

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 620 960**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

C12N 15/12 (2006.01)

A61K 31/713 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.06.2010 PCT/US2010/038761**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.12.2010 WO2010148050**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.06.2010 E 10790092 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.02.2017 EP 2443237**

54 Título: **Tratamiento de enfermedades relacionadas con un gen de colágeno mediante la inhibición de un transcrito antisentido natural a un gen de colágeno**

30 Prioridad:

16.06.2009 US 187384 P

16.12.2009 US 286939 P

16.12.2009 US 286965 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.06.2017

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 2 620 960 T3

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

DESCRIPCIÓN

Tratamiento de enfermedades relacionadas con un gen de colágeno mediante la inhibición de un transcrito antisentido natural a un gen de colágeno.

5

CAMPO DE LA INVENCION

La presente solicitud reivindica la prioridad de la solicitud de patente provisional de Estados Unidos 61/187.384, presentada el 16 de junio de 2009, n.º 61/286.939, presentada el 16 de diciembre de 2009 y la solicitud de patente provisional de Estados Unidos n.º 61/286.965, presentada el 16 de diciembre de 2009.

10

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

15 ANTECEDENTES

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

20

25

RESUMEN

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

30

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

35

Un aspecto proporciona un método de modulación de la función y/o expresión de un polinucleótido de un gen de colágeno en células o tejidos de paciente *in vivo* o *in vitro* que comprende poner en contacto dichas células o tejidos con un oligonucleótido antisentido de 5 a 30 nucleótidos de longitud, donde dicho oligonucleótido tiene al menos un 50 % de identidad de secuencia con un complemento inverso de un polinucleótido que comprende de 5 a 30 nucleótidos consecutivos dentro de los nucleótidos 1 a 387 de la SEQ ID NO: 4, 1 a 561 de la SEQ ID NO: 5, 1 a 335 de la SEQ ID NO: 6, 1 a 613 de la SEQ ID NO: 7, 1 a 177 de la SEQ ID NO: 8, y 1 a 285 de la SEQ ID NO: 9, modulando así la función y/o expresión del polinucleótido de un gen de colágeno en células o tejidos de paciente *in vivo* o *in vitro*.

40

45

En otro aspecto, un oligonucleótido se dirige a una secuencia antisentido natural de un polinucleótido de un gen de colágeno, por ejemplo, nucleótidos expuestos en la SEQ ID NO: 4 a 9, y cualquier variante, alelo, homólogo, mutante, derivado, fragmento y secuencia complementaria a los mismos. Los ejemplos de oligonucleótidos antisentido se exponen como las SEQ ID NO: 10 a 29.

50

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

55

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

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

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

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

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

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

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

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

Se describen otros aspectos a continuación.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 es un gráfico de resultados de PCR en tiempo real que muestra el cambio en veces + desviación estándar en ARNm de Col1a1 después del tratamiento de células HepG2 con oligonucleótidos de fosforotioato introducidos usando Lipofectamine 2000, en comparación con el control. Los resultados de PCR en tiempo real muestran que los niveles del ARNm de Col1a1 en las células HepG2 se aumentan significativamente 48 h después de tratamiento con uno de los oligos diseñados para Col1a1 antisentido DW440457. Las barras indicadas como CUR-1361 a CUR-1364 corresponden a muestras tratadas con las SEQ ID NO: 10 a 13 respectivamente.

La figura 2 es un gráfico de resultados de PCR en tiempo real que muestra el cambio en veces + desviación estándar en ARNm de Colla2 después del tratamiento de células HUVEC con oligonucleótidos de fosforotioato introducidos usando Lipofectamine 2000, en comparación con el control. Los resultados de PCR en tiempo real muestran que los niveles del ARNm de Colla2 en las células HUVEC se aumentan significativamente 48 h después de tratamiento con uno de los oligos diseñados para Colla2 antisentido Hs.571263. Las barras representadas como CUR-0862, CUR-0864, CUR-0863, CUR-0865, CUR-0866 y CUR-0867 corresponden a muestras tratadas con las SEQ ID NOS: 14 a 19 respectivamente.

La figura 3 es un gráfico de resultados de PCR en tiempo real que muestra el cambio en veces + desviación estándar en ARNm de Col7a1 después del tratamiento de células HUVEC con oligonucleótidos de fosforotioato introducidos usando Lipofectamine 2000, en comparación con el control. Los resultados de PCR en tiempo real muestran que los niveles de ARNm de Col7a1 en las células HUVEC se aumentan significativamente 48 h después de tratamiento con uno de los siRNA diseñados para Col7a1 como CV425857 (CV425857.1_1, CV425857.1_2,) y un siRNA para BU615800.1 (BU615800.1_1). Las barras representadas como CUR-0356, CUR-0358, CUR-0360 y CUR-0362, corresponden a muestras tratadas con las SEQ ID NOS: 20 a 23 respectivamente.

La figura 4 es un gráfico de resultados de PCR en tiempo real que muestra el cambio en veces + desviación estándar en ARNm de Col7a1 después del tratamiento de células HepG2 con oligonucleótidos de fosforotioato

introducidos usando Lipofectamine 2000, en comparación con el control. Los resultados de PCR en tiempo real muestran que los niveles de ARNm de Col7a1 en las células HepG2 se aumentan significativamente 48 h después de tratamiento con dos de los oligos diseñados para Co17a1 como be142537 y bg998538. Las barras representadas como CUR-0360 y CUR-0856 a CUR-0860 corresponden a muestras tratadas con la SEQ ID NO: 22 y la SEQ ID NO: 24 a 28 respectivamente.

Descripción de la lista de secuencias

- SEQ ID NO: 1: Colágeno de Homo sapiens, tipo I, alfa 1 (COL1A1), ARNm (N.º de acceso a NCBI: NM-000088.3).
 10 SEQ ID NO: 2: Colágeno de Homo sapiens, tipo I, alfa 2 (COL1A2), ARNm (N.º de acceso a NCBI: NM_000089.3).
 SEQ ID NO: 3: NM_024013.1| Colágeno de Homo sapiens, tipo VII, alfa 1 (COL7A1), ARNm (n.º de acceso a NCBI: NM_000094.3).
 SEQ ID NOs: 4 a 9: SEQ ID NO: 4: Secuencia antisentido de COL1A1 natural (DW440457); SEQ ID NO: 5: Secuencia antisentido de COL1A2 natural (Hs.571263); SEQ ID NO: 6: Secuencia antisentido de COL7A1 natural
 15 (CV425857.1).
 SEQ ID NO: 7: Secuencia antisentido de COL7A1 natural (BU615800.1); SEQ ID NO: 8: Secuencia antisentido de COL7A1 natural (BE142537); SEQ ID NO: 9: Secuencia antisentido de COL7A1 natural (BG998538).
 SEQ ID NOs: 10 a 29 - Oligonucleótidos antisentido. "r" indica ARN y * indica enlace fosfotioato.
 SEQ ID NO: 30 a 33 son los complementos inversos de los oligonucleótidos antisentido de SEQ ID NO: 20 a 23
 20 respectivamente. "r" indica ARN.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Varios aspectos de la divulgación se describen a continuación con referencia a aplicaciones ejemplares para
 25 ilustración. Debe entenderse que los numerosos detalles, relaciones y métodos específicos se exponen para proporcionar un entendimiento completo de la divulgación. Un experto en la técnica relevante, sin embargo, reconocerá fácilmente que la divulgación puede ponerse en práctica sin uno o más de los detalles específicos o con otros métodos. La presente divulgación no está limitada por el orden de actos o acontecimientos, ya que algunos actos pueden producirse en diferentes órdenes y/o simultáneamente con otros actos o acontecimientos. Además, no
 30 todos los actos o acontecimientos ilustrados son requeridos para implementar una metodología de acuerdo con la presente divulgación.

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

Definiciones

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

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

y más preferiblemente dentro de 2 veces, de un valor. Si se describen valores particulares en la solicitud y reivindicaciones, a menos que se establezca de otro modo, debe asumirse que el término "aproximadamente" significa dentro de un intervalo de error aceptable para el valor particular.

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

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

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

El oligonucleótido puede ser "quimérico", es decir, estar compuesto de diferentes regiones. En el contexto de esta divulgación, los compuestos "quiméricos" son oligonucleótidos que contienen dos o más regiones químicas, por ejemplo, una o más regiones de ADN, una o más regiones de ARN, una o más regiones de PNA, etc. Cada región química está constituida de al menos una unidad de monómero, es decir, un nucleótido en el caso de un compuesto de oligonucleótidos. Estos oligonucleótidos normalmente comprenden al menos una región en la que el oligonucleótido se modifica con el fin de presentar una o más propiedades deseadas. Las propiedades deseadas del oligonucleótido incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, elevada resistencia a la degradación por nucleasas, elevada captación celular y/o elevada afinidad de unión para el ácido nucleico diana. Las diferentes regiones del oligonucleótido pueden, por lo tanto, tener diferentes propiedades. Los oligonucleótidos quiméricos de la presente divulgación pueden formarse como estructuras mixtas de dos o más oligonucleótidos, oligonucleótidos modificados, oligonucleósidos y/o análogos de oligonucleótidos, como se ha descrito anteriormente.

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

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

Como se usan en el presente documento, las palabras Colágeno, tipo I, alfa 1; Colágeno Alpha-1(I), COL1A1, colágeno tipo I alfa-1, cadena de colágeno alfa-1(I), OI4, se consideran iguales en la bibliografía y se usan de forma intercambiable en la presente solicitud.

Como se usan en el presente documento, las palabras Colágeno alfa-2(I), "colágeno, tipo I, alfa 2", colágeno alfa2(I), colágeno alfa-2 tipo I, cadena de Colágeno alfa-2(I) y COL1A2, se consideran iguales en la bibliografía y se usan de forma intercambiable en la presente solicitud.

Como se usan en el presente documento, las palabras cadena de colágeno alfa-1(VII), COL7A1, EBD1, EBDCT, EBR1, colágeno LC, colágeno de cadena larga, se consideran iguales en la bibliografía y se usan de forma intercambiable en la presente solicitud.

5

Como se usa en el presente documento, la expresión "oligonucleótido específico para" u "oligonucleótido que se dirige a" se refiere a un oligonucleótido que tiene una secuencia (i) capaz de formar un complejo estable con una porción del gen elegido como diana, o (ii) capaz de formar un dúplex estable con una porción de una transcripción de ARNm del gen elegido como diana. La estabilidad de los complejos y dúplex puede determinarse por cálculos teóricos y/o ensayos *in vitro*. Se describen ensayos ejemplares para determinar la estabilidad de complejos y dúplex de hibridación se describen en los Ejemplos a continuación.

Como se usa en el presente documento, la expresión "ácido nucleico diana" incluye ADN, ARN (que comprende preARNm y ARNm) transcrito a partir de tal ADN, y también ADNc derivado de tal ARN, secuencias codificantes, no codificantes, polinucleótidos sentido o antisentido. La hibridación específica de un compuesto oligomérico con su ácido nucleico diana interfiere con la función normal del ácido nucleico. Esta modulación de la función de un ácido nucleico diana por compuestos, que hibridan específicamente con éste, se denomina generalmente "antisentido". Las funciones de ADN que van a interferirse incluyen, por ejemplo, la replicación y la transcripción. Las funciones de ARN que van a interferirse incluyen todas las funciones vitales tales como, por ejemplo, translocalización del ARN al sitio de traducción de proteína, traducción de proteína desde ARN, corte y empalme del ARN para dar una o más especies de ARNm, y actividad catalítica que puede acoplarse en o facilitarse por el ARN. El efecto global de tal interferencia con la función del ácido nucleico diana es la modulación de la expresión de un producto codificado u oligonucleótidos.

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

40

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

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

diana.

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

10

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

15

El término "nucleótido" incluye nucleótidos que existen de forma natural, así como nucleótidos que no existen de forma natural. Debe ser evidente para el experto en la técnica que los diversos nucleótidos que se han considerado previamente "que no existen de forma natural" se han encontrado posteriormente en la naturaleza. Por lo tanto, "nucleótidos" incluye no sólo las moléculas que contienen heterociclos de purina y pirimidina conocidas, sino también análogos y tautómeros heterocíclicos de las mismas. Los Ejemplos ilustrativos de otros tipos de nucleótidos son moléculas que contienen adenina, guanina, timina, citosina, uracilo, purina, xantina, diaminopurina, 8-oxo-N⁶-metiladenina, 7-deazaxantina, 7-deazaguanina, N⁴,N⁴-etanocitosina, N⁶,N⁶-etano-2,6-diaminopurina, 5-metilcitosina, 5-alquilil (C3-C6)-citosina, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, pseudoisocitosina, 2-hidroxi-5-metil-4-triazolopiridina, isocitosina, isoguanina, inosina y los nucleótidos "que no existen de forma natural" descritos en la Pat. de Estados Unidos n.º 5.432.272. El término "nucleótido" pretende incluir todos y cada uno de estos ejemplos, así como análogos y tautómeros de los mismos. Los nucleótidos especialmente interesantes son aquellos que contienen adenina, guanina, timina, citosina y uracilo, que se consideran como los nucleótidos que existen de forma natural en relación con la aplicación terapéutica y diagnóstica en seres humanos. Los nucleótidos incluyen los azúcares naturales 2'-desoxi y 2'-hidroxilo, por ejemplo, como se describe en Kornberg y Baker, DNA Replication, 2ª Ed. (Freeman, San Francisco, 1992), así como sus análogos.

20

25

30

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

35

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

40

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

50

Como se usa en el presente documento, la expresión "condiciones de hibridación rigurosas" o "condiciones rigurosas" se refiere a condiciones bajo las que un compuesto de la divulgación hibridará con su secuencia diana, pero con un número mínimo de otras secuencias. Las condiciones rigurosas son dependientes de la secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias y en el contexto de esta divulgación, las "condiciones rigurosas" en las que hibridan los compuestos oligoméricos con una secuencia diana se determinan por la naturaleza y composición de los compuestos oligoméricos y los ensayos en los que se están investigando. En general, las condiciones de hibridación rigurosas comprenden bajas concentraciones (<0,15 M) de sales con cationes inorgánicas tales como Na⁺⁺ o K⁺⁺ (es decir, baja fuerza iónica), temperatura superior a 20 °C - 25 °C por debajo de la T_m del complejo de compuesto oligomérico:secuencia diana, y la presencia de desnaturalizantes tales como formamida,

55

dimetilformamida, sulfóxido de dimetilo, o el detergente dodecilsulfato sódico (SDS). Por ejemplo, la velocidad de hibridación disminuye un 1,1 % por cada 1 % de formamida. Un ejemplo de una condición de hibridación de alta rigurosidad es 0,1 x tampón cloruro sódico-citrato sódico (SSC)/SDS al 0,1% (peso/volumen) a 60 °C durante 30 minutos.

5

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

Se entiende en la técnica que la secuencia de un compuesto oligomérico no necesita ser complementaria al 100 % a la de su ácido nucleico diana para ser específicamente hibridable. Además, un oligonucleótido puede hibridarse sobre uno o más segmentos de forma que segmentos intermedios o adyacentes no participen en el acontecimiento de hibridación (por ejemplo, una estructura de bucle, desapareamiento o estructura de horquilla). Los compuestos oligoméricos de la presente divulgación comprenden al menos aproximadamente el 70 %, o al menos aproximadamente el 75 %, o al menos aproximadamente el 80 %, o al menos aproximadamente el 85 %, o al menos aproximadamente el 90 %, o al menos aproximadamente el 95 %, o al menos aproximadamente el 99 %, de complementariedad de secuencia con una región diana dentro de la secuencia de ácidos nucleicos diana a la que se dirigen. Por ejemplo, un compuesto antisentido en el que 18 de los 20 nucleótidos del compuesto antisentido son complementarios a una región diana, y, por tanto, hibridarían específicamente, representaría el 90 por ciento de complementariedad. En este ejemplo, los nucleótidos no complementarios restantes pueden agruparse o intercalarse con nucleótidos complementarios y no necesitan ser contiguos entre sí o a nucleótidos complementarios. Como tal, un compuesto antisentido que tiene 18 nucleótidos de longitud que tiene 4 (cuatro) nucleótidos no complementarios que están flanqueados por dos regiones de complementariedad completa con el ácido nucleico diana tendría el 77,8 % de complementariedad global con el ácido nucleico diana y así entraría dentro del alcance de la presente divulgación. El porcentaje de complementariedad de un compuesto antisentido con una región de un ácido nucleico diana puede determinarse rutinariamente usando programas BLAST (herramientas de búsqueda de alineamientos locales básicos) y programas PowerBLAST conocidos en la técnica. El porcentaje de homología, la identidad de secuencias o la complementariedad pueden determinarse, por ejemplo, mediante el programa Gap (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison Wis.), usando parámetros por defecto, que usa el algoritmo de Smith y Waterman (Adv. Appl. Math., (1981) 2, 482-489).

