV de Promega (cat. n.º Z3105) o el kit de aislamiento de ARN total RNeasy de Qiagen (cat. n.º 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 (cat. n.º AB1453B) o el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (cat. n.º 4368813) 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 mezcla de expresión génica Taqman de ABI (cat. n.º 4369510) y cebadores/sondas diseñados por ABI (ensayo de expresión génica Taqman de Applied Biosystems: Hs00855471_g1. 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).

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

Resultados: Los resultados del ensayo ELISA muestran que la proteína IFNA se aumentó en extractos de células MCF7 que se trataron con oligos diseñados para IFNA1 antisentido DA39381 (Fig. 6).

Aunque la divulgación se ha ilustrado y descrito con respecto a una o más implementaciones, tendrán lugar alteraciones equivalentes y modificaciones para otros expertos en la técnica tras la lectura y comprensión de esta memoria descriptiva y los dibujos adjuntos. Además, aunque puede haberse desvelado una característica particular de la divulgación con respecto únicamente a una de varias implementaciones, dicha característica puede combinarse con una o más características diferentes de otras implementaciones según pueda desearse y sea ventajoso para cualquier aplicación determinada o particular.

El Resumen de la divulgación permitirá al lector determinar rápidamente la naturaleza de la divulgación técnica. Se presenta con el entendimiento de que no se usará para interpretar ni limitar el alcance o significado de las siguientes reivindicaciones.

55

LISTA DE SECUENCIAS

<110> CuRNA, Inc.

<120> TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES RELACIONADAS CON UN GEN ANTIVÍRICO MEDIANTE LA

INHIBICIÓN DE UNA TRANSCRIPCIÓN ANTISENTIDO NATURAL A UN GEN ANTIVÍRICO.

<130> Genes antiviricos
 <150> 61/181.773
 <151> 28-05-2009
 5 <150> 61/237.886
 <151> 28-08-2009
 <150> 61/231.458
 <151> 05-08-2009
 <160> 39
 10 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 4759
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 15 <300>
 <308> NM_014314.3
 <309> 19-04-2010
 <313> (1)..(4759)
 <400> 1
 20

tagttattaa	agttcctatg	cagctccgcc	tcgcgctcgg	cctcatttcc	tcggaaaatc	60
cctgctttcc	ccgctcgcca	cgccctcctc	ctacccggct	ttaaagctag	tgaggcacag	120
cctgcgggga	acgtagctag	ctgcaagcag	aggccggcat	gaccaccgag	cagcgacgca	180
gcctgcaagc	cttccaggat	tatatccgga	agaccctgga	ccctacctac	atcctgagct	240
acatggcccc	ctggtttagg	gaggaagagg	tgcagtatat	tcaggctgag	aaaaacaaca	300
agggcccaat	ggaggctgcc	acactttttc	tcaagttcct	gttggagctc	caggaggaag	360
gctggttccg	tggctttttg	gatgccctag	accatgcagg	ttattctgga	ctttatgaag	420
ccattgaaag	ttgggatttc	aaaaaaaaattg	aaaagttgga	ggagtataga	ttacttttaa	480
aacgtttaca	accagaattt	aaaaccagaa	ttatcccaac	cgatatcatt	tctgatctgt	540
ctgaatgttt	aattaatcag	gaatgtgaag	aaattctaca	gatttgctct	actaagggga	600
tgatggcagg	tcagagaaa	ttggtggaat	gccttctcag	atcagacaag	gaaaactggc	660
ccaaaacttt	gaaacttgct	ttggagaaag	aaaggaacaa	gttcagtgaa	ctgtggattg	720
tagagaaagg	tataaaagat	gttgaaacag	aagatcttga	ggataagatg	gaaacttctg	780
acatacagat	tttctaccaa	gaagatccag	aatgccagaa	tcttagtgag	aattcatgtc	840
caccttcaga	agtgtctgat	acaaacttgt	acagcccatt	taaaccaaga	aattaccaat	900
tagagcttgc	tttgcctgct	atgaaaggaa	aaaacacaat	aatatgtgct	cctacaggtt	960

ES 2 618 576 T3

gtggaaaaac ctttgtttca ctgcttatat gtgaacatca tcttaaaaaa ttoccacaag 1020
 gacaaaaggg gaaagtgtc ttttttgcga atcagatccc agtgtatgaa cagcagaaat 1080
 ctgtattctc aaaatacttt gaaagacatg ggtatagagt tacaggcatt tctggagcaa 1140
 cagctgagaa tgtcccagtg gaacagattg ttgagaacaa tgacatcatc attttaactc 1200
 cacagattct tgtgaacaac cttaaaaagg gaacgattcc atcactatcc atctttactt 1260
 tgatgatatt tgatgaatgc cacaacacta gtaacaacaa cccgtacaat atgatcatgt 1320
 ttaattatct agatcagaaa cttggaggat cttcaggccc actgccccag gtcattgggc 1380
 tgactgcctc ggttgggtgtt ggggatgcca aaaacacaga tgaagccttg gattatatct 1440
 gcaagctgtg tgcttctctt gatgcgtcag tgatagcaac agtcaaacac aatctggagg 1500
 aactggagca agttgtttat aagccccaga agtttttcag gaaagtggaa tcacggatta 1560
 gcgacaaatt taaatacatc atagctcagc tgatgaggga cacagagagt ctggcaaaga 1620
 gaatctgcaa agacctcgaa aacttatctc aaattcaaaa tagggaattt ggaacacaga 1680
 aatatgaaca atggattgtt acagttcaga aagcatgcat ggtgttccag atgccagaca 1740
 aagatgaaga gagcaggatt tgtaaagccc tgtttttata cacttcacat ttgctgaaat 1800
 ataatgatgc cctcattatc agtgagcatg cacgaatgaa agatgctctg gattacttga 1860
 aagacttctt cagcaatgtc cgagcagcag gattcgatga gattgagcaa gatcttactc 1920
 agagatttga agaaaagctg caggaactag aaagtgttc cagggatccc agcaatgaga 1980
 atcctaaaact tgaagacctc tgcttcatct tacaagaaga gtaccactta aaccagaga 2040
 caataacaat tctctttgtg aaaaccagag cacttgtgga cgctttaaaa aattggattg 2100
 aaggaaatcc taaactcagt tttctaaaac ctggcatatt gactggacgt ggcaaaaacaa 2160
 atcagaacac aggaatgacc ctcccggcac agaagtgtat attggatgca ttcaaagcca 2220
 gtggagatca caatattctg attgccacct cagttgctga tgaaggcatt gacattgcac 2280
 agtgcfaatct tgtcatcctt tatgagtatg tgggcaatgt catcaaatg atocaaacca 2340
 gaggcagagg aagagcaaga ggtagcaagt gcttccttct gactagtaat gctggtgtaa 2400
 ttgaaaaaga acaataaac atgtacaaag aaaaaatgat gaatgactct attttacgcc 2460
 ttcagacatg ggacgaagca gtatttaggg aaaagattct gcatatacag actcatgaaa 2520
 aattcatcag agatagtcaa gaaaaaccaa aacctgtacc tgataaggaa aataaaaaac 2580
 tgctctgcag aaagtgcaaa gccttggcat gttacacagc tgacgtaaga gtgatagagg 2640
 aatgccatta cactgtgctt ggagatgctt ttaaggaatg ctttgtgagt agaccacatc 2700
 ccaagccaaa gcagttttca agttttgaaa aaagagcaaa gatattctgt gcccgacaga 2760
 actgcagcca tgactgggga atccatgtga agtacaagac atttgagatt ccagttataa 2820
 aaattgaaag ttttgggtg gaggatattg caactggagt tcagacactg tactcgaagt 2880
 ggaaggactt tcattttgag aagataccat ttgatccagc agaaatgtcc aatgatatc 2940

