

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 618 894**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.06.2010 PCT/US2010/039824**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.12.2010 WO2010151671**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.06.2010 E 10792665 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.03.2017 EP 2446036**

54 Título: **TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES RELACIONADAS CON EL RECEPTOR DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL 2 (TNFR2) POR INHIBICIÓN DEL TRANSCRITO NATURAL ANTISENTIDO PARA TNFR2**

30 Prioridad:

24.06.2009 US 219911 P

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

22.06.2017

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 2 618 894 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 el receptor del factor de necrosis tumoral 2 (TNFR2) por inhibición del transcrito natural antisentido para TNFR2

5

CAMPO DE LA DESCRIPCIÓN

La presente solicitud reivindica la prioridad de la solicitud de patente provisional de EE.UU. nº 61/219.911 presentada el 24 de junio de 2009.

10

Los aspectos de la descripción comprenden oligonucleótidos que modulan la expresión y/o función de TNFR2 y las moléculas asociadas.

ANTECEDENTES

15

Las hibridaciones ADN-ARN y ARN-ARN son importantes para muchos aspectos de la función de los ácidos nucleicos que incluyen la replicación, transcripción y traducción de ADN. La hibridación es fundamental también para diversas tecnologías que detectan un ácido nucleico en particular o alteran su expresión. Los nucleótidos antisentido perturban, por ejemplo, la expresión génica al hibridarse con el ARN diana, interfiriendo así con el splicing, transcripción, traducción y replicación del ARN. El ADN antisentido tiene la característica añadida de que los híbridos ADN-ARN actúan como un sustrato para la digestión por la ribonucleasa H, una actividad que está presente en la mayoría de los tipos celulares. Las moléculas antisentido pueden suministrarse a las células, como sucede con 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), lo que refleja que los productos antisentido tienen utilidad terapéutica.

25

El documento WO-02/064.836 describe la modulación antisentido de la expresión de la subunidad alfa catalítica de la proteína fosfatasa 2.

El documento WO-2006/026.485 describe la modulación de la expresión HIF1-beta.

30

El documento WO-2004/043.398 describe la modulación de la expresión de jumonji.

El documento WO-02/088.393 describe la modulación antisentido de la expresión del receptor del factor de necrosis tumoral 2.

En Wahlestedt y col. 2006 (Drug Discovery Today, vol. 11(11-12): 503-508) y en el documento WO-2007/087.113 se describen transcritos de ARN no codificantes y antisentido naturales como dianas potenciales de fármacos.

35

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

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

40

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

RESUMEN DE LA DESCRIPCIÓN

45

Este Resumen se proporciona para presentar el resumen de la descripción con el fin de indicar brevemente la naturaleza y la sustancia de la descripción.

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

50

Un aspecto proporciona un procedimiento para modular la función y/o expresión de un polinucleótido TNFR2 en células o tejidos del paciente *in vivo* o *in vitro* que comprende la puesta en contacto de dichas células o tejidos con un oligonucleótido antisentido de 5 a 30 nucleótidos de longitud donde dicho oligonucleótido tiene al menos el 50% de identidad de secuencias con un complemento inverso de un polinucleótido que comprende de 5 a 30 nucleótidos consecutivos en los nucleótidos 1 a 413 de la SEQ ID NO: 2 y 1 a 413 de la SEQ ID NO: 3 modulando así la función y/o expresión del polinucleótido TNFR2 en las células o tejidos del paciente *in vivo* o *in vitro*.

55

En otro aspecto preferido, un oligonucleótido se dirige a una secuencia antisentido natural de polinucleótidos de TNFR2, por ejemplo, nucleótidos expresados en las SEQ ID NO: 2 y 3, y cualquier variante, alelo, homólogo, mutante, derivado, fragmento y secuencia de complementariedad de los mismos. Se exponen ejemplos de oligonucleótidos antisentido en las SEQ ID NO: 4 a 10.

Otro aspecto proporciona un procedimiento de modulación de la función y/o expresión de un polinucleótido TNFR2 en células o tejidos del paciente *in vivo* o *in vitro* que comprende la puesta en contacto de dichas células o tejidos con un oligonucleótido antisentido de 5 a 30 nucleótidos de longitud donde dicho oligonucleótido tiene al menos el 50% de identidad de secuencias con un complemento inverso del sentido contrario del polinucleótido TNFR2; modulando así la función y/o expresión del polinucleótido TNFR2 en las células o tejidos del paciente *in vivo* o *in vitro*.

Otro aspecto proporciona un procedimiento de modulación de la función y/o expresión de un polinucleótido TNFR2 en células o tejidos del paciente *in vivo* o *in vitro* que comprende la puesta en contacto de dichas células o tejidos con un oligonucleótido antisentido de 5 a 30 nucleótidos de longitud donde dicho oligonucleótido tiene al menos el 50% de identidad de secuencias con un oligonucleótido antisentido y un polinucleótido antisentido TNFR2; modulando así la función y/o expresión del polinucleótido TNFR2 en células o tejidos del paciente *in vivo* o *in vitro*.

En un aspecto preferido, una composición comprende uno o más oligonucleótidos antisentido que se unen a polinucleótidos de TNFR2 con sentido y antisentido.

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

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

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

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

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

En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos se encapsulan en un liposoma unido a una molécula portadora (por ejemplo, colesterol, péptido TAT).

A continuación se describen otros aspectos.

45 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 es un gráfico de los resultados de una PCR en tiempo real que muestra el nivel de cambio + desviación típica en ARNm de TNFR2 después del tratamiento de células HepG2 con oligonucleótidos de fosforotioato introducidos usando Lipofectamina 2000, en comparación con el control. Los resultados de la PCR en tiempo real muestran que los niveles de ARNm de TNRSF1B en las células HepG2 aumentan significativamente 48 h después del tratamiento con 1 de los oligos designados como Hs.679340 antisentido TNRSF1B (CUR-0792) y 1 oligo designado como Hs.639108 (CUR-0787). Las barras denotadas como CUR-0790, CUR-0792, CUR-0788, CUR-0786, CUR-0789, CUR-0787 y CUR-0791 corresponden a muestras tratadas con las SEQ ID NO: 4 a 10 respectivamente.

Descripción del listado de secuencias

SEQ ID NO: 1: Superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral de Homo sapiens, miembro 1B (TNFRSF1B), ARNm (NCBI nº acceso: NM_001066); SEQ ID NO: 2: secuencia antisentido natural de TNFR2

(Hs.639108); SEQ ID NO: 3: secuencia antisentido natural de TNFR2 (Hs.679340); SEQ ID NO: 4 a 10: oligonucleótidos antisentido. * indica enlace de fosfotioato.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA DESCRIPCIÓN

5 A continuación se describen varios aspectos de la descripción con referencia a aplicaciones de ejemplo con fines de ilustración. Debe entenderse que numerosos detalles específicos, relaciones y procedimientos se exponen para proporcionar una comprensión completa de la descripción. Sin embargo, un experto en la materia reconocerá fácilmente que la descripción puede ponerse en práctica sin uno o varios de los detalles específicos o con otros
10 procedimientos. La presente descripción no está limitada por la ordenación de las acciones o acontecimientos, dado que algunas acciones pueden producirse en órdenes diferentes y/o de forma simultánea con otras acciones o acontecimientos. Además, no todas las acciones o acontecimientos ilustrados son necesarios para implementar una metodología de acuerdo con la presente descripción.

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

25 *Definiciones*

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

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

45 Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "ARNm" significa el o los transcritos de ARNm conocidos en la actualidad de un gen diana, y cualquier transcrito adicional que pueda elucidarse.

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

monocatenarios o circulares.

En el contexto de esta descripción, el término "oligonucleótido" se refiere a un oligómero o polímero de ácido ribonucleico (ARN) o ácido desoxirribonucleico (ADN) o miméticos de los mismos. El término "oligonucleótido", también incluye oligómeros lineales o circulares de monómeros o uniones naturales y/o modificados, lo que incluye desoxirribonucleósidos, ribonucleósidos, formas sustituidas y alfa-anoméricas de los mismos, ácidos nucleicos peptídicos (PNA), ácidos nucleicos bloqueados (LNA), fosforotioato, metilfosfonato, y similares. Los oligonucleótidos pueden unirse específicamente a un polinucleótido diana por medio de un patrón regular de interacciones entre monómeros, tal como tipo Watson-Crick de apareamiento de bases, tipos Hoogsteen o Hoogsteen inverso de apareamiento de bases, o similares.

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

El oligonucleótido puede estar compuesto por regiones que pueden estar unidas en "registro", es decir, cuando los monómeros están unidos consecutivamente, como en el ADN nativo, o unidos por medio de espaciadores. Los espaciadores pretenden constituir un "puente" covalente entre las regiones y en casos preferidos tienen una longitud no superior aproximadamente a 100 átomos de carbono. Los espaciadores pueden contener diferentes funcionalidades, por ejemplo, tienen carga positiva o negativa, comportan propiedades especiales de unión a ácidos nucleicos (intercaladores, compuestos de unión al surco, toxinas, fluoróforo, etc.), son lipófilos, incluyen estructuras secundarias especiales como, por ejemplo, alanina que contiene péptidos que inducen hélices alfa.

Tal como se usa en la presente memoria descriptiva "TNFR2" y "receptor del factor de necrosis tumoral 2" incluyen a todos los miembros de la familia, mutantes, alelos, fragmentos, especies, secuencias codificantes y no codificantes, polinucleótidos con sentido y antisentido, etc.

Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, las palabras 'receptor del factor de necrosis tumoral 2', CD120b, p75, p75TNFR, receptor de TNF-alfa p80, TBPII, TNFBR, TNFR1B, TNFR2, TNF-R2, TNF-R75, TNFR80, TNFR-II, TNF-RII, TNF-R-II, receptor del factor de necrosis tumoral 2, miembro 1B de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral y receptor del factor de necrosis tumoral tipo II, se usan indistintamente en la presente solicitud.

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

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

La interferencia de ARN "ARNi" está mediada por moléculas de ARN bicatenario (dsRNA) que tienen una homología específica de secuencias con sus secuencias de ácidos nucleicos "diana". En ciertos aspectos de la presente descripción, los mediadores son dúplex de ARN "de interferencia pequeños" de 5 a 25 nucleótidos (siRNA). Los siRNA proceden del procesamiento de dsRNA por una enzima ARNasa conocida como Dicer. Los productos de dúplex de siRNA son reclutados en un complejo de siRNA multiproteínas denominado RISC (RNA Induced Silencing Complex). Sin desear vincularse a ninguna teoría en particular, se cree que un RISC es guiado a un ácido nucleico diana (de forma adecuada ARNm), donde el dúplex de siRNA interacciona de un modo específico de la secuencia para mediar de forma catalítica. Los ARN de interferencia pequeños que pueden usarse de acuerdo con la presente descripción pueden sintetizarse y usarse de acuerdo con procedimientos que son bien conocidos en la técnica y que serán familiares para el experto en la materia. Los ARN de interferencia pequeños para su uso en los procedimientos de la presente descripción comprenden de manera adecuada entre aproximadamente 1 y aproximadamente 50 nucleótidos (nt). En ejemplos de aspectos no limitativos, los siRNA pueden comprender de aproximadamente 5 a aproximadamente 40 nt, de aproximadamente 5 a aproximadamente 30 nt, de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 nt, de aproximadamente 15 a aproximadamente 25 nt o aproximadamente 20-25 nucleótidos.

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

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

Por "ARN señuelo" se entiende una molécula de ARN que imita el dominio de unión natural para un ligando. El ARN señuelo compite por tanto con la diana de unión natural para la unión de un ligando específico. Por ejemplo, se ha demostrado que la sobreexpresión del ARN de respuesta de trans-activación a VIH (TAR) puede actuar como un "señuelo" y unirse de manera eficiente a la proteína tat de VIH, evitando así la unión a secuencias TAR codificadas en el ARN de VIH. Se entiende que éste es un ejemplo específico. Los expertos en la materia reconocerán que no es sino un ejemplo, y que pueden generarse fácilmente otros aspectos usando técnicas conocidas generalmente en la técnica.

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

El término "nucleótido" cubre tanto los nucleótidos de ocurrencia natural como los nucleótidos de ocurrencia no natural. Para el experto en la materia debe estar claro que varios nucleótidos que antes se habían considerado "de ocurrencia no natural" posteriormente se han encontrado en la naturaleza. Así, los "nucleótidos" incluyen no sólo las moléculas conocidas que contienen heterociclos de purina y pirimidina, sino también análogos heterocíclicos y tautómeros de los mismos. 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-metilcitosina, 5-(C3-C6)-alquilcitosina, 5-

fluorouracilo, 5-bromouracilo, seudoisocitosina, 2-hidroxi-5-metil-4-triazolopiridina, isocitosina, isoguanina, inosina y los nucleótidos de "ocurrencia no natural" descritos en Benner y col., patente de EE.UU. nº 5.432.272. El término "nucleótido" pretende cubrir todos y cada uno de estos ejemplos así como los análogos y tautómeros de los mismos. Son especialmente interesantes los nucleótidos que contienen adenina, guanina, timina, citosina y uracilo, que se consideran los nucleótidos de ocurrencia natural en relación con la aplicación terapéutica y diagnóstica en seres humanos. Los nucleótidos incluyen los azúcares naturales 2'-desoxi y 2'-hidroxilo, por ejemplo, tal como se describe en Komberg y Baker, DNA Replication, 2ª ed. (Freeman, San Francisco, 1992) así como sus análogos.

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

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

Un compuesto antisentido es "específicamente hibridable" cuando la unión del compuesto con el ácido nucleico diana interfiere con la función normal del ácido nucleico diana para provocar una modulación de la función y/o actividad, y existe 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 una unión específica, es decir, en condiciones fisiológicas en el caso de ensayos *in vivo* o tratamiento terapéutico, y en condiciones en que se realizan los ensayos en el caso de ensayos *in vitro*.

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

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

Debe entenderse en la técnica que no es necesario que la secuencia de un compuesto oligomérico sea complementaria al 100% con la de su ácido nucleico diana para ser específicamente hibridable. Por otra parte, un

oligonucleótido puede hibridarse con uno o más segmentos de manera que los segmentos interpuestos o adyacentes no intervienen en el suceso de hibridación (por ejemplo, una estructura en bucle, un error de acoplamiento o una estructura en horquilla). Los compuestos oligoméricos de la presente descripción comprenden al menos aproximadamente el 70%, o al menos aproximadamente el 75%, o al menos aproximadamente el 80%, o al menos aproximadamente el 85%, o al menos aproximadamente el 90%, o al menos aproximadamente el 95%, o al menos aproximadamente el 99% de complementariedad de secuencias con una región diana dentro de la secuencia diana de ácidos nucleicos a la que están direccionados. Por ejemplo, un compuesto antisentido en el que 18 de 20 nucleótidos del compuesto antisentido son complementarios a una región diana, y por tanto se hibridarían específicamente, representarían el 90% de complementariedad. En este ejemplo, los nucleótidos no complementarios restantes pueden agruparse o intercalarse con nucleótidos complementarios y no es necesario que sean contiguos entre sí o con nucleótidos complementarios. De este modo, un compuesto antisentido que tiene 18 nucleótidos de longitud y tiene 4 (cuatro) nucleótidos no complementarios que están flanqueados por dos regiones de complementariedad completa con el ácido nucleico tendría un 77,8% de complementariedad global con el ácido nucleico diana y así estaría dentro del alcance de la presente descripción. El % de complementariedad de un compuesto antisentido con una región de un ácido nucleico diana puede determinarse de forma rutinaria usando programas BLAST (herramientas básicas de búsqueda de alineación local) y programas PowerBLAST conocidos en la técnica. El % de homología, identidad de secuencias o complementariedad puede determinarse, por ejemplo, mediante el programa Gap (Wisconsin Sequence Analysis Package, versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison Wis.), usando la configuración por defecto, que usa el algoritmo de Smith y Waterman (*Adv. Appl. Math.*, (1981) 2, 482-489).

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

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

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

Los polipéptidos resultantes tendrán en general una identidad de aminoácidos importante relativa entre sí. Una variante polimórfica es una variación en la secuencia de polinucleótidos de un gen en particular entre individuos de una especie dada. Las variantes polimórficas también pueden comprender "polimorfismos de nucleótido único" (SNP) o mutaciones de base única en las que la secuencia de polinucleótidos varía en una base. La presencia de SNP puede ser indicativa, por ejemplo, de una cierta población con propensión a un estado patológico, es decir, de la sensibilidad frente a la 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 de ocurrencia no natural, tales como fracciones de azúcares alteradas o uniones entre azúcares. Entre ellas algunos ejemplos son fosforotioato y otras especies que contienen azufre que son conocidas en la técnica. Los ácidos nucleicos derivados pueden contener también etiquetas, que incluyen radionucleótidos, enzimas, agentes fluorescentes, agentes quimioluminiscentes, agentes cromógenos, sustratos, cofactores,

inhibidores, partículas magnéticas y similares.

Un polipéptido o péptido "derivado" es aquel que se modifica, por ejemplo, por glucosilación, pegilación, fosforilación, sulfatación, reducción/alquilación, acilación, copulación química o tratamiento ligero con formalina. Un derivado
5 puede modificarse también para que contenga una etiqueta detectable, directa o indirectamente, lo que incluye, pero no se limita a, una etiqueta de radioisótopo, fluorescente y de enzimas.

Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, se entiende que el término "animal" o "paciente" incluye, por ejemplo, seres humanos, ovejas, alces, ciervos, venados de cola oscura, visones, mamíferos, monos, caballos,
10 vacas, cerdos, cabras, perros, gatos, ratas, ratones, aves, pollos, reptiles, peces, insectos y arácnidos.

"Mamífero" cubre mamíferos de sangre caliente que normalmente están bajo atención médica (por ejemplo, seres humanos y animales domesticados). Entre los ejemplos se incluyen felinos, caninos, equinos, bovinos y humanos, así como sólo humanos.