40

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

45

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

50

El término "variante", cuando se usa en el contexto de una secuencia de polinucleótidos, puede incluir una secuencia de polinucleótidos relacionada con un gen de tipo silvestre. Esta definición también puede incluir, por ejemplo, variantes "alélicas", de "corte y empalme", de "especie" o "polimórficas". Una variante de corte y empalme puede tener identidad significativa con una molécula de referencia, pero generalmente tendrá un mayor o menor número de polinucleótidos debido al corte y empalme alternativo de exones durante el procesamiento de ARNm. El polipéptido correspondiente puede poseer dominios funcionales adicionales o una ausencia de dominios. Las variantes de especie son secuencias de polinucleótidos que varían de una especie a otra. Son de particular utilidad en la divulgación variantes de productos génicos de tipo silvestre. Las variantes pueden resultar de al menos una

55

mutación en la secuencia de ácidos nucleicos y pueden producir ARNm alterados o polipéptidos cuya estructura o función puede o puede no alterarse. Cualquier gen natural o recombinante dado puede tener ninguna, una o muchas formas alélicas. Los cambios mutacionales comunes que dan lugar a variantes se atribuyen generalmente a delecciones, adiciones o sustituciones naturales de nucleótidos. Cada uno de estos tipos de cambios puede producirse solo, o en combinación con los otros, una o más veces en una secuencia dada.

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

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

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

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

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

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

Como se usa en el presente documento, "cáncer" se refiere a todos los tipos de cáncer o neoplasia o tumores malignos que se encuentran en mamíferos, incluyendo, pero sin limitación: leucemias, linfomas, melanomas, carcinomas y sarcomas. El propio cáncer se manifiesta como un "tumor" o tejido que comprende células malignas del cáncer. Los ejemplos de tumores incluyen sarcomas y carcinomas, tales como, pero sin limitación: fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rbdomiosarcoma, carcinoma de colon, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de las glándulas sudoríparas, carcinoma de las glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de las vías biliares, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, cáncer de cuello uterino, tumor testicular, carcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón de células pequeñas, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, neuroblastoma y retinoblastoma. Los cánceres adicionales que pueden tratarse por la composición desvelada de acuerdo con la divulgación incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, linfoma no Hodgkin, mieloma múltiple, neuroblastoma, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, rbdomiosarcoma, trombocitosis primaria, tumores de pulmón de células pequeñas de

macroglobulinemia primaria, tumores cerebrales primarios, cáncer de estómago, cáncer de colon, insulanoma pancreático maligno, carcinoide maligno, cáncer de vejiga urinaria, lesiones cutáneas premalignas, cáncer testicular, linfomas, cáncer de tiroides, neuroblastoma, cáncer del esófago, cáncer de tracto genitourinario, hipercalcemia maligna, cáncer del cuello uterino, cáncer endometrial, cáncer cortical adrenal y cáncer de próstata.

5

"Enfermedad o trastorno neurológico" se refiere a cualquier enfermedad o trastorno del sistema nervioso y/o del sistema visual. "Enfermedad o trastorno neurológico" incluye una enfermedad o trastornos que implican al sistema nervioso central (cerebro, tronco encefálico y cerebelo), el sistema nervioso periférico (incluyendo nervios craneales), y el sistema nervioso autónomo (partes del cual están situadas tanto en el sistema nervioso central como

10

el periférico). Los ejemplos de trastornos neurológicos incluyen, pero sin limitación, dolor de cabeza, estupor y coma, demencia, convulsiones, trastornos del sueño, traumatismo, infecciones, neoplasias, neurooftalmología, trastornos del movimiento, enfermedades desmielinizantes, trastornos de la médula espinal, y trastornos de los nervios periféricos, uniones musculares y neuromusculares. La enfermedad de adicción y metal, incluyen, pero sin limitación, trastorno bipolar y esquizofrenia, también se incluyen en la definición de trastorno neurológico. La siguiente es una

15

lista de varios trastornos neurológicos, síntomas, signos y síndromes que pueden tratarse usando composiciones y métodos de acuerdo con la presente divulgación: afasia epileptiforme adquirida; encefalomieltis diseminada aguda; adrenoleucodistrofia; degeneración macular relacionada con la edad; agenesia del cuerpo calloso; agnosia; síndrome de Aicardi; enfermedad de Alexander; enfermedad de Alpers; hemiplejía alterna; demencia vascular; esclerosis lateral amiotrófica; anencefalia; síndrome de Angelman; angiomatosis; anoxia; afasia; apraxia; quistes aracnoideos; aracnoiditis; malformación de Anroni-Chiari; malformación arteriovenosa; síndrome de Asperger; ataxia; telegiectasia; trastorno de hiperactividad por déficit de atención; autismo; disfunción autonómica; dolor de espalda;

20

enfermedad de Batten; enfermedad de Behcet; parálisis de Bell; blefaroespasma esencial benigno; amiotrofia focal benigna; hipertensión intracraneal benigna; enfermedad de Binswanger; blefaroespasma; síndrome de Bloch Sulzberger; lesión del plexo braquial; absceso del cerebro; lesión cerebral; tumores cerebrales (incluyendo

25

glioblastoma multiforme); tumor espinal; síndrome de Brown-Séquard; enfermedad de Canavan; síndrome del túnel carpiano; causalgia; síndrome de dolor central; mielinólisis central pontina; trastorno cefálico; aneurisma cerebral; arteriosclerosis cerebral; atrofia cerebral; gigantismo cerebral; parálisis cerebral; enfermedad de Charcot-Marie-Tooth; neuropatía inducida por la quimioterapia y dolor neuropático; malformación de Chiari; corea; polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica; dolor crónico; síndrome de dolor regional crónico; síndrome de Coffin Lowry;

30

coma, incluyendo estado vegetativo persistente; diplejía facial congénita; degeneración corticobasal; arteritis craneal; craneosinostosis; enfermedad de Creutzfeldt-Jakob; trastornos traumáticos acumulativos; síndrome de Cushing; enfermedad por cuerpos de inclusión citomegálica; infección por citomegalovirus; síndrome de ojos y pies bailarines; síndrome de Dandy-Walker; enfermedad de Dawson; síndrome de De Morsier; parálisis de Dejerine-Klumpke; demencia; dermatomiositis; neuropatía diabética; esclerosis difusa; disautonomía; disgrafía; dislexia; distonías;

35

encefalopatía epiléptica infantil temprana; síndrome de silla vacía; encefalitis; encefalocelos; angiomatosis encefalotrigeminal; epilepsia; parálisis de Erb; temblor esencial; enfermedad de Fabry; síndrome de Fahr; desmayo; parálisis espástica familiar; convulsiones febriles; síndrome de Fisher; ataxia de Friedreich; demencia fronto-temporal y otras "tauopatías"; enfermedad de Gaucher; síndrome de Gerstmann; arteritis de células gigantes; enfermedad de inclusión de células gigantes; leucodistrofia de células globoides; síndrome de Guillain-Barre; mielopatía asociada a

40

HTLV-1; enfermedad de Hallervorden-Spatz; lesión en la cabeza; dolor de cabeza; espasmo hemifacial; paraplegia espástica hereditaria; heredoopatía atáctica polineuritiformis; herpes zoster ótico; herpes zoster; síndrome de Hirayama; demencia y neuropatía asociadas al VIH (también manifestaciones neurológicas del SIDA); holoprosencefalia; enfermedad de Huntington y otras enfermedades de repetición de poliglutamina; hidranencefalia; hidrocefalia; hipercortisolismo; hipoxia; encefalomieltis mediada inmune; miositis por cuerpos de inclusión;

45

incontinencia pigmentaria; enfermedad por almacenamiento de ácido fitánico infantil; enfermedad de refsum infantil; espasmos infantiles; miopatía inflamatoria; quiste intracraneal; hipertensión intracraneal; síndrome de Joubert; síndrome de Keams-Sayre; enfermedad de Kennedy; síndrome de Kinsbourne; síndrome de Klippel Feil; enfermedad de Krabbe; enfermedad de Kugelberg-Welander; kuru; enfermedad de Lafora; síndrome miasténico de Lambert-Eaton; síndrome de Landau-Kleffner; síndrome medular lateral (Wallenberg); problemas de aprendizaje; enfermedad

50

de Leigh; síndrome de Lennox-Gustaut; síndrome de Lesch-Nyhan; leucodistrofia; demencia de cuerpos de Lewy; Lisencefalia; síndrome de enclaustramiento: enfermedad de Lou Gehrig (es decir, enfermedad de neuronas motoras o esclerosis lateral amiotrófica); enfermedad lumbar del disco; secuelas neurológicas de la enfermedad de Lyme; enfermedad de Machado-Joseph; macrencefalia; megalencefalia; síndrome de Melkersson-Rosenthal; enfermedad de Menieres; meningitis; enfermedad de Menkes; leucodistrofia metacromática; microcefalia; migraña; síndrome de

55

Miller Fisher; mini-apoplejías; miopatías mitocondriales; síndrome de Mobius; amiotrofia monomélica; enfermedad de neuronas motoras; enfermedad de Moyamoya; mucopolisacaridosis; demencia por multi-infarto; neuropatía motora multifocal; esclerosis múltiple y otros trastornos desmielinizantes; atrofia del sistema múltiple con hipotensión postural; distrofia muscular; miastenia gravis; esclerosis mielinoclástica difusa; encefalopatía mioclónica de lactantes; mioclonía; miopatía; miotonía congénita; narcolepsia; neurofibromatosis; síndrome neuroléptico maligno;

- manifestaciones neurológicas del SIDA; secuelas neurológicas del lupus; neuromiotonía; lipofuscinosis neuronal cerioidea; trastornos de migración neuronal; enfermedad de Niemann-Pick; síndrome de O'Sullivan-McLeod; neuralgia occipital; secuencia de disrafismo espinal oculto; síndrome de Ohtahara; atrofia olivopontocerebelar; opsoclono mioclono; neuritis óptica; hipotensión otostática; síndrome de uso excesivo; parestesia; enfermedad o
- 5 trastorno neurodegenerativo (enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica (ALS), demencia, esclerosis múltiple y otras enfermedades y trastornos asociados a la muerte de las células neuronales); paramiotonía congénita; enfermedades paraneoplásicas; ataques paroxísticos; síndrome de Parry Romberg; enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher; parálisis periódicas; neuropatía periférica; neuropatía dolorosa y dolor neuropático; estado vegetativo persistente; trastornos generalizados del desarrollo;
- 10 reflejo del estornudo fótico; enfermedad por almacenamiento de ácido fitánico; enfermedad de Pick; nervio pellizado; tumores pituitarios; polimiositis; pencefalía; síndrome post-polio; neuralgia posherpética; encefalomiелitis postinfecciosa; hipotensión postural; síndrome de Prader-Willi; esclerosis lateral primaria; enfermedades por priones; atrofia hemifacial progresiva; leucoencefalopatía multifocal progresiva; polidistrofia esclerosante progresiva; parálisis supranuclear progresiva; pseudotumor cerebral; síndrome de Ramsay-Hunt (tipos I
- 15 y II); encefalitis de Rasmussen; síndrome de distrofia simpática refleja; enfermedad de Refsum; trastornos de movimiento repetitivo; lesiones por esfuerzo repetitivo; síndrome de piernas inquietas; mielopatía asociada a retrovirus; síndrome de Rett; síndrome de Reye; baile de San Vito; enfermedad de Sandhoff; enfermedad de Schilder; esquizencefalía; displasia septo-óptica; síndrome del bebé sacudido; culebrilla; síndrome de Shy-Drager; síndrome de Sjogren; apnea del sueño; síndrome de Soto; espasticidad; espina bífida; lesión de la médula espinal;
- 20 tumores de la médula espinal; atrofia muscular espinal; síndrome de la persona rígida; ictus; síndrome de Sturge-Weber; panencefalitis esclerosante subaguda; encefalopatía aterosclerótica subcortical; corea de Sydenham; síncope; siringomielia; discinesia tardía; enfermedad de Tay-Sachs; arteritis temporal; síndrome de la médula espinal anclada; enfermedad de Thomsen; síndrome del opérculo torácico; neuralgia del trigémino; parálisis de Todd; síndrome de Tourette; ataque isquémico transitorio; encefalopatías espongiiformes transmisibles; mielitis transversal;
- 25 lesión cerebral traumática; temblor; neuralgia trigeminal; paraparesia espástica tropical; esclerosis tuberosa; demencia vascular (demencia multi-infarto); vasculitis incluyendo arteritis temporal; enfermedad de Von Hippel-Lindau; síndrome de Wallenberg; enfermedad de Werdnig-Hoffman; síndrome de West; latigazo cervical; síndrome de Williams; enfermedad de Wildon; y síndrome de Zellweger.
- 30 Una "inflamación" se refiere a afecciones y inflamatorias sistémicas y afecciones asociadas a la migración y atracción de monocitos, leucocitos y/o neutrófilos. Los ejemplos de inflamación incluyen, pero sin limitación, inflamación resultante de infección con organismos patógenos (incluyendo bacterias gram-positivas, bacterias gram-negativas, virus, hongos y parásitos, tales como protozoos y helmintos), rechazo al trasplante (incluyendo rechazo de órganos sólidos, tales como riñón, hígado, corazón, pulmón o cornea, así como rechazo de trasplantes médula
- 35 ósea incluyendo enfermedad de injerto contra huésped (GVHD)), o de reacciones autoinmunes o alérgicas crónicas o agudas localizadas. Las enfermedades autoinmunes incluyen glomerulonefritis aguda; artritis reumatoide o reactiva; glomerulonefritis crónica; enfermedades inflamatorias del intestino, tales como enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y enterocolitis necrotizante; síndromes asociados a la transfusión de granulocitos; dermatosis inflamatoria, tales como dermatitis por contacto, dermatitis atópica, psoriasis; lupus eritematoso sistémico (SLE), tiroiditis
- 40 autoinmune, esclerosis múltiple, y algunas formas de diabetes, o cualquier otro estado autoinmune en el que el ataque por el sistema inmune del propio sujeto dé como resultado una destrucción tisular patológica. Las reacciones alérgicas incluyen asma alérgica, bronquitis crónica, hipersensibilidad aguda y retardada. Las patologías inflamatorias sistémicas incluyen inflamación asociada a trauma, quemaduras, reperfusión tras eventos isquémicos (por ejemplo, eventos trombóticos en corazón, cerebro, intestinos o vasculatura periférica, incluyendo infarto de
- 45 miocardio e ictus), sepsis, ARDS o síndrome de disfunción orgánica múltiple. El reclutamiento de células inflamatorias también se produce en las placas ateroscleróticas. La inflamación incluye, pero sin limitación, linfoma no Hodgkin, granulomatosis de Wegener, tiroiditis de Hashimoto, carcinoma hepatocelular, atrofia del timo, pancreatitis crónicas, artritis reumatoide, hiperplasia linfocítica reactiva, osteoartritis, colitis ulcerosa, carcinoma papilar, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, colecistitis aguda, colecistitis crónica, cirrosis, sialadenitis crónica, peritonitis,
- 50 pancreatitis aguda, pancreatitis crónica, Gastritis crónica, adenomiosis, endometriosis, cervicitis aguda, cervicitis crónica, hiperplasia linfocítica, esclerosis múltiple, hipertrofia secundaria a púrpura trombocitopénica idiopática, nefropatía IgA primaria, lupus eritematoso sistémico, psoriasis, enfisema pulmonar, pielonefritis crónica, y cistitis crónica.
- 55 *Composiciones y moléculas de polinucleótidos y oligonucleótidos*

Dianas

En un aspecto, las dianas comprenden secuencias de ácido nucleico de un gen de colágeno, incluyendo, sin

limitación, secuencias no codificantes y/o codificantes sentido y/o antisentido asociadas al gen de colágeno.

En un aspecto, las dianas comprenden secuencias de ácido nucleico de COL1A1, incluyendo, sin limitación, secuencias no codificantes y/o codificantes sentido y/o antisentido asociadas al gen COL1A1.