ES 2 618 576 T3

aggtcctcaa tcttcagcta cagggaatga gtaactttga gtggagaaga aacaaacata 3000
 gtgggtataa tcatggatcg cttgtacccc tgtgaaaata tattttttaa aatatcctt 3060
 agcagtttgt actatattat atatgcaaag cacaaatgag tgaatcacag cactgagtat 3120
 tttgtaggcc aacagagctc atagtacttg ggaaaaatta aaaagcctca tttctagcct 3180
 tctttttaga gtcaactgcc aacaaacaca cagtaatcac tctgtacaca ctgggataga 3240
 tgaatgaatg gaatgttggg aatttttatc tccctttgtc tccttaacct actgtaaact 3300
 ggcttttgcc cttaacaatc tactgaaatt gttcttttga aggttaccag tgactctggt 3360
 tgccaaatcc actgggcact tcttaacctt ctatttgacc tctgcgcatt tggccctggt 3420
 gagcactctt cttgaagctc tccctgggct tctctctctt ctagtctctat tctagtcttt 3480
 ttttattgag tcctcctctt tgctgatccc ttccaagggt tcaatatata tacatgtata 3540
 tactgtacat atgtatatgt aactaatata catacataca ggtatgtata tgtaatggtt 3600
 atatgtactc atgttcctgg tgtagcaacg tgtggtatgg ctacacagag aacatgagaa 3660
 cataaagcca tttttatgct tactactaaa agctgtccac tgtagagttg ctgtatgtag 3720
 caatgtgtat ccaactctaca gtggtcagct tttagtagag agcataaaaa tgataaaata 3780
 cttcttgaaa acttagttta ctatacatct tgccctatta atatgttctc ttaacgtgtg 3840
 ccattgttct ctttgaccat tttcctataa tgatggtgat gttcaacacc tggactgaat 3900
 gtctgttctc agatcccttg gatgttacag atgaggcagt ctgactgtcc tttctacttg 3960
 aaagattaga atatgtatcc aaatggcatt cacgtgtcac ttagcaagggt ttgctgatgc 4020
 ttcaaagagc ttagtttgcg gtttcctgga cgtggaaaca agtatctgag ttccctggag 4080
 atcaacggga tgaggtgtta cagctgcctc cctcttcatg caatctggtg agcagtggtg 4140
 caggcgggga gccagagaaa cttgccagtt atataacttc tctttggctt ttcttcatct 4200
 gtaaaacaag gataaactg aactgtaagg gttagtgag agtttttaat taaaagaatg 4260
 tgtgaaaagt acatgacaca gtagtgtctt gataatagtt actagtagta gtattcttac 4320
 taagacccaa tacaatgga ttatttaaac caagtttatg agttggtttt ttttcatttt 4380
 ctatttgtat tttattaaga gtgtcttttc ttatgtgatt ttttttaatt gctatttgat 4440
 atggtttggc tatatgtccc caccctaatc tcatcttgaa ttataatccc catgtgtcaa 4500
 gggaggggacc tgacgggag tgattggatc acgggggagc ttgtcccat gctgttcttg 4560
 ggatagtgag ttagttctca tgagatctga tggttttata agtgtttgac aattcctcct 4620
 ttacacacac tctctctctc atctgctgcc atgtaagact tgccctgctc ccttctgcc 4680
 atgattgtaa gtttcctgag gcctcctcag ccatgtggaa ctgtgaaatct attaagcctc 4740
 ttttctttat aaatgaaaa 4759