15 "Tratar" o "tratamiento" cubre el tratamiento de un estado patológico en un mamífero, e incluye: (a) prevención de que el estado patológico se produzca en un mamífero, en particular, cuando dicho mamífero tiene propensión al estado patológico pero todavía no se ha diagnosticado que lo tiene; (b) inhibición del estado patológico, por ejemplo, interrupción de su desarrollo; y/o (c) alivio del estado patológico, por ejemplo, provocando la regresión del estado
20 patológico hasta que se alcanza un criterio de valoración deseado. El tratamiento incluye también la mejoría de un síntoma de una enfermedad (por ejemplo, aliviar el dolor o las molestias), donde dicha mejoría puede o no influir directamente en la enfermedad (por ejemplo, causa, transmisión, expresión, etc.).

Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, "cáncer" se refiere a todos los tipos de cáncer o neoplasias o
25 tumores malignos encontrados en mamíferos, lo que incluye, pero no se limita a: leucemias, linfomas, melanomas, carcinomas y sarcomas. El cáncer se manifiesta como un "tumor" o tejido que comprende células malignas del cáncer. Entre los ejemplos de tumores se incluyen sarcomas y carcinomas tales como, pero sin limitarse a ellos: fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteógeno, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing,
30 leiomiomasarcoma, rhabdomiomasarcoma, carcinoma de colon, cáncer de páncreas, 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, cistoadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma del conducto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, cáncer de cuello
35 de útero, tumor testicular, carcinoma de pulmón, carcinoma pulmonar microcítico, 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 mediante la composición divulgada de acuerdo con la descripción incluyen pero no se limitan a, por ejemplo, enfermedad de Hodgkin, linfoma no hodgkiniano, mieloma múltiple, neuroblastoma, cáncer
40 de mama, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, rhabdomiomasarcoma, trombocitosis primaria, macroglobulinemia primaria, tumores pulmonares microcíticos, tumores cerebrales primarios, cáncer de estómago, cáncer de colon, insulinooma pancreático maligno, carcinoide maligno, cáncer de la vejiga urinaria, lesiones cutáneas premalignas, cáncer testicular, linfomas, cáncer de tiroides, neuroblastoma, cáncer esofágico, cáncer de las vías genitourinarias, hipercalcemia maligno, cáncer de cuello de útero, cáncer de endometrio, cáncer de la corteza suprarrenal y cáncer
45 de próstata.

"Enfermedad o trastorno neurológico" se refiere a cualquier enfermedad o trastorno del sistema nervioso y/o del sistema visual. "Enfermedad o trastorno neurológico" incluye las enfermedades o trastornos que afectan al sistema nervioso central (encéfalo, tronco del encéfalo y cerebelo), el sistema nervioso periférico (que incluye los nervios
50 craneales) y el sistema nervioso autónomo (partes de que están situadas en los sistemas nerviosos central y periférico). Los ejemplos de trastornos neurológicos incluyen pero no se limitan a, cefalea, estupor y coma, demencia, convulsiones, trastornos del sueño, traumatismos, infecciones, neoplasias, neurooftalmología, trastornos del movimiento, enfermedades desmielinizantes, trastornos de la médula espinal y trastornos de los nervios periféricos, los músculos y las uniones neuromusculares. La adicción y la enfermedad mental incluyen, pero no se
55 limitan a, trastorno bipolar y esquizofrenia, y se incluyen también en la definición de trastorno neurológico. A continuación se ofrece una lista de varios trastornos neurológicos, síntomas, signos y síndromes que pueden tratarse usando las composiciones y procedimientos de acuerdo con la presente descripción: afasia epileptiforme adquirida; encefalomiелitis diseminada aguda; adrenoleucodistrofia; degeneración macular relacionada con la edad; agenesia del cuerpo calloso; agnosia; síndrome de Aicardi; enfermedad de Alexander; enfermedad de Alpers;

hemiplejía alternante; demencia vascular; esclerosis lateral amiotrófica; anencefalia; síndrome de Angelman; angiomatosis; anoxia; afasia; apraxia; quistes aracnoideos; aracnoiditis; malformación de Arnold-Chiari; malformación arteriovenosa; síndrome de Asperger; ataxia telangiectasia; trastorno de hiperactividad con déficit de atención; autismo; disfunción autónoma; lumbalgia; enfermedad de Batten; enfermedad de Behçet; parálisis de Bell; 5 blefaroespasma esencial benigno; focal benigno; amiotrofia; hipertensión intracraneal benigna; enfermedad de Binswanger; blefaroespasma; síndrome de Bloch Sulzberger; lesión del plexo braquial; absceso encefálico; lesión encefálica; tumores cerebrales (que incluyen glioblastoma multiforme); tumor espinal; síndrome de Brown-Sequard; enfermedad de Canavan; síndrome del túnel carpiano; causalgia; síndrome de dolor central; mielínolisis de la protuberancia central; trastorno celiaco; aneurisma cerebral; arteriosclerosis cerebral; atrofia cerebral; gigantismo cerebral; parálisis cerebral; enfermedad de Charcot-Marie-Tooth; neuropatía inducida por quimioterapia y dolor neuropático; malformación de Chiari; corea; polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica; dolor crónico; síndrome de dolor regional crónico; síndrome de Coffin Lowry; coma, que incluye estado vegetativo persistente; 10 diplejía facial congénita; degeneración corticobasal; arteritis craneal; craneosinostosis; enfermedad de Creutzfeldt-Jakob; trastornos traumáticos acumulativos; síndrome de Cushing; enfermedad de cuerpos de inclusión citomegálicos; infección por citomegalovirus; síndrome de los pies y los ojos inquietos; síndrome de Dandy-Walker; enfermedad de Dawson; síndrome de De Morsier; parálisis de Dejerine-Klumke; demencia; dermatomiositis; neuropatía diabética; esclerosis difusa; disautonomía; disgrafia; dislexia; distonías; encefalopatía epiléptica infantil temprana; síndrome de la silla vacía; encefalitis; encefaloceles; angiomatosis del trigémino encefálico; epilepsia; parálisis de Erb; temblor esencial; enfermedad de Fabry; síndrome de Fahr; desfallecimiento; parálisis espástica familiar; convulsiones febriles; síndrome de Fisher; ataxia de Friedreich; demencia frontotemporal y otras "tauopatías"; enfermedad de Gaucher; síndrome de Gerstmann; arteritis de las células gigantes; enfermedad por 20 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; cefalea; espasmo hemifacial; paraplejía espástica hereditaria; heredopatía atáxica de polineuritisformis; herpes zóster ótico; herpes zóster; síndrome de Hirayama; demencia y neuropatía asociadas a VIH (también manifestaciones neurológicas del SIDA); holoprosencefalia; 25 enfermedad de Huntington y otras enfermedades por repetición de poliglutamina; hidranencefalia; hidrocefalia; hipercortisolismo; hipoxia; encefalomiелitis por mediación inmunitaria; miositis de cuerpos de inclusión; incontinencia de pigmentos; enfermedad infantil por almacenamiento de ácido fitánico; enfermedad de Refsum infantil; espasmos infantiles; miopatía inflamatoria; quiste intracraneal; hipertensión intracraneal; síndrome de Joubert; síndrome de Kearns-Sayre; enfermedad de Kennedy; síndrome de Kinsbourne; síndrome de Klippel Feil; enfermedad de Krabbe; enfermedad de Kugelberg-Welander; kuru; enfermedad de Lafora; síndrome de miasténico de Lambert-Eaton; síndrome de Landau-Kleffner; síndrome de medular lateral (Wallenberg); discapacidades de aprendizaje; enfermedad de Leigh; síndrome de Lennox-Gustaut; síndrome de Lesch-Nyhan; leucodistrofia; demencia por 30 cuerpos de Lewy; lisencefalia; síndrome de enclaustramiento; enfermedad de Lou Gehrig (es decir, enfermedad de las neuronas motoras o esclerosis lateral amiotrófica); enfermedad de los discos lumbares; secuelas neurológicas de la enfermedad de Lyme; enfermedad de Machado-Joseph; macroencefalia; megalencefalia; síndrome de Melkersson-Rosenthal; enfermedad de Meniere; meningitis; enfermedad de Meukes; leucodistrofia metacromática; microcefalia; migraña; síndrome de Miller Fisher; miniaccidentes cerebrovasculares; miopatías mitocondriales; síndrome de Mobius; amiotrofia monomérica; enfermedad de las neuronas motoras; enfermedad de Moyamoya; 40 mucopolisacaridosis; demencia multiinfarto; neuropatía motora multifocal; esclerosis múltiple y otros trastornos desmielinizantes; atrofia sistémica múltiple con hipotensión postural; distrofia muscular; miastenia grave; esclerosis mielínoclastica difusa; encefalopatía mioclónica de los lactantes; mioclonía; miopatía; miotonía congénita; narcolepsia; neurofibromatosis; síndrome maligno neuroléptico; manifestaciones neurológicas del SIDA; secuelas neurológicas del lupus; neuromiotonía; lipofuscinosis cerioide neuronal; trastornos de la migración neuronal; enfermedad de Niemann-Pick; síndrome de O'Sullivan-McLeod; neuralgia occipital; secuencia de disrafia espinal oculta; síndrome de Ohtahara; atrofia olivopontocerebelosa; mioclonía-opsoclonía; neuritis óptica; hipotensión ortostática; síndrome por sobreuso; parestesia; enfermedad o trastorno neurodegenerativo (enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), demencia, esclerosis múltiple y otras enfermedades y trastornos asociados con la muerte de las células neuronales); 50 paramiotonía congénita; enfermedades paraneoplásicas; ataques paroxísticos; síndrome de Parry Romberg; enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher; parálisis periódicas; neuropatía periférica; neuropatía dolorosa y dolor neuropático; estado vegetativo persistente; trastornos penetrantes del desarrollo; reflejo del estornudo fótico; enfermedad de almacenamiento de ácido fitánico; enfermedad de Pick; nervio pinzado; tumores de la hipófisis; polimiositis; porencefalia; síndrome post-polio; neuralgia postherpética; encefalomiелitis postinfecciosa; hipotensión postural; síndrome de Prader-Willi; esclerosis lateral priónica; enfermedades priónicas; atrofia hemifacial progresiva; 55 leucoencefalopatía multifocal progresiva; poliostrofia esclerosante progresiva; parálisis supranuclear progresiva; seudotumor cerebral; síndrome de Ramsay-Hunt (tipos I y II); encefalitis de Rasmussen; síndrome de distrofia simpática refleja; enfermedad de Refsum; trastornos del movimiento repetitivo; lesiones por esfuerzos repetitivos; síndrome de las piernas inquietas; mielopatía asociada a retrovirus; síndrome de Rett; síndrome de Reye; baile de

san Vito; enfermedad de Sandhoff; enfermedad de Schilder; esquizoencefalia; displasia septoóptica; síndrome del bebé sacudido; herpes zóster; síndrome de Shy-Drager; 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 Stiff-Person; accidente cerebrovascular; síndrome de Sturge-Weber; panencefalitis esclerosante subaguda; encefalopatía arteriosclerótica subcortical; corea de Sydenham; síncope; siringomielia; discinesia tardía; enfermedad de Tay-Sachs; arteritis temporal; síndrome de la médula trabada; enfermedad de Thomsen; síndrome de la salida torácica; tic doloroso; parálisis de Todd; síndrome de Tourette; ataque isquémico transitorio; encefalopatías espongiiformes transmisibles; mielitis transversa; lesión cerebral traumática; temblor; neuralgia del trigémino; paraparesia espástica tropical; esclerosis tuberosa; demencia vascular (demencia multiinfarto); vasculitis que incluye arteritis arterial; enfermedad de Von Hippel-Lindau; síndrome de Wallenberg; enfermedad de Werdnig-Hoffman; síndrome de West; lesión por latigazo; síndrome de Williams; enfermedad de Wildon; y síndrome de Zellweger.

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

Una enfermedad o trastorno cardiovascular incluye aquellos trastornos que pueden causar isquemia o que son provocados por reperfusión del corazón. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, aterosclerosis, enfermedad de las arterias coronarias, miocarditis granulomatosa, miocarditis crónica (no granulomatosa), cardiomiopatía hipertrófica primaria, enfermedad de las arterias periféricas (PAD), enfermedad vascular periférica, tromboembolia venosa, embolia pulmonar, accidente cerebrovascular, angina de pecho, infarto de miocardio, daños en el tejido cardiovascular causados por parada cardíaca, daños en el tejido cardiovascular causados por derivación cardíaca, shock cardiogénico y afecciones relacionadas que serían conocidas para el experto en la materia o que implican disfunción o daño de los tejidos en el corazón o la vasculatura, especialmente, pero sin limitarse a, daños en los tejidos relacionados con activación de TNFR2. Las enfermedades cardiovasculares incluyen, pero no se limitan a, aterosclerosis, miocarditis granulomatosa, infarto de miocardio, fibrosis miocárdica secundaria a cardiopatía valvular, fibrosis miocárdica sin infarto, cardiomiopatía hipertrófica primaria y miocarditis crónica (no granulomatosa).

Los ejemplos de enfermedades o trastornos asociados con estrés oxidativo incluyen pero no se limitan a aterosclerosis, enfermedad de Parkinson, insuficiencia cardíaca, infarto de miocardio, enfermedad de Alzheimer, síndrome de fatiga crónica, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), esclerosis múltiple, enfermedades o trastornos hepáticos, enfermedades o trastornos digestivos, diabetes, cáncer, autoinmunidad, enfermedades o trastornos de tipo inmunitario, enfermedades o trastornos neurológicos, enfermedades o trastornos neurodegenerativos, reparación nerviosa y parálisis, diferenciación neuroendocrina, enfermedades inflamatorias, enfermedades o trastornos musculares, enfermedades o trastornos asociados con organismos infecciosos, y similares.

Composiciones y moléculas de polinucleótidos y oligonucleótidos

Dianas: En un aspecto, las dianas comprenden secuencias de ácidos nucleicos de receptor del factor de necrosis tumoral 2 (TNFR2), que incluyen sin limitación secuencias no codificantes y/o codificantes con sentido y/o antisentido asociadas con TNFR2.

El factor de necrosis tumoral (TNF) es un destacado mediador proinflamatorio que se ha asociado de forma directa con la fisiopatología de varias enfermedades agudas y crónicas, en particular artritis reumatoide y Morbus Crohn. La expresión de TNF regulada por aumento se ha encontrado también en varias enfermedades neurodegenerativas tales como paludismo cerebral, demencia por SIDA, enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple o accidente cerebrovascular, lo que sugiere asimismo un posible papel patógeno del TNF en estas enfermedades. La forma expresada por membrana señala el TNF a través de los dos receptores de TNF (TNFR1 y TNFR2), mientras que el TNF, escindido proteolíticamente de la forma de membrana, actúa principalmente por medio de TNFR1. Las vías de señales iniciadas desde el dominio de muerte que contiene TNFR1, lo que conduce a respuestas celulares proapoptóticas y antiapoptóticas se han estudiado en gran detalle. En cambio, hay menos información sobre los mecanismos moleculares que rodean a las vías de señalización y las respuestas celulares iniciadas exclusivamente por medio de TNFR2.

CD120 (grupo de diferenciación 120), también conocido como receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR). Esta proteína es un miembro de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral. Existen dos variantes del receptor, cada una codificada por un gen independiente: CD120a-TNFR1-TNFRSF1A y CD120b-TNFR2-TNFRSF1B.

TNF- α no actúa independientemente en la célula, sino que lo hace a través de la unión a los dos receptores, la superfamilia de receptores de TNF, miembro 1A (TNFRSF1A o p55/p60), y la superfamilia de receptores de TNF, miembro 1B (TNFRSF1B/TNFR2, también denominados TNFR, p75/p80). TNFRSF1B/TNFR2 es el mayor de estos receptores, que están presentes en muchos tipos celulares, y se expresan con fuerza en linfocitos T y B con estimulación. TNFRSF1B puede regular la unión de TNF- α a TNFRSF1A, y así regular los niveles de TNF- α necesarios para estimular la acción del factor de transcripción, factor-kappa B nuclear (NF- κ B). El gen para TNFRSF1B está situado en el cromosoma 1p36.3-p36.2, que coincide con el locus de sensibilidad a la EII identificado anteriormente, IBD7.

Los miembros de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNFR) desempeñan diversos papeles en la regulación de la activación de los linfocitos. Un miembro importante de la familia de TNFR para activación de linfocitos B es CD40. Las señales de CD40 estimulan la secreción de TNF- α por linfocitos B, que posteriormente señala por medio de TNFR2 (CD120b) para mejorar la activación de linfocitos B. Aunque la función del receptor TNFR1 (CD120a) proapoptótico y proinflamatorio ha sido objeto de muchas investigaciones, se sabe menos sobre las distintas contribuciones de CD120b a la activación celular y sobre el modo en que estimula los episodios en la dirección 3'. Los miembros de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral se unen a diversos miembros de la familia de proteínas adaptadoras citoplásmicas, los factores asociados al receptor del factor de necrosis tumoral (TRAF), durante la señalización. CD40 y CD120b se unen al factor 2 asociado con receptores de TNF (TRAF2) tras la estimulación de ligandos.

Los polimorfismos de nucleótido único (SNP) en TNFRSF1B/TNFR2 también pueden modular el riesgo de diversas enfermedades autoinmunes, que incluyen artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico y enfermedad de Crohn (EC).

En los aspectos preferidos se usan oligonucleótidos antisentido para prevenir o tratar enfermedades o trastornos asociados con miembros de la familia TNFR2. Las enfermedades y trastornos de ejemplo mediados por el receptor del factor de necrosis tumoral 2 (TNFR2) que pueden tratarse con células/tejidos regenerados a partir de células madre obtenidas usando los compuestos antisentido comprenden: cáncer, una enfermedad o afección asociada con o caracterizada por proliferación celular, una enfermedad o trastorno asociado con la expresión o función mutante o aberrante de TNFRSF1B/TNFR2, una enfermedad o trastorno neurológico, una enfermedad o trastorno autoinmune, una enfermedad o trastorno asociado con el sistema inmunitario, una enfermedad inflamatoria intestinal, una alteración inflamatoria crónica con sensibilidad poligénica (por ejemplo, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, etc.), una enfermedad o trastorno asociado con una actividad de citocinas excesiva, caquexia, una enfermedad hepática, una enfermedad renal (por ejemplo, glomerulonefritis, rechazo de trasplante de riñón agudo, necrosis tubular aguda, etc.), una enfermedad o trastorno cardiovascular, arteriogenia mediada por isquemia y angiogenia, estrés oxidativo,

inflamación, paludismo cerebral, una enfermedad, trastorno o alteración asociados a inflamación (por ejemplo, artritis reumatoide, psoriasis y artritis psoriásica, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, alteración epitelial del colon inducida por inflamación crónica, etc.).