5

En un aspecto, las dianas comprenden secuencias de ácido nucleico de COL1A2, incluyendo, sin limitación, secuencias no codificantes y/o codificantes sentido y/o antisentido asociadas al gen COL1A2.

En un aspecto, las dianas comprenden secuencias de ácido nucleico de COL7A1, incluyendo, sin limitación, secuencias no codificantes y/o codificantes sentido y/o antisentido asociadas al gen COL7A1.

10

El colágeno de tipo I es el componente ECM más enriquecido en la vasculatura y se encuentra en abundancia en la placa, cuyos niveles afectan a la vulnerabilidad de la placa y se correlacionan con la mortalidad y morbilidad de la aterosclerosis (Libby P., et al (2000) J. Intern. Med. 247: 349-358; Rekhter MD., (1993) Am. J. Pathol. 143: 1634-1648). Consiste en dos cadenas $\alpha 1$ (I) y una cadena $\alpha 2$ (I) que son producidas por dos genes bastante grandes que residen en cromosomas diferentes tanto en el genoma humano como en el genoma del ratón (Myllyharju, J., et al (2001) Ann. Med. 33, 7-21). El colágeno tipo I es un miembro de una familia de colágenos fibrilares y representa del 80 al 90 % de la proteína que se encuentra en el hueso. También se encuentra en grandes cantidades en tejidos tales como piel, los ligamentos y los tendones. El gen COL1A1 se localiza en el brazo largo (q) del cromosoma 17 entre las posiciones 21.3 y 22.1, desde el par de bases 45.616.455 hasta el par de bases 45.633.991.

15

20

El colágeno de tipo I es el componente ECM más enriquecido en la vasculatura y se encuentra en abundancia en la placa, cuyos niveles afectan a la vulnerabilidad de la placa y se correlacionan con la mortalidad y morbilidad de la aterosclerosis (Libby P., et al (2000) J. Intern. Med. 247: 349-358; Rekhter MD., (1993) Am. J. Pathol. 143: 1634-1648). Consiste en dos cadenas $\alpha 1$ (I) y una cadena $\alpha 2$ (I) que son producidas por dos genes bastante grandes que residen en cromosomas diferentes tanto en el genoma humano como en el genoma del ratón (Myllyharju, J., et al (2001) Ann. Med. 33, 7-21. El gen del colágeno alfa2 (I) (COL1A2) se localiza en el cromosoma 7q22.1.

25

El colágeno, tipo VII, alfa 1 (epidermólisis ampullosa, distrófica, dominante y recesiva), también conocido como COL7A1, es un gen humano. Este gen codifica la cadena alfa del colágeno tipo VII. La fibrilla de colágeno tipo VII, compuesta por tres cadenas de colágeno alfa idénticas, está restringida a la zona subterránea debajo del epitelio escamoso estratificado. Funciona como una fibrilla de anclaje entre los epitelios externos y el estroma subyacente. Las mutaciones en este gen están asociadas a todas las formas de epidermólisis ampullosa distrófica. En ausencia de mutaciones, sin embargo, una respuesta autoinmune contra el colágeno tipo VII puede dar como resultado una forma adquirida de esta enfermedad denominada epidermólisis ampullosa adquirida.

30

35

El colágeno tipo VII también se encuentra en la retina; Su función en este órgano es desconocida.

COL7A1 se localiza en el brazo corto del cromosoma humano 3, en la región cromosómica denominada 3p21.31. El gen tiene aproximadamente 31.000 pares de bases en tamaño y es notable por la extrema fragmentación de su secuencia codificante en 118 exones. COL7A1 se transcribe en un ARNm de 9.287 pares de bases. En la piel, la proteína de colágeno tipo VII es sintetizada por los queratinocitos y los fibroblastos dérmicos.

40

La epidermólisis ampullosa distrófica (DEB) es un trastorno cutáneo hereditario clínicamente heterogéneo, caracterizado por la formación de ampollas de la piel y membranas mucosas después de traumatismos menores y con una amplia gama de gravedad clínica. Todas las formas son causadas por mutaciones en COL7A1, el gen que codifica el colágeno VII. Este colágeno, el componente principal de las fibrillas de anclaje, se reduce o falta en la piel con DEB, y las fibrillas de anclaje están morfológicamente alteradas o ausentes y funcionalmente defectuosas. En particular, el espectro completo de mutaciones genéticas y los mecanismos moleculares que conducen a estas alteraciones visuales y funcionales siguen siendo esquivos, a pesar de los significativos esfuerzos científicos.

45

50

En todo el mundo, la DEB afecta a miles de familias. Por lo tanto, una detección eficaz de la mutación COL7A1 es urgentemente necesaria para un diagnóstico preciso, el pronóstico, el asesoramiento genético y un diagnóstico prenatal fiable, y, lo que es más importante, para la identificación de candidatos adecuados para futuros ensayos de terapia génica. COL7A1 se encuentra en la región 3p21 y abarca más de 30,5 kb. Comparte características estructurales con otros genes de colágeno y consiste en 118 pequeños exones y pequeños intrones. Hasta la fecha, se han indicado más de 200 mutaciones diferentes, pero se conocen muy pocas mutaciones recurrentes o puntos calientes.

55

En algunos aspectos, se usan oligonucleótidos antisentido para prevenir o tratar enfermedades o trastornos asociados a los miembros de la familia de un gen de colágeno. Las enfermedades y trastornos mediados por el gen de colágeno ejemplares que pueden tratarse con células/tejidos regenerados a partir de células madre que se obtienen usando los compuestos antisentido comprenden: un trastorno del colágeno, degradación del colágeno 5 relacionado con la edad, osteogénesis imperfecta, otosclerosis (OTSC), osteoporosis, osteoartritis, cáncer de células escamosas del esófago, condrodisplasia, síndrome de Marfan atípico, síndrome de Ehlers-Danlos (EDS), epidermolisis ampollosa distrófica (DEB), enfermedad de Caffey, aneurismas (por ejemplo, aneurismas intracraneales), fibrosis pulmonar idiopática, cirrosis hepática, fibrosis renal, fibrosis hepática, fibrosis del corazón, escleroderma, cicatrices hipertróficas, queloides, cáncer, inflamación, una enfermedad genética (por ejemplo, 10 distrofia muscular de Duchenne), una enfermedad o trastorno neurológico (por ejemplo, enfermedad de Parkinson, de Alzheimer, de Huntington, de Gaucher), una enfermedad metabólica (por ejemplo, diabetes tipo I), una enfermedad o trastorno autoinmune, traumatismo (por ejemplo, lesión medular, quemaduras, etc.), isquemia, y otra enfermedad o trastorno de los vasos sanguíneos, corazón y piel, envejecimiento de la piel, una enfermedad o trastorno o afección cutánea que requiere reconstrucción de la piel, una enfermedad hepática o renal que requiere 15 trasplante; regeneración de tendón, hueso o tejido; reparación esquelética, reparación de cartílagos y huesos.

En otro aspecto, los oligonucleótidos antisentido modulan la expresión normal y/o la función normal de un gen de colágeno en pacientes que padecen o están en riesgo de desarrollar enfermedades o trastornos asociados a genes de colágeno.

20 Un ejemplo de la presente divulgación proporciona una composición de matriz basada en un gen de colágeno, comprendiendo dicha composición una matriz de colágeno purificada tridimensional compuesta por fibrillas de colágeno, donde la función y/o la expresión de un polinucleótido del gen de colágeno en las células de las fibrillas de colágeno está modulada *in vivo* o *in vitro* poniendo en contacto células o tejidos de fibrillas de colágeno con al 25 menos un oligonucleótido antisentido que se dirige a una región de un oligonucleótido antisentido natural del polinucleótido del gen de colágeno.

Un aspecto de la presente divulgación proporciona un método de cicatrización de heridas *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo* o regeneración tisular o ingeniería de tejidos que comprende la aplicación de una composición de matriz extracelular 30 de la presente divulgación a una herida.

Un aspecto de la presente divulgación proporciona un método para preparar una composición de matriz basada en un gen de colágeno, que comprende poner en contacto células o tejidos de colágeno con al menos un oligonucleótido antisentido que se dirige a una región de un oligonucleótido antisentido natural del polinucleótido del 35 gen de colágeno; modulando de este modo una función y/o la expresión del polinucleótido del gen de colágeno en células o tejidos de pacientes *in vivo* o *in vitro*.

Otro aspecto de la presente divulgación proporciona una composición para soportar células madre, comprendiendo la composición una matriz basada en un gen de colágeno, purificada y diseñada por ingeniería, que comprende 40 fibrillas de colágeno, y una población de células madre. Las composiciones de matriz a base de colágeno purificadas diseñadas por ingeniería de la presente divulgación se pueden usar en solitario o en combinación con células como una construcción de injerto de tejido para mejorar la reparación de tejidos dañados o enfermos.

De acuerdo con un aspecto, se proporciona un método mejorado para cultivar células madre. El método comprende 45 preparar una composición de gen de colágeno solubilizada con las características deseadas como se proporciona en la presente divulgación, añadir células a la composición de gen de colágeno solubilizada y polimerizar la composición de colágeno en condiciones controladas para proporcionar una matriz formada a partir de fibrillas de colágeno y tener la microestructura deseada. En un aspecto, las células se añaden a la matriz basada en el gen de colágeno, y las células se cultivan en condiciones adecuadas para la proliferación de las células.

50 En aspectos, la composición de matriz basada en el gen de colágeno se utiliza para prevenir o tratar enfermedades o trastornos asociados a la pérdida de un tipo celular o tejido particular que puede reemplazarse por nuevas células/tejidos regenerados a partir de las células madre pluripotentes.

55 En aspectos, la composición de matriz basada en el gen de colágeno se usa junto con al menos uno de los factores de transcripción seleccionados de entre: OCT4, c-myc, KLF4 y/o Sox2, NANOG, LIN28 y otros factores de transcripción requeridos para inducir células madre pluripotentes a partir de un tejido adulto dado. Estas células pueden introducirse adicionalmente en una lesión y permitir que se diferencien en un tipo celular requerido *in vitro* o *in vivo*.

Los ejemplos de enfermedades que pueden tratarse con células/tejidos regenerados a partir de la composición de matriz basada en el gen de colágeno usando las células madre y los compuestos antisentido comprenden cáncer, enfermedades genéticas (por ejemplo, distrofia muscular de Duchenne), enfermedades neurodegenerativas (por ejemplo enfermedad de Parkinson, de Alzheimer, de Gaucher), enfermedades metabólicas (por ejemplo, diabetes tipo I), traumatismo (por ejemplo, lesiones medulares, quemaduras, etc.), isquemia, y otras enfermedades de los vasos sanguíneos, del corazón, del hígado o del riñón que requieren trasplante.

En aspectos, la composición de matriz basada en el gen de colágeno también puede utilizarse en la regeneración de tendones, huesos o tejidos; la reparación esquelética, procesos de reparación de cartílago, óseos, osteoporosis, prótesis para artropatías, etc., que pueden inyectarse *in situ* en pequeñas fracturas no unificadoras o en lesiones cartilaginosas, en la circulación sistémica de individuos osteoporóticos o pueden implantarse adsorbidos en el biomaterial apropiado (colágeno, hidroxiapatita, etc.) para promover la formación de cartílago o hueso en las lesiones. Además, la composición puede adsorberse en la hidroxiapatita (periapatita) que reviste las prótesis para artropatías de cadera, rodilla, para mejorar la integración biológica de estas prótesis en el huésped, prolongando su vida útil. La composición puede usarse también en la artrodesis espinal para promover la fusión espinal y mejorar la eficacia de estos procedimientos realizados por los procedimientos estándar con injerto autólogo o banco óseo.

En los aspectos de la presente divulgación, se proporcionan regímenes terapéuticos y/o cosméticos y tratamientos adaptados relacionados a sujetos que requieren tratamientos de la piel o en riesgo de desarrollar afecciones para las cuales requerirán tratamientos de la piel. El diagnóstico puede hacerse, por ejemplo, basándose en el estado del gen del colágeno del sujeto. Los niveles de expresión de un gen de colágeno de un paciente en un tejido dado, tales como piel, se pueden determinar por métodos conocidos por los expertos en la técnica y descritos en otra parte en este documento, por ejemplo, analizando el tejido usando PCR o métodos de detección basados en anticuerpos.

Un aspecto de la presente divulgación proporciona una composición para el tratamiento de la piel y/o una aplicación cosmética que comprende oligonucleótidos antisentido del gen de colágeno, por ejemplo, para regular de manera ascendente la expresión del gen de colágeno en la piel. Los ejemplos de oligonucleótidos antisentido se exponen como las SEQ ID NO: 4 a 29. En aspectos, las células se tratan *in vivo* con los oligonucleótidos de la presente divulgación, para aumentar la vida útil de la célula o prevenir la apoptosis. Por ejemplo, la piel puede protegerse del envejecimiento, por ejemplo, del desarrollo de arrugas, mediante el tratamiento de la piel, por ejemplo, células epiteliales, como se describe en el presente documento. En un aspecto ejemplar, la piel se pone en contacto con una composición farmacéutica o cosmética que comprende un compuesto antisentido del gen de colágeno como se describe en el presente documento. Los ejemplos de padecimientos cutáneos o afecciones de la piel incluyen trastornos o enfermedades asociadas a o causadas por inflamación, daño solar o envejecimiento natural. Por ejemplo, las composiciones encuentran utilidad en la prevención o tratamiento de dermatitis de contacto (incluyendo dermatitis de contacto irritante y dermatitis alérgica de contacto), dermatitis atópica (también conocido como eczema alérgico), queratosis actínica, trastornos de queratinización (incluyendo eccema), enfermedades de epidermolísis ampollosa (incluyendo pénfigo), dermatitis exfoliativa, dermatitis seborreica, eritemas (incluyendo eritema multiforme y eritema nodoso), daño causado por el sol u otras fuentes de luz, lupus eritematoso discoide, dermatomiositis, cáncer de piel y los efectos del envejecimiento natural.

En los aspectos de la presente divulgación, una composición que comprende oligonucleótidos antisentido del gen de colágeno, por ejemplo, para regular de forma ascendente la expresión del gen de colágeno en el cuero cabelludo e inhibir la señalización del receptor de andrógenos, evitando así la alopecia androgenética (pérdida de cabello). En aspectos, a un paciente que padece alopecia se le administra una formulación tópica o sistémica.

En un aspecto, un oligonucleótido antisentido descrito en el presente documento se incorpora en una formulación tópica que contiene un vehículo tópico que es generalmente adecuado para la administración tópica de fármacos y que comprende cualquier material conocido en la técnica. El vehículo tópico puede seleccionarse de manera que proporcione la composición en la forma deseada, por ejemplo, como una pomada, loción, crema, microemulsión, gel, aceite, solución, o similares, y puede estar compuesto por un material de origen natural o sintético. Es preferible que el vehículo seleccionado no afecte negativamente al agente activo u otros componentes de la formulación tópica. Los ejemplos de vehículos tópicos adecuados para su uso en el presente documento incluyen agua, alcoholes y otros disolventes orgánicos no tóxicos, glicerina, aceite mineral, silicona, vaselina, lanolina, ácidos grasos, aceites vegetales, parabenos, ceras y similares. Las formulaciones pueden ser pomadas, lociones, cremas, microemulsiones y geles incoloros e inodoros.

Los oligonucleótidos antisentido de la divulgación se pueden incorporar en pomadas, que generalmente son

preparaciones semisólidas que están típicamente basadas en vaselina u otros derivados de petróleo. La base de pomada específica que se utilizará, como se apreciará por los expertos en la técnica, es aquella que proporcionará una administración óptima del fármaco y, preferiblemente, proporcionará también otras características deseadas, por ejemplo, emolencia o similares. Al igual que con otros portadores o vehículos, una base de pomada debe ser inerte, estable, no irritante y no sensibilizante. Como se explica en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co.), las bases de pomada pueden agruparse en cuatro clases: bases oleaginosas; bases emulsionables; bases de emulsión; y bases solubles en agua. Las bases de pomada oleaginosas incluyen, por ejemplo, aceites vegetales, grasas obtenidas de animales, e hidrocarburos semisólidos obtenidos a partir de petróleo. Las bases de pomada emulsionables, también conocidas como bases de pomada absorbentes, contienen poca o nada de agua e incluyen, por ejemplo, sulfato de hidroxistearina, lanolina anhidra y vaselina hidrófila. Las bases de pomada en emulsión son emulsiones de agua en aceite (W/O) o emulsiones de aceite en agua (O/W), e incluyen, por ejemplo, alcohol cetílico, monoestearato de glicerilo, lanolina y ácido esteárico. Las bases de pomada solubles en agua ejemplares se preparan a partir de polietilenglicoles (PEG) de peso molecular variable (véase, por ejemplo, Remington's, anteriormente).