<210> 2

<211> 3434

5 <212> ADN

ES 2 618 576 T3

<213> Homo sapiens
 <300>
 <308> NM_022168.2
 <309> 16-05-2010
 5 <313> (1)..(3434)
 <400> 2

```

gccccgctgc ccacctgccc gcctgcccac ctgccaggt gcgagtgcag ccccgcgcgc      60
cggcctgaga gccctgtgga caacctcgtc attgtcaggc acagagcggg agaccctgct      120
tctctaagtg ggcagcggac agcggcacgc acatttcacc tgtcccgcag acaacagcac      180
catctgcttg ggagaaccct ctcccttctc tgagaaagaa agatgtcgaa tgggtattcc      240
acagacgaga atttccgcta tctcatctcg tcttcaggg ccagggtgaa aatgtacatc      300
caggtggagc ctgtgctgga ctacctgacc tttctgcctg cagaggtgaa ggagcagatt      360
cagaggacag tcgccacctc cgggaacatg caggcagttg aactgctgct gagcaccttg      420
gagaagggag tctggcacct tggttggact cgggaattcg tggaggccct ccggagaacc      480
ggcagccctc tggccgcccg ctacatgaac cctgagctca cggacttgcc ctctccatcg      540
tttgagaacg ctcatgatga atatctccaa ctgctgaacc tccttcagcc cactctggtg      600
gacaagcttc tagttagaga cgtcttggat aagtgcattg aggaggaact gttgacaatt      660
gaagacagaa accggattgc tgctgcagaa aacaatggaa atgaatcagg tgtaagagag      720
ctactaaaaa ggattgtgca gaaagaaaac tggttctctg catttctgaa tgttcttcgt      780
caaacaggaa acaatgaact tgtccaagag ttaacaggct ctgattgctc agaaagcaat      840
gcagagattg agaatztatc acaagttgat ggtcctcaag tggagagca acttctttca      900
accacagttc agccaaatct ggagaaggag gtctggggca tggagaataa ctcatcagaa      960
tcatcttttg cagattcttc tgtagtttca gaatcagaca caagtttggc agaaggaagt     1020
gtcagctgct tagatgaaag tcttggacat aacagcaaca tgggcagtga ttcaggcacc     1080
atgggaagtg attcagatga agagaatgtg gcagcaagag catccccgga gccagaactc     1140
cagctcaggc cttaccaaat ggaagttgcc cagccagcct tggaggggaa gaatatcatc     1200
atctgectcc ctacaggag tggaaaaacc agagtggctg tttacattgc caaggatcac     1260
ttagacaaga agaaaaaagc atctgagcct ggaaaagtta tagttcttgt caataaggta     1320
ctgetagttg aacagctctt ccgcaaggag ttccaacat ttttgaagaa atggtatcgt     1380
gttattggat taagtgggta tacccaactg aaaatatcat ttccagaagt tgtcaagtcc     1440
tgtgatatta ttatcagtac agctcaaate cttgaaaact ccctcttaa cttggaaaat     1500
ggagaagatg ctggtgttca attgtcagac ttttcctca ttatcattga tgaatgtcat     1560
cacaccaaca aagaagcagt gtataataac atcatgaggc attatttgat gcagaagttg     1620
aaaaacaata gactcaagaa agaaaacaaa ccagtgattc cccttctca gatactggga     1680
    
```

ES 2 618 576 T3

ctaacagctt cacctggtgt tggaggggcc acgaagcaag ccaaagctga agaacacatt 1740
 ttaaaactat gtgccaatct tgatgcattt actattaaaa ctgttaaaga aaaccttgat 1800
 caactgaaaa accaaataca ggagccatgc aagaagtttg ccattgcaga tgcaaccaga 1860
 gaagatccat ttaaagagaa acttctagaa ataatgacaa ggattcaaac ttattgtcaa 1920
 atgagtccaa tgtcagattt tggaactcaa ccctatgaac aatgggccat tcaaatggaa 1980
 aaaaaagctg caaaagaagg aaatcgcaaa gaacgtgttt gtgcagaaca tttgaggaag 2040
 tacaatgagg ccctacaaat taatgacaca attcgaatga tagatgcgta tactcatctt 2100
 gaaactttct ataatgaaga gaaagataag aagtttgtag tcatagaaga tgatagtgat 2160
 gaggggtgtg atgatgagta ttgtgatggt gatgaagatg aggatgattt aaagaaacct 2220
 ttgaaactgg atgaaacaga tagattttctc atgactttat tttttgaaaa caataaaatg 2280
 ttgaaaaggc tggctgaaaa ccgagaatat gaaaatgaaa agctgaccaa attaagaaat 2340
 accataatgg agcaatatac taggactgag gaatcagcac gaggaataat ctttacaaaa 2400
 acacgacaga gtgcatatgc gctttcccag tggattactg aaaatgaaaa atttgctgaa 2460
 gtaggagtca aagcccacca tctgattgga gctggacaca gcagtgagtt caaacccatg 2520
 acacagaatg aacaaaaaga agtcattagt aaatttcgca ctggaaaaat aaatctgctt 2580
 atcgctacca cagtggcaga agaaggtctg gatattaaag aatgtaacat tgttatccgt 2640
 tatggtctcg tcaccaatga aatagccatg gtcaggccc gtggtcgagc cagagctgat 2700
 gagagcacct acgtcctggt tgetcacagt ggttcaggag ttatcgaaca tgagacagtt 2760
 aatgatttcc gagagaagat gatgtataaa gctatacatt gtgttcaaaa tatgaaacca 2820
 gaggagtatg ctcataagat tttggaatta cagatgcaaa gtataatgga aaagaaaatg 2880
 aaaaccaaga gaaatattgc caagcattac aagaataacc catcactaat aactttcctt 2940
 tgcaaaaact gcagtgtgct agcctgttct ggggaagata tccatgtaat tgagaaaatg 3000
 catcacgtca atatgacccc agaattcaag gaactttaca ttgtaagaga aaacaaagca 3060
 ctgcaaaaaga agtgtgccga ctatcaaata aatggtgaaa tcatctgcaa atgtggccag 3120
 gcttggggaa caatgatggt gcacaaaggc ttagatttgc cttgtctcaa aataaggaat 3180
 tttgtagtgg ttttcaaaaa taattcaaca aagaaacaat acaaaaagtg ggtagaatta 3240
 cctatcacat ttcccaatct tgactattca gaatgctggt tatttagtga tgaggattag 3300
 cacttgattg aagattcttt taaaatacta tcagttaaac atttaatatg attatgatta 3360
 atgtattcat tatgctacag aactgacata agaatcaata aaatgattgt tttactctgc 3420
 aaaaaaaaaa aaaa 3434