5 En un aspecto preferido, los oligonucleótidos son específicos para polinucleótidos de TNFR2, lo que incluye, sin limitación, regiones no codificantes. Las dianas de TNFR2 comprenden variantes de TNFR2; mutantes de TNFR2, que incluyen SNP; secuencias no codificantes de TNFR2; alelos, fragmentos y similares. Preferentemente el oligonucleótido es una molécula de ARN antisentido.

10 De acuerdo con los aspectos de la descripción, la molécula de ácido nucleico diana no se limita a polinucleótidos de TNFR2 en solitario pero se extiende a cualquiera de las isoformas, receptores, homólogos, regiones no codificantes y similares de TNFR2.

En otro aspecto preferido, un oligonucleótido se dirige a una secuencia antisentido natural (antisentido natural a las regiones codificantes y no codificantes) de dianas de TNFR2, lo que incluye, sin limitación, variantes, alelos, homólogos, mutantes, derivados, fragmentos y secuencias de complementariedad de los mismos. Preferentemente el oligonucleótido es una molécula de ARN o ADN antisentido.

20 En otro aspecto preferido, los compuestos oligoméricos de la presente descripción también incluyen variantes en que una base diferente está presente en una o más de las posiciones de nucleótidos en el compuesto. Por ejemplo, si el primer nucleótido es una adenina, pueden producirse variantes que contienen timidina, guanosina, citidina u otros nucleótidos naturales o no naturales en esta posición. Esto puede realizarse en cualquiera de las posiciones del compuesto antisentido. A continuación estos compuestos se someten a ensayo usando los procedimientos descritos en la presente memoria descriptiva para determinar su capacidad para inhibir la expresión de un ácido nucleico diana.

En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencias o complementariedad, entre el compuesto antisentido y la diana es de aproximadamente el 50% a aproximadamente el 60%. En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencias o complementariedad, es de aproximadamente el 60% a aproximadamente el 70%. En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencias o complementariedad, es de aproximadamente el 70% a aproximadamente el 80%. En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencias o complementariedad, es de aproximadamente el 80% a aproximadamente el 90%. En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencias o complementariedad, es 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 provocar una pérdida de actividad, y existe un grado de complementariedad suficiente para evitar la unión inespecífica del compuesto antisentido a secuencias no diana de ácidos nucleicos en condiciones en las que se desea una unión específica. Dichas condiciones incluyen, por ejemplo, condiciones fisiológicas en el caso de ensayos *in vivo* o tratamiento terapéutico, y condiciones en las que se realizan los ensayos en el caso de ensayos *in vitro*.

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

En otro aspecto preferido, el direccionamiento de TNFR2 que incluye sin limitación secuencias antisentido que se identifican y se expanden, usando por ejemplo, PCR, hibridación, etc., una o más de las secuencias indicadas como SEQ ID NO: 2 y 3, y similares, modulan la expresión o función de TNFR2. En un aspecto, la expresión o función se regula por aumento en comparación con un control. En otro aspecto preferido, la expresión o función se regula por disminución en comparación con un control.

En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos comprenden las secuencias de ácidos nucleicos indicadas como SEQ ID NO: 4 a 10 que incluyen secuencias antisentido que se identifican y expanden, usando por ejemplo, PCR, hibridación, etc. Estos oligonucleótidos pueden comprender uno o más nucleótidos modificados, fragmentos cortos o

largos, enlaces modificados y similares. Los ejemplos de enlaces modificados o uniones internucleotídicas comprenden fosforotioato, fosforoditioato o similares. En otro aspecto preferido, los nucleótidos comprenden un derivado del fósforo. El derivado del fósforo (o grupo fosfato modificado) que puede unirse a la fracción de azúcar o análogo de azúcar en los oligonucleótidos modificados de la presente descripción puede ser un monofosfato, difosfato, trifosfato, alquilfosfato, alcanofosfato, fosforotioato y similares. También se conoce la preparación de los análogos de fosfato indicados anteriormente, y su incorporación en nucleótidos, nucleótidos modificados y oligonucleótidos, de por sí, y no es necesario describirla aquí.

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

En algunos aspectos de la presente descripción los compuestos oligoméricos antisentido, en particular los 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 serán objeto de interferencia comprenden, por ejemplo, la replicación y la transcripción. Las funciones de ARN que serán objeto de interferencia comprenden todas las funciones vitales como, por ejemplo, la translocación del ARN al sitio de traducción de proteínas, la traducción de proteínas desde el ARN, el splicing del ARN para producir una o más especies de ARNm y la actividad catalítica que puede ser impulsada o facilitada por el ARN. Las funciones pueden regularse por aumento o inhibirse dependiendo de las funciones deseadas.

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

El direccionamiento de un compuesto antisentido en una molécula de ácidos nucleicos en particular, en el contexto de esta descripción, puede ser un proceso en varias etapas. El proceso comienza normalmente con la identificación de un ácido nucleico diana cuya función se va a modular. Este ácido nucleico diana puede ser, por ejemplo, un gen celular (o ARNm transcrito a partir del gen) cuya expresión se asocia con un trastorno o estado patológico en particular, o una molécula de ácidos nucleicos de un agente infeccioso. En la presente descripción, el ácido nucleico diana codifica el receptor del factor de necrosis tumoral 2 (TNFR2).

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

En un aspecto preferido, los oligonucleótidos antisentido se unen a las secuencias antisentido naturales del receptor del factor de necrosis tumoral 2 (TNFR2) y modulan la expresión y/o función del receptor del factor de necrosis tumoral 2 (TNFR2) (SEQ ID NO: 1). Los ejemplos de secuencias antisentido incluyen las SEQ ID NO: 2 a 10.

En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos antisentido se unen a uno o más segmentos de polinucleótidos del receptor del factor de necrosis tumoral 2 (TNFR2) y modulan la expresión y/o función de receptor del factor de necrosis tumoral 2 (TNFR2). Los segmentos comprenden al menos cinco nucleótidos consecutivos de los polinucleótidos del receptor del factor de necrosis tumoral 2 (TNFR2) con sentido o antisentido.

En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos antisentido son específicos de secuencias antisentido naturales del receptor del factor de necrosis tumoral 2 (TNFR2) donde la unión de los oligonucleótidos a las secuencias antisentido naturales de TNFR2 modulan la expresión y/o función del receptor del factor de necrosis tumoral 2 (TNFR2).

En otro aspecto preferido, los compuestos de oligonucleótidos comprenden las secuencias indicadas como SEQ ID NO: 4 a 10, secuencias antisentido que se identifican y expanden, usando por ejemplo, PCR, hibridación, etc. Estos oligonucleótidos pueden comprender uno o más nucleótidos modificados, fragmentos cortos o largos, enlaces modificados y similares. Los ejemplos de enlaces modificados o uniones internucleotídicas comprenden fosforotioato, fosforoditioato o similares. En otro aspecto preferido, los nucleótidos comprenden un derivado del fósforo. El derivado del fósforo (o grupo fosfato modificado) que puede unirse a la fracción del azúcar o análogo de azúcar en los oligonucleótidos modificados de la presente descripción puede ser un monofosfato, difosfato, trifosfato, alquilfosfato, alcanofosfato, fosforotioato y similares. La preparación de los análogos de fosfato indicados anteriormente, y su incorporación en nucleótidos, nucleótidos modificados y oligonucleótidos, de por sí, es también conocida y no es preciso describirla aquí.

Dado que, como se sabe en la técnica, el codón de inicio de traducción es normalmente 5'-AUG (en moléculas de ARNm transcritas; 5'-ATG en la molécula de ADN correspondiente), el codón de inicio de traducción se refiere también como "codón AUG", "codón de inicio" o "codón de inicio AUG". Una minoría de genes tiene un codón de inicio de traducción que tiene la secuencia de ARN 5'-GUG, 5'-UUG o 5'-CUG; y se ha demostrado que 5'-AUA, 5'-ACG y 5'-CUG funcionan *in vivo*. Así, los términos "codón de inicio de traducción" y "codón de inicio" pueden comprender muchas secuencias de codones, aun cuando el aminoácido iniciador en cada caso es normalmente la metionina (en eucariotas) o la formilmetionina (en procariotas). Los genes eucarióticos o procarióticos pueden tener dos o más codones de inicio alternativos, cualquiera de los cuales puede usarse preferentemente para el inicio de la traducción en un tipo celular o tejido en particular, o en un conjunto determinado de condiciones. En el contexto de la descripción, "codón de inicio" y "codón de inicio de traducción" se refieren al codón o codones que se usan *in vivo* para iniciar la traducción de un ARNm transcrito a partir de un gen que codifica el receptor del factor de necrosis tumoral 2 (TNFR2), con independencia de la o las secuencias de dichos codones. Un codón de terminación de traducción (o "codón de parada") de un gen puede tener una de entre tres secuencias, es decir, 5'-UAA, 5'-UAG y 5'-UGA (las secuencias de ADN correspondientes son 5'-TAA, 5'-TAG y 5'-TGA, respectivamente).

Los términos "región de codón de inicio" y "región de codón de inicio de traducción" se refieren a una parte de dicho ARNm o gen que comprende de aproximadamente 25 a aproximadamente 50 nucleótidos contiguos en cualquier dirección (es decir, 5' o 3') a partir de un codón de inicio de traducción. De forma similar, los términos "región de codón de parada" y "región de codón de terminación de traducción" se refieren a una parte de dicho ARNm o gen que comprende de aproximadamente 25 a aproximadamente 50 nucleótidos contiguos en cualquier dirección (es decir, 5' o 3') a partir de un codón de terminación de traducción. En consecuencia, la "región de codón de inicio" (o "región de codón de inicio de traducción") y la "región de codón de parada" (o "región de codón de terminación de traducción") son todas regiones que pueden ser direccionadas efectivamente mediante los compuestos antisentido de la presente descripción.

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

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

Aunque algunos transcritos de ARNm eucarióticos se traducen directamente, pueden contener una o más regiones, conocidas como "intrones", que se escinden de un transcrito antes de ser traducidas. Las regiones restantes (y por tanto traducidas) se conocen como "exones" y se someten a splicing juntas para formar una secuencia de ARNm continua. En un aspecto, el direccionamiento a sitios de splicing, es decir, uniones intrón-exón o uniones exón-intrón, es especialmente útil en situaciones en que en la enfermedad interviene un splicing aberrante, o en que en la enfermedad interviene una sobreproducción de un producto de splicing en particular. Una unión de fusión aberrante

debida a la reordenación o deleción es otro aspecto de un sitio diana. Los transcritos de ARNm producidos por medio del proceso de splicing de dos (o más) ARNm de diferentes fuentes génicas se conocen como "transcritos de fusión". Los intrones pueden ser objeto efectivamente de direccionamiento usando compuestos antisentido dirigidos, por ejemplo, a ADN o pre-ARNm.

5

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

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

10

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

15 Pueden producirse transcritos de ARN alternativos a partir de la misma región genómica de ADN. Estos transcritos alternativos se conocen generalmente como "variantes". Más específicamente, "las variantes de pre-ARNm" son transcritos producidos a partir del mismo ADN genómico que difieren de otros transcritos producidos a partir del mismo ADN genómico en su posición de inicio o de parada y que contienen secuencia de intrones o de exones.

20 Tras la escisión de una o más regiones de exones o intrones, o de partes de las mismas durante el splicing, 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 procesada siempre debe producir una única variante de ARNm como resultado del splicing. Estas variantes de ARNm se conocen también como "variantes de splicing alternativas". Si no se produce el splicing de la variante de pre-ARNm entonces la variante de pre-ARNm es idéntica a la variante de ARNm.

25

Las variantes pueden producirse a través del uso de señales alternativas para transcripción de inicio o de parada. Los pre-ARNm y los ARNm pueden poseer más de un codón de inicio o codón de parada. Las variantes que proceden de un pre-ARNm o ARNm que usa codones de inicio alternativas se conocen como "variantes de inicio alternativas" de dicho pre-ARNm o ARNm. Los transcritos que usan un codón de parada alternativo se conocen como "variantes de parada alternativas" de dicho pre-ARNm o ARNm. Un tipo específico de variante de parada alternativa es la "variante poli-A" en la que los múltiples transcritos producidos proceden de la selección alternativa de una de las "señales de parada poli-A" por la maquinaria de transcripción, para producir así transcritos que terminan en sitios poli-A únicos. Dentro del contexto de la descripción, los tipos de variantes descritos en la presente memoria descriptiva son también casos de ácidos nucleicos diana.

30

35

Las posiciones en el ácido nucleico diana con el que se hibridan los compuestos antisentido se definen como una parte de al menos 5-10 nucleótidos de una región diana a la que se dirige un compuesto antisentido activo.

40 Si bien en la presente memoria descriptiva se indican las secuencias específicas de ciertos segmentos diana, un experto en la materia reconocerá que sirven para ilustrar y describir aspectos concretos dentro del alcance de la presente descripción. Los segmentos diana adicionales son fáciles de identificar por un experto en la materia a la vista de esta descripción.

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

Los segmentos diana pueden incluir secuencias de ADN o ARN que comprenden al menos los 5 nucleótidos consecutivos del extremo 5' de uno de los segmentos diana preferidos ilustrativos (siendo los restantes nucleótidos una extensión consecutiva del mismo ADN o ARN que empieza inmediatamente hacia el extremo 5' del segmento diana y continúa hasta que el ADN o ARN contiene de aproximadamente 5 a aproximadamente 100 nucleótidos). De forma similar los segmentos diana preferidos se representan mediante secuencias de ADN o ARN que comprenden al menos los 5 nucleótidos consecutivos desde el extremo 3' de uno de los segmentos diana preferidos ilustrativos (siendo los restantes nucleótidos una extensión consecutiva del mismo ADN o ARN que empieza inmediatamente hacia el extremo 3' del segmento diana y continúa hasta que el ADN o ARN contiene de aproximadamente 5 a aproximadamente 100 nucleótidos). Un experto en la materia provisto de los segmentos diana ilustrados en la presente memoria descriptiva podrá, sin una experimentación innecesaria, identificar segmentos diana preferidos adicionales.

50

55

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

5

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

10

En un aspecto, se prefiere dirigirse a ácidos nucleicos específicos mediante oligonucleótidos antisentido. El direccionamiento de un compuesto antisentido a un ácido nucleico en particular es un proceso en múltiples etapas. El proceso comienza normalmente con la identificación de una secuencia de ácidos nucleicos cuya función debe modularse. Puede ser, por ejemplo, un gen celular (o ARNm transcrito a partir del gen) cuya expresión se asocia con un trastorno o estado patológico en particular, o un polinucleótido no codificante como por ejemplo, ARN no codificante (ARNnc).

15

Los ARN pueden clasificarse en (1) ARN mensajeros (ARNm), que se traducen en proteínas, y (2) ARN codificantes no proteínicos (ARNnc). Los ARNnc comprenden micro-ARN, transcritos antisentido y otras unidades transcripcionales (TU) que contienen una alta densidad de codones de parada y carecen de ningún "Marco de lectura abierto" extenso. Muchos ARNnc parecen empezar en sitios de inicio en regiones 3' no traducidas (3' UTR) de loci codificante de proteínas. Los ARNnc suelen ser raros y al menos la mitad de los ARNnc que han sido secuenciados por el consorcio FANTOM parecen no ser poliadenilados. La mayoría de los investigadores se han centrado por motivos evidentes en los ARNm poliadenilados que son procesados y exportados al citoplasma. Recientemente, se ha demostrado que el conjunto de ARN nucleares no poliadenilados puede ser muy grande, y que muchos de dichos transcritos proceden de las llamadas regiones intergénicas. El mecanismo por el cual los ARNnc pueden regular la expresión génica es el apareamiento de bases con transcritos diana. Los ARN que actúan por apareamiento de bases pueden agruparse en (1) ARN codificados en cis que son codificados en la misma posición genética, pero en la cadena opuesta a los ARN sobre los que actúan y por tanto muestran una perfecta complementariedad con su diana, y (2) ARN transcodificados que son codificados en una posición cromosómica distinta de los ARN sobre los que actúan y generalmente no muestran un potencial de apareamiento de bases perfecto con sus dianas.

20

25

30

Sin querer vincularse a ninguna teoría, la perturbación de un polinucleótido antisentido por los oligonucleótidos antisentido descritos en la presente memoria descriptiva puede alterar la expresión de los ARN mensajeros con sentido correspondientes. Sin embargo, esta regulación puede ser discordante (la interferencia génica antisentido produce una elevación de ARN mensajero) o concordante (la interferencia génica antisentido produce una reducción concomitante de ARN mensajero). En estos casos, los oligonucleótidos antisentido pueden ser direccionados a partes superpuestas o no superpuestas del transcrito antisentido lo que lleva a su interferencia génica o secuestro. El antisentido codificante y no codificante puede ser direccionado de la misma manera y cualquier categoría es capaz de regular los transcritos con sentido correspondientes, de forma concordante o discordante. Las estrategias que se emplean para identificar los nuevos oligonucleótidos para su uso contra una diana pueden basarse en la interferencia génica de transcritos de ARN antisentido por oligonucleótidos antisentido o cualquier otro medio de modulación de la diana deseada.

35

40

45

Estrategia 1: En el caso de regulación discordante, la atenuación del transcrito antisentido eleva la expresión del gen convencional (con sentido). Si este último gen codificara un fármaco diana conocido o posible, la interferencia génica de su contraparte antisentido podría imitar de forma concebible la acción de un agonista del receptor o un estimulante enzimático.