Los oligonucleótidos antisentido de la divulgación se pueden incorporar en lociones, que generalmente son preparaciones para ser aplicadas a la superficie de la piel sin fricción, y son típicamente preparaciones líquidas o semilíquidas en las que las partículas sólidas, incluyendo el agente activo, están presentes en una base de agua o alcohol. Las lociones son normalmente suspensiones de sólidos, y pueden comprender una emulsión oleosa líquida del tipo aceite en agua. Las lociones son formulaciones preferidas para tratar grandes áreas corporales, debido a la facilidad de aplicación de una composición más fluida. Generalmente es necesario que la materia insoluble en una loción sea finamente dividida. Las lociones contendrán típicamente agentes de suspensión para producir mejores dispersiones, así como compuestos útiles para localizar y mantener el agente activo en contacto con la piel, por ejemplo, metilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, o similares. Una formulación de loción ejemplar para su uso junto con el presente método contiene propilenglicol mezclado con una vaselina hidrófila tal como la que se puede obtener con la marca registrada Aquaphor® de Beiersdorf, Inc. (Norwalk, Conn.).

Los oligonucleótidos antisentido de la divulgación pueden incorporarse en cremas, que generalmente son emulsiones líquidas o semisólidas viscosas, ya sea de aceite en agua o agua en aceite. Las bases de crema son lavables al agua, y contienen una fase oleosa, un emulsionante y una fase acuosa. La fase oleosa está generalmente constituida por vaselina y un alcohol graso, tal como alcohol cetílico o estearílico; la fase acuosa normalmente, aunque no necesariamente, excede la fase oleosa en volumen, y generalmente contiene un humectante. El emulsionante en una formulación en crema, como se explica en Remington, anteriormente, es generalmente un tensioactivo no iónico, aniónico, catiónico o anfótero.

Los oligonucleótidos antisentido de la divulgación pueden incorporarse en microemulsiones, que generalmente son termodinámicamente estables, dispersiones isotrópicamente transparentes de dos líquidos inmiscibles, tales como aceite y agua, estabilizados por una película interfacial de moléculas tensioactivas (Encyclopedia of Pharmaceutical Technology (Nueva York: Marcel Dekker, 1992), volumen 9). Para la preparación de microemulsiones, son necesarios un tensioactivo (emulsionante), un co-tensioactivo (co-emulsionante), una fase oleosa y una fase acuosa. Los tensioactivos adecuados incluyen cualquier tensioactivo que sea útil en la preparación de emulsiones, por ejemplo, emulsionantes que se usan típicamente en la preparación de cremas. El co-tensioactivo (o "co-emulsionante") se selecciona generalmente del grupo de derivados de poliglicerol, derivados de glicerina y alcoholes grasos. Las combinaciones emulsionante/co-emulsionante preferidas se seleccionan generalmente, aunque no necesariamente, del grupo que consiste en monoestearato de glicerilo y estearato de polioxietileno; palmitoestearato de polietilenglicol y de etilenglicol; y triglicéridos caprílicos y cápricos y macroglicéridos de oleoilo. La fase acuosa incluye no sólo agua sino también, típicamente, tampones, glucosa, propilenglicol, polietilenglicoles, preferiblemente polietilenglicoles de bajo peso molecular (por ejemplo, PEG 300 y PEG 400), y/o glicerol y similares, mientras que la fase oleosa comprenderá generalmente, por ejemplo, ésteres de ácidos grasos, aceites vegetales modificados, aceites de silicona, mezclas de mono- y triglicéridos, mono- y di-ésteres de PEG (por ejemplo, macroglicéridos de oleoilo), etc.

Los oligonucleótidos antisentido de la divulgación se pueden incorporar en formulaciones de gel, que generalmente son sistemas semisólidos que consisten en suspensiones constituidas por pequeñas partículas inorgánicas (sistemas bifásicos) o grandes moléculas orgánicas distribuidas sustancialmente uniformemente a lo largo de un líquido portador (geles monofásicos). Los geles monofásicos se pueden hacer, por ejemplo, combinando el agente activo, un líquido portador y un agente gelificante adecuado tal como tragacanto (del 2 al 5 %), alginato sódico (al 2-10 %), gelatina (al 15 %), metilcelulosa (al 3-5 %), carboximetilcelulosa sódica (al 2-5 %), carbómero (al 0,3-5 %) o alcohol polivinílico (al 10-20 %), y mezclando hasta que se produce un producto semisólido característico. Otros

agentes gelificantes adecuados incluyen metilhidroxixelulosa, polioxietileno-polioxipropileno, hidroxietilcelulosa y gelatina. Aunque los geles emplean comúnmente un líquido portador acuoso, también se pueden usar alcoholes y aceites como el líquido portador.

- 5 Se pueden incluir diversos aditivos, conocidos por los expertos en la técnica, en formulaciones, por ejemplo, formulaciones tópicas. Los ejemplos de aditivos incluyen, pero sin limitación, solubilizantes, potenciadores de permeación de la piel, opacificantes, conservantes (por ejemplo, antioxidantes), agentes gelificantes, agentes tamponantes, tensioactivos (particularmente tensioactivos no iónicos y anfóteros), emulsionantes, emolientes, humectantes, colorantes, fragancia, y similares. Se prefiere particularmente la inclusión de solubilizantes y/o
- 10 potenciadores de permeación de la piel, junto con emulsionantes, emolientes y conservantes. Una formulación tópica óptima comprende aproximadamente: del 2 % en peso al 60 % en peso, preferiblemente del 2 % en peso al 50 % en peso, de solubilizante y/o potenciador de permeación de la piel; del 2 % en peso al 50 % en peso, preferiblemente del 2 % en peso al 20 % en peso, de emulsionantes; del 2 % en peso al 20 % en peso de emoliente; y del 0,01 al 0,2 % en peso de conservante, constituyendo el agente activo y el vehículo (por ejemplo, agua) el resto de la
- 15 formulación.

- Un potenciador de permeación de la piel sirve para facilitar el paso de los niveles terapéuticos del agente activo para pasar a través de un área de tamaño razonable de la piel intacta. Los potenciadores adecuados se conocen bien en la técnica e incluyen, por ejemplo: alcanoles inferiores tales como metanol etanol y 2-propanol; alquil metil sulfóxidos
- 20 tales como dimetilsulfóxido (DMSO), decilmetilsulfóxido (C.sub.10 MSO) y tetradecilmetilsulfóxido; pirrolidonas tales como 2-pirrolidona, N-metil-2-pirrolidona y N-(-hidroxietil)pirrolidona; urea; N,N-dietil-m-toluamida; alcanodiolos C.sub.2-C.sub.6; disolventes diversos tales como dimetilformamida (DMF), N,N-dimetilacetamida (DMA) y alcohol tetrahidrofurfurílico; y las azacicloheptan-2-onas 1-sustituidas, particularmente 1-n-dodecilciclazacicloheptan-2-ona (laurocapram; disponible bajo la marca registrada Azone.sup.RTM de Whitby Research Incorporated, Richmond,
- 25 Va.).

- Los ejemplos de solubilizantes incluyen, pero sin limitación, los siguientes: éteres hidrófilos tales como éter monoetílico de dietilenglicol (etoxidiglicol, disponible en el mercado como Transcutol.sup.RTM) y oleato de dietilenglicol monoetil éter (disponible en el mercado como Soficutol.sup.RTM); derivados de aceite de ricino de
- 30 polietileno tales como aceite de ricino de polioxi 35, aceite de ricino hidrogenado de polioxi 40, etc.; polietilenglicol, particularmente polietilenglicoles de bajo peso molecular tales como PEG 300 y PEG 400, y derivados de polietilenglicol tales como glicéridos caprílicos/cápricos PEG-8 (disponible en el mercado como Labrasol.sup.RTM); alquil metil sulfóxidos, tal como DMSO; pirrolidonas, tales como 2-pirrolidona y N-metil-2-pirrolidona; y DMA. Muchos solubilizantes también pueden actuar como potenciadores de la absorción. Se puede incorporar un único
- 35 solubilizante en la formulación, o se puede incorporar en la misma una mezcla de solubilizantes.

- Los emulsionantes y co-emulsionantes adecuados incluyen, sin limitación, los emulsionantes y co-emulsionantes descritos con respecto a las formulaciones en microemulsión. Los emolientes incluyen, por ejemplo, propilenglicol, glicerol, miristato de isopropilo, polipropilenglicol-2 (PPG-2) propionato de éter de miristilo, y similares.
- 40

- Otros agentes activos también se pueden incluir en las formulaciones, por ejemplo, otros agentes antiinflamatorios, analgésicos, agentes antimicrobianos, agentes antifúngicos, antibióticos, vitaminas, antioxidantes y agentes bloqueadores del sol que se encuentran comúnmente en formulaciones de filtro solar que incluyen, pero sin limitación, antranilatos, benzofenonas (particularmente benzofenona-3), derivados de alcanfor, cinamatos (por
- 45 ejemplo, metoxicinamato de octilo), dibenzoil metanos (por ejemplo, butil metoxidibenzoilmetano), ácido p-aminobenzoico (PABA), y derivados de los mismos, y salicilatos (por ejemplo, salicilato de octilo).

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

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

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

el oligonucleótido es una molécula de ARN o de ADN antisentido.

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

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

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

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

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

En otro aspecto, los oligonucleótidos comprenden secuencias de ácidos nucleicos expuestas como SEQ ID NO: 10 a 29 que incluyen secuencias antisentido que se identifican y se expanden, usando por ejemplo, PCR, hibridación, etc. Estos oligonucleótidos pueden comprender uno o más nucleótidos modificados, fragmentos más cortos o más largos, enlaces modificados y similares. Los ejemplos de enlaces modificados o enlaces internucleotídicos comprenden fosforotioato, fosforoditioato o similares. En otro aspecto, los nucleótidos comprenden un derivado de fósforo. El derivado de fósforo (o grupo fosfato modificado) que puede unirse al resto de azúcar o de análogo de azúcar en los oligonucleótidos modificados de la presente divulgación puede ser un monofosfato, difosfato, trifosfato, alquilfosfato, alcanofosfato, fosforotioato y similares. La preparación de los análogos de fosfato que se han indicado anteriormente, y su incorporación en nucleótidos, nucleótidos modificados y oligonucleótidos, también se conoce *per se* y no necesita describirse aquí.

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

En aspectos de la presente divulgación, los compuestos antisentido oligoméricos, particularmente oligonucleótidos, se unen a moléculas de ácidos nucleicos diana y modulan la expresión y/o función de moléculas codificadas por un gen diana. Las funciones de ADN que van a interferirse comprenden, por ejemplo, replicación y transcripción. Las

funciones de ARN que van a interferirse comprenden todas las funciones vitales, tales como, por ejemplo, translocalización del ARN al sitio de traducción de proteína, traducción de proteína desde ARN, corte y empalme del ARN para producir una o más especies de ARNm, y actividad catalítica que puede acoplarse en o facilitarse por el ARN. Las funciones pueden regularse por aumento o inhibirse dependiendo de las funciones deseadas.

5

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

10

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

15

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

20

25

En un aspecto, los oligonucleótidos antisentido se unen a las secuencias antisentido naturales de un gen de colágeno y modulan la expresión y/o función de un gen de colágeno (SEQ ID NO: 1 a 3). Los ejemplos de secuencias antisentido incluyen SEQ ID NOS: 4 a 29.

30

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

35

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

40

En otro aspecto, los compuestos de oligonucleótido comprenden secuencias expuestas como SEQ ID NO: 10 a 29, secuencias antisentido que se identifican y expanden usando, por ejemplo, PCR, hibridación etc. Estos oligonucleótidos pueden comprender uno o más nucleótidos modificados, fragmentos más cortos o más largos, enlaces modificados y similares. Los ejemplos de enlaces modificados o enlaces internucleotídicos comprenden fosforotioato, fosforoditioato o similares. En otro aspecto, los nucleótidos comprenden un derivado de fósforo. El derivado de fósforo (o grupo fosfato modificado) que puede unirse al resto de azúcar o de análogo de azúcar en los oligonucleótidos modificados de la presente divulgación puede ser un monofosfato, difosfato, trifosfato, alquilfosfato, alcanofosfato, fosforotioato y similares. La preparación de los análogos de fosfato que se han indicado anteriormente, y su incorporación en nucleótidos, nucleótidos modificados y oligonucleótidos, también se conoce *per se* y no necesita describirse aquí.

45

50

Ya que, como se conoce en la técnica, el codón de inicio de la traducción normalmente es 5'-AUG (en moléculas de ARNm transcrito; 5-ATG en la molécula de ADN correspondiente), el codón de inicio de la traducción también se denomina el "codón AUG", el "codón de inicio" o el "codón de inicio AUG". Una minoría de genes tiene un codón de inicio de la traducción que tiene la secuencia de ARN 5'-GUG, 5'-UUG o 5'-CUG; y se ha mostrado que 5'-AUA, 5'-ACG y 5'-CUG funcionan *in vivo*. Por lo tanto, las expresiones "codón de inicio de la traducción" y "codón de inicio" pueden incluir muchas secuencias de codón, aun cuando el aminoácido iniciador en cada caso normalmente sea metionina (en eucariotas) o formilmetionina (en procariotas). Los genes eucariotas y procariotas pueden tener dos o más codones de inicio alternativos, uno cualquiera de los cuales puede utilizarse preferiblemente para el inicio de la traducción en un tipo particular de célula o tejido, o bajo un conjunto particular de condiciones. En el contexto de la

55

divulgación, "codón de inicio" y "codón de inicio de la traducción" se refieren al codón o codones que se usan *in vivo* para iniciar la traducción de un ARNm transcrito de un gen que codifica un gen de colágeno, independientemente de la secuencia o secuencias de tales codones. Un codón de terminación de la traducción (o "codón de terminación") de un gen puede tener una de tres secuencias, es decir, 5'-UAA, 5'-UAG y 5'-UGA (las secuencias de ADN correspondientes son 5'-TAA, 5'-TAG y 5'-TGA, respectivamente).

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

El marco de lectura abierto (ORF) o "región codificante", que se conoce en la técnica para referirse a la región entre el codón de inicio de la traducción y el codón de terminación de la traducción, también es una región que puede ser eficazmente elegida como diana. Dentro del contexto de la presente divulgación, una región elegida como diana es la región intragénica que incluye el codón de inicio o de terminación de la traducción del marco de lectura abierto (ORF) de un gen.

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

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

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

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

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

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

Tras la escisión de una o más regiones de exón o intrón, o porciones de las mismas durante el corte y empalme, las variantes de pre-ARNm producen "variantes de ARNm" más pequeñas. En consecuencia, las variantes de ARNm son variantes de pre-ARNm procesadas y cada variante de pre-ARNm única siempre debe producir una variante de ARNm única como resultado del corte y empalme. Estas variantes de ARNm también se conocen como "variantes de corte y empalme alternativas". Si no se produce corte y empalme de la variante de pre-ARNm, entonces la variante de pre-ARNm es idéntica a la variante de ARNm.

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

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

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

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

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

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

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

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

Los ARN pueden clasificarse en (1) ARN mensajeros (ARNm), que se traducen en proteínas, y (2) ARN no

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

15 Sin desear quedar ligado por la teoría, la perturbación de un polinucleótido antisentido por los oligonucleótidos antisentido descritos en el presente documento puede alterar la expresión de los ARN mensajero sentido correspondientes. Sin embargo, esta regulación puede ser discordante (la inactivación antisentido produce elevación de ARN mensajero) o concordante (la inactivación antisentido produce reducción concomitante de ARN mensajero).
 20 En estos casos, los oligonucleótidos antisentido pueden dirigirse a partes solapantes o no solapantes de la transcripción antisentido que producen su inactivación o secuestro. El antisentido codificante, así como no codificante, puede dirigirse de una manera idéntica y que cualquier categoría es capaz de regular las transcripciones sentido correspondientes - tanto de una manera concordante como discordante. Las estrategias que se emplean en identificar nuevos oligonucleótidos para su uso contra una diana pueden basarse en la inactivación de
 25 transcripciones de ARN antisentido por oligonucleótidos antisentido o cualquier otro medio de modulación de la diana deseada.