<210> 3
 <211> 876
 5 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

ES 2 618 576 T3

<300>
 <308> NM_024013.1
 <309> 16-05-2010
 <313> (1)..(876)
 5 <400> 3

```

agaacctaga gcccaaggtt cagagtcacc catctcagca agcccagaag tatctgcaat      60
atctacgatg gcctcgccct ttgctttact gatggctctg gtgggtgctca gctgcaagtc     120
aagctgctct ctgggctgtg atctccctga gaccacagc ctggataaca ggaggacctt     180
gatgctcctg gcacaaatga gcagaatctc tccttcctcc tgtctgatgg acagacatga     240
ctttggattt ccccaggagg agtttgatgg caaccagttc cagaaggctc cagccatctc     300
tgtcctccat gagctgatcc agcagatctt caacctcttt accacaaaag attcatctgc     360
tgcttgggat gaggacctcc tagacaaatt ctgcaccgaa ctctaccagc agctgaatga     420
cttgggaagcc tgtgtgatgc aggaggagag ggtgggagaa actcccctga tgaatgcgga     480
ctccatcttg gctgtgaaga aatacttccg aagaatcact ctctatctga cagagaagaa     540
atacagccct tgtgcctggg aggttgtcag agcagaaatc atgagatccc tctctttatc     600
aacaacttg caagaaagat taaggaggaa ggaataacat ctggccaac atgaaaacaa     660
ttcttattga ctcatacacc aggtcacgct ttcattgaatt ctgtcatttc aaagactctc     720
accctgcta taactatgac catgtgata aactgattta tctatttaa tatttattta     780
actattcata agatttaa atttttgtt catataacgt catgtgcacc tttacactgt     840
ggttagtgta ataaaacatg ttccttatat ttactc      876
    
```

<210> 4
 10 <211> 1267
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 4

```

tctttcacc catctttatt ctctgctcca tgaggaaaga aaaacagctt cctcctcatt      60
ctgatttctt tttttttttt tttttttatt ataactaag ttttagggta catgtgcaca     120
ttgtgcaggt tagttacata tgtatacatg tgccatgctg gtgcgctgca cccactaatg     180
tgteatctag cattaggtat atctcccaat getatecctc cccctcccc cgacccacc     240
acagtccctt cacaaccaca actgtcatac cgttcacccc ttattcctcc agaatgaaac     300
accaccaa atcctgaagcgt ccaccatgga aatcagttct tggatacctc tgggctgtct     360
acatgttaag atggctgcag agtgaccaga gaattctggg gcgggggatg gggagtgtct     420
tagtgacagc aggccacaca cagacaatgg acagtacagc tggggcgctg ggggaagaaag     480
cagtctgcca gtactctgct catccctctc cctttcctgt tcttgagat tgcctaaag     540
agctccaagc ttttgcctc tgttctgcag agttccttcc ttcggttaa acccatatac     600
    
```

15

ES 2 618 576 T3

agggaccagg atgctcaaac ccaaaccocca aacccttatac aaagcaccca caaaaggggg 660
 gctcaccctt agaaccataa ttcccttttag tcttaagaat ataagatttt ccctacctcg 720
 ttatactttt actaagcctt tttttgtttg tttttttgag acggagtctt actctgttgc 780
 ccaggctgga gtgcagtggc gcgatctcgg ctcaactgcaa gctctgcctc ccgggttcac 840
 gccattctcc tgccctcagcc tcccgagtag ctgggactac aggtgccctg caccgcgcct 900
 ggctaatttt ttgtattttt agtagagacg gggtttcacc gtgggtctcaa tctcctgacc 960
 tcgtgatcca cccgcctcgg cctcccaaag tgctgggatt acaggcatga gccaccgcgc 1020
 ccggccttta ctaagccttt gaaagcaaat ccttcccctt tgagcagggc agctgggcct 1080
 ggtcatgtat gataggacag ggataccaac acaactcagg cttcccagct gccagtaact 1140
 cccagctaca ctggttatag ggcttcttgt tccctacat ctctgcctat ctatctgtaa 1200
 gtgttacggg aacccecaat gctattacat agcctgattc aacagatact taaccattt 1260
 cctcctc 1267

- <210> 5
- <211> 586
- 5 <212> ADN
- <213> Homo sapiens
- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (414)..(414)
- 10 <223> n es a, c, g, o t
- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (442)..(442)
- <223> n es a, c, g, o t
- 15 <220>
- <221> misc_feature
- <222> (452)..(452)
- <223> n es a, c, g, o t
- <220>
- 20 <221> misc_feature
- <222> (529)..(529)
- <223> n es a, c, g, o t
- <220>
- <221> misc_feature
- 25 <222> (580)..(580)
- <223> n es a, c, g, o t
- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (583)..(583)
- 30 <223> n es a, c, g, o t
- <400> 5

gagacggagt ettactctgt tgcccaggct ggagtgcagt ggcgcgatct cggetcactg 60
 caagctctgc ctcccgggtt cacgccatto tcctgcctca gcctcccag tagctgggac 120

ES 2 618 576 T3

tacaggtgcc cgtcaccgcg cctggctaata tttttgtatt tttagtagag acggggtttc 180
accgtggtct caatctcctg acctcgtgat ccaccgcct cggcctcca gagtgtggg 240
attacaggca tgagccaccg cgccccgct ttaactaagcc tttgaaagca aatccttccc 300
ctttgagcag ggcagctggg cctggtcatg tatgatagga cagggatacc aacacaactc 360
aggcttccca gctgccagta actcccagct aactgggta taggggcttc ttgntcccta 420
ccatctctgg ctatctatct gnaagtgtta cnggaacccc aatgtctatt acatagcctg 480
attcaacaga tacttaacc atttctctt acccaattct tctctggng tgctggctac 540
aaaagaatgc ctacatttg ctagcctttt ttttcttaan aanttt 586

<210> 6

<211> 741

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 6

gcagttctgg ggaaaccatt agtaatttgt gatcgtagag atttgtctcc cagtattccc 60
tagggcaaaa atattgggag ttcctagtca cctaaatgaa gaaccttatt tttagcagtt 120
tccctttcag ggtcctaaca ggactgtgga gtaatgtacg gggttatgta ggagcaatgc 180
agagccactt ttgaaaaaca gtagccaagg ttctactggc tgccttetta ggacattatt 240
aaatatcata aacacaagtg gaatttaaca ccagccagt ttgtgtcaa ccagacagcg 300
tcattatgaa caaagattat ataacgatag ctgatattaa gtaagtttta aaagttgaca 360
tccaagagt gaagcctact tattcagtac agatttgtg aatgaaattc gtagttttat 420
ttacggcat aatgaaacag agttccagac atgtacctgc caaatttggg tctggtgtc 480
ttatcgtatg caggctggat acctgctact gtgcttctac aggatgtaa cagtgtcccc 540
tgagtaaaac agttccacgg tcagtacatt tgggaaccac tgagttaaat gggttttatc 600
actgcagaac agacacaaga acaatgtgtg ctgtaaatca ctgtttgag ggaaggtgg 660
cagcaaatgg cacagaaacc cacctgacca cagactgctt tcttctgggc gttcacgcac 720
tgtgtccac aggatactct t 741