50

Estrategia 2: En el caso de regulación concordante, podrían atenuarse simultáneamente los transcritos antisentido y con sentido y conseguir así una reducción sinérgica de la expresión génica convencional (con sentido). Si, por ejemplo, se usa un oligonucleótido antisentido para conseguir la interferencia génica, esta estrategia puede usarse para aplicar un oligonucleótido antisentido direccionado con el transcrito con sentido y otro oligonucleótido antisentido al transcrito antisentido correspondiente, o un único oligonucleótido antisentido simétrico energéticamente que se dirige simultáneamente a los transcritos con sentido y antisentido superpuestos.

55

De acuerdo con la presente descripción, los compuestos antisentido incluyen oligonucleótidos antisentido, ribozimas, oligonucleótidos de secuencia de guía externa (EGS), compuestos de siRNA, compuestos de ARN de interferencia

(ARNi) monocatenarios o bicatenarios tales como compuestos de siRNA, y otros compuestos oligoméricos que se hibridan con al menos una parte del ácido nucleico diana y modulan su función. De este modo, pueden ser ADN, ARN, semejantes a ADN, semejantes a ARN o mezclas de los mismos, o pueden ser miméticos de uno o más de los mismos. Estos compuestos pueden ser compuestos oligoméricos monocatenarios, bicatenarios, circulares u horquilla y pueden contener elementos estructurales tales como protuberancias internas o terminales, defectos de apareamiento o bucles. Los compuestos antisentido se preparan de forma rutinaria linealmente aunque pueden unirse o prepararse de otros modos para ser circulares y/o ramificados. Los compuestos antisentido pueden incluir construcciones como, por ejemplo, dos cadenas hibridadas para formar un compuesto total o parcialmente bicatenario o una cadena única con suficiente autocomplementariedad para permitir la hibridación y formación de un compuesto total o parcialmente bicatenario. Las dos cadenas pueden estar unidas internamente para dejar extremos 3' o 5' libres o pueden estar unidas para formar una estructura continua en horquilla o bucle. La estructura en horquilla puede contener un saliente en el extremo 5' o 3' que produce una extensión de carácter monocatenario. Los compuestos bicatenarios pueden incluir opcionalmente salientes en los dos extremos. Las modificaciones adicionales pueden incluir grupos conjugados unidos a uno de los extremos, posiciones de nucleótidos seleccionadas, posiciones de azúcares o con una de las uniones de internucleósidos. Alternativamente, las dos cadenas pueden estar unidas por medio de una fracción no de ácidos nucleicos o un grupo conector. Cuando está formado por una única cadena, el dsRNA puede adoptar la forma de una molécula de tipo horquilla autocomplementaria que se pliega sobre sí misma para formar un dúplex. Así, los dsRNA pueden ser total o parcialmente bicatenarios. La modulación específica de la expresión génica puede conseguirse mediante la expresión estable de horquillas de dsRNA en líneas celulares transgénicas, sin embargo, en algunos aspectos, la expresión génica o función se regula por aumento. Cuando se forma a partir de dos cadenas, o de una sola cadena que adopta la forma de una molécula de tipo horquilla autocomplementaria plegada sobre sí misma para formar un dúplex, las dos cadenas (o regiones de una sola cadena que forman un dúplex) son cadenas de ARN complementarias que se emparejan en bases en la forma de Watson-Crick.

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

En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos o compuestos antisentido deseados comprenden al menos uno de entre: ARN antisentido, ADN antisentido, oligonucleótidos antisentido quiméricos, oligonucleótidos antisentido que comprenden uniones modificadas, ARN de interferencia (ARNi), ARN de interferencia corta (siRNA); un ARN de interferencia micro (miRNA); un ARN pequeño temporal (stRNA); o un ARN de horquilla corto (shRNA); activación génica inducida por ARN pequeño (ARNa); ARN pequeños de activación (saRNA), o combinaciones de los mismos.

El dsRNA puede activar también la expresión génica, un mecanismo que se ha denominado "activación génica inducida por ARN pequeño" o ARNa. Los dsRNA que se dirigen a promotores génicos inducen una potente activación transcripcional de los genes asociados. La ARNa se ha demostrado en células humanas usando dsRNA sintéticos, denominados "ARN de activación pequeños" (saRNA). En la actualidad no se sabe si la ARNa se conserva en otros organismos.

Se ha descubierto que los ARN bicatenarios pequeños (dsRNA), tales como los ARN de interferencia pequeños (siRNA) y los micro-ARN (miRNA), activan un mecanismo evolutivo conservado conocido como ARN de interferencia (ARNi). El ARNi conduce invariablemente al silenciamiento génico por medio de la remodelación de cromatina para suprimir así la transcripción, degradar el ARNm complementario o bloquear la traducción de proteínas. Sin embargo, en los aspectos descritos en detalle en la sección de ejemplos que se ofrece a continuación, se ha mostrado que los oligonucleótidos aumentan la expresión y/o función de los polinucleótidos del receptor del factor de necrosis tumoral 2 (TNFR2) y los productos codificados de los mismos. Los dsRNA pueden actuar también como ARN de activación pequeños (saRNA). Sin querer vincularse a ninguna teoría, mediante el direccionamiento de secuencias en promotores génicos, los saRNA inducirían la expresión de los genes diana en un fenómeno referido como activación transcripcional inducida por dsRNA (ARNa).

En un aspecto adicional, los "segmentos diana preferidos" identificados en la presente memoria descriptiva pueden emplearse en el cribado de compuestos adicionales que modulan la expresión de los polinucleótidos del receptor del factor de necrosis tumoral 2 (TNFR2). Los "moduladores" son aquellos compuestos que disminuyen o aumentan la expresión de una molécula de ácidos nucleicos que codifica el receptor del factor de necrosis tumoral 2 (TNFR2) y que comprenden al menos una parte de 5 nucleótidos que es complementaria a un segmento diana preferido. El procedimiento de cribado comprende las etapas de la puesta en contacto de un segmento diana preferido de una molécula de ácidos nucleicos que codifica polinucleótidos con sentido o antisentido naturales del receptor del factor de necrosis tumoral 2 (TNFR2) con uno o más moduladores candidatos, y la selección de uno o más moduladores candidatos que reducen o aumentan la expresión de una molécula de ácidos nucleicos que codifica polinucleótidos del receptor del factor de necrosis tumoral 2 (TNFR2), por ejemplo las SEQ ID NO: 4 a 10. Una vez demostrado que el modulador o los moduladores candidatos son capaces de modular (por ejemplo, aumentando o reduciendo) la expresión de una molécula de ácidos nucleicos que codifica polinucleótidos del receptor del factor de necrosis tumoral 2 (TNFR2), el modulador puede emplearse en posteriores estudios de investigación de la función de los polinucleótidos del receptor del factor de necrosis tumoral 2 (TNFR2), o para su uso como un agente de investigación, diagnóstico o terapéutico de acuerdo con la presente descripción.

El direccionamiento de la secuencia antisentido natural modula preferentemente la función del gen diana. Por ejemplo, el gen TNFR2 (por ejemplo, número de acceso NM_001066). En un aspecto preferido, la diana es un polinucleótido antisentido del gen TNFR2. En un aspecto preferido, un oligonucleótido antisentido se dirige a secuencias naturales con sentido y/o antisentido de los polinucleótidos del receptor del factor de necrosis tumoral 2 (TNFR2) (por ejemplo, número de acceso NM_001066), variantes, alelos, isoformas, homólogos, mutantes, derivados, fragmentos y secuencias de complementariedad de los mismos. Preferentemente el oligonucleótido es una molécula antisentido y las dianas incluyen regiones codificantes y no codificantes de polinucleótidos de TNFR2 antisentido y/o con sentido.

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

En la técnica se ha demostrado que dichas fracciones de oligonucleótidos bicatenarios modulan la expresión de la diana y regulan la traducción así como el procesamiento de ARN mediante un mecanismo antisentido. Por otra parte, las fracciones bicatenarias pueden estar sujetas a modificaciones químicas. Por ejemplo, se ha demostrado que dichas fracciones bicatenarias inhiben la diana mediante la hibridación clásica de la cadena antisentido del dúplex con la diana, activando así la degradación enzimática de la diana.

En un aspecto preferido, un oligonucleótido antisentido se dirige a polinucleótidos del receptor del factor de necrosis tumoral 2 (TNFR2) (por ejemplo, número de acceso NM_001066), variantes, alelos, isoformas, homólogos, mutantes, derivados, fragmentos y secuencias de complementariedad de los mismos. Preferentemente el oligonucleótido es una molécula antisentido.

De acuerdo con los aspectos de la descripción, la molécula de ácidos nucleicos diana no se limita al receptor del factor de necrosis tumoral 2 (TNFR2) en solitario sino que se extiende a cualquiera de las isoformas, receptores, homólogos y similares de moléculas del receptor del factor de necrosis tumoral 2 (TNFR2).

En otro aspecto preferido, un oligonucleótido se dirige a una secuencia antisentido natural de polinucleótidos de TNFR2, por ejemplo, polinucleótidos expresados como las SEQ ID NO: 2 y 3, y cualquier variante, alelo, homólogo, mutante, derivado, fragmento y secuencia de complementariedad de los mismos. Se indican ejemplos de oligonucleótidos antisentido como las SEQ ID NO: 4 a 10.

En un aspecto, los oligonucleótidos son complementarios a o se unen con secuencias de ácidos nucleicos de antisentido del receptor del factor de necrosis tumoral 2 (TNFR2), lo que incluye sin limitación secuencias con sentido y/o antisentido no codificantes asociadas con los polinucleótidos del receptor del factor de necrosis tumoral 2 (TNFR2) y modulan la expresión y/o función de las moléculas del receptor del factor de necrosis tumoral 2 (TNFR2).

En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos son complementarios a o se unen con secuencias de ácidos nucleicos de antisentido natural de TNFR2 antisentido, indicadas como las SEQ ID NO: 2 y 3 y modulan la expresión y/o función de las moléculas de TNFR2.

En un aspecto preferido, los oligonucleótidos comprenden secuencias de al menos 5 nucleótidos consecutivos de las

SEQ ID NO: 4 a 10 y modulan la expresión y/o función de moléculas del receptor del factor de necrosis tumoral 2 (TNFR2).

Las dianas de polinucleótidos comprenden TNFR2, lo que incluye miembros de la familia de los mismos, variantes de TNFR2; mutantes de TNFR2, lo que incluye SNP; secuencias no codificantes de TNFR2; alelos de TNFR2; especies variantes, fragmentos y similares. Preferentemente el oligonucleótido es una molécula antisentido.

En otro aspecto preferido, el oligonucleótido que se dirige a polinucleótidos del receptor del factor de necrosis tumoral 2 (TNFR2) comprende: ARN antisentido, ARN de interferencia (ARNi), ARN de interferencia corto (siRNA); micro ARN de interferencia (miRNA); un ARN temporal pequeño (stRNA); o un ARN de horquilla corto (shRNA); activación génica inducida por ARN pequeño (ARNa); o ARN de activación pequeño (saRNA).

En otro aspecto preferido, el direccionamiento de polinucleótidos del receptor del factor de necrosis tumoral 2 (TNFR2), por ejemplo SEQ ID NO: 2 y 3 modula la expresión o función de estas dianas. En un aspecto, la expresión o función se regula por aumento en comparación con un control. En otro aspecto preferido, la expresión o función se regula por disminución en comparación con un control.

En otro aspecto preferido, los compuestos antisentido comprenden secuencias indicadas como SEQ ID NO: 4 a 10. Estos oligonucleótidos pueden comprender uno o más nucleótidos modificados, fragmentos cortos o largos, enlaces modificados y similares.

En otro aspecto preferido, las SEQ ID NO: 4 a 10 comprenden uno o más nucleótidos 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 enzimáticas de ácidos nucleicos (por ejemplo, ribozimas) son moléculas de ácidos nucleicos capaces de catalizar una o más de entre una variedad de reacciones, lo que incluye la capacidad de escindir repetidamente otras moléculas de ácidos nucleicos separadas de una forma específica de secuencias de bases de nucleótidos. Dichas moléculas de ácidos nucleicos enzimáticas pueden usarse, por ejemplo, para dirigirse prácticamente a cualquier transcrito de ARN.

Debido a su especificidad de secuencias, las moléculas de ácidos nucleicos enzimáticas de escisión trans son prometedoras como agentes terapéuticos para las enfermedades humanas (Usman & McSwiggen, (1995) *Ann. Rep. Med. Chem.* 30, 285-294; Christoffersen y Marr, (1995) *J Med. Chem.* 38, 2023-2037). Las moléculas de ácidos nucleicos enzimáticas pueden diseñarse para escindir dianas de ARN específicas dentro del sustrato del ARN celular. Dicho episodio de escisión convierte el ARNm en no funcional y anula la expresión de proteínas de ese ARN. De esta forma, la síntesis de una proteína asociada con un estado patológico puede inhibirse selectivamente.

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

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

El desarrollo de ribozimas que son óptimas para la actividad catalítica contribuiría significativamente a cualquier estrategia que emplee ribozimas de escisión de ARN con el fin de regular la expresión génica. La ribozima tipo cabeza de martillo, por ejemplo, actúa con una velocidad catalítica (*k_{cat}*) de aproximadamente 1 min⁻¹ en presencia de concentraciones de saturación (10 mM) de cofactor de Mg²⁺. Se ha mostrado que una ribozima artificial de "ligasa de ARN" cataliza la reacción de automodificación correspondiente con una velocidad de aproximadamente 100 min⁻¹. Además, se sabe que ciertas ribozimas de tipo cabeza de martillo modificadas que tienen brazos de unión al sustrato hechas de ADN catalizan la escisión de ARN con tasas de recambio múltiples que se acercan a 100 min⁻¹. Finalmente, la sustitución de un residuo específico dentro del núcleo catalítico de la cabeza de martillo con determinados análogos de nucleótidos proporciona ribozimas modificadas que muestran una mejora de hasta 10

veces en la velocidad catalítica. Estos hallazgos revelan que las ribozimas pueden promover transformaciones químicas con velocidades catalíticas que son significativamente mayores que las mostradas *in vitro* por la mayoría de las ribozimas de autoescisión naturales. Así es posible que las estructuras de ciertas ribozimas de autoescisión puedan optimizarse para proporcionar una actividad catalítica máxima, o que puedan prepararse motivos de ARN totalmente nuevos que muestren velocidades significativamente más rápidas para la escisión de fosfodiésteres de ARN.

La escisión intermolecular de un sustrato de ARN por un catalizador de ARN que se ajusta al modelo de "cabeza de martillo" fue mostrada por primera vez en 1987 (Uhlenbeck, O. C. (1987) *Nature*, 328: 596-600). El catalizador de ARN fue recuperado y se hizo reaccionar con múltiples moléculas de ARN, para demostrar que era un catalizador auténtico.

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

El ARN de interferencia (ARNi) se ha convertido en una poderosa herramienta para modular la expresión génica en mamíferos y células de mamíferos. Este planteamiento requiere el suministro de un ARN de interferencia pequeño (siRNA) como un ARN en sí o como un ADN, usando un virus o un plásmido de expresión y la secuencia codificante para ARN de horquilla pequeños que se procesan como siRNA. Este sistema hace posible un transporte eficiente de los pre-siRNA al citoplasma donde están activos y permiten el uso de promotores específicos de tejidos y regulados 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 por nucleótidos de ocurrencia natural, azúcares y uniones de internucleósidos covalentes (estructura principal) así como oligonucleótidos que tienen partes de ocurrencia no natural que actúan de forma similar. Dichos oligonucleótidos modificados o sustituidos se prefieren a menudo con respecto a las formas nativas debido a sus propiedades convenientes como, por ejemplo, captación celular mejorada, afinidad mejorada para un ácido nucleico diana y mayor estabilidad en presencia de nucleasas.

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

Una vez introducidos en un sistema, los compuestos de la descripción pueden activar la acción de una o más enzimas o proteínas estructurales para efectuar la escisión u otra modificación del ácido nucleico diana o pueden actuar mediante mecanismos basados en la ocupación. En general, los ácidos nucleicos (lo que incluye 5 oligonucleótidos) pueden describirse como "semejantes a ADN" (es decir, que tienen generalmente uno o más azúcares 2'-desoxi y, generalmente, bases T en lugar de U) o "semejantes a ARN" (es decir, que tienen generalmente uno o más azúcares 2'-hidroxilo o modificados en 2' y, generalmente bases U en lugar de T). Las hélices de ácidos nucleicos pueden adoptar más de un tipo de estructura, muy comúnmente las formas A y B. Se cree que, en general, los oligonucleótidos que tienen una estructura semejante a una forma B son "semejantes a 10 ADN" y los que tienen estructura semejante a una forma A son "semejantes a ARN." En algunos casos (químicos), un compuesto antisentido puede contener regiones en forma A y B.

Los compuestos antisentido de acuerdo con esta descripción pueden comprender una parte antisentido de aproximadamente 5 a aproximadamente 80 nucleótidos (es decir de aproximadamente 5 a aproximadamente 80 15 nucleósidos unidos) de longitud. Esto se refiere a la longitud de la cadena antisentido o parte del compuesto antisentido. En otras palabras, un compuesto antisentido monocatenario de la descripción comprende de 5 a aproximadamente 80 nucleótidos, y un compuesto antisentido bicatenario de la descripción (como un dsRNA, por ejemplo) comprende una cadena o una parte con sentido y antisentido de 5 a aproximadamente 80 nucleótidos de longitud. Un experto en la materia observará que esto incluye las partes antisentido de 5, 6, 7,8, 9, 10, 11, 12, 13, 20 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 intermedio.

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

30 En un aspecto, los compuestos de oligonucleótidos o antisentido de la descripción tienen partes antisentido de 12 ó 13 a 30 nucleótidos de longitud. Un experto en la materia observará que esto comprende compuestos antisentido que tienen partes antisentido de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ó 30 nucleótidos de longitud, o cualquier intervalo intermedio.