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

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

40 Según la presente divulgación, los compuestos antisentido incluyen oligonucleótidos antisentido, ribozimas, oligonucleótidos de secuencia de guía externa (EGS), compuestos de siRNA, compuestos de interferencia (iARN) de ARN mono- o bicatenario tales como compuestos de siRNA, y otros compuestos oligoméricos que hibridan con al menos una porción del ácido nucleico diana y modulan su función. Como tales, pueden ser ADN, ARN, similares a
 45 ADN, similares a ARN, o mezclas de los mismos, o pueden ser miméticos de uno o más de estos. Estos compuestos pueden ser compuestos oligoméricos monocatenarios, bicatenarios, circulares o de horquilla, y pueden contener elementos estructurales tales como protuberancias internas o terminales, desapareamientos o bucles. Los compuestos antisentido se preparan rutinariamente linealmente, pero pueden unirse o prepararse de otro modo para ser circulares y/o ramificados. Los compuestos antisentido pueden incluir construcciones tales como, por ejemplo,
 50 dos hebras hibridadas para formar un compuesto completa o parcialmente bicatenario o una única hebra con auto-complementariedad suficiente para permitir la hibridación y formación de un compuesto completa o parcialmente bicatenario. Las dos hebras pueden enlazarse internamente, dejando los extremos 3' o 5' libres, o pueden enlazarse para formar una estructura de horquilla continua o bucle. La estructura de horquilla puede contener un nucleótido protuberante en cualquiera de los extremos 5' o 3' que produce una extensión del carácter monocatenario. Los compuestos bicatenarios opcionalmente pueden incluir nucleótidos protuberantes en los extremos. Las
 55 modificaciones adicionales pueden incluir grupos conjugados unidos a uno de los extremos, posiciones de nucleótido seleccionadas, adiciones de azúcar o a uno de los enlaces internucleosídicos. Como alternativa, las dos hebras pueden enlazarse mediante un resto no de ácido nucleico o grupo conector. Cuando se forma a partir de solo una hebra, el dsARN puede tomar la forma de una molécula tipo horquilla auto-complementaria que se dobla sobre sí misma para formar un dúplex. Por lo tanto, el dsARN puede ser completa o parcialmente bicatenario. Puede lograrse

una modulación específica de la expresión génica por expresión estable de horquillas de dsARN en líneas celulares transgénicas, sin embargo, en algunos aspectos, la expresión génica o función está regulada por aumento. Cuando se forma a partir de dos hebras, o una única hebra que adopta la forma de una molécula de tipo horquilla auto-complementaria que se dobla sobre sí misma para formar un dúplex, las dos hebras (o regiones formadoras de 5 dúplex de una sola hebra) son hebras de ARN complementarias que se aparean con bases en el modo de Watson-Crick.

Una vez introducidos a un sistema, los compuestos de la divulgación pueden provocar la acción de una o más enzimas o proteínas estructurales para efectuar la escisión u otra modificación del ácido nucleico diana o pueden 10 trabajar mediante mecanismos basados en la ocupación. En general, los ácidos nucleicos (incluyendo oligonucleótidos) pueden describirse como "similares a ADN" (es decir, que generalmente tienen uno o más 2'-desoxiazúcares y, generalmente, bases T en vez de U) o "similares a ARN" (es decir, que generalmente tienen uno o más 2'-hidroxi azúcares o azúcares modificados en 2' y, generalmente bases U en vez de T). Las hélices de ácido nucleico pueden adoptar más de un tipo de estructura, más comúnmente las formas A y B. Se cree que, en general, 15 los oligonucleótidos que tienen estructura similar a la forma B son "similares a ADN" y aquellos que tienen estructura similar a la forma A son "similares a ARN". En algunos casos (quiméricos), un compuesto antisentido puede contener tanto regiones en forma A como B.

En otro aspecto, los oligonucleótidos diseñados o compuestos antisentido comprenden al menos uno de: ARN 20 antisentido, ADN antisentido, oligonucleótidos antisentido quiméricos, oligonucleótidos antisentido que comprenden enlaces modificados, ARN de interferencia (iARN), ARN interferente pequeño (siRNA); un microARN interferente (miARN); un ARN temporal pequeño (ARNtp); o un ARN de horquilla corta (ARNhc); activación génica inducida por ARN pequeño (aARN); ARN activantes pequeños (ARNap), o combinaciones de los mismos.

25 dsARN también puede activar la expresión génica, un mecanismo que se ha denominado "activación génica inducida por ARN pequeño" o aARN. Los promotores génicos que se dirigen a dsARN inducen la potente activación transcripcional de genes asociados. El aARN se demostró en células humanas usando dsARN sintéticos, llamados "ARN activantes pequeños" (ARNap).

30 Se ha descubierto que el ARN bicatenario pequeño (dsARN), tal como ARN interferente pequeño (siRNA) y microARN (miARN), es el desencadenante de un mecanismo evolutivamente conservado conocido como interferencia de ARN (iARN). La iARN conduce invariablemente al silenciamiento génico. Sin embargo, en los aspectos descritos en detalle en la sección de ejemplos a continuación, se muestra que los oligonucleótidos aumentan la expresión y/o función de los polinucleótidos de un gen de colágeno y productos codificados de los 35 mismos. Los dsARN también pueden actuar como ARN activantes pequeños (ARNap). Sin desear quedar ligado por la teoría, direccionando secuencias a promotores génicos, los ARNap inducirán la expresión de genes diana en un fenómeno denominado activación transcripcional inducida por dsARN (aARN).

En un aspecto adicional, los "segmentos diana" identificados en el presente documento pueden emplearse en un 40 cribado para compuestos adicionales que modulan la expresión de polinucleótidos de un gen de colágeno. "Moduladores" son aquellos compuestos que disminuyen o aumentan la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica un gen de colágeno y que comprenden al menos una porción de 5 nucleótidos que es complementaria a un segmento diana. El método de cribado comprende las etapas de poner en contacto un segmento diana de una molécula de ácido nucleico que codifica polinucleótidos sentido o antisentido naturales de un 45 gen de colágeno con uno o más moduladores candidatos, y seleccionar uno o más moduladores candidatos que disminuyen o aumentan la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica un polinucleótidos de un gen de colágeno, por ejemplo, SEQ ID NO: 10 a 29. Una vez se muestra que el modulador o moduladores candidatos son capaces de modular (por ejemplo, disminuir o aumentar) la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica un polinucleótido de un gen de colágeno, el modulador puede entonces emplearse en estudios de investigación 50 adicionales de la función de un polinucleótido de un gen de colágeno, o para su uso como un agente de investigación, diagnóstico o terapéutico según la presente divulgación.

El direccionamiento de la secuencia antisentido natural modula preferiblemente la función del gen diana. Por ejemplo, el gen de colágeno (por ejemplo, números de acceso NM_000088, NM_000089, NM_000094). En un 55 aspecto, la diana es un polinucleótido antisentido del gen de colágeno. En un aspecto, un oligonucleótido antisentido se dirige a secuencias sentido y/o antisentido naturales de un polinucleótido de un gen de colágeno (por ejemplo, números de acceso NM_000088, NM_000089, NM_000094), variantes, alelos, isoformas, homólogos, mutantes, derivados, fragmentos y secuencias complementarias a los mismos. Preferiblemente, el oligonucleótido es una molécula antisentido y las dianas incluyen regiones codificantes y no codificantes de polinucleótidos antisentido y/o

sentido de un gen de colágeno.

Los segmentos diana de la presente divulgación también pueden combinarse con sus compuestos antisentido complementarios respectivos de la presente divulgación para formar oligonucleótidos (duplexados) bicatenarios 5 estabilizados.

Se ha mostrado en la técnica que dichos restos de oligonucleótido bicatenario modulan la expresión de diana y regulan la traducción, así como el procesamiento de ARN mediante un mecanismo antisentido. Además, los restos bicatenarios pueden someterse a modificaciones químicas. Por ejemplo, se ha mostrado que tales restos 10 bicatenarios inhiben la diana por la hibridación clásica de la hebra antisentido del dúplex con la diana, activando de este modo la degradación enzimática de la diana.

En un aspecto, un oligonucleótido antisentido se dirige a polinucleótidos de un gen de colágeno (por ejemplo, números de acceso NM_000088, NM_000089, NM_000094), variantes, alelos, isoformas, homólogos, mutantes, 15 derivados, fragmentos y secuencias complementarias a los mismos. Preferiblemente, el oligonucleótido es una molécula antisentido.

Según aspectos de la divulgación, la molécula de ácido nucleico diana no se limita al gen de colágeno en solitario, sino que se extiende a cualquiera de las isoformas, receptores, homólogos y similares de las moléculas de un gen 20 de colágeno.

En otro aspecto, un oligonucleótido se dirige a una secuencia antisentido natural de un polinucleótido de un gen de colágeno, por ejemplo, polinucleótidos expuestos como SEQ ID NO: 4 a 9, y cualquier variante, alelo, homólogo, mutante, derivado, fragmento y secuencia complementaria a los mismos. Los ejemplos de oligonucleótidos 25 antisentido se exponen como las SEQ ID NO: 10 a 29.

En un aspecto, los oligonucleótidos son complementarios a o se unen a secuencias de ácidos nucleicos de antisentido de un gen de colágeno, incluyendo, sin limitación, secuencias sentido y/o antisentido no codificantes asociadas a un polinucleótido de un gen de colágeno, y modulan la expresión y/o función de una molécula de un gen 30 de colágeno.

En otro aspecto, los oligonucleótidos son complementarios a o se unen a secuencias de ácidos nucleicos de antisentido natural de un gen de colágeno, expuestas como SEQ ID NO: 4 a 9, y modulan la expresión y/o función de una molécula de un gen de colágeno. 35

En un aspecto, los oligonucleótidos comprenden secuencias de al menos 5 nucleótidos consecutivos de las SEQ ID NOs: 10 a 29, y modulan la expresión y/o función de una molécula de un gen de colágeno.

Las dianas de polinucleótido comprenden un gen de colágeno, incluyendo miembros de la familia del mismo, 40 variantes de un gen de colágeno; mutantes de un gen de colágeno, que incluyen SNP; secuencias no codificantes de un gen de colágeno; alelos de un gen de colágeno; variantes de especies, fragmentos y similares. Preferiblemente, el oligonucleótido es una molécula antisentido.

En otro aspecto, el oligonucleótido que se dirige a polinucleótidos de un gen de colágeno comprende: ARN 45 antisentido, ARN de interferencia (iARN), ARN interferente pequeño (siRNA); microARN interferente (miARN); un ARN temporal pequeño (ARNtp); o un ARN de horquilla corta (ARNhc); activación génica inducida por ARN pequeño (aARN); o, ARN activante pequeño (ARNap).

En otro aspecto, el direccionamiento de un polinucleótido de un gen de colágeno, por ejemplo, SEQ ID NO: 4 a 9, 50 modula la expresión o función de estas dianas. En un aspecto, la expresión o función está regulada por aumento en comparación con un control. En otro aspecto, la expresión o función se regula por disminución en comparación con un control.

En otro aspecto, los compuestos antisentido comprenden secuencias expuestas como SEQ ID NO: 10 a 29. Estos 55 oligonucleótidos pueden comprender uno o más nucleótidos modificados, fragmentos más cortos o más largos, enlaces modificados y similares.

En otro aspecto, las SEQ ID NO: 10 a 29 comprenden uno o más nucleótidos de LNA.

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

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

En general, los ácidos nucleicos enzimáticos con actividad de escisión de ARN actúan uniéndose primero a un ARN
15 diana. Tal unión se produce mediante la porción de unión de diana de un ácido nucleico enzimático que se mantiene en estrecha proximidad a una porción enzimática de la molécula que actúa para escindir el ARN diana. Por lo tanto, el ácido nucleico enzimático se reconoce primero y después se une a ARN diana mediante apareamiento de bases complementario, y una vez se une al sitio correcto, actúa enzimáticamente para cortar el ARN diana. La escisión estratégica de un ARN diana tal destruirá su capacidad para dirigir la síntesis de una proteína codificada. Después
20 de unirse un ácido nucleico enzimático y escindir su ARN diana, se libera de ese ARN para buscar otra diana y puede unirse repetidamente y escindir nuevas dianas.

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

El desarrollo de ribozimas que son óptimas para la actividad catalítica contribuirá significativamente a cualquier estrategia que emplea ribozimas que escinden ARN con el fin de regular la expresión génica. La ribozima de cabeza de martillo, por ejemplo, funciona con una velocidad catalítica (kcat) de aproximadamente 1 min⁻¹ en presencia de
30 concentraciones de saturación (10 mM) de cofactor de Mg²⁺. Se ha mostrado que una ribozima de "ARN ligasa" artificial cataliza la reacción de auto-modificación correspondiente con una velocidad de aproximadamente 100 min⁻¹. Además, se sabe que ciertas ribozimas de cabeza de martillo modificadas que tienen brazos de unión al sustrato hechos de ADN catalizan la escisión de ARN con múltiples velocidades de recuperación que se aproximan a 100 min⁻¹. Finalmente, la sustitución de un residuo específico dentro del núcleo catalítico de la cabeza de martillo con
35 ciertos análogos de nucleótido da ribozimas modificadas que muestran una mejora de tanto como 10 veces en la velocidad catalítica. Estos hallazgos demuestran que las ribozimas pueden promover transformaciones químicas con velocidades catalíticas que son significativamente superiores a las mostradas *in vitro* por la mayoría de las ribozimas que se auto-escinden naturales. Después, es posible que las estructuras de ciertas ribozimas de auto-escisión puedan optimizarse para dar la máxima actividad catalítica, o que puedan prepararse motivos de ARN
40 completamente nuevos que muestran velocidades significativamente más rápidas para la escisión de fosfodiéster de ARN.

La escisión intermolecular de un sustrato de ARN por un catalizador de ARN que se ajusta al modelo de "cabeza de martillo" se mostró por primera vez en 1987. Se recuperó el catalizador de ARN y se hizo reaccionar con múltiples
45 moléculas de ARN, demostrando que era verdaderamente catalítico.

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

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

En un aspecto preferido, un oligonucleótido o compuesto antisentido comprende un oligómero o polímero de ácido

ribonucleico (ARN) y/o ácido desoxirribonucleico (ADN), o un mimético, quimera, análogo u homólogo de los mismos. Este término incluye oligonucleótidos compuestos de nucleótidos de origen natural, azúcares y enlaces internucleósido covalentes (estructura), así como oligonucleótidos que tienen porciones que no existen de forma natural que funcionan de forma similar. Tales oligonucleótidos modificados o sustituidos son frecuentemente
5 deseados con respecto a formas nativas debido a propiedades deseables tales como, por ejemplo, captación celular mejorada, afinidad potenciada para un ácido nucleico diana y aumento de la estabilidad en presencia de nucleasas.

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

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

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

En un aspecto, los compuestos antisentido de la divulgación tienen porciones antisentido de 10 a 50 nucleótidos de longitud. Un experto en la técnica apreciará que éstos incorporan oligonucleótidos que tienen porciones antisentido de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39,

40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 nucleótidos de longitud, o cualquier intervalo entre los mismos. En algunos aspectos, los oligonucleótidos tienen 15 nucleótidos de longitud.

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

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

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

En otro aspecto, los oligonucleótidos antisentido, tales como, por ejemplo, las moléculas de ácidos nucleicos expuestas en las SEQ ID NO: 4 a 29, comprenden una o más sustituciones o modificaciones. En un aspecto, los nucleótidos están sustituidos con ácidos nucleicos bloqueados (LNA).

En otro aspecto, los oligonucleótidos se dirigen a una o más regiones de las moléculas de ácidos nucleicos sentido y/o antisentido de secuencias codificantes y/o no codificantes asociadas a un gen de colágeno y las secuencias expuestas como SEQ ID NO: 1 a 9. Los oligonucleótidos también se dirigen a regiones solapantes de las SEQ ID NOS: 1 a 9.

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

Los compuestos antisentido quiméricos de la divulgación pueden formarse como estructuras compuestas de dos o más oligonucleótidos, oligonucleótidos modificados, miméticos de oligonucleósidos y/o de oligonucleótidos, como se han descrito anteriormente. Tales compuestos también se han denominado en la técnica híbridos o gámperos. Las Patentes de Estados Unidos representativas que indican la preparación de tales estructuras híbridas comprenden, pero sin limitación, las patentes de Estados n.º 5.013.830; 5.149.797; 5.220.007; 5.256.775; 5.366.878; 5.403.711; 5.491.133; 5.565.350; 5.623.065; 5.652.355; 5.652.356; y 5.700.922.