10

<210> 7

<211> 251

<212> ADN

<213> Homo sapiens

15 <400> 7

ccctaaaagt ttaaataggt tacttttata agacatttac agttcaatga gctgataagg 60
taattatagg atcacatata tgtgggaatt aagaaatgtg tatgaatgag tcagaaaaaa 120
aataaagcca aggtaagtgt atggatttgg aatcaggaca tcagaagcta aaagactaac 180
tctaaaatag taaaggaatt tgaagtagct agaggggtaa acaagcaaaa aaaagagctc 240

ES 2 618 576 T3

ataataaata t 251

<210> 8
 <211> 681
 5 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 8

ggccggggaa agcgaattct ctctgacacc aagaccaacg ctctagcaaa gtcctccgg 60
 cggatatttt gttttcccag caggttctgc ctaacaata aggtcctttg taggcacaaa 120
 tgtgcagggc ataaaagcat gtgatttggg actttccaa ggggaagtga acagaaactg 180
 ccacagacc ccagcgtgaac agggagtac cctcggctgg tgaatgtagg caggcctggc 240
 tgaggggtgg gagactgcca gggacaggtg agagatgaag ctcagaagac atctttgcag 300
 agatgtggag aagacaggag gaagtccttc ctaaaataaa cctgacctcc tattgctggg 360
 atttatgcag ctttgaccag gacctggtaa cagatgtgga tggacttgaa ccaccaactc 420
 agcttagaag gaagccaaga cttaaagttt cctagatccc agctttttgg aaattttagc 480
 attcaggtgc caggaatgca gatgggacag ccagtgccag aaacaggccc agctatactc 540
 ctcgatggat actctgggcc agcatattca gacacttatt cctcagctgg tgactccgtg 600
 tatacttact tcagtgtctg tgctggacag gatggtgaag tggatgctga agaacttcag 660
 agatgtttga cacagtctgg a 681

10 <210> 9
 <211> 580
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 15 <400> 9

gatgccgaac tgcttcaagt tcctctctgt tctctattcc ctgatatac aagtttctg 60
 gtcctcatac cgtgtggttg agtgaaatca aaacttccac gatagcaatg ctgattggac 120
 aaagaatgtg ttgtggacac aaaaccaaac tctggaggac agaggattca ttccaagggg 180
 ctgcttgat tcaatgactg gtctacgtgg ggggtggaag tccccttact ccacctgtga 240
 agagtcttcc cagtttcaga ccacctccc gcctcctggt attggctaag gccattttgt 300
 gactacactg caggtagaga cagattccct ggaagtacct tctcaaggcc agtgtagagc 360
 tccaatcac ccagcagatt ctccctctcc cactgccccc accaagcagg tctccaggtg 420
 ttccagctgc tgatgaagtc cagtgtggag ttgggtccagg agggctcgtg tccaggcagc 480
 agaggagcgc tctgtgtgga agaggetgaa gatctgctgc agcatctcag gaggacagac 540
 agggcctggg cctgctgcaa ctggctgtca tacacatctc 580

<210> 10
 20 <211> 54
 <212> ARN

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 10	
5	rararcra rgrurura rgrcrurg rgrgruru rarcrurg rcra	54
	<210> 11	
	<211> 54	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 11	
	rurararga rarururg rgrurararg rargrara rarurgrg ruru	54
	<210> 12	
15	<211> 54	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
20	<400> 12	
	rcrargra rgrururg rargrarc rarcgrgu rgrararc rcrc	54
	<210> 13	
	<211> 54	
	<212> ARN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 13	
	rgrururg rgrururc rurgrurg rcraruru rgrcrurg rcra	54
30	<210> 14	
	<211> 54	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 14	
	rurgruru rgrararc rcrararc rurgrcru rgrgrurg ruru	54
	<210> 15	
	<211> 54	
40	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 15	
45	rarargr rururc rurgrurg rargrarc rargrurg rgru	54
	<210> 16	
	<211> 54	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 16	
	rurururu rarargr rurararg rgrararu rurururg ruru	54
	<210> 17	
55	<211> 54	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	

	<400> 17	
	rgrgrgraru rgrararcrg rgrurarurg rarcragru rurgrurgu ruru	54
	<210> 18	
	<211> 54	
5	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 18	
10	rgrrcrurg rurararurc rrcrcargc rarcgururu rgrgrgrarg rgrc	54
	<210> 19	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 19	
	gcttctgatg tcttgattac	20
	<210> 20	
20	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
25	<400> 20	
	catacactta ccttggtt	19
	<210> 21	
	<211> 21	
	<212> ADN	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 21	
	cctctagcta ctcaaattc c	21
35	<210> 22	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
40	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 22	
	agtctacca ccctcagcca	20
	<210> 23	
	<211> 20	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 23	
50	cttctctctg tcttctccac	20
	<210> 24	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
55	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 24	
	gagcgttggt cttggtgtca g	21
	<210> 25	

	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 25	
	gcagtttctg ttcactccc	20
	<210> 26	
	<211> 20	
10	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 26	
15	tctctcacct gtcctcgca	20
	<210> 27	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 27	
	gcctgtctg tctccatga	20
	<210> 28	
25	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
30	<400> 28	
	tcttcagcct cttcacaca g	21
	<210> 29	
	<211> 20	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 29	
	gatttcactc aaccacacgg	20
40	<210> 30	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 30	
	gggagggtgg tctgaaact	19
	<210> 31	
	<211> 48	
50	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Complemento inverso del oligonucleótido antisentido de SEQ ID NO: 10	
	<400> 31	
55	rrcrcrgru rararcruc rrcrcrgrc rurarcrcrarc rurgrgtt	48
	<210> 32	
	<211> 48	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