35 En otro aspecto preferido, los compuestos oligoméricos de la presente descripción también incluyen variantes en las que está presente una base diferente en una o más de las posiciones de nucleótidos en el compuesto. Por ejemplo, si el primer nucleótido es una adenosina, pueden producirse variantes que contienen timidina, guanosina o citidina en esta posición. Esto puede realizarse en cualquiera de las posiciones de los compuestos antisentido o de dsRNA. A continuación se someten a ensayo estos compuestos usando los procedimientos descritos en la presente memoria 40 descriptiva para determinar su capacidad de inhibir la expresión de un ácido nucleico diana.

En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencias o complementariedad, entre el compuesto antisentido y la diana es de aproximadamente el 40% a aproximadamente el 60%. En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencias o complementariedad, es de aproximadamente el 60% a aproximadamente el 70%. En algunos 45 aspectos, la homología, identidad de secuencias o complementariedad, es de aproximadamente el 70% a aproximadamente el 80%. En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencias o complementariedad, es de aproximadamente el 80% a aproximadamente el 90%. En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencias o complementariedad, es aproximadamente el 90%, aproximadamente el 92%, aproximadamente el 94%, aproximadamente el 95%, aproximadamente el 96%, aproximadamente el 97%, aproximadamente el 98%, 50 aproximadamente el 99% o aproximadamente el 100%.

En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos antisentido, como por ejemplo, las moléculas de ácidos nucleicos indicadas en las SEQ ID NO: 2 a 10 comprenden una o más sustituciones o modificaciones. En un aspecto, los nucleótidos están sustituidos por ácidos nucleicos bloqueados (LNA).

55 En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos se dirigen a una o más regiones de las moléculas de ácidos nucleicos con sentido y/o antisentido de secuencias codificantes y/o no codificantes asociadas con TNFR2 y las secuencias indicadas como SEQ ID NO: 1 a 3. Los oligonucleótidos se dirigen también a regiones de superposición de las SEQ ID NO: 1 a 3.

Algunos oligonucleótidos preferidos de esta descripción son oligonucleótidos quiméricos. Los "oligonucleótidos quiméricos" o "quimeras", en el contexto de esta descripción, son oligonucleótidos que contienen dos o más regiones distintas químicamente, cada una formada por al menos un nucleótido. Estos oligonucleótidos contienen normalmente al menos una región de nucleótidos modificados que confiere una o más propiedades beneficiosas (como, por ejemplo, aumento de la resistencia a la nucleasa, mayor captación en las células, aumento de la afinidad de unión para la diana) y una región que es un sustrato para enzimas capaces de escindir híbridos ARN:ADN o ARN:ARN. A modo de ejemplo, la ARNasa H es una endonucleasa celular que escinde la cadena de ARN de un dúplex ARN:ADN. Por tanto, la activación de la ARNasa H produce la escisión del ARN diana, con lo que mejora enormemente la eficiencia de la modulación antisentido de la expresión génica. En consecuencia, cuando se usan oligonucleótidos quiméricos a menudo pueden obtenerse resultados comparables con oligonucleótidos más cortos, en comparación con desoxioligonucleótidos de fosforotioato que se hibridan con la misma región diana. La escisión del ARN diana puede detectarse de forma rutinaria mediante electroforesis en gel y, si fuera necesario, técnicas de hibridación de ácidos nucleicos asociadas conocidas en la técnica. En un aspecto preferido, un oligonucleótido quimérico comprende al menos una región modificada para aumentar la afinidad de unión a la diana, y, normalmente, una región que actúa como sustrato para ARNasa H. La afinidad de un oligonucleótido por esta diana (en este caso, un ácido nucleico que codifica ras) se determina de forma rutinaria midiendo la T_m de un par oligonucleótido/diana, que es la temperatura a la que el oligonucleótido y la diana se disocian; la disociación se detecta espectrofotométricamente. Cuanto más elevada es la T_m , mayor es la afinidad del oligonucleótido por la diana.

Los compuestos antisentido quiméricos de la descripción pueden formarse como estructuras compuestas de dos o más oligonucleótidos, oligonucleótidos modificados, oligonucleósidos y/o oligonucleótidos miméticos tal como se describe anteriormente. Dichos compuestos se han referido también en la técnica como híbridos o gámperos. Las patentes representativas de los Estados Unidos que enseñan la preparación de dichas estructuras híbridas comprenden, pero no se limitan a, las patentes de EE.UU. nº 5.013.830; 5.149.797; 5.220.007; 5.256.775; 5.366.878; 5.403.711; 5.491.133; 5.565.350; 5.623.065; 5.652.355; 5.652.356; y 5.700.922.

En otro aspecto preferido, la región del oligonucleótido que se modifica comprende al menos un nucleótido modificado en la posición 2' del azúcar, con la máxima preferencia un nucleótido modificado en 2'-O-alquilo, 2'-O-alquil-O-alquilo o 2'-fluoro. En otros aspectos preferidos, las modificaciones de ARN incluyen modificaciones de 2'-fluoro, 2'-amino y 2' O-metilo en la ribosa de las pirimidinas, residuos abásicos o una base invertida en el extremo 3' del ARN. Dichas modificaciones se incorporan de forma rutinaria en los oligonucleótidos y estos oligonucleótidos han demostrado tener una T_m más alta (es decir, una mayor afinidad de unión a la diana) que los 2'-desoxioligonucleótidos con respecto a una diana dada. El efecto de dicha afinidad incrementada consiste en mejorar enormemente la inhibición de la expresión génica de los oligonucleótidos de ARNi. La ARNasa H es una endonucleasa celular que escinde la cadena de ARN de los dúplex ARN:ADN; la activación de esta enzima produce por tanto la escisión del ARN diana, y así puede mejorar enormemente la eficiencia de la inhibición del ARNi. La escisión del ARN diana puede demostrarse de forma rutinaria mediante electroforesis en gel. En otro aspecto preferido, el oligonucleótido quimérico también se modifica para mejorar la resistencia a la nucleasa. Las células contienen una diversidad de exonucleasas y endonucleasas que pueden degradar los ácidos nucleicos. Se ha demostrado que una serie de modificaciones de nucleótidos y nucleósidos hacen que el oligonucleótido en el que se incorporan sea más resistente a la digestión de la nucleasa que el oligodesoxinucleótido nativo. La resistencia a la nucleasa se mide de forma rutinaria mediante la incubación de oligonucleótidos con extractos celulares o soluciones aisladas de nucleasa y midiendo la magnitud del oligonucleótido intacto que queda con el tiempo, normalmente por electroforesis en gel. Los oligonucleótidos que han sido modificados para mejorar su resistencia a la nucleasa sobreviven intactos durante más tiempo que los oligonucleótidos no modificados. Diversas modificaciones de oligonucleótidos han demostrado capacidad para mejorar o conferir resistencia a la nucleasa. En la actualidad se prefieren más los oligonucleótidos que contienen al menos una modificación de fosforotioato. En algunos casos, las modificaciones de los oligonucleótidos que mejoran la afinidad de unión a la diana son capaces también, independientemente, de mejorar la resistencia a la nucleasa.

Los ejemplos específicos de algunos oligonucleótidos preferidos que se contemplan para esta descripción incluyen aquellos que comprenden estructuras principales modificadas, por ejemplo, fosforotioatos, fosfotriésteres, fosfonatos de metilo, enlaces entre azúcares de alquilo o cicloalquilo de cadena corta o enlaces entre azúcares heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta. Los más preferidos son los oligonucleótidos con estructuras principales de fosforotioato y aquellos que tienen estructuras principales de heteroátomos, en particular las estructuras principales de $\text{CH}_2\text{-NH-O-CH}_2$, $\text{CH}_2\text{-N(CH}_3\text{)-O-CH}_2$ [conocida como estructura principal de metileno(metilimino) o MMI], $\text{CH}_2\text{-O-N(CH}_3\text{)-CH}_2$, $\text{CH}_2\text{-N(CH}_3\text{)-N(CH}_3\text{)-CH}_2$ y $\text{O-N(CH}_3\text{)-CH}_2\text{-CH}_2$, donde la estructura principal de fosfodiéster

nativa se representa como O-P-O-CH₂). Se prefiere también la estructura principal de amida divulgada por De Mesmaeker y col. (1995) *Acc. Chem. Res.* 28:366-374. Se prefieren también los oligonucleótidos que tienen estructura principal de morfolino (Summerton y Weller, patente de EE.UU. nº 5.034.506). En otros aspectos preferidos, tales como la estructura principal de ácido nucleico peptídico (PNA), la estructura principal de fosfodiéster del oligonucleótido está sustituida por una estructura principal de poliamida, estando los nucleótidos unidos directa o indirectamente a los átomos de nitrógeno aza de la estructura principal de poliamida. Los oligonucleótidos pueden comprender también una o más fracciones de azúcares sustituidos. Los oligonucleótidos preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': OH, SH, SCH₃, F, OCN, OCH₃ OCH₃, OCH₃ O(CH₂)_n CH₃, O(CH₂)_n NH₂ o O(CH₂)_n CH₃ donde n es de 1 a aproximadamente 10; alquilo inferior C1-C10, alcoxilalcoxi, 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 reportero; un intercalador; un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido; o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un oligonucleótido y otros sustituyentes que tiene propiedades similares. Una modificación preferida incluye 2'-metoxietoxi [2'-O-CH₂ CH₂ OCH₃, también conocida como 2'-O-(2-metoxietil)]. Otras modificaciones preferidas incluyen 2'-metoxi (2'-O-CH₃), 2'-propoxi (2'-OCH₂ CH₂CH₃) y 2'-fluoro (2'-F). También pueden prepararse modificaciones similares en otras posiciones en el oligonucleótido, en particular en la 3' posición del azúcar en el nucleótido en el extremo 3' y en la posición 5' del nucleótido en el extremo 5'. Los oligonucleótidos pueden tener también miméticos de azúcares tales como ciclobutilos en lugar del grupo pentofuranosilo.

Los oligonucleótidos también pueden incluir, adicional o alternativamente, modificaciones o sustituciones de nucleobases (referida a menudo en la técnica simplemente como "base"). Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, los nucleótidos "no modificados" o "naturales" incluyen adenina (A), guanina (G), timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Los nucleótidos modificados incluyen nucleótidos presentes de manera poco frecuente o transitoria en los ácidos nucleicos naturales como, por ejemplo, hipoxantina, 6-metiladenina, 5-Me pirimidinas, en particular 5-metilcitosina (también referida como 5-metil-2' desoxicitosina y referida a menudo en la técnica como 5-Me-C), 5-hidroximetilcitosina (HMC), glucosil HMC y gentobiosil HMC, así como nucleótidos sintéticos como, por ejemplo, 2-aminoadenina, 2-(metilamino)adenina, 2-(imidazolilalquil)adenina, 2-(aminoalquilamino)adenina u otras alquiladeninas heterosustituidas, 2-tiouracilo, 2-tiotimina, 5-bromouracilo, 5-hidroximetiluracilo, 8-azaguanina, 7-deazaguanina, N₆ (6-aminohexil)adenina y 2,6-diaminopurina. Puede incluirse una base "universal" conocida en la técnica como, por ejemplo, la inosina. Se ha demostrado que las sustituciones en 5-Me-C aumentan la estabilidad del dúplex de ácido nucleico en 0,6-1,2°C y en la actualidad son sustituciones de bases preferidas.

Otra modificación de los oligonucleótidos de la descripción implica la unión química al oligonucleótido de una o más fracciones o conjugados que mejoran la actividad o captación celular del oligonucleótido. Dichas fracciones incluyen pero no se limitan a fracciones de lípidos tales como una fracción de colesterol, una fracción de colesterilo, una cadena alifática como, por ejemplo, restos de dodecanodiol o undecilo, una cadena de poliamina o polietilenglicol o ácido acético de adamantano. En la técnica se conocen oligonucleótidos que comprenden fracciones lipófilas, y procedimientos para preparar dichos oligonucleótidos, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. nº 5.138.045, 5.218.105 y 5.459.255.

No es necesario que todas las posiciones en un oligonucleótido dado estén modificadas uniformemente, y de hecho más de una de las modificaciones mencionadas anteriormente puede incorporarse en un único oligonucleótido o incluso en un único nucleósido dentro de un oligonucleótido. La presente descripción incluye también oligonucleótidos que son oligonucleótidos quiméricos tal como se define anteriormente en la presente memoria descriptiva.

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

Los oligonucleótidos usados de acuerdo con esta descripción pueden prepararse de forma cómoda y rutinaria a través de la bien conocida técnica de la síntesis en fase sólida. Los equipos para dicha síntesis son comercializados por varios vendedores, entre ellos Applied Biosystems. Puede emplearse también cualquier otro medio para dicha síntesis; la síntesis real de los oligonucleótidos está dentro de las capacidades de un experto en la materia. También se conoce bien el uso de técnicas similares para preparar otros oligonucleótidos tal como los fosforotioatos y los derivados alquilados. Se conoce bien también el uso de técnicas similares y amiditas modificadas disponibles

comercialmente y productos de vidrios de poros controlados (CPG) tales como amiditas modificadas con biotina, fluoresceína, acridina o psoraleno y/o CPG (disponible en Glen Research, Sterling VA) para sintetizar oligonucleótidos marcados por fluorescencia, biotinilados o modificados por otros medios tales como oligonucleótidos modificados con colesterol.

5

De acuerdo con la descripción, el uso de modificaciones tales como el uso de monómeros de LNA para mejorar la potencia, la especificidad y la duración de acción y ensanchar los modos de administración de los oligonucleótidos formados por especies químicas actuales tales como MOE, ANA, FANA, PS, etc. Esto puede conseguirse sustituyendo algunos de los monómeros en los oligonucleótidos actuales por monómeros de LNA. El oligonucleótido modificado por LNA puede tener un tamaño similar al compuesto original o puede ser mayor o preferentemente menor. Se prefiere que dichos oligonucleótidos modificados con LNA contengan menos de aproximadamente el 70%, más preferentemente menos de aproximadamente el 60%, con la máxima preferencia menos de aproximadamente el 50% de monómeros de LNA y que sus tamaños estén entre aproximadamente 5 y 25 nucleótidos, más preferentemente entre aproximadamente 12 y 20 nucleótidos.

15

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

20

25 Las patentes de los Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de las uniones que contienen fósforo anteriores comprenden, pero no se limitan a, las patentes de EE.UU. nº 3.687.808; 4.469.863; 4.476.301; 5.023.243; 5.177.196; 5.188.897; 5.264.423; 5.276.019; 5.278.302; 5.286.717; 5.321.131; 5.399.676; 5.405.939; 5.453.496; 5.455.233; 5.466.677; 5.476.925; 5.519.126; 5.536.821; 5.541.306; 5.550.111; 5.563.253; 5.571.799; 5.587.361; y 5.625.050.

30

Las estructuras principales de oligonucleótidos modificados preferidas que no incluyen un átomo de fósforo en las mismas incluyen estructuras principales que están formadas por uniones de internucleósidos de alquilo o cicloalquilo de cadena corta, heteroátomos mixtos y uniones de internucleósidos de alquilo o cicloalquilo, o una o más uniones de internucleósidos heteroatómicas o heterocíclicas de cadena corta. Estas comprenden las que tiene uniones de morfolino (formadas entre la parte del azúcar de un nucleósido); estructuras principales de siloxano; estructuras principales de sulfuro, sulfóxido y sulfona; estructuras principales de formacetilo y tioformacetilo; estructuras principales de formacetilo y tioformacetilo de metileno; estructuras principales que contienen alqueno; estructuras principales de sulfamato; estructuras principales de metilénimino y metilénhidracino; estructuras principales de sulfonato y sulfonamida; estructuras principales de amida; y otras que tiene partes de componentes de N, O, S y

35

40

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

45

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

50

55

En otro aspecto preferido de la descripción los oligonucleótidos con estructuras principales de fosforotioato y los

oligonucleósidos con estructuras principales de heteroátomos, y en particular estructura principal CH₂-NH-O-CH₂-, -CH₂-N (CH₃)-O-CH₂, conocida como metileno (metilimino) o estructura principal -CH₂-O-N (CH₃)-CH₂-, -CH₂N(CH₃)-N(CH₃)CH₂-y-O-N(CH₃)-CH₂-CH₂- donde la estructura principal de fosfodiéster nativa se representa como -O-P-O-CH₂- de la patente de EE.UU. 5.489.677 referida anteriormente, y las estructuras principales de amida de la patente de EE.UU. 5.602.240 referida anteriormente. También se prefieren oligonucleótidos que tienen estructuras principales de morfolino de la patente de EE.UU. 5.034.506 referida anteriormente.

Los oligonucleótidos modificados pueden contener también una o más fracciones de azúcares sustituidas. Los oligonucleótidos preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': OH; F; O-, S-, o N-alquilo; O-, S-, o N-alqueno; O-, S- o N-alquino; u O alquil-O-alquilo, donde el alquilo, el alqueno y el alquino pueden ser alquilo C a CO o alqueno o alquino C₂ a CO sustituidos o sin sustituir. Se prefieren especialmente O (CH₂)_n OmCH₃, 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 preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': C a CO, (alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, alcarilo, aralquilo, O-alcarilo o O-aralquilo, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, polialquilamino, sililo sustituido, un grupo de escisión de ARN, un grupo reportero, un intercalador, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un oligonucleótido, y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. Una modificación preferida comprende 2'-metoxietoxi (2'-O-CH₂CH₂OCH₃, también conocido como 2'-O-(2-metoxietil) o 2'-MOE) es decir, un grupo alcoxialcoxi. Una modificación más preferida comprende 2'-dimetilaminooxietoxi, es decir, un grupo O(CH₂)₂ON(CH₃)₂, también conocido como 2'-DMAOE, tal como se describe en los ejemplos en la presente memoria descriptiva mostrados más adelante, y 2'-dimetilaminoetoxietoxi (también conocido en la técnica como 2'-O-dimetilaminoetoxietilo o 2'-DMAEOE), es decir, 2'-O-CH₂-O-CH₂-N (CH₂)₂.