En otro aspecto, la región del oligonucleótido que se modifica comprende al menos un nucleótido modificado en la posición 2' del azúcar, más preferiblemente un nucleótido modificado con 2'-O-alquilo, 2-O-alquil-O-alquilo o 2'-flúor. En otros aspectos, las modificaciones de ARN incluyen modificaciones de 2'-flúor, 2'-amino y 2'-O-metilo en la ribosa de pirimidinas, residuos abásicos o una base invertida en el extremo 3' del ARN. Tales modificaciones se incorporan rutinariamente en oligonucleótidos y se ha mostrado que estos oligonucleótidos tienen una mayor T_m (es decir, mayor afinidad de unión a diana) que los 2'-desoxioligonucleótidos contra una diana dada. El efecto de tal afinidad elevada es potenciar enormemente la inhibición por oligonucleótidos de iARN de la expresión génica. La RNasa H es una endonucleasa celular que escinde la hebra de ARN del dúplex de ARN:ADN; por lo tanto, la activación de esta enzima da como resultado la escisión del ARN diana, y puede mejorar en gran medida de este modo la eficiencia de inhibición de iARN. La escisión del ARN diana puede demostrarse rutinariamente por electroforesis en gel. En otro aspecto, el oligonucleótido químico también se modifica para potenciar la resistencia a nucleasas. Las células contienen una diversidad de exo- y endo-nucleasas que pueden degradar ácidos nucleicos. Se ha mostrado que varias modificaciones de nucleótidos y nucleósidos hacen que el oligonucleótido en el que se incorporan sea más resistente a la digestión por nucleasa que el oligodesoxinucleótido nativo. La resistencia a nucleasas se mide rutinariamente incubando oligonucleótidos con extractos celulares o soluciones de nucleasa aisladas y midiendo el grado de oligonucleótido intacto que queda con el tiempo, normalmente por electroforesis en gel. Los oligonucleótidos que se han modificado para potenciar su resistencia a nucleasas sobreviven intactos durante más tiempo que los oligonucleótidos sin modificar. Se ha demostrado que una diversidad de modificaciones de oligonucleótidos potencia o confiere resistencia a nucleasas. Los oligonucleótidos que contienen al menos una modificación de fosforotioato son actualmente más preferidos. En algunos aspectos, las modificaciones de oligonucleótidos que mejoran la afinidad de unión a diana son, por lo tanto, independientemente capaces de potenciar la resistencia a nucleasas. Algunas modificaciones deseables pueden encontrarse en De Mesmaeker et al. (1995) Acc. Chem. Res., 28: 366-374.

Los ejemplos específicos de algunos oligonucleótidos previstos para esta divulgación incluyen aquellos que comprenden estructuras modificadas, por ejemplo, fosforotioatos, fosfotriésteres, metilfosfonatos, enlaces entre azúcares de alquilo o cicloalquilo de cadena corta o enlaces entre azúcares heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta. La mayor parte son oligonucleótidos con estructuras de fosforotioato y aquellos con estructuras de heteroátomo, particularmente estructuras de CH₂--NHO--CH₂, CH, --N(CH₃)--O--CH₂ [conocido como una estructura de metil(metilimino) o MMI], CH₂--O--N(CH₃)--CH₂, CH₂--N(CH₃)--N(CH₃)--CH₂ y O--N(CH₃)--CH₂--CH₂, en los que la estructura de fosfodiéster nativa se representa O--P--O--CH. También se prefieren las estructuras amida desveladas por De Mesmaeker et al. (1995) Acc. Chem. Res. 28: 366-374. También se prefieren oligonucleótidos que tienen estructuras principales de morfolino (Summerton y Weller, Pat. de Estados Unidos n.º 5.034.506). En otros aspectos, tales como la estructura de ácido nucleico peptídico (PNA), la estructura de fosfodiéster del oligonucleótido se sustituye por una estructura de poliamida, estando los nucleótidos unidos directa o indirectamente a los átomos de nitrógeno azo de la estructura poliamida. Los oligonucleótidos también pueden comprender uno o más restos de azúcar sustituidos. Los oligonucleótidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': OH, SH, SCH₃, F, OCN, OCH₃ OCH₃, OCH₃ O(CH₂)_n CH₃, O(CH₂)_n NH₂ u O(CH₂)_n CH₃, donde n es de 1 a aproximadamente 10; alquilo C1 a C10 inferior, alcohalcoxi, alquilo, alcarilo o aralquilo inferior sustituido; Cl; Br; CN; CF₃; OCF₃; O--, S--, o N-alquilo; O--, S--, o N-alqueno; SOCH₃; SO₂ CH₃; ONO₂; NO₂; N₃; NH₂; heterocicloalquilo; heterocicloalcarilo; aminoalquilamino; polialquilamino; sililo sustituido; un grupo de escisión de ARN; un grupo indicador; un intercalador; un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido; o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un oligonucleótido y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. Una modificación preferida incluye 2'-metoxietoxi [2'-O-CH₂ CH₂ OCH₃, también conocido como 2'-O-(2-metoxietilo)]. Otras modificaciones preferidas incluyen 2'-metoxi (2'-O-CH₃), 2'-propoxi (2'-OCH₂ CH₂CH₃) y 2'-fluoro (2'-F). También pueden hacerse modificaciones similares en otras posiciones sobre el oligonucleótido, particularmente la posición 3' del azúcar en el nucleótido del extremo 3' y la posición 5' del nucleótido del extremo 5'. Los oligonucleótidos también pueden tener miméticos de azúcar tales como ciclobutilos en lugar del grupo pentofuranosilo.

Los oligonucleótidos también pueden incluir, adicionalmente o como alternativa, modificaciones o sustituciones de nucleobases (frecuentemente denominadas en la técnica simplemente "base"). Como se usa en el presente documento, nucleótidos "no modificados" o "naturales" incluyen adenina (A), guanina (G), timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Los nucleótidos modificados incluyen nucleótidos encontrados únicamente poco frecuentemente o transitoriamente en ácidos nucleicos naturales, por ejemplo, hipoxantina, 6-metiladenina, 5-Me-pirimidinas, particularmente 5-metilcitosina (también denominada 5-metil-2'-desoxicitosina y frecuentemente denominada en la técnica 5-Me-C), 5-hidroxi-metilcitosina (HMC), glicosil HMC y gentobiosil HMC, así como nucleótidos sintéticos, por ejemplo, 2-aminoadenina, 2-(metilamino)adenina, 2-(imidazolilalquil)adenina, 2-(aminoalquilamino)adenina u otras

alquiladeninas heterosustituidas, 2-tiouracilo, 2-tiotimina, 5-bromouracilo, 5-hidroximetiluracilo, 8-azaguanina, 7-deazaguanina, N6(6-aminohexil)adenina y 2,6-diaminopurina. Puede incluirse una base "universal" conocida en la técnica, por ejemplo, inosina. Se ha mostrado que las sustituciones de 5-Me-C aumentan la estabilidad del dúplex de ácido nucleico en 0,6-1,2 °C (Sanghvi, Y. S., en Crooke, S. T. y Lebleu, B., eds, Antisense Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, págs. 276-278) y son en el presente sustituciones de base.

Otra modificación de los oligonucleótidos de la divulgación implica enlazar químicamente al oligonucleótido uno o más restos o conjugados que potencian la actividad o captación celular del oligonucleótido. Tales restos incluyen, pero sin limitación, restos de lípido tales como un resto de colesterol, un resto colesteroilo, un tioéter, por ejemplo, hexil-S-tritilitiol, un tiocolesterol, una cadena alifática, por ejemplo, residuos de dodecanodiol o de undecilo, un fosfolípido, por ejemplo, di-hexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-FI-fosfonato de trietilamonio, una poliamina o una cadena de polietilenglicol, o ácido adamantanoacético. Los oligonucleótidos que comprenden restos lipófilos, y métodos para preparar tales oligonucleótidos, se conocen en la técnica, por ejemplo, las Pat. de Estados Unidos n.º 5.138.045, 5.218.105 y 5.459.255.

No es necesario que todas las posiciones en un oligonucleótido dado estén uniformemente modificadas, y de hecho más de una de las modificaciones anteriormente mencionadas puede incorporarse en un único oligonucleótido o incluso dentro de un único nucleósido dentro de un oligonucleótido. La presente divulgación también incluye oligonucleótidos que son oligonucleótidos quiméricos como se ha definido anteriormente en el presente documento.

En otro aspecto, la molécula de ácido nucleico de la presente divulgación está conjugada con otro resto que incluye, pero sin limitación, nucleótidos abásicos, poliéter, poliamina, poliamidas, péptidos, hidratos de carbono, lípido, o compuestos de polihidrocarburo. Los expertos en la técnica reconocerán que estas moléculas pueden enlazarse a uno o más de cualquiera de los nucleótidos que comprenden la molécula de ácido nucleico en varias posiciones en el azúcar, base o grupo fosfato.

Los oligonucleótidos usados según la presente divulgación pueden prepararse convenientemente y rutinariamente mediante la técnica ya conocida de síntesis en fase sólida. El equipo para tales síntesis se vende por varios proveedores, incluyendo Applied Biosystems. También puede emplearse cualquier otro medio para tal síntesis: la síntesis real de los oligonucleótidos está perfectamente dentro de las aptitudes de un experto en la técnica. También se conocen bien usar técnicas similares para preparar otros oligonucleótidos tales como los fosforotioatos y derivados alquilados. También se conoce bien usar técnicas similares y amiditos modificados disponibles en el mercado y productos de vidrio de poro controlado (CPG) tales como biotina, fluoresceína, acridina o amiditos modificados con psoraleno y/o CPG (disponible en Glen Research, Sterling VA) para sintetizar oligonucleótidos fluorescentemente marcados, biotinilados u otros oligonucleótidos modificados, tales como oligonucleótidos modificados con colesterol.

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

Las estructuras de oligonucleótidos modificados comprenden, pero sin limitación, fosforotioatos, fosforotioatos quirales, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, metilo y otros alquil fosfonatos que comprenden 3'-alquilenfosfonatos y fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidatos que comprenden 3'-amino fosforamidato y aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionoalquilfosfonatos, tionoalquilfosfotriésteres y boranofosfonatos que tienen enlaces 3'-5' normales, análogos enlazados en 2'-5' de estos, y aquellos que tienen polaridad invertida donde los pares adyacentes de unidades de nucleósidos están enlazados 3'-5' a 5'-3' o 2'-5' a 5'-2'. También se incluyen diversas sales, sales mixtas y formas de ácido libre.

Las patentes de Estados Unidos representativas que muestran la preparación de los enlaces que contienen fósforo anteriores comprenden, pero sin limitación, las patentes de Estados Unidos n.º 3.687.808; 4.469.863; 4.476.301; 5.023.243; 5.177.196; 5.188.897; 5.264.423; 5.276.019; 5.278.302; 5.286.717; 5.321.131; 5.399.676; 5.405.939; 5.453.496; 5.455.233; 5.466.677; 5.476.925; 5.519.126; 5.536.821; 5.541.306; 5.550.111; 5.563.253; 5.571.799;

5.587.361; y 5.625.050.

Las estructuras de oligonucleótido modificadas que no incluyen un átomo de fósforo en las mismas tienen estructuras que se forman por enlaces internucleósido de alquilo o cicloalquilo de cadena corta, enlaces internucleósidos de heteroátomo y alquilo o cicloalquilo mixtos, o uno o más enlaces internucleósidos heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta. Estos comprenden aquellos que tienen enlaces morfolino (formados en parte a partir de la porción de azúcar de un nucleósido); estructuras de siloxano; estructuras de sulfuro, sulfóxido y sulfona; estructuras de formaceto y tioformaceto; estructuras de metilenoformaceto y tioformaceto; estructuras que contienen alqueno; estructuras de sulfamato; estructuras de metilenoimino y metilenohidrazino; estructuras de sulfonato y sulfonamida; estructuras de amida; y otras que tienen partes de componentes de N, O, S y CH₂ mixtos.

Las patentes de Estados Unidos representativas que muestran la preparación de los oligonucleósidos anteriores comprenden, pero sin limitación, las patentes de Estados Unidos n.º 5.034.506; 5.166.315; 5.185.444; 5.214.134; 5.216.141; 5.235.033; 5.264.562; 5.264.564; 5.405.938; 5.434.257; 5.466.677; 5.470.967; 5.489.677; 5.541.307; 5.561.225; 5.596.086; 5.602.240; 5.610.289; 5.602.240; 5.608.046; 5.610.289; 5.618.704; 5.623.070; 5.663.312; 5.633.360; 5.677.437; y 5.677.439.

En otros miméticos de oligonucleótidos, tanto el azúcar como el enlace internucleósido, es decir, la estructura, de las unidades de nucleótido se sustituyen por grupos novedosos. Las unidades de base se mantienen para la hibridación con un compuesto de ácido nucleico diana apropiado. Tal compuesto oligomérico, un oligonucleótido mimético que se ha mostrado que tiene excelentes propiedades de hibridación, se denomina un ácido nucleico peptídico (PNA). En compuestos de PNA, la estructura de azúcar de un oligonucleótido se reemplaza por una estructura que contiene amida, en particular una estructura de aminoetilglicina. Las nucleobases son retenidas y se unen directa o indirectamente a átomos de nitrógeno azo de la porción de amida de la estructura. Las patentes de Estados Unidos representativas que muestran la preparación de compuestos de PNA comprenden, pero sin limitación, las patentes de Estados Unidos n.º 5.539.082; 5.714.331; y 5.719.262.

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

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

Los oligonucleótidos modificados también pueden contener uno o más restos de azúcar sustituidos. Los oligonucleótidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': OH; F; O-, S- o N-alquilo; O-, S-, o N-alqueno; O-, S- o N-alquino; o O-alquil-O-alquilo, donde el alquilo, alqueno y alquino pueden ser alquilo de C a CO sustituido o sin sustituir o alqueno y alquino de C₂ a CO. Particularmente se prefieren O(CH₂)_nOmCH₃, O(CH₂)_n, OCH₃, O(CH₂)_nNH₂, O(CH₂)_nCH₃, O(CH₂)_nONH₂ y O(CH₂)_nON(CH₂)_nCH₃)₂ donde n y m pueden ser de 1 a aproximadamente 10. Otros oligonucleótidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': de C a CO (alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, alcarilo, aralquilo, O-alcarilo o O-aralquilo, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, polialquilamino, sililo sustituido, un grupo de escisión de ARN, un grupo indicador, un intercalador, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido, o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un oligonucleótido, y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. Una modificación comprende 2'-metoxietoxi (2'-O-CH₂CH₂OCH₃, también conocido como 2'-O-(2'-metoxietilo) o 2'-MOE), es decir, un grupo alcóxialcoxi. Una modificación adicional comprende 2'-dimetilaminoetoxietoxi, es decir, un grupo O(CH₂)₂ON(CH₃)₂, también conocido como 2'-DMAOE, como se describe en los ejemplos en el presente documento a continuación, y 2'-dimetilaminoetoxietoxi (también conocido en la técnica como 2'-O-dimetilaminoetoxietilo o 2'-DMAEOE), es decir, 2'-O-CH₂-O-CH₂-N(CH₂)₂.

Otras modificaciones comprenden 2'-metoxi (2'-OCH₃), 2'-aminopropoxi (2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂) y 2'-flúor (2'-F). También pueden hacerse modificaciones similares en otras posiciones en el oligonucleótido, particularmente la posición 3' del azúcar en el nucleótido del extremo 3' o en oligonucleótidos enlazados 2'-5' y la posición 5' del

nucleótido del extremo 5'. Los oligonucleótidos también pueden tener miméticos de azúcar tales como restos ciclobutilo en lugar del pentofuranosil azúcar. Las patentes de Estados Unidos representativas que muestran la preparación de tales estructuras de azúcar modificadas comprenden, pero sin limitación, las patentes de Estados Unidos n.º 4.981.957; 5.118.800; 5.319.080; 5.359.044; 5.393.878; 5.446.137; 5.466.786; 5.514.785; 5.519.134; 5.567.811; 5.576.427; 5.591.722; 5.597.909; 5.610.300; 5.627.053; 5.639.873; 5.646.265; 5.658.873; 5.670.633; y 5.700.920.