- <220>
 <223> Complemento inverso del oligonucleótido antisentido de SEQ ID NO: 11
 <400> 32
 rrcrcrcraru rururrcrcru rrcrururarc rrcrcrararu rurcruta 48
- 5 <210> 33
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
- 10 <223> Complemento inverso del oligonucleótido antisentido de SEQ ID NO: 12
 <400> 33
 rgrurururc rarcrcrgru rgrgrurcru rrcrarurc rurcrctg 48
 <210> 34
 <211> 48
- 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
- <223> Complemento inverso del oligonucleótido antisentido de SEQ ID NO: 13
 <400> 34
- 20 rgrrcrargc rarararug rgrrcrarca rgrarararc rrcracc 48
 <210> 35
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 25 <220>
- <223> Complemento inverso del oligonucleótido antisentido de SEQ ID NO: 14
 <400> 35
 rgrrcrarclu rgrurgrclu rrcrcrarca rgrgrarura rrcrctt 48
 <210> 36
- 30 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
- <223> Complemento inverso del oligonucleótido antisentido de SEQ ID NO: 15
 <400> 36
- 35 rgrrcrarclu rgrurgrclu rrcrcrarca rgrgrarura rrcrctt 48
 <210> 37
 <211> 48
 <212> ADN
- 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
- <223> Complemento inverso del oligonucleótido antisentido de SEQ ID NO: 16
 <400> 37
 rrcrcrarura rarururc rrcrururura rgrurcruru rarargaa 48
- 45 <210> 38
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
- 50 <223> Complemento inverso del oligonucleótido antisentido de SEQ ID NO: 17
 <400> 38
 rrcrcrarca rarcrcrgru rrcrarurarc rrcgrururc rarurccc 48
 <210> 39
 <211> 48
- 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
- <223> Complemento inverso del oligonucleótido antisentido de SEQ ID NO: 18
 <400> 39

rcrucrcrc rararargru rgcrurgrg rgrarurura rcrarggc

48

REIVINDICACIONES

1. Un oligonucleótido que se dirige a un transcrito antisentido natural de un gen antivírico para su uso como un compuesto terapéutico, donde el oligonucleótido aumenta la expresión del gen antivírico, donde el gen 5 antivírico es IFNA1.
2. Un oligonucleótido que se dirige a un transcrito antisentido natural de un gen antivírico para su uso en la prevención o tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado a un gen antivírico, donde el oligonucleótido aumenta la expresión del gen antivírico, donde el gen antivírico es IFNA1, donde la enfermedad o trastorno se 10 selecciona del grupo que consiste en una enfermedad, trastorno o una afección causada por un agente infeccioso (por ejemplo, incluyendo, un virus, bacteria, hongo, protozoo, etc.), una enfermedad o trastorno del sistema inmunitario, cáncer (por ejemplo, leucemia, linfoma, melanoma, carcinoma o sarcoma), una enfermedad o trastorno hepático, una enfermedad vírica (por ejemplo, donde el virus que causa la enfermedad es un virus del herpes o un virus de la hepatitis, tal como Hepatitis A, Hepatitis B, Hepatitis C, Hepatitis D, o Hepatitis E), psoriasis y una 15 enfermedad de inmunodeficiencia.
3. Uso de un oligonucleótido que se dirige a un transcrito antisentido natural de un gen antivírico para la fabricación de un medicamento para su uso en la prevención o tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado a un gen antivírico, donde el oligonucleótido aumenta la expresión del gen antivírico, donde el gen antivírico es 20 IFNA1, donde la enfermedad o trastorno se selecciona del grupo que consiste en una enfermedad, trastorno o una afección causada por un agente infeccioso (por ejemplo, incluyendo, un virus, bacteria, hongo, protozoo, etc.), una enfermedad o trastorno del sistema inmunitario, cáncer (por ejemplo, leucemia, linfoma, melanoma, carcinoma o sarcoma), una enfermedad o trastorno hepático, una enfermedad vírica (por ejemplo, donde el virus que causa la enfermedad es un virus del herpes o un virus de la hepatitis, tal como Hepatitis A, Hepatitis B, Hepatitis C, Hepatitis 25 D, o Hepatitis E), psoriasis y una enfermedad de inmunodeficiencia.
4. Un método *in vitro* para aumentar la expresión de un gen antivírico en células o tejidos de pacientes que comprende: poner en contacto dichas células o tejido con un oligonucleótido que se dirige a un transcrito antisentido natural de un gen antivírico; aumentando de este modo la expresión del gen antivírico, donde el gen 30 antivírico es IFNA1.
5. Un oligonucleótido para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, o uso de un oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 3 y un método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 4, donde el transcrito antisentido natural tiene la secuencia de ácido nucleico como se expone en la SEQ ID NO: 9. 35
6. Un oligonucleótido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 5, o uso de un oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 3 o la reivindicación 5, o un método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 4 o la reivindicación 5, donde el oligonucleótido es un compuesto de siRNA.
- 40 7. Un oligonucleótido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 5, o uso de un oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 3 o la reivindicación 5, o un método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 4 o la reivindicación 5, donde el oligonucleótido es monocatenario.
8. Un oligonucleótido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, o 5 a 7, o 45 uso de un oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 o 5 a 7, o un método *in vitro* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, donde el oligonucleótido comprende al menos una de las SEQ ID NOs: 29, 27, 28, 30.
9. Un oligonucleótido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, o 5 a 8, o 50 uso de un oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 o 5 a 8, o un método *in vitro* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, donde la expresión del gen antivírico se aumenta en al menos un 10 %.
10. Un oligonucleótido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, o 5 a 9, o 55 uso de un oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 o 5 a 9, o un método *in vitro* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 9, donde el oligonucleótido comprende adicionalmente una o más modificaciones que comprenden
- a. al menos un enlace internucleósido modificado seleccionado de entre: un fosforotioato, alquilfosfonato,

fosforoditioato, alquifosfonotioato, fosforamidato, carbamato, carbonato, fosfato triéster, acetamidato, carboximetil éster, y combinaciones de los mismos;

b. un ácido nucleico peptídico (PNA), un ácido nucleico bloqueado (LNA), un ácido arabino-nucleico (FANA), un análogo, un derivado, y combinaciones de los mismos, 2'-fluoro, un resto de azúcar modificado con 2'-O-metoxietilo, un resto de azúcar modificado con 2'-metoxi, un resto de azúcar modificado con 2'-O-alquilo, un resto de azúcar bicíclico, y combinaciones de los mismos.

11. Un oligonucleótido que se dirige a un transcrito antisentido natural de un gen antivírico, donde el oligonucleótido aumenta la expresión del gen antivírico, donde el gen antivírico es IFNA1, y donde el transcrito antisentido natural tiene las secuencias de ácido nucleico como se expone en la SEQ ID NO: 9.