Otras modificaciones preferidas comprenden 2'-metoxi (2'-O CH₃), 2'-aminopropoxi (2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂) y 2'-fluoro (2'-F). Pueden prepararse también modificaciones similares en otras posiciones en el oligonucleótido, en particular en la posición 3' del azúcar en el nucleótido en el extremo 3' o en oligonucleótidos ligados en 2'-5' y en la posición 5' del nucleótido en el extremo 5'. Los oligonucleótidos pueden tener también miméticos de azúcares tales como fracciones de ciclobutilo en lugar del azúcar pentofuranosilo. Las patentes de los Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de dichas estructuras de azúcares modificadas comprenden, pero no se limitan a, las patentes de EE.UU. n° 4.981.957; 5.118.800; 5.319.080; 5.359.044; 5.393.878; 5.446.137; 5.466.786; 5.514.785; 5.519.134; 5.567.811; 5.576.427; 5.591.722; 5.597.909; 5.610.300; 5.627.053; 5.639.873; 5.646.265; 5.658.873; 5.670.633; y 5.700.920.

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

Además, los nucleótidos comprenden los divulgados en la patente de Estados Unidos 3.687.808, los divulgados en 'The Concise Encyclopedia of Polymer Science And Engineering', páginas 858-859, Kroschwitz, J.I., ed. John Wiley & Sons, 1990, los divulgados por Englisch y col., 'Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, página 613, y los divulgados por Sanghvi, Y.S., capítulo 15, 'Antisense Research and Applications', páginas 289-302, Croke, S.T. y Lebleu, B. ed., CRC Press, 1993. Algunos de estos nucleótidos son especialmente útiles para aumentar la afinidad de unión de los compuestos oligoméricos de la descripción. Comprenden pirimidinas sustituidas en 5, 6-azapirimidinas y purinas sustituidas en N-2, N-6 y O-6, que comprenden 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. Se ha demostrado que las sustituciones en 5-metilcitosina aumentan la estabilidad del dúplex de ácidos nucleicos en 0,6-1,2°C (Sanghvi, Y.S., Croke, S.T. y Lebleu, B., eds, 'Antisense Research and Applications', CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278) y en la actualidad son sustituciones de bases preferidas, más especialmente todavía cuando se combinan con modificaciones de azúcares en 2'-O-metoxietil.

Las patentes de los Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de los nucleótidos modificados

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

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

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

Las patentes de los Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de dichos oligonucleótidos
15 conjugados comprenden, pero no se limitan a, las patentes de EE.UU. nº 4.828.979; 4.948.882; 5.218.105; 5.525.465; 5.541.313; 5.545.730; 5.552.538; 5.578.717; 5.580.731; 5.580.731; 5.591.584; 5.109.124; 5.118.802; 5.138.045; 5.414.077; 5.486.603; 5.512.439; 5.578.718; 5.608.046; 4.587.044; 4.605.735; 4.667.025; 4.762.779; 4.789.737; 4.824.941; 4.835.263; 4.876.335; 4.904.582; 4.958.013; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.245.022; 5.254.469; 5.258.506; 5.262.536; 5.272.250; 5.292.873; 5.317.098; 5.371.241;
20 5.391.723; 5.416.203; 5.451.463; 5.510.475; 5.512.667; 5.514.785; 5.565.552; 5.567.810; 5.574.142; 5.585.481; 5.587.371; 5.595.726; 5.597.696; 5.599.923; 5.599.928 y 5.688.941.

Descubrimiento de fármacos: Los compuestos de la presente descripción pueden aplicarse también en los campos del descubrimiento de fármacos y la validación de dianas. La presente descripción comprende el uso de los
25 compuestos y segmentos diana preferidos identificados en la presente memoria descriptiva en los esfuerzos de descubrimientos de fármacos para determinar las relaciones que existen entre los polinucleótidos del receptor del factor de necrosis tumoral 2 (TNFR2) y un estado patológico, fenotipo o dolencia. Estos procedimientos incluyen la detección o modulación de polinucleótidos del receptor del factor de necrosis tumoral 2 (TNFR2) que comprenden la puesta en contacto de una muestra, tejido, célula u organismo con los compuestos de la presente descripción, la
30 medida del nivel de polinucleótidos de los ácidos nucleicos o las proteínas del receptor del factor de necrosis tumoral 2 (TNFR2) y/o un criterio de valoración fenotípico o químico relacionado en algún momento posterior al tratamiento, y opcionalmente la comparación del valor medido con una muestra no tratada o una muestra tratada con un compuesto de la descripción adicional. Estos procedimientos pueden realizarse también en paralelo o en combinación con otros experimentos para determinar la función de genes desconocidos para el proceso de
35 validación de dianas o para determinar la validez de un producto génico en particular como diana para el tratamiento o la prevención de una enfermedad, dolencia o fenotipo en particular.

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

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

La expresión de ARN a partir del ácido nucleico exógeno puede detectarse también midiendo la actividad enzimática
50 o la actividad de la proteína reportera. Por ejemplo, la actividad moduladora antisentido puede medirse indirectamente como un aumento o una disminución en la expresión de los ácidos nucleicos diana como una indicación de que el ácido nucleico exógeno está produciendo el ARN efector. Basándose en la conservación de secuencias, los cebadores pueden diseñarse y usarse para amplificar regiones codificantes de los genes diana. Inicialmente, la región codificante con expresión más intensa de cada gen puede usarse para construir un gen de
55 control modelo, aunque puede usarse cualquier región codificante o no codificante. Cada gen de control se ensambla insertando cada región codificante entre una región codificante reportera y su señal poli(A). Estos plásmidos producirían un ARNm con un gen reportero en la parte en dirección 5' del gen y una posible diana de ARNi en la región no codificante en 3'. La efectividad de los oligonucleótidos antisentido individuales se analizaría mediante la modulación del gen reportero. Los genes reporteros útiles en los procedimientos de la presente

descripción incluyen acetohidroxiácido sintasa (AHAS), fosfatasa alcalina (AP), beta galactosidasa (LacZ), beta glucuronidasa (GUS), cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), proteína fluorescente verde (GFP), proteína fluorescente roja (RFP), proteína fluorescente amarilla (YFP), proteína fluorescente cian (CFP), peroxidasa de rábano picante (HRP), luciferasa (Luc), nopalina sintasa (NOS), octopina sintasa (OCS) y derivados de los mismos. Se dispone de 5 múltiples marcadores seleccionables que confieren resistencia a la ampicilina, bleomicina, cloranfenicol, gentamicina, higromicina, kanamicina, lincomicina, metotrexato, fosfotricina, puromicina y tetraciclina. Los procedimientos para determinar la modulación de un gen reportero son bien conocidos en la técnica, e incluyen, pero no se limitan a, procedimientos fluorométricos (por ejemplo, espectroscopia con fluorescencia, clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), microscopia con fluorescencia), determinación de la resistencia a los 10 antibióticos.

La expresión de la proteína de TNFR2 y de ARNm puede someterse a ensayo usando procedimientos conocidos para los expertos en la materia y descritos en otro lugar en la presente memoria descriptiva. Por ejemplo, pueden usarse inmunoensayos como ELISA para medir los niveles de proteínas. Los kits de ensayo ELISA para TNFR2 15 están disponibles comercialmente, por ejemplo, en R&D Systems (Minneapolis, MN).

En algunos aspectos, la expresión de TNFR2 (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 descripción se evalúa mediante la comparación con la expresión de TNFR2 en una muestra de control. Por ejemplo, la expresión de la proteína o ácido nucleico puede compararse usando procedimientos conocidos para los expertos en la materia con la de una muestra no tratada o tratada de forma simulada. Alternativamente, la comparación con una muestra tratada con un oligonucleótido antisentido de control (por ejemplo, que tiene una secuencia alterada o diferente) puede realizarse dependiendo de la información que se desee. En otro aspecto, puede compararse la diferencia en la expresión de la proteína o ácido nucleico de TNFR2 en una muestra tratada con respecto a una no tratada con la diferencia en la 25 expresión de un ácido nucleico diferente (que incluye cualquier patrón que el investigador considere apropiado, por ejemplo, un gen de mantenimiento) en una muestra tratada con respecto a una muestra no tratada.

Las diferencias observadas pueden expresarse según se desee, por ejemplo, en forma de una proporción o fracción, para su uso en la comparación con un control. En algunos aspectos, el nivel de ARNm o proteína de TNFR2, en una muestra tratada con un oligonucleótido antisentido de la presente descripción, se incrementa o se reduce en 30 aproximadamente 1,25 veces a aproximadamente 10 veces o más con respecto a una muestra no tratada o a una muestra tratada con un ácido nucleico de control. En algunos aspectos, el nivel de ARNm o proteína de TNFR2 se incrementa o se reduce en al menos aproximadamente 1,25 veces, al menos aproximadamente 1,3 veces, al menos aproximadamente 1,4 veces, al menos aproximadamente 1,5 veces, al menos aproximadamente 1,6 veces, al menos aproximadamente 1,7 veces, al menos aproximadamente 1,8 veces, al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 2,5 veces, al menos aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 3,5 veces, al menos aproximadamente 4 veces, al menos aproximadamente 4,5 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 5,5 veces, al menos aproximadamente 6 veces, al menos aproximadamente 6,5 veces, al menos aproximadamente 7 veces, al menos aproximadamente 7,5 veces, al menos aproximadamente 8 veces, al menos aproximadamente 8,5 veces, al menos aproximadamente 9 veces, al menos aproximadamente 9,5 veces, o al menos aproximadamente 10 veces o más.

Kits, reactivos de investigación, diagnóstico y tratamiento

45 Los compuestos de la presente descripción pueden usarse con fines diagnósticos, terapéuticos y profilácticos, y como reactivos de investigación y componentes de kits. Además, los oligonucleótidos antisentido, que pueden inhibir la expresión génica con especificidad extraordinaria, son usados a menudo por los expertos en la materia para determinar la función de genes en particular o para distinguir entre las funciones de distintos miembros de una vía biológica.

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

55 Tal como se usa en la presente memoria descriptiva el término "sistema biológico" o "sistema" se define como cualquier organismo, célula, cultivo celular o tejido que expresa, o se hace competente para expresar productos de los genes del receptor del factor de necrosis tumoral 2 (TNFR2). Incluyen, pero no se limitan a, seres humanos, animales transgénicos, células, cultivos celulares, tejidos, xenoinjertos, trasplantes y combinaciones de los mismos.

Como ejemplo no limitativo, los patrones de expresión en las células o tejidos tratados con uno o más compuestos antisentido se comparan con las células o tejidos de control no tratados con compuestos antisentido y se analizan los patrones producidos en lo referente a los niveles diferenciales de expresión génica, por ejemplo, asociación con enfermedades, vías de señalización, localización celular, nivel de expresión, tamaño, estructura o función de los genes examinados. Estos análisis pueden realizarse en células estimuladas o no estimuladas y en presencia o ausencia de otros compuestos que afectan a los patrones de expresión.

Los ejemplos de procedimientos de análisis de expresión génica conocidos en la técnica incluyen matrices o micromatrices de ADN, SAGE (análisis en serie de expresión génica), READS (amplificación de enzimas de restricción de ADNc digeridos), TOGA (análisis de expresión génica total), matrices de proteínas y proteómica, secuenciación de etiquetas de secuencias expresadas (EST), huella de ARN sustractiva (SuRF), clonación sustractiva, visualización diferencial (DD), hibridación genómica comparativa, técnicas FISH (hibridación fluorescente in situ) y procedimientos de espectrometría de masas.

Los compuestos de la descripción son útiles para investigación y diagnóstico, dado que estos compuestos se hibridan con ácidos nucleicos que codifican el receptor del factor de necrosis tumoral 2 (TNFR2). Por ejemplo, los oligonucleótidos que se hibridan con tanta eficiencia y en condiciones tales como las divulgadas en la presente memoria descriptiva para ser moduladores efectivos del receptor del factor de necrosis tumoral 2 (TNFR2) son cebadores o sondas efectivos en condiciones que favorecen la amplificación o detección génica, respectivamente. Estos cebadores y sondas son útiles en procedimientos que requieren la detección específica de moléculas de ácidos nucleicos que codifican el receptor del factor de necrosis tumoral 2 (TNFR2) y en la amplificación de dichas moléculas de ácidos nucleicos para la detección o para su uso en estudios adicionales del receptor del factor de necrosis tumoral 2 (TNFR2). La hibridación de los oligonucleótidos antisentido, en particular los cebadores y las sondas, de la descripción con un ácido nucleico que codifica el receptor del factor de necrosis tumoral 2 (TNFR2) pueden detectarse por medios conocidos en la técnica. Dichos medios pueden incluir conjugación de una enzima con el oligonucleótido, radiomarcado del oligonucleótido o cualquier otro medio de detección adecuado. Pueden prepararse también kits que usan dichos medios de detección para detectar el nivel de receptor del factor de necrosis tumoral 2 (TNFR2) en una muestra.

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

Para fines terapéuticos, un animal, preferentemente un ser humano, en el que se sospeche una enfermedad o trastorno que puede ser tratado mediante la modulación de la expresión de los polinucleótidos del receptor del factor de necrosis tumoral 2 (TNFR2) se trata con la administración de compuestos antisentido de acuerdo con esta descripción. Por ejemplo, en un aspecto no limitativo, los procedimientos comprenden la etapa de administrar al animal necesitado de tratamiento una cantidad terapéuticamente efectiva de modulador del receptor del factor de necrosis tumoral 2 (TNFR2). Los moduladores del receptor del factor de necrosis tumoral 2 (TNFR2) de la presente descripción modulan efectivamente la actividad del receptor del factor de necrosis tumoral 2 (TNFR2) o modulan la expresión de la proteína del receptor del factor de necrosis tumoral 2 (TNFR2). En un aspecto, la actividad o expresión del receptor del factor de necrosis tumoral 2 (TNFR2) en un animal se inhibe aproximadamente en el 10% en comparación con un control. Preferentemente, la actividad o expresión del receptor del factor de necrosis tumoral 2 (TNFR2) en un animal se inhibe en aproximadamente el 30%. Más preferentemente, la actividad o expresión del receptor del factor de necrosis tumoral 2 (TNFR2) en un animal se inhibe en el 50% o más. Así, los compuestos oligoméricos modulan la expresión del ARNm del receptor del factor de necrosis tumoral 2 (TNFR2) en al menos el 10%, en al menos el 50%, en al menos el 25%, en al menos el 30%, en al menos el 40%, en al menos el 50%, en al menos el 60%, en al menos el 70%, en al menos el 75%, en al menos el 80%, en al menos el 85%, en al menos el 90%, en al menos el 95%, en al menos el 98%, en al menos el 99% o en el 100% en comparación con un control.

En un aspecto, la actividad o expresión del receptor del factor de necrosis tumoral 2 (TNFR2) y/o en un animal se incrementa en aproximadamente el 10% en comparación con un control. Preferentemente, la actividad o expresión del receptor del factor de necrosis tumoral 2 (TNFR2) en un animal se incrementa en aproximadamente el 30%. Más preferentemente, la actividad o expresión del receptor del factor de necrosis tumoral 2 (TNFR2) en un animal se

incrementa en el 50% o más. Así, los compuestos oligoméricos modulan la expresión del ARNm del receptor del factor de necrosis tumoral 2 (TNFR2) en al menos el 10%, en al menos el 50%, en al menos el 25%, en al menos el 30%, en al menos el 40%, en al menos el 50%, en al menos el 60%, en al menos el 70%, en al menos el 75%, en al menos el 80%, en al menos el 85%, en al menos el 90%, en al menos el 95%, en al menos el 98%, en al menos el 99% o en el 100% en comparación con un control.

Por ejemplo, la reducción de la expresión del receptor del factor de necrosis tumoral 2 (TNFR2) puede medirse en el suero, la sangre, el tejido adiposo, el hígado o cualquier otro líquido, tejido u órgano del cuerpo del animal. Preferentemente, las células contenidas en dichos líquidos, tejidos u órganos para analizar contienen una molécula de ácidos nucleicos que codifica péptidos del receptor del factor de necrosis tumoral 2 (TNFR2) y/o la proteína del receptor del factor de necrosis tumoral 2 (TNFR2) en sí.

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

Conjugados

Otra modificación de los oligonucleótidos de la descripción implica la unión química al oligonucleótido de una o más fracciones o conjugados que mejoran la actividad, la distribución celular o la captación celular del oligonucleótido. Estas fracciones o conjugados pueden incluir grupos conjugados unidos por enlaces covalentes a grupos funcionales tales como grupos hidroxilo primarios o secundarios. Los grupos conjugados de la descripción incluyen intercaladores, moléculas reporteras, poliaminas, poliamidas, polietilenglicoles, poliéteres, grupos que mejoran las propiedades farmacodinámicas de los oligómeros y grupos que mejoran las propiedades farmacocinéticas de los oligómeros. Los grupos conjugados típicos incluyen colesterol, lípidos, fosfolípidos, biotina, fenacina, folato, fenantridina, antraquinona, acridina, fluoresceínas, rodaminas, cumarinas y colorantes. Los grupos que mejoran las propiedades farmacodinámicas, en el contexto de esta descripción, incluyen grupos que mejoran la captación, potencian la resistencia a la degradación y/o refuerzan la hibridación específica de las secuencias con el ácido nucleico diana. Los grupos que mejoran las propiedades farmacocinéticas, en el contexto de esta descripción, incluyen grupos que mejoran la captación, la distribución, el metabolismo o la excreción de los compuestos de la presente descripción. Los grupos conjugados representativos se divulgan en la solicitud de patente internacional nº PCT/US92/09.196, presentada el 23 de octubre de 1992, y la patente de EE.UU. nº 6.287.860. Las fracciones de conjugados incluyen, pero no se limitan a, fracciones lipídicas tales como una fracción de colesterol, ácido cólico, un tioéter, por ejemplo, hexil-5-tridactilol, un tiocolesterol, una cadena alifática, por ejemplo, residuos de dodecanodiol o undecilo, un fosfolípido, por ejemplo, di-hexadecil-rac-glicerol o trietilamonio 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato, una poliamina o una cadena de polietilenglicol, o ácido acético de adamantano, una fracción de palmitilo, o una fracción de octadecilamina o hexilamino-carbonil-oxicolesterol. Los oligonucleótidos de la descripción pueden conjugarse también con sustancias farmacológicas activas, por ejemplo, aspirina, warfarina, fenilbutazona, ibuprofeno, suprofen, fenbufeno, ketoprofeno, (S)-(+)-pranoprofeno, carprofeno, dansilsarcosina, ácido 2,3,5-triidobenzoico, ácido flufenámico, ácido folínico, una benzotiadiazida, clorotiadiazida, una diazepina, indometicina, un barbitúrico, una cefalosporina, un fármaco sulfa, un antidiabético, un antibacteriano o un antibiótico.