Los oligonucleótidos también pueden comprender modificaciones o sustituciones de nucleobases (frecuentemente denominadas en la técnica simplemente "base"). Como se usa en el presente documento, nucleótidos "no modificados" o "naturales" comprenden las bases de purina adenina (A) y guanina (G), y las bases de pirimidina timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Los nucleótidos modificados comprenden otros nucleótidos sintéticos y naturales tales como 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroxietilcitosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, derivados de 6-metilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, derivados de 2-propilo y otros de alquilo de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracilo y citosina, 5-propiniluracilo y citosina, 6-azouracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudo-uracilo), 4-tiouracilo, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo y otras adeninas y guaninas sustituidas en 8, 5-halo, particularmente 5-bromo, 5-trifluorometilo y otros uracilos y citosinas sustituidos en 5, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-deazaguanina y 7-deazaadenina y 3-deazaguanina y 3-deazaadenina.

Además, los nucleótidos comprenden los desvelados en la patente de Estados Unidos n.º 3.687.808, los desvelados en "The Concise Encyclopedia of Polymer Science And Engineering", páginas 858-859, Kroschwitz, J.L., ed. John Wiley & Sons, 1990, los desvelados por Englisch et al., "Angewandte Chemie, International Edition", 1991, 30, página 613, y los desvelados por Sanghvi, Y.S., Capítulo 15, "Antisense Research and Applications", páginas 289-302, Crooke, S.T. y Lebleu, B. ca., CRC Press, 1993. Algunos de estos nucleótidos son particularmente útiles para aumentar la afinidad de unión de los compuestos oligoméricos de la divulgación. Estos comprenden pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y purinas sustituidas en N-2, N-6 y O-6, que comprenden 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. Se ha mostrado que las sustituciones de 5-metilcitosina aumentan la estabilidad del dúplex de ácido nucleico en 0,6-1,2 °C (Sanghvi, Y.S., Crooke, S.T. y Lebleu, B., eds, "Antisense Research and Applications", CRC Press, Boca Raton, 1993, págs. 276-278) y son en el presente sustituciones de base, incluso más particularmente cuando se combinan con modificaciones de 2'-O-metoxietil azúcar.

Las patentes de Estados Unidos representativas que muestran la preparación de los nucleótidos modificados que se han indicado anteriormente, así como otros nucleótidos modificados, comprenden, pero sin limitación, las patentes de Estados Unidos n.º 3.687.808, así como 4.845.205; 5.130.302; 5.134.066; 5.175.273; 5.367.066; 5.432.272; 5.457.187; 5.459.255; 5.484.908; 5.502.177; 5.525.711; 5.552.540; 5.587.469; 5.596.091; 5.614.617; 5.750.692, y 5.681.941.

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

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

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

Descubrimiento de fármacos: Los compuestos de la presente divulgación también pueden aplicarse en las áreas del descubrimiento de fármacos y validación de dianas. La presente divulgación comprende el uso de los compuestos y segmentos diana identificados en el presente documento en los esfuerzos del descubrimiento de fármacos para esclarecer relaciones que existen entre un polinucleótido de un gen de colágeno y una patología, fenotipo o

afección. Estos métodos incluyen detectar o modular un polinucleótido de un gen de colágeno que comprende poner en contacto una muestra, tejido, célula u organismo con los compuestos de la presente divulgación, medir el nivel de ácido nucleico o de proteína de un polinucleótido de un gen de colágeno y/o un criterio de valoración fenotípico o químico relacionado en algún momento después del tratamiento, y opcionalmente comparar el valor medido con una muestra no tratada o muestra tratada con un compuesto adicional de la divulgación. Estos métodos también pueden realizarse en paralelo o en combinación con otros experimentos para determinar la función de genes desconocidos para el proceso de validación de dianas o para determinar la validez de un producto génico particular como diana para el tratamiento o prevención de una enfermedad, afección o fenotipo particular.

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

La transferencia de un ácido nucleico exógeno en una célula huésped u organismo puede evaluarse detectando directamente la presencia del ácido nucleico en la célula u organismo. Tal detección puede lograrse por varios métodos muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, la presencia del ácido nucleico exógeno puede detectarse por Southern blot o por una técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando cebadores que amplifican específicamente secuencias de nucleótidos asociadas al ácido nucleico. La expresión de los ácidos nucleicos exógenos también puede medirse usando métodos convencionales que incluyen análisis de expresión génica. Por ejemplo, el ARNm producido a partir de un ácido nucleico exógeno puede detectarse y cuantificarse usando una Northern blot y PCR con transcripción inversa (RT-PCR).

La expresión de ARN del ácido nucleico exógeno también puede detectarse midiendo una actividad enzimática o una actividad de proteína indicadora. Por ejemplo, puede medirse la actividad moduladora antisentido indirectamente como una disminución o aumento en la expresión de ácido nucleico diana como una indicación de que el ácido nucleico exógeno está produciendo el ARN efector. Basándose en la conservación de secuencias, pueden diseñarse cebadores y usarse para amplificar regiones codificantes de los genes diana. Inicialmente, la región codificante más altamente expresada de cada gen puede usarse para construir un gen de control modelo, aunque puede usarse cualquier región codificante o no codificante. Cada gen de control se ensambla insertando cada región codificante entre una región codificante indicadora y su señal de poli(A). Estos plásmidos producirán un ARNm con un gen indicador en la porción aguas arriba del gen y una posible diana de iARN en la región no codificante 3'. La eficacia de los oligonucleótidos antisentido individuales se ensayará por modulación del gen indicador. Los genes indicadores útiles en los métodos de la presente divulgación incluyen acetohidroxiácido sintasa (AHAS), fosfatasa alcalina (AP), beta-galactosidasa (LacZ), beta-glucuronidasa (GUS), cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), proteína verde fluorescente (GFP), proteína roja fluorescente (RFP), proteína amarilla fluorescente (YFP), proteína cian fluorescente (CFP), peroxidasa de rábano picante (HRP), luciferasa (Luc), nopalina sintasa (NOS), octopina sintasa (OCS), y derivados de los mismos. Están disponibles múltiples marcadores de selección que confieren resistencia a ampicilina, bleomicina, cloranfenicol, gentamicina, higromicina, kanamicina, lincomicina, metotrexato, fosfotricina, puromicina y tetraciclina. Los métodos de determinación de la modulación de un gen indicador se conocen bien en la técnica, e incluyen, pero sin limitación, métodos fluorimétricos (por ejemplo, espectroscopia de fluorescencia, clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), microscopía de fluorescencia), determinación de la resistencia a antibióticos.

La expresión de las proteínas COL1A1, COL1A2, COL7A1 y ARNm puede ensayarse usando métodos conocidos por los expertos en la técnica y descritos en cualquier parte en el presente documento. Por ejemplo, pueden usarse inmunoensayos tales como ELISA para medir niveles de proteína. Los anticuerpos de un gen de colágeno para ELISA están disponibles en el mercado, por ejemplo, en R&D Systems (Mineápolis, MN), Abcam, Cambridge, MA.

En aspectos, la expresión de COL1A1, COL1A2, COL7A1 (por ejemplo, ARNm o proteína) en una muestra (por ejemplo, células o tejidos *in vivo* o *in vitro*) tratada usando un oligonucleótido antisentido de la divulgación se evalúa comparando con la expresión de un gen de colágeno en una muestra de control. Por ejemplo, la expresión de la proteína o ácido nucleico puede compararse usando métodos conocidos por los expertos en la técnica con aquella en una muestra tratada con vector vacío o sin tratar. Como alternativa, la comparación con una muestra tratada con un oligonucleótido antisentido de control (por ejemplo, una que tiene una secuencia alterada o diferente) puede hacerse dependiendo de la información deseada. En otro aspecto, una diferencia en la expresión de la proteína o ácido nucleico de un gen de colágeno en una muestra tratada frente a una muestra sin tratar puede compararse con la diferencia en la expresión de un ácido nucleico diferente (incluyendo cualquier estándar considerado apropiado por el investigador, por ejemplo, un gen de mantenimiento) en una muestra tratada frente a una muestra sin tratar.

Las diferencias observadas pueden expresarse según se desee, por ejemplo, en forma de una relación o fracción, para su uso en una comparación con control. En aspectos, el nivel de ARNm de un gen de colágeno o proteína, en

una muestra tratada con un oligonucleótido antisentido de la presente divulgación, disminuye o aumenta aproximadamente 1,25 veces a aproximadamente 10 veces o más con respecto a una muestra sin tratar o una muestra tratada con un ácido nucleico de control. En aspectos, el nivel de ARNm de un gen de colágeno o proteína aumenta o disminuye al menos aproximadamente 1,25 veces, al menos aproximadamente 1,3 veces, al menos 5 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 10 aproximadamente 7 veces, al menos aproximadamente 7,5 veces, al menos aproximadamente 8 veces, al menos aproximadamente 8,5 veces, al menos aproximadamente 9 veces, al menos aproximadamente 9,5 veces, o al menos aproximadamente 10 veces o más.

Kits, reactivos de investigación, productos de diagnóstico y productos terapéuticos

15 Los compuestos de la presente divulgación pueden utilizarse para diagnóstico, agentes terapéuticos y profilaxis, y como reactivos de investigación y componentes de kits. Además, los oligonucleótidos antisentido, que son capaces de inhibir la expresión génica con exquisita especificidad, se usan frecuentemente por los expertos para aclarar la función de genes particulares o para distinguir entre funciones de diversos miembros de una vía biológica.

20 Para su uso en kits y productos de diagnóstico y en diversos sistemas biológicos, los compuestos de la presente divulgación, tanto en solitario como en combinación con otros compuestos o productos terapéuticos, son útiles como herramientas en análisis diferenciales y/o combinatorios para aclarar patrones de expresión de una porción o del complemento entero de genes expresados dentro de células y tejidos.

25 Como se usa en el presente documento, la expresión "sistema biológico" o "sistema" se define como cualquier organismo, célula, cultivo celular o tejido que expresa, o se ha hecho competente para expresar productos de genes de colágeno. Estos incluyen, pero sin limitación, seres humanos, animales transgénicos, células, cultivos celulares, tejidos, xenoinjertos, trasplantes y combinaciones de los mismos.

30 Como un ejemplo no limitante, los patrones de expresión dentro de células o tejidos tratados con uno o más compuestos antisentido se comparan con células o tejidos de control no tratados con compuestos antisentido y los patrones producidos se analizan para niveles diferenciales de expresión génica ya que están relacionados, por ejemplo, con asociación de enfermedad, vía de señalización, localización celular, nivel de expresión, tamaño, estructura o función de los genes examinados. Estos análisis pueden realizarse en células estimuladas o sin 35 estimular y en presencia o ausencia de otros compuestos que afectan los patrones de expresión.

Los ejemplos de métodos de análisis de la expresión génica conocidos en la técnica incluyen matrices o micromatrices de ADN (Brazma y Vilo, (2000) FEBS Lett., 480, 17-24; Celis, et al., (2000) FEBS Lett., 480, 2-16), 40 SAGE (análisis en serie de la expresión génica) (Madden, et al., (2000) Drug Discov. Today, 5, 415- 425), READS (amplificación por enzima de restricción de ADNc digeridos) (Prashar y Weissman, (1999) Methods Enzymol., 303, 258-72), TOGA (análisis de la expresión génica total) (Sutcliffe, et al., (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 97, 1976-81), matrices de proteínas y proteómica (Celis, et al., (2000) FEBS Lett., 480, 2-16; Jungblut, et al., Electrophoresis, 1999, 2100-10), secuenciación de etiquetas de secuencia expresada (EST) (Celis, et al., FEBS Lett., 2000, 480, 2-45 16; Larsson, et al., J. Biotechnol., 2000, 80, 143-57), huellas genómicas de ARN sustractivas (SuRF) (Fuchs, et al., (2000) Anal. Biochem. 286, 91-98; Larson, et al., (2000) Cytometry 41, 203-208), clonación sustractiva, expresión diferencial (DD) (Jurecic y Belmont, (2000) Curr. Opin. Microbiol. 3, 316-21), hibridación genómica comparativa (Carulli, et al., (1998) J. Cell Biochem. Suppl., 31, 286-96), técnicas de FISH (hibridación *in situ* fluorescente) (Going y Gusterson, (1999) Eur. J. Cancer, 35, 1895-904) y métodos de espectrometría de masas (To, Comb. (2000) Chem. 50 High Throughput Screen, 3, 235-41).

Los compuestos de la divulgación son útiles para investigación y diagnóstico, debido a que estos compuestos hibridan con ácidos nucleicos que codifican un gen de colágeno. Por ejemplo, los oligonucleótidos que hibridan con tal eficiencia y bajo tales condiciones que se han desvelado en el presente documento por ser moduladores de un 55 gen de colágeno eficaces son cebadores o sondas eficaces en condiciones que favorecen la amplificación génica o detección, respectivamente. Estos cebadores y sondas son útiles en métodos que requieren la detección específica de moléculas de ácidos nucleicos que codifican un gen de colágeno y en la amplificación de dichas moléculas de ácidos nucleicos para la detección o para su uso en estudios adicionales de un gen de colágeno. La hibridación de los oligonucleótidos antisentido, particularmente los cebadores y sondas, de la divulgación con un ácido nucleico que

codifica un gen de colágeno puede detectarse por medios conocidos en la técnica. Tales medios pueden incluir conjugación de una enzima con el oligonucleótido, radiomarcado del oligonucleótido, o cualquier otro medio de detección adecuado. También pueden prepararse kits que usan tales medios de detección para detectar el nivel de un gen de colágeno en una muestra.

5

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

Para productos terapéuticos, un animal, preferiblemente un ser humano, que se sospecha que tiene una enfermedad o trastorno que puede tratarse modulando la expresión de un polinucleótido de un gen de colágeno se trata administrando compuestos antisentido de acuerdo con esta divulgación. Por ejemplo, en un aspecto no limitante, los métodos comprenden la etapa de administrar al animal que necesita el tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz del modulador de un gen de colágeno. Los moduladores de un gen de colágeno de la presente divulgación modulan eficazmente la actividad de un gen de colágeno, o modulan la expresión de una proteína de un gen de colágeno. En un aspecto, la actividad o expresión de un gen de colágeno en un animal se inhibe en aproximadamente el 10 % en comparación con un control. Preferiblemente, la actividad o expresión de un gen de colágeno en un animal se inhibe en aproximadamente el 30 %. Más preferiblemente, la actividad o expresión de un gen de colágeno en un animal se inhibe al 50 % o más. Por lo tanto, los compuestos oligoméricos modulan la expresión del ARNm de un gen de colágeno en al menos el 10 %, al menos el 50 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o el 100 % en comparación con un control.

En un aspecto, la actividad o expresión de un gen de colágeno y/o en un animal se eleva aproximadamente en un 10 % en comparación con un control. Preferiblemente, la actividad o expresión de un gen de colágeno en un animal se eleva en aproximadamente el 30 %. Más preferiblemente, la actividad o expresión de un gen de colágeno en un animal se eleva al 50 % o más. Por lo tanto, los compuestos oligoméricos modulan la expresión del ARNm de un gen de colágeno en al menos el 10 %, al menos el 50 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o el 100 % en comparación con un control.

Por ejemplo, la reducción de la expresión de un gen de colágeno puede medirse en suero, sangre, tejido adiposo, hígado o cualquier otro fluido corporal, tejido u órgano del animal. Preferiblemente, las células contenidas dentro de dichos fluidos, tejidos u órganos que se analizan contienen una molécula de ácido nucleico que codifica péptidos de un gen de colágeno y/o la propia proteína de un gen de colágeno.