12. El oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 11, donde el oligonucleótido es un compuesto de siRNA.

13. El oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 11, donde el oligonucleótido es monocatenario.

14. El oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, donde el oligonucleótido comprende al menos una de las SEQ ID NOs: 29, 27, 28, 30.

15. El oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, donde la expresión del gen antivírico se aumenta en al menos un 10 %.

16. El oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15, donde el oligonucleótido comprende adicionalmente una o más modificaciones que comprenden:

a. al menos un enlace internucleósido modificado seleccionado de entre: un fosforotioato, alquifosfonato, fosforoditioato, alquifosfonotioato, fosforamidato, carbamato, carbonato, fosfato triéster, acetamidato, carboximetil éster, y combinaciones de los mismos;

b. un ácido nucleico peptídico (PNA), un ácido nucleico bloqueado (LNA), un ácido arabino-nucleico (FANA), un análogo, un derivado, y combinaciones de los mismos, un resto de azúcar modificado con 2'-O-metoxietilo, un resto de azúcar modificado con 2'-metoxi, un resto de azúcar modificado con 2'-O-alquilo, un resto de azúcar bicíclico, y combinaciones de los mismos.

17. El oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 16, donde el oligonucleótido tiene entre 10 a 30 nucleótidos de longitud.

18. El oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 17, donde el oligonucleótido tiene al menos un 90 % de complementariedad con respecto a una región diana dentro de dicho transcrito antisentido natural del gen antivírico.

19. Una composición farmacéutica que comprende al menos un oligonucleótido que tiene las características de un oligonucleótido definido en cualquiera de las reivindicaciones 11 a 18 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Figura 1