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

Formulaciones

Los compuestos de la descripción también pueden mezclarse, encapsularse, conjugarse o asociarse de otro modo con otras moléculas, estructuras de moléculas o mezclas de compuestos, como por ejemplo, liposomas, moléculas dirigidas a receptores, formulaciones orales, rectales, tópicas u otras, para ayudar en la captación, distribución y/o absorción. Las patentes de los Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de dichas formulaciones de ayuda a la captación, distribución y/o absorción incluyen, pero no se limitan a, las patentes de EE.UU. nº 5.108.921; 5.354.844; 5.416.016; 5.459.127; 5.521.291; 5.543.165; 5.547.932; 5.583.020; 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 no es necesario administrar los oligonucleótidos antisentido en el contexto de un vector con el fin de modular una expresión y/o función diana, los aspectos de la descripción se refieren a las construcciones de vectores de expresión para la expresión de oligonucleótidos antisentido, que comprenden promotores, secuencias de genes promotores híbridos y poseen una intensa actividad de promotor constitutiva, o una actividad de promotor que puede inducirse en el caso deseado.

10 En un aspecto, la práctica de la descripción implica la administración de al menos uno de los oligonucleótidos antisentido precedentes con un sistema de suministro de ácidos nucleicos adecuado. En un aspecto, este sistema incluye un vector no vírico de forma operativa con el polinucleótido. Los ejemplos de dichos vectores no víricos incluyen el oligonucleótido en solitario (por ejemplo, una cualquiera o más de las SEQ ID NO: 4 a 10) o en combinación con una formulación adecuada de proteínas, polisacáridos o lípidos.

15 Además, los sistemas de suministro de ácidos nucleicos adecuados incluyen un vector vírico, normalmente una secuencia de al menos uno de entre adenovirus, virus asociados a adenovirus (AAV), adenovirus dependientes de auxiliares, retrovirus o virus de hemaglutinina de complejo de liposoma de Japón (HVJ). Preferentemente, el vector vírico comprende un fuerte promotor eucariótico ligado de forma operativa al polinucleótido por ejemplo, un promotor de citomegalovirus (CMV).

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

30 Los compuestos antisentido de la descripción comprenden cualquier sal, éster o sal de dichos ésteres farmacéuticamente aceptables, o cualquier otro compuesto que, tras la administración a un animal, lo que incluye un ser humano, es capaz de proporcionar (directa o indirectamente) el metabolito o residuo biológicamente activo de los mismos.

35 El término "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales fisiológica y farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la descripción: es decir, sales que conservan la actividad biológica deseada del compuesto original y no imparten efectos toxicológicos no deseados al mismo. Para los oligonucleótidos, los ejemplos preferidos de sales farmacéuticamente aceptables y sus usos se describen más ampliamente en la patente de EE.UU. nº 6.287.860.

40 La presente descripción incluye también composiciones farmacéuticas y formulaciones que incluyen los compuestos antisentido de la descripción. Las composiciones farmacéuticas de la presente descripción pueden administrarse de diversas formas dependiendo de si se desea un tratamiento local o sistémico y de la zona para tratar. La administración puede ser tópica (lo que incluye oftálmica y en las membranas mucosas incluida la administración vaginal y rectal), pulmonar, por ejemplo, por inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, lo que incluye por nebulizador; intratraqueal, intranasal, epidérmica y transdérmica), oral o parenteral. La administración parenteral

45 incluye la inyección o infusión intravenosa, intraarterial subcutánea, intraperitoneal o intramuscular; o la administración intracraneal, por ejemplo, intratecal o intraventricular.

50 Para el tratamiento de los tejidos del sistema nervioso central, la administración puede realizarse, por ejemplo, por inyección o infusión en el líquido cefalorraquídeo. La administración de ARN antisentido en el líquido cefalorraquídeo se describe, por ejemplo, en la solicitud de patente de EE.UU. nº 2007/0.117.772, "Procedimientos para ralentizar la progresión de la enfermedad ELA familiar".

55 Cuando se pretende que el oligonucleótido antisentido de la presente descripción se administre a las células del sistema nervioso central, la administración puede realizarse con uno o más agentes capaces de promover la penetración del oligonucleótido antisentido del sujeto a través de la barrera hematoencefálica. La inyección puede realizarse, por ejemplo, en la corteza entorrínica o en el hipocampo. El suministro de factores neutróficos por administración de un vector de adenovirus a las neuronas motoras del tejido muscular se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. nº 6.632.427, "Transferencia génica mediada por vectores de adenovirus en las neuronas motoras medulares". El suministro de vectores directamente en el encéfalo, por ejemplo, el núcleo estriado, el

tálamo, el hipocampo o la sustancia negra, es conocido en la técnica y se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. nº 6.756.523, "Vectores de adenovirus para la transferencia de genes extraños en células del sistema nervioso central en particular el encéfalo". La administración puede ser rápida mediante inyección o realizarse durante un periodo de tiempo por infusión lenta o administración de formulaciones de liberación lenta.

5

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

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

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

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

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

50

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

55

Las emulsiones son normalmente sistemas heterogéneos de un líquido dispersado en otro en forma de gotas normalmente de diámetro superior a 0,1 μm . Las emulsiones pueden contener componentes adicionales además de las fases dispersadas, y el fármaco activo que puede estar presente como solución en la fase acuosa, la fase oleosa o en sí mismo como una fase separada. Las microemulsiones se incluyen como un aspecto de la presente

descripción. Las emulsiones y sus usos son bien conocidos en la técnica y se describen adicionalmente en la patente de EE.UU. nº 6.287.860.

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

Los liposomas incluyen también liposomas "estabilizados estéricamente", un término que, tal como se usa en la presente memoria descriptiva, se refiere a liposomas que comprenden uno o más lípidos especializados. Cuando se incorporan en los liposomas, estos lípidos especializados producen liposomas con mayor tiempo de vida en circulación que los liposomas que carecen de dichos lípidos especializados. Los ejemplos de liposomas estabilizados estéricamente son aquellos en los que parte del lípido de formación de vesículas del liposoma comprende uno o más glucolípidos o se deriva de uno o más polímeros hidrófilos, tales como una fracción de polietilenglicol (PEG). Los liposomas y sus usos se describen ampliamente en la patente de EE.UU. nº 6.287.860.

Las formulaciones y composiciones farmacéuticas de la presente descripción también pueden incluir tensioactivos. El uso de tensioactivos en productos farmacológicos, formulaciones y en emulsiones es bien conocido en la técnica. Los tensioactivos y sus usos se describen ampliamente en la patente de EE.UU. nº 6.287.860.

En un aspecto, la presente descripción emplea varios potenciadores de penetración para efectuar el suministro eficiente de los ácidos nucleicos, en particular los oligonucleótidos. Además de ayudar a la difusión de fármacos no lipófilos a través de las membranas celulares, los potenciadores de penetración también mejoran la permeabilidad de los fármacos lipófilos. Los potenciadores de penetración pueden clasificarse como pertenecientes a una de cinco posibles categorías extensas, es decir, tensioactivos, ácidos grasos, sales biliares, agentes de quelación y productos no tensioactivos y no de quelación. Los potenciadores de penetración y sus usos se describen ampliamente en la patente de EE.UU. nº 6.287.860.

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

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

Para administración tópica u otra, los oligonucleótidos de la descripción pueden encapsularse en liposomas o pueden formar complejos de los mismos, en particular con liposomas catiónicos. Alternativamente, los oligonucleótidos pueden formar complejos con los lípidos, en particular con lípidos catiónicos. Los ácidos grasos y ésteres preferidos, las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos y sus usos se describen ampliamente en la patente de EE.UU. nº 6.287.860.

Las composiciones y formulaciones para administración oral incluyen polvos o gránulos, micropartículas, nanopartículas, suspensiones o soluciones en agua o medios no acuosos, cápsulas, cápsulas de gel, bolsas, comprimidos o minicomprimidos. Pueden ser convenientes los espesantes, agentes aromatizantes, diluyentes, emulsionantes, adyuvantes de dispersión o aglutinantes. Las formulaciones orales preferidas son aquellas en que los oligonucleótidos de la descripción se administran en conjunción con uno o más potenciadores de penetración tensioactivos y agentes de quelación. Los tensioactivos preferidos incluyen ácidos grasos y/o ésteres o sales de los mismos, ácidos biliares y/o sales de los mismos. Los ácidos/sales biliares y ácidos grasos preferidos y sus usos se describen ampliamente en la patente de EE.UU. nº 6.287.860. También se prefieren combinaciones de potenciadores de penetración, por ejemplo, ácidos grasos/sales en combinación con ácidos/sales biliares. Una combinación preferida en particular es la sal sódica de ácido láurico, ácido cáprico y UDCA. Los potenciadores de penetración adicionales incluyen éter polioxietileno-9-laurílico, éter polioxietileno-20-cetílico. Los oligonucleótidos de la

descripción pueden suministrarse oralmente, en forma granular que incluye partículas secas pulverizadas, o en complejos para formar micro o nanopartículas. Los agentes de formación de complejos de oligonucleótidos y sus usos se describen ampliamente en la patente de EE.UU. nº 6.287.860.

- 5 Las composiciones y formulaciones para administración parenteral, intratecal o intraventricular pueden incluir soluciones acuosas estériles que pueden contener también tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados tales como, pero sin limitarse a, potenciadores de penetración, compuestos de soporte y otros vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables.
- 10 Algunos aspectos de la descripción proporcionan composiciones farmacéuticas que contienen uno o más compuestos oligoméricos y uno o más de otros agentes quimioterapéuticos que actúan mediante un mecanismo no antisentido. Los ejemplos de dichos agentes quimioterapéuticos incluyen pero no se limitan a fármacos quimioterapéuticos contra el cáncer tales como daunorrubicina, daunomicina, dactinomicina, doxorubicina, epirubicina, idarrubicina, esorrubicina, bleomicina, mafosfamida, ifosfamida, citosina arabinósido, biscloroetilnitrosourea, busulfán, mitomicina C, actinomicina D, mitramicina, prednisona, hidroxiprogesterona, testosterona, tamoxifeno, dacarbacina, procarbina, hexametilmelamina, pentametilmelamina, mitoxantrona, amsacrina, clorambucilo, metilciclohexilnitrosourea, mostazas de nitrógeno, melfalán, ciclofosfamida, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-azacitidina, hidroxiurea, desoxicoformicina, 4-hidroxiperoxiciclo-fosforamida, 5-fluorouracilo (5-FU), 5-fluorodesoxiuridina (5-FUdR), metotrexato (MTX), colchicina, taxol, vincristina, vinblastina, etopósido (VP-16), trimetrexato, irinotecán, topotecán, gemcitabina, tenipósido, cisplatino y dietilestilbestrol (DES). Cuando se usan con los compuestos de la descripción, dichos agentes quimioterapéuticos pueden usarse individualmente (por ejemplo, 5-FU y oligonucleótido), en secuencia (por ejemplo, 5-FU y oligonucleótido durante un periodo de tiempo seguido por MTX y oligonucleótido) o en combinación con uno o más de otros de dichos agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, 5-FU, MTX y oligonucleótido, o 5-FU, radioterapia y oligonucleótido). Los fármacos antiinflamatorios, que incluyen pero no se limitan a fármacos antiinflamatorios no esteroideos y corticoesteroides, y los fármacos antivíricos, que incluyen pero no se limitan a ribavirina, vidarabina, aciclovir y ganciclovir, también pueden combinarse en composiciones de la descripción. Las combinaciones de compuestos antisentido y otros fármacos no antisentido están también dentro del alcance de esta descripción. Pueden usarse dos o más compuestos combinados juntos o en secuencia.
- 30 En otro aspecto relacionado, las composiciones de la descripción pueden contener uno o más compuestos antisentido, en particular oligonucleótidos, dirigidos a un primer ácido nucleico y uno o más compuestos antisentido adicionales dirigidos a un segundo ácido nucleico diana. Por ejemplo, la primera diana puede ser una secuencia antisentido en particular del receptor del factor de necrosis tumoral 2 (TNFR2), y la segunda diana puede ser una región de otra secuencia de nucleótidos. Alternativamente, las composiciones de la descripción pueden contener dos o más compuestos antisentido dirigidos a diferentes regiones del mismo ácido nucleico diana del receptor del factor de necrosis tumoral 2 (TNFR2). En la presente memoria descriptiva se ilustran numerosos ejemplos de compuestos antisentido y pueden seleccionarse otros de entre los compuestos adecuados conocidos en la técnica. Pueden usarse dos o más compuestos combinados juntos o en secuencia.

40 *Dosificación:*

- Según se cree, la formulación de composiciones terapéuticas y su posterior administración (dosificación) están dentro del alcance de los expertos en la materia. La dosificación depende de la gravedad y de la capacidad de respuesta del estado patológico que se tratará, donde el curso del tratamiento dura de varios días a varios meses, o hasta que se alcance la cura o se consiga una disminución del estado patológico. Los planes ópticos de dosificación pueden calcularse a partir de medidas de acumulación del fármaco en el organismo del paciente. Los expertos en la materia pueden determinar fácilmente las dosificaciones óptimas, las metodologías de dosificación y las tasas de repetición. Las dosificaciones óptimas pueden variar dependiendo de la potencia relativa de los oligonucleótidos individuales, y en general pueden estimarse basándose en los valores de CE50 que se consideran efectivos en modelos animales *in vitro* e *in vivo*. En general, la dosificación está comprendida entre 0,01 µg y 100 g por kg de peso corporal, y puede administrarse una vez o más al día, a la semana, al mes o al año, o incluso una vez cada 2 a 20 años. Los expertos en la materia pueden estimar fácilmente las tasas de repetición para dosificación basándose en los tiempos de residencia medidos y en las concentraciones del fármaco en los líquidos corporales o los tejidos.
- 55 Después de un tratamiento con éxito, puede ser conveniente hacer que el paciente se someta a una terapia de mantenimiento para prevenir la recurrencia del estado patológico, donde el oligonucleótido se administra en dosis de mantenimiento, comprendidas entre 0,01 µg y 100 g por kg de peso corporal, una vez o más al día, a una vez cada 20 años.

En algunos aspectos, un paciente es tratado 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 peso corporal. Algunas dosis inyectadas de oligonucleótidos antisentido se describen, por ejemplo, en la patente de EE.UU. nº 7.563.884, "Modulación antisentido de expresión de PTP1B".

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

Aunque se citan varias referencias en este documento, los solicitantes no admiten que ninguna referencia en particular sea un "estado de la técnica" para su invención. Los aspectos de las composiciones y procedimientos de la invención se ilustran mediante los ejemplos siguientes.

EJEMPLOS

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

Ejemplo 1: Diseño de oligonucleótidos antisentido específicos para una molécula de ácidos nucleicos antisentido para un receptor del factor de necrosis tumoral 2 (TNFR2) y/o una cadena de receptor con sentido del polinucleótido del factor de necrosis tumoral 2 (TNFR2)

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

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

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

Las propiedades de hibridación de los oligonucleótidos descritos en la presente memoria descriptiva pueden determinarse por uno o más ensayos *in vitro* tal como se conoce en la técnica. Por ejemplo, las propiedades de los oligonucleótidos descritos en la presente memoria descriptiva pueden obtenerse determinando la fuerza de unión

entre el antisentido natural diana y las moléculas de fármaco potenciales usando un ensayo de curva de fusión.

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

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

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

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

Los picos de fusión se construyen representando gráficamente la derivada de fluorescencia negativa con respecto a la temperatura ($-d(\text{Fluorescencia})/dT$) en el eje y frente a la temperatura (eje x) usando un software apropiado (por ejemplo, LightCycler (Roche) o SDS Dissociation Curve, ABI). Se analizan los datos para identificar la temperatura de la rápida transición desde el complejo dsDNA a moléculas monocatenarias. Esta temperatura se denomina T_m y es directamente proporcional a la intensidad de la interacción entre las dos moléculas. Normalmente, T_m será superior a 40°C.

Ejemplo 2: Modulación de polinucleótidos de TNFR2

Tratamiento de células HepG2 con oligonucleótidos antisentido

Se cultivaron células HepG2 de ATCC (cat# HB-8065) en medios de cultivo (MEM/EBSS (Hyclone cat# SH30024, o Mediatech cat# MT-10-010-CV) + FBS al 10% (Mediatech cat# MT35-011-CV) + penicilina/estreptomicina (Mediatech cat# MT30-002-CI)) a 37°C y CO₂ al 5%. Un día antes del experimento se volvieron a sembrar en placa las células a la densidad de $1,5 \times 10^5$ /ml en placas de 6 pocillos y se incubaron a 37°C y CO₂ al 5%. En el día del experimento se cambió el medio en las placas de 6 pocillos por medio de cultivo nuevo. Se diluyeron todos los oligonucleótidos antisentido a la concentración de 20 µM. Se incubaron 2 µl de esta solución con 400 µl de medio Opti-MEM (Gibco cat# 31985-070) y 4 µl de Lipofectamina 2000 (Invitrogen cat# 11668019) a temperatura ambiente durante 20 min y se aplicaron células HepG2 a cada pocillo de las placas de 6 pocillos. Se usó una mezcla similar que incluía 2 µl de agua en lugar de la solución del oligonucleótido como controles transfectados de forma simulada. Después de 3-18 h de incubación a 37°C y CO₂ al 5% se cambió el medio por medio de cultivo nuevo. 48 h después de la adición de los oligonucleótidos antisentido se retiró el medio y se extrajo ARN de las células usando SV Total RNA Isolation System de Promega (cat# Z3105) o RNeasy Total RNA Isolation kit de Qiagen (cat# 74181) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se añadieron 600 ng de ARN a la reacción de transcripción inversa realizada usando Verso ADNc kit de Thermo Scientific (cat# AB1453B) o High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (cat# 4368813) tal como se describe en el protocolo del fabricante. El ADNc de esta reacción de transcripción inversa se usó para monitorizar la expresión génica mediante PCR en tiempo real usando ABI Taqman Gene Expression Mix (cat# 4369510) y cebadores/sondas diseñados por ABI (Applied Biosystems Taqman Gene Expression Assay: Hs00961755_ml de Applied Biosystems Inc., Foster City CA). Se usó el siguiente ciclo de PCR: 50°C durante 2 min, 95°C durante 10 min, 40 ciclos de (95°C durante 15 segundos, 60°C durante 1 min) usando el ciclador térmico Mx4000 (Stratagene).

El nivel de cambio en expresión génica después de tratamiento con oligonucleótidos antisentido se calculó basándose en la diferencia en los valores de dCt normalizados a 18S entre muestras tratadas y transfectadas de forma simulada.

5

Resultados: Los resultados de la PCR en tiempo real muestran que los niveles de ARNm de TNRSF1B en las células HepG2 están significativamente aumentados 48 h después del tratamiento con 1 de los oligos diseñados para TNRSF1B antisentido Hs.679340 (CUR-0792) y 1 oligo diseñado para Hs.639108 (CUR-0787) (Fig. 1).

- 10 Aunque la descripción se ha ilustrado y descrito con respecto a una o más implementaciones, a los expertos en la materia se les ocurrirán alteraciones y modificaciones equivalentes tras la lectura y comprensión de la presente memoria descriptiva y de los dibujos adjuntos. Además, aunque puede haberse divulgado una característica en particular de la descripción con respecto a sólo una de las diversas implementaciones, dicha característica puede combinarse con una o más de otras características de las otras implementaciones según resulte conveniente o
15 ventajoso para cualquier aplicación dada o particular.

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

20

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> CuRNA, Inc.

5 <120> TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES RELACIONADAS CON EL RECEPTOR DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL 2 (TNFR2) POR INHIBICIÓN DEL TRANSCRITO NATURAL ANTISENTIDO PARA TNFR2

<130> TNFR2

10 <150> 61/219.911
<151> 2009-06-24

<160> 10

15 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 3682

<212> ADN

20 <213> Homo sapiens

<300>

<308> NM_001066.2

<309> 2010-06-06

25 <313> (1)..(3682)

<400> 1

```

30 gcgagcgag cggagcctgg agagaaggcg ctgggctgag agggcgcgag ggcgagagg 60
   cagggggcaa ccggaccccg ccgcaccca tggcgcccgt cgccgtctgg gccgagctgg 120
   ccgtcggact ggagctctgg gctgcggcgc acgcctggc cgcccagggtg gcatttacac 180
35 cctacgcccc ggagcccggg agcacatgcc ggctcagaga atactatgac cagacagctc 240
   agatgtgctg cagcaaatgc tcgccgggcc aacatgcaaa agtcttctgt accaagacct 300
   cggacaccgt gtgtgactcc tgtgaggaca gcacatacac ccagctctgg aactgggttc 360
40 ccgagtgtct gagctgtggc tcccgtgta gctctgacca ggtgaaact caagcctgca 420
   ctgggaaca gaaccgatc tgcacctgca ggcccggctg gtactgagcg ctgagcaagc 480
45 aggaggggtg ccggctgtgc gcgccgctgc gcaagtgcc cccgggctc ggcgtggcca 540
   gaccaggaac tgaaacatca gacgtggtgt gcaagccctg tgccccggg acgttctcca 600
   acacgacttc atccacggat attgcaggc cccaccagat ctgtaacgtg gtggccatcc 660
50 ctgggaatgc aagcatggat gcagtctgca cgtccacgtc cccaccggg agtatggccc 720
   caggggcagt acaactacc cagccagtgt ccacacgatc ccaacacacg cagccaactc 780
55 cagaaccag cactgtcca agcacctct tcctgctccc aatgggcccc agccccccag 840
   ctgaagggag cactggcgac ttcgtcttc cagttggact gattgtgggt gtgacagcct 900
   tgggtctact aataatagga gtggtgaact gtgtcatcat gaccaggtg aaaaagaagc 960

```

ES 2 618 894 T3

	ccttgtcct	gcagagagaa	gccaaggtgc	ctcacttgcc	tgccgataag	gcccgggta	1020
	cacagggccc	cgagcagcag	cacctgtga	tcacagcgcc	gagctccagc	agcagctccc	1080
5	tggagagctc	ggccagtgcg	ttggacagaa	gggcgcccac	tcggaaccag	ccacaggcac	1140
	caggcgtgga	ggccagtggg	gcccggggagg	cccggggcag	caccggggagc	tcagattctt	1200
10	cccctggtgg	ccatgggacc	caggtcaatg	tcacctgcat	cgtaaacgtc	tgtagcagct	1260
	ctgaccacag	ctcacagtgc	tctcccaag	ccagctccac	aatgggagac	acagattcca	1320
	gcccctcgga	gtccccgaag	gacgagcagg	tccccttctc	caaggaggaa	tgtgcctttc	1380
15	ggtcacagct	ggagacgcca	gagaccctgc	tggggagcac	cgaagagaag	cccctgcccc	1440
	ttggagtgcc	tgatgctggg	atgaagccca	gtaaccagg	ccggtgtggg	ctgtgtcgta	1500
20	gccaaggtgg	gctgagccct	ggcaggatga	ccctgcgaag	gggccctggt	cctccaggc	1560
	ccccaccact	aggactctga	ggctctttct	gggccaagtt	cctctagtgc	cctccacagc	1620
	cgcagcctcc	ctctgacctg	caggccaaga	gcagaggcag	cgagttgtgg	aaagcctctg	1680
25	ctgccatggc	gtgtccctct	cggaaggctg	gctgggcatg	gacgttcggg	gcatgctggg	1740
	gcaagtccct	gactctctgt	gacctgcccc	gcccagctgc	acctgccagc	ctggctctg	1800
30	gagcccttgg	gtttttgtt	tgtttgttg	tttgttgtt	tgtttctccc	cctgggctct	1860
	gccccagctc	tggctccag	aaaaccccag	catcctttc	tgcagagggg	ctttctggag	1920
	aggagggatg	ctgcctgagt	cacccatgaa	gacaggacag	tgcttcagcc	tgaggctgag	1980
35	actgcgggat	ggtcctgggg	ctctgtgcag	ggaggagggtg	gcagccctgt	agggaacggg	2040
	gtcctcaag	ttagctcagg	aggcttgaa	agcatcacct	caggccaggt	gcagtggctc	2100
40	acgcctatga	tcccagcact	ttgggaggct	gaggcgggtg	gatcacctga	ggttaggagt	2160
	tcgagaccag	cctggccaac	atggtaaaac	cccatctcta	ctaaaaatac	agaaattagc	2220
	cgggcgtggt	ggcgggcacc	tatagtcca	gctactcaga	agcctgaggc	tgggaaatcg	2280
45	tttgaacccg	ggaagcggag	gttcagggga	gccgagatca	cgccactgca	ctccagcctg	2340
	ggcgacagag	cgagagtctg	tctcaaaaga	aaaaaaaaag	caccgcctcc	aatgccaac	2400
50	ttgtcctttt	gtaccatggt	gtgaaagtca	gatgcccaga	gggccaggc	aggccaccat	2460
	attcagtgct	gtggcctggg	caagataacg	cacttctaac	tagaaatctg	ccaattttt	2520
	aaaaaagtaa	gtaccactca	ggccaacaag	ccaacgacaa	agccaaactc	tgccagccac	2580
55	atccaacccc	ccacctgcca	ttgcaccct	ccgcctcac	tccggtgtgc	ctgcagcccc	2640
	gcgcctcctt	cctgtgctgc	ctaggccaca	ccatctcctt	tcagggaatt	tcagggaacta	2700

ES 2 618 894 T3

	gagatgactg	agtcctcgta	gccatctctc	tactcctacc	tcagcctaga	ccctcctcct	2760
	ccccagagg	ggtgggtfcc	tctccccac	tccccactt	caattcctgg	gccccaaacg	2820
5	ggctgcctg	ccactttggt	acatggccag	tgtgatccca	agtgccagtc	ttgtgtctgc	2880
	gtctgtgtg	cggtcgtgg	gtgtgtgtag	ccaaggtcgg	taagttgaat	ggcctgcctt	2940
	gaagccactg	aagctgggat	tctccccat	tagagttagc	ctccccctc	ccagggccag	3000
10	ggccctgcag	aggggaaacc	agtgtagcct	tgcccggatt	ctgggaggaa	gcaggtgag	3060
	gggctcctgg	aaaggctcag	tctcaggagc	atggggataa	aggagaaggc	atgaaattgt	3120
15	ctagcagagc	aggggcaggg	tgataaattg	ttgataaatt	ccactggact	tgagcttggc	3180
	agctgaacta	ftggagggtg	ggagagccca	gccattacca	tggagacaag	aagggtttfc	3240
	caccctggaa	tcaagatgtc	agactggctg	gctgcagtga	cgtagcactg	tactcaggag	3300
20	gctgagggga	ggatcactgg	agcccaggag	tttgaggctg	cagcgagcta	tgatcgcgcc	3360
	actacactcc	agcctgagca	acagagttag	accctgtctc	ttaaagaaaa	aaaaagtcag	3420
25	actgctggga	ctggccaggt	ttctgcccac	attggaccca	catgaggaca	tgatggagcg	3480
	cacctgcccc	ctggtggaca	gtcctgggag	aacctcaggc	ttcctggca	tcacagggca	3540
	gagccgggaa	gcgatgaatt	tggagactct	gtggggcctt	ggttccctg	tgtgtgtgtg	3600
30	ttgatcccaa	gacaatgaaa	gtttgactg	tatgctggac	ggcattcctg	cttatcaata	3660
	aacctgtttg	ttttaaaaaa	aa				3682
35	<210> 2						
	<211> 413						
	<212> ADN						
	<213> Homo sapiens						
40	<400> 2						
	gggagcccca	ggtggcacag	aagcaggctg	agtcctattc	ctgggctgg	gaccccagta	60
45	gagccgagta	ctgaggagcc	tcattcaaaa	cacaggatcc	cagggccggg	cgcagtggtc	120
	cacacctgta	atcccagcac	tttgggaggc	cgaggtggtc	accgaatcac	gaggtcagga	180
	gattgagacc	atcctggcta	acaaggtgaa	accccgctc	tactaaaaat	acaaaaaatt	240
50	agctgggcga	gctggtgggt	gcctgtatgc	ccagctactt	gggaggctga	ggcaggagaa	300
	tggtgtgaac	ccgggagggc	gagcttgacg	tgagccaaga	ttgtgccact	gcactccagc	360
55	ctgggcgaca	aagcaagact	cttttcaag	aaaaaaaaaa	aaaaaacat	gtc	413
	<210> 3						
	<211> 413						

ES 2 618 894 T3

<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 3

5
 tttttttt tttttttg gcaaagacta agagtttata attggagcgc actcattcat 60
 tcattcattc aacagtgtgt agggcccctg atctctcca ggcactggcc caggccctcc 120
 10 catagggagt ttcaggatg gagtgagggg cactgatgag acctcccacc gaggaggctg 180
 ggggctatga tggggcagac agaaatggcc acgtcagctc ctgtgggcag ttggggacag 240
 gtaggaaacag gtgtggcagg caggggtggc atgagtgcag gcaagaggca ggggctcagt 300
 15 gagctgggga gcagctgggg gtgagtgagc tggaggaggg ctgctgtgtg ggggctgcag 360
 ccatcagtcc ccacctggag gcggcccaaa gggagcctgg ccctgttctg gtg 413

20

<210> 4
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido

<400> 4

30 gttcacacca ttctctgcc t 21

<210> 5

<211> 20

35

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido antisentido

40

<400> 5

agcctgcttc tgtccacct 20

45

<210> 6

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

50

<220>

<223> Oligonucleótido antisentido

<400> 6

55 ctctcagta ctggtctt 19

<210> 7

<211> 19

<212> ADN

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
5	<400> 7	
	acaccattct cctgcctca	19
10	<210> 8	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 8	
	tgctgccac acctgtcct	20
20	<210> 9	
	<211> 20	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
30	<400> 9	
	ctccatcct agaactcct	20
35	<210> 10	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
40	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 10	
	gccacacctg ttctacctg t	21
45		

REIVINDICACIONES

1. Un oligonucleótido que se dirige a un transcrito natural antisentido del receptor del factor de necrosis tumoral 2 (TNFR2) para su uso como un compuesto terapéutico, donde el oligonucleótido aumenta la expresión del receptor del factor de necrosis tumoral 2 (TNFR2).
5
2. Un oligonucleótido que se dirige a un transcrito natural antisentido del receptor del factor de necrosis tumoral 2 (TNFR2) para su uso en la prevención o tratamiento de una enfermedad o trastorno asociados al receptor del factor de necrosis tumoral 2 (TNFR2), donde el oligonucleótido aumenta la expresión del receptor del factor de necrosis tumoral 2 (TNFR2), donde la enfermedad o trastorno se selecciona de entre el grupo que consiste en una enfermedad o trastorno cardiovascular, inflamación, artritis reumatoide, psoriasis y artritis psoriásica, una enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, una enfermedad o trastorno autoinmune.
10
3. Uso de un oligonucleótido que se dirige a un transcrito natural antisentido del receptor del factor de necrosis tumoral 2 (TNFR2) para fabricar un medicamento para la prevención o tratamiento de una enfermedad o trastorno asociados al receptor del factor de necrosis tumoral 2 (TNFR2) donde dicho oligonucleótido aumenta la expresión del receptor del factor de necrosis tumoral 2 (TNFR2), donde la enfermedad o trastorno se selecciona de entre el grupo que consiste en una enfermedad o trastorno cardiovascular, inflamación, artritis reumatoide, psoriasis y artritis psoriásica, una enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, una enfermedad o trastorno autoinmune.
15
20
4. Un procedimiento *in vitro* para aumentar la expresión del receptor del factor de necrosis tumoral 2 (TNFR2) en células o tejidos del paciente que comprende: la puesta en contacto de dichas células o tejidos con un oligonucleótido que se dirige a un transcrito natural antisentido del receptor del factor de necrosis tumoral 2 (TNFR2);
25 aumentando así la expresión del receptor del factor de necrosis tumoral 2 (TNFR2).
5. El oligonucleótido para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, o el uso de acuerdo con la reivindicación 3, o el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, donde el transcrito natural antisentido tiene la secuencia de ácidos nucleicos que se expone en la SEQ ID NO: 2 ó 3.
30
6. El oligonucleótido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 ó 5, o el uso de acuerdo con la reivindicación 3 ó 5, o el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4 ó 5, donde el oligonucleótido es monocatenario o donde el oligonucleótido es un compuesto de siRNA.
7. El oligonucleótido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 5 ó 6, o el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3, 5 ó 6, o el procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, donde el oligonucleótido comprende al menos una de las SEQ ID NO: 4 a 9.
35
8. El oligonucleótido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 5 a 7, o el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3, 5 a 7, o el procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, donde la expresión del receptor del factor de necrosis tumoral 2 (TNFR2) se incrementa en al menos el 10%.
9. El oligonucleótido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 5 a 8, o el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3, 5 a 8, o el procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, donde el oligonucleótido comprende además una o más modificaciones que comprenden:
45
- a) al menos una unión de internucleósidos modificada seleccionada de entre: un fosforotioato, alquilfosfonato, fosforoditioato, alquilfosfonotioato, fosforamidato, carbamato, carbonato, triéster de fosfato, acetamidato, éster de carboximetilo, y combinaciones de los mismos;
50
- b) un ácido nucleico peptídico (PNA), un ácido nucleico bloqueado (LNA), un ácido arabinonucleico, un análogo, un derivado, y combinaciones de los mismos, 2'-fluoro, una fracción de azúcares modificada en 2'-O-metoxietilo, una fracción de azúcares modificada en 2'-metoxi, una fracción de azúcares modificada en 2'-O-alquilo, una fracción de azúcares bicíclicos, y combinaciones de los mismos.
55
10. Un oligonucleótido que se dirige a un transcrito natural antisentido del receptor del factor de necrosis tumoral 2 (TNFR2), donde el oligonucleótido aumenta la expresión del receptor del factor de necrosis tumoral 2 (TNFR2), y donde el transcrito natural antisentido tiene la secuencia de ácidos nucleicos que se expone en la SEQ

ID NO: 2 ó 3.

11. El oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 10, donde el oligonucleótido es monocatenario o donde el oligonucleótido es un compuesto de siRNA.
- 5 12. El oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 10 ó 11, donde el oligonucleótido comprende al menos una de las SEQ ID NO: 4 a 9.
13. El oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, donde la expresión del receptor del factor de necrosis tumoral 2 (TNFR2) se incrementa en al menos el 10%.
14. El oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, donde el oligonucleótido comprende además una o más modificaciones que comprenden:
- 15 a) al menos una unión de internucleósidos modificada seleccionada de entre: un fosforotioato, alquilfosfonato, fosforoditioato, alquilfosfonotioato, fosforamidato, carbamato, carbonato, triéster de fosfato, acetamidato, éster de carboximetilo y combinaciones de los mismos;
- b) un ácido nucleico peptídico (PNA), un ácido nucleico bloqueado (LNA), un ácido arabinonucleico, un análogo, un derivado, y combinaciones de los mismos, 2'-fluoro, una fracción de azúcares modificada en 2'-O-metoxietilo, una fracción de azúcares modificada en 2'-metoxi, una fracción de azúcares modificada en 2'-O-alkilo, una fracción de azúcares bicíclicos, y combinaciones de los mismos.
- 20 15. El oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, donde el oligonucleótido tiene entre 10 y 30 nucleótidos de longitud.
- 25 16. El oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 15, donde el oligonucleótido tiene al menos el 90% de complementariedad de secuencias con una región diana en dicho transcrito natural antisentido del receptor del factor de necrosis tumoral 2 (TNFR2).
- 30 17. Una composición farmacéutica que comprende al menos un oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 16 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Figura 1