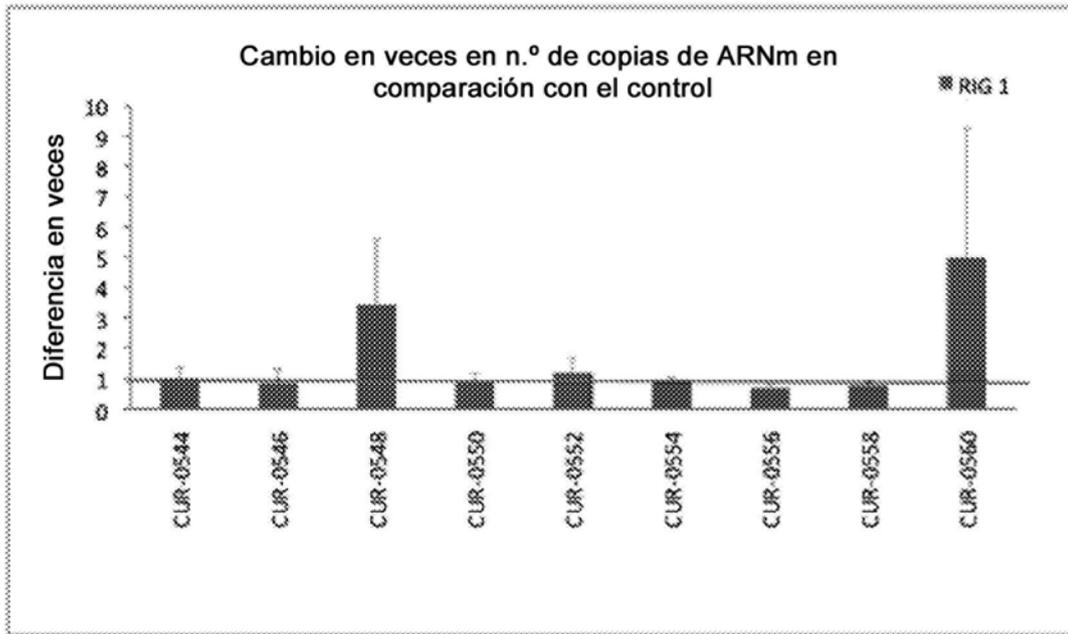


Figura 2

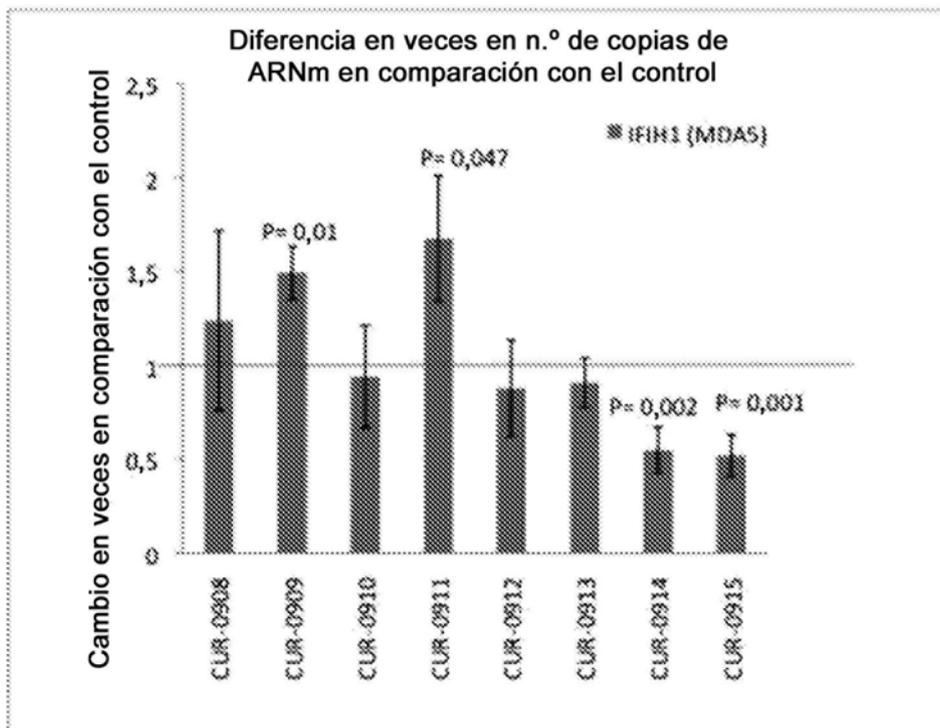


Figura 3

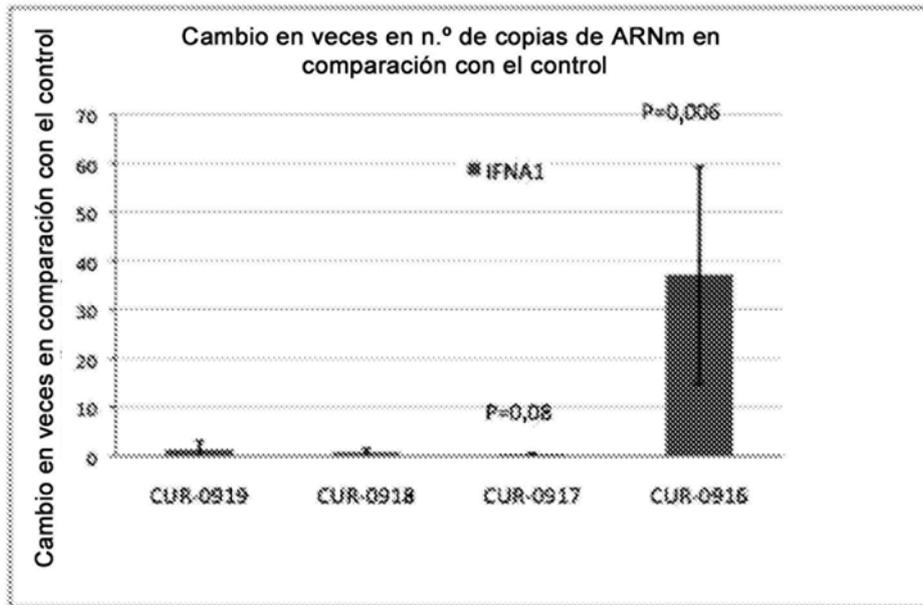


Figura 4

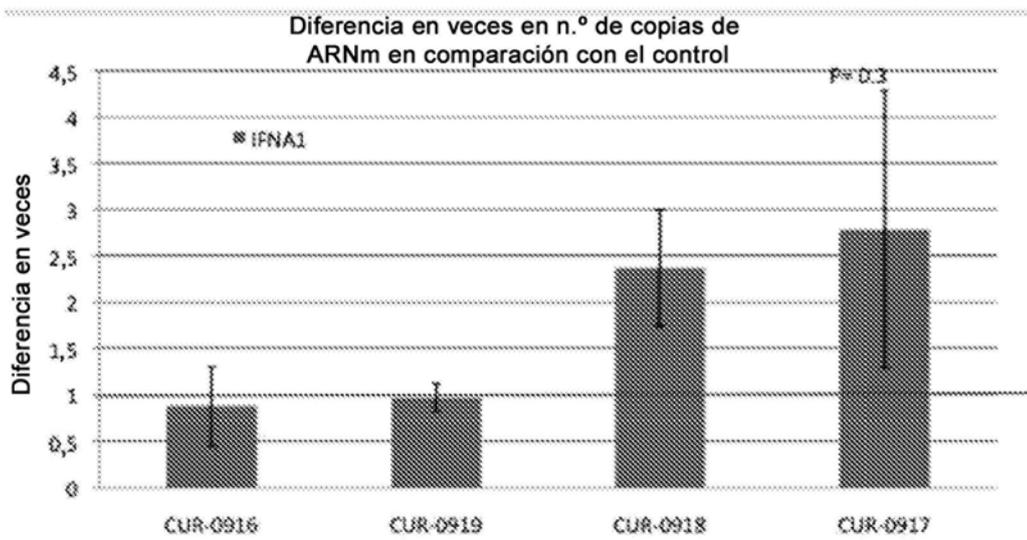


Figura 5

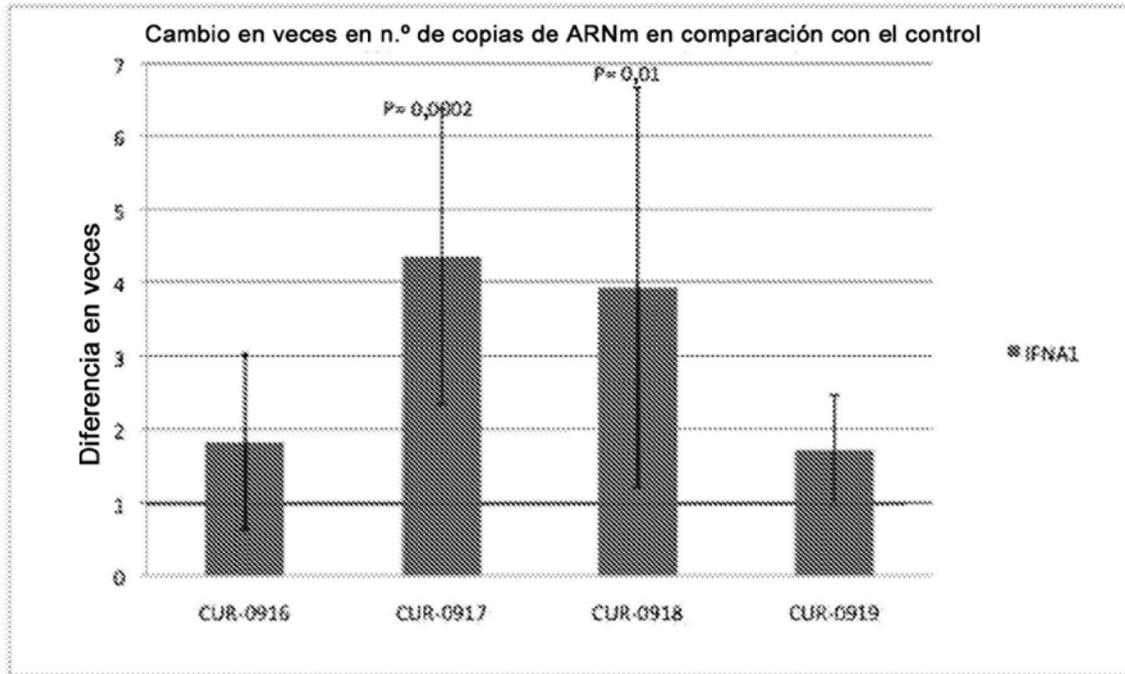


Figura 6