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

45

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

50

55

- conjugados incluyen, pero sin limitación, restos de lípidos tales como un resto colesterol, ácido cólico, un tioéter, por ejemplo, hexil-5-tritilol, un tiocolesterol, una cadena alifática, por ejemplo, residuos de dodecanodiol o undecilo, un fosfolípido, por ejemplo, di-hexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicerol-3-H-fosfonato de trietilamonio, una poliamina o una cadena de polietilenglicol, o ácido adamantanoacético, un resto palmitilo, o un resto octadecilamina
- 5 o hexilamino-carbonil-oxicolesterol. Los oligonucleótidos de la divulgación también pueden conjugarse con principios activos, por ejemplo, aspirina, warfarina, fenilbutazona, ibuprofeno, suprofen, fenbufeno, ketoprofeno, (S)-(+)-pranoprofeno, carprofeno, dansilarsosina, ácido 2,3,5-triyodobenzoico, ácido flufenámico, ácido folínico, una benzotiadiazida, clorotiazida, una diazepina, indometacina, un barbitúrico, una cefalosporina, un fármaco sulfa, un antidiabético, un antibacteriano o un antibiótico.
- 10 Las patentes de Estados Unidos representativas que muestran la preparación de tales conjugados de oligonucleótidos incluyen, pero sin limitación, las Pat. de Estados Unidos n.º 4.828.979; 4.948.882; 5.218.105; 5.525.465; 5.541.313; 5.545.730; 5.552.538; 5.578.717; 5.580.731; 5.580.731; 5.591.584; 5.109.124; 5.118.802; 5.138.045; 5.414.077; 5.486.603; 5.512.439; 5.578.718; 5.608.046; 4.587.044; 4.605.735; 4.667.025; 4.762.779;
- 15 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.
- 20 *Formulaciones:* Los compuestos de la divulgación también pueden mezclarse, encapsularse, conjugarse o asociarse de otro modo a otras moléculas, estructuras de molécula o mezclas de compuestos, como, por ejemplo, liposomas, moléculas dirigidas a receptor, formulaciones orales, rectales, tópica u otras, para ayudar en la captación, distribución y/o absorción. Las patentes de Estados Unidos representativas que muestran la preparación de tales formulaciones que facilitan la captación, distribución y/o absorción incluyen, pero sin limitación, las Pat. de Estados
- 25 Unidos n.º 5.108.921; 5.354.844; 5.416.016; 5.459.127; 5.521.291; 5.543.165; 5.547.932; 5.583.020; 5.591.721; 4.426.330; 4.534.899; 5.013.556; 5.108.921; 5.213.804; 5.227.170; 5.264.221; 5.356.633; 5.395.619; 5.416.016; 5.417.978; 5.462.854; 5.469.854; 5.512.295; 5.527.528; 5.534.259; 5.543.152; 5.556.948; 5.580.575; y 5.595.756.
- Aunque los oligonucleótidos antisentido no necesitan administrarse en el contexto de un vector con el fin de modular
- 30 una expresión y/o función de diana, los aspectos de la divulgación se refieren a construcciones de vector de expresión para la expresión de oligonucleótidos antisentido, que comprende promotores, secuencias de genes promotores híbridos y poseen una fuerte actividad constitutiva promotora, o una actividad de promotor que puede inducirse en el caso deseado.
- 35 En un aspecto, la práctica de la divulgación implica administrar al menos uno de los oligonucleótidos antisentido anteriores con un sistema de administración de ácidos nucleicos adecuado. En un aspecto, ese sistema incluye un vector no viral operativamente ligado al polinucleótido. Los ejemplos de tales vectores no virales incluyen el oligonucleótido en solitario (por ejemplo, una cualquiera o más de SEQ ID NO: 10 a 29) o en combinación con una formulación de proteína, polisacárido o lípido adecuada.
- 40 Los sistemas de administración de ácidos nucleicos adecuados adicionales incluyen vector viral, normalmente una secuencia de al menos uno de un adenovirus, virus asociado a adenovirus (AAV), adenovirus dependiente de cooperador, retrovirus, o complejo de virus hemaglutinante de liposoma de Japón (HVJ). Preferiblemente, el vector viral comprende un promotor de eucariota fuerte operativamente enlazado al polinucleótido, por ejemplo, un
- 45 promotor de citomegalovirus (CMV).
- Los vectores preferidos adicionales incluyen vectores virales, proteínas de fusión y conjugados químicos. Los vectores retrovirales incluyen virus de la leucemia murina de Moloney y virus basados en el VIH. Un vector viral basado en el VIH preferido comprende al menos dos vectores donde los genes gag y pol son de un genoma del VIH
- 50 y el gen env es de otro virus. Se prefieren vectores virales de ADN. Estos vectores incluyen vectores de pox tales como vectores de ortopox o avipox, vectores del virus del herpes tales como un vector del virus del herpes simple I (HSV), vectores de adenovirus y vectores de virus adeno-asociados.
- Los compuestos antisentido de la divulgación incluyen cualquier sal farmacéuticamente aceptable, éster o sal de
- 55 tales ésteres, o cualquier otro compuesto que, tras la administración a un animal, incluyendo un ser humano, es capaz de proporcionar (directa o indirectamente) el metabolito biológicamente activo o residuo del mismo.
- La expresión "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales fisiológicamente y farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la divulgación: es decir, sales que conservan la actividad biológica deseada del

compuesto precursor y no confieren efectos toxicológicos no deseados al mismo. Para los oligonucleótidos, los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables y sus usos se describen adicionalmente en la Pat. de Estados Unidos n.º 6.287.860.

5 La presente divulgación también incluye composiciones farmacéuticas y formulaciones que incluyen los compuestos antisentido de la divulgación. Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación pueden administrarse en varias formas que dependen de si se desea tratamiento local o sistémico y del área que va a tratarse. La administración puede ser tópica (incluyendo oftálmica y a membranas mucosas que incluyen administración vaginal y rectal), pulmonar, por ejemplo, por inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, incluyendo por nebulizador; 10 intratraqueal, intranasal, epidérmica y transdérmica), oral o parenteral. La administración parenteral incluye inyección o infusión intravenosa, intrarterial, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular; o administración intracraneal, por ejemplo, intratecal o intraventricular.

Para tratar tejidos en el sistema nervioso central, la administración puede hacerse por, por ejemplo, inyección o 15 infusión en el líquido cefalorraquídeo. La administración de ARN antisentido en líquido cefalorraquídeo se describe, por ejemplo, en la Pub. de Sol. de Pat. de Estados Unidos n.º 2007/0117772, "Methods for slowing familial ALS disease progression".

Si se pretende que el oligonucleótido antisentido de la presente divulgación se administre a células en el sistema 20 nervioso central, la administración puede ser con uno o más agentes capaces de promover la penetración del oligonucleótido antisentido objeto a través de la barrera hematoencefálica. La inyección puede hacerse, por ejemplo, en la corteza entorrinal o el hipocampo. La administración de factores neurotróficos por administración de un vector de adenovirus a neuronas motoras en tejido muscular se describe, por ejemplo, en la Pat. de Estados Unidos n.º 6.632.427, "Adenoviral-vector-mediated gene transfer into medullary motor neurons". La administración de vectores 25 directamente al cerebro, por ejemplo, el estriado, el tálamo, el hipocampo, o la sustancia negra, se conoce en la técnica y se describe, por ejemplo, en la Pat. de Estados Unidos n.º 6.756.523, "Adenovirus vectors for the transfer of foreign genes into cells of the central nervous system particularly in brain". La administración puede ser rápida como mediante inyección o hacerse durante un periodo de tiempo como por infusión o administración lenta de formulaciones de liberación lenta.

30 Los oligonucleótidos antisentido objeto también puede enlazarse o conjugarse con agentes que proporcionan propiedades farmacéuticas o farmacodinámicas deseables. Por ejemplo, el oligonucleótido antisentido puede acoplarse a cualquier sustancia, conocida en la técnica para promover la penetración o transporte a través de la barrera hematoencefálica, tal como un anticuerpo para el receptor de transferrina, y administrarse mediante 35 inyección intravenosa. El compuesto antisentido puede enlazarse con un vector viral, por ejemplo, que hace al compuesto antisentido más eficaz y/o aumenta el transporte del compuesto antisentido a través de la barrera hematoencefálica. La rotura osmótica de la barrera hematoencefálica también puede realizarse, por ejemplo, por infusión de azúcares incluyendo, pero sin limitación, mesoeritritol, xilitol, D(+) galactosa, D(+) lactosa, D(+) xilosa, dulcitol, mio-inositol, L(-) fructosa, D(-) manitol, D(+) glucosa, D(+) arabinosa, D(-) arabinosa, celobiosa, D(+) 40 maltosa, D(+) rafinosa, L(+) ramnosa, D(+) melibiosa, D(-) ribosa, adonitol, D(+) arabitól, L(-) arabitól, D(+) fucosa, L(-) fucosa, D(-) lixosa, L(+) lixosa y L(-) lixosa, o aminoácidos que incluyen, pero sin limitación, glutamina, lisina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glicina, histidina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, tirosina, valina y taurina. Los métodos y materiales para potenciar la penetración de la barrera hematoencefálica se describen, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos n.º 4.866.042, "Method for 45 the delivery of genetic material across the blood brain barrier", 6.294.520, "Material for passage through the blood-brain barrier", y 6.936.589, "Parenteral delivery systems".

Los compuestos antisentido objeto pueden mezclarse, encapsularse, conjugarse o asociarse de otro modo a otras 50 moléculas, estructuras de molécula o mezclas de compuestos, por ejemplo, liposomas, moléculas dirigidas a receptor, formulaciones orales, rectales, tópica u otras, para facilitar la captación, distribución y/o absorción. Por ejemplo, pueden incluirse lípidos catiónicos en la formulación para facilitar la captación de oligonucleótidos. Se mostró que una composición de este tipo que facilita la captación es LIPOFECTIN (disponible en GIBCO-BRL, Bethesda, MD).

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

Las formulaciones farmacéuticas de la presente divulgación, que pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria, pueden prepararse según técnicas convencionales muy conocidas en la industria farmacéutica. Tales técnicas incluyen la etapa de poner en asociación los principios activos con el vehículo o vehículos farmacéuticos o uno o más excipientes. En general, las formulaciones se preparan poniendo en asociación uniforme e íntimamente los principios activos con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos, o ambos, y después, si fuera necesario, moldeando el producto.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Las composiciones y formulaciones para administración por vía oral incluyen polvos o gránulos, micropartículas, nanopartículas, suspensiones o soluciones en agua o medios no acuosos, cápsulas, cápsulas de gel, sobres, comprimidos o minicompimidos. Pueden ser deseables espesantes, aromatizantes, diluyentes, emulsionantes, adyuvantes de dispersión o aglutinantes. Las formulaciones orales son aquellas en las que los oligonucleótidos de la divulgación se administran conjuntamente con uno o más potenciadores de la penetración, tensioactivos y quelantes. Los tensioactivos incluyen ácidos grasos y/o ésteres o sales de los mismos, ácidos biliares y/o sales de los mismos. Los ácidos biliares/sales y ácidos grasos y sus usos se describen adicionalmente en la Pat. de Estados Unidos n.º 6.287.860. También son combinaciones de potenciadores de la penetración, por ejemplo, ácidos grasos/sales en combinación con ácidos biliares/sales. Una combinación particular es la sal de sodio de ácido láurico, ácido cáprico y UDCA. Los potenciadores de la penetración adicionales incluyen éter polioxietileno-9-laurílico, éter polioxietileno-20-cetílico. Los oligonucleótidos de la divulgación pueden administrarse por vía oral, en forma granulada que incluye partículas secadas por pulverización, o complejados para formar micro o nanopartículas. Los agentes de complejantes de oligonucleótidos y sus usos se describen adicionalmente en la Pat. de Estados Unidos n.º 6.287.860.

Las composiciones y formulaciones para administración parenteral, intratecal o intraventricular pueden incluir soluciones acuosas estériles que también pueden contener tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados tales como, pero sin limitación, potenciadores de la penetración, compuestos portadores y otros vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables.

Ciertos aspectos de la divulgación proporcionan composiciones farmacéuticas que contienen uno o más compuestos oligoméricos y uno o más agentes quimioterapéuticos diferentes que funcionan por un mecanismo no antisentido. Los ejemplos de tales agentes quimioterapéuticos incluyen, pero sin limitación, fármacos quimioterapéuticos para el cáncer tales como daunorrubicina, daunomicina, dactinomicina, doxorubicina, epirubicina, idarrubicina, esorubicina, bleomicina, mafosfamida, ifosfamida, citosina arabinósido, biscloroetil-nitrosurea, busulfano, mitomicina C, actinomicina D, mitramicina, prednisona, hidroxiprogesterona, testosterona, tamoxifeno, dacarbazina, procarbazona, hexametilmelamina, pentametilmelamina, mitoxantrona, amsacrina, clorambucilo, metilciclohexilnitrosurea, mostazas de nitrógeno, melfalan, ciclofosfamida, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-azacitidina, hidroxiurea, desoxicofomicina, 4-hidroxiperoxiciclo-fosforamida, 5-fluorouracilo (5-FU), 5-fluorodesoxiuridina (5-FUdR), metotrexato (MTX), colchicina, taxol, vincristina, vinblastina, etopósido (VP-16), trimetrexato, irinotecán, topotecán, gemcitabina, tenipósido, cisplatino y dietilestilbestrol (DES). Cuando se usan con los compuestos de la divulgación, tales agentes quimioterapéuticos pueden usarse individualmente (por ejemplo, 5-FU y oligonucleótido), secuencialmente (por ejemplo, 5-FU y oligonucleótido durante un periodo de tiempo seguido de MTX y oligonucleótido), o en combinación con uno o varios de otros de tales agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, 5-FU, MTX y oligonucleótido, o 5-FU, radioterapia y oligonucleótido). Los fármacos antiinflamatorios, que incluyen, pero sin limitación, fármacos antiinflamatorios no esteroideos y corticosteroides, y fármacos antivirales, que incluyen, pero sin limitación, ribivirina, vidarabina, aciclovir y ganciclovir, también pueden combinarse en composiciones de la divulgación. Las combinaciones de compuestos antisentido y otros fármacos no antisentido también están dentro del alcance de la presente divulgación. Pueden usarse dos o más compuestos combinados juntos o secuencialmente.

En otro aspecto relacionado, las composiciones de la divulgación pueden contener uno o más compuestos antisentido, particularmente oligonucleótidos, dirigidos a un primer ácido nucleico y uno o más compuestos antisentido adicionales dirigidos a un segundo ácido nucleico diana. Por ejemplo, la primera diana puede ser una secuencia antisentido particular de un gen de colágeno, y la segunda diana puede ser una región de otra secuencia de nucleótidos. Como alternativa, las composiciones de la divulgación pueden contener dos o más compuestos

antisentido dirigidos a diferentes regiones de la misma diana de ácido nucleico de un gen de colágeno. Se ilustran numerosos ejemplos de compuestos antisentido en el presente documento y otros pueden seleccionarse de entre compuestos adecuados conocidos en la técnica. Pueden usarse dos o más compuestos combinados juntos o secuencialmente.

5

Dosificación:

Se cree que la formulación de composiciones terapéuticas y su posterior administración (dosificación) están dentro de la experiencia de los expertos en la técnica. La dosificación depende de la gravedad y sensibilidad de la patología que va a tratarse, durando el ciclo de tratamiento de varios días a varios meses, o hasta que se efectúe una cura o se logre una disminución de la patología. Pueden calcularse programas de dosificación óptimos a partir de mediciones de acumulación de fármaco en el cuerpo del paciente. Los expertos pueden determinar fácilmente dosificaciones óptimas, metodologías de dosificación y tasas de repetición. Las dosificaciones óptimas pueden variar dependiendo de la potencia relativa de oligonucleótidos individuales, y generalmente pueden estimarse basándose en las CE50 que se encuentra que son eficaces en modelos animales *in vitro* e *in vivo*. En general, la dosificación es de 0,01 µg a 100 g por kg de peso corporal, y puede administrarse una vez o más diariamente, semanalmente, mensualmente o anualmente, o incluso una vez cada 2 a 20 años. Los expertos en la técnica pueden estimar fácilmente tasas de repetición para la dosificación basándose en tiempos de residencia medidos y concentraciones del fármaco en los fluidos o tejidos corporales. Tras el tratamiento satisfactorio, puede desearse que el paciente reciba terapia de mantenimiento para prevenir la reaparición de la patología, donde el oligonucleótido se administra en dosis de mantenimiento, que oscilan de 0,01 µg a 100 g por kg de peso corporal, una vez o más diariamente, a una vez cada 20 años.

En aspectos, un paciente se trata con una dosificación de fármaco que es al menos aproximadamente 1, al menos aproximadamente 2, al menos aproximadamente 3, al menos aproximadamente 4, al menos aproximadamente 5, al menos aproximadamente 6, al menos aproximadamente 7, al menos aproximadamente 8, al menos aproximadamente 9, al menos aproximadamente 10, al menos aproximadamente 15, al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 25, al menos aproximadamente 30, al menos aproximadamente 35, al menos aproximadamente 40, al menos aproximadamente 45, al menos aproximadamente 50, al menos aproximadamente 60, al menos aproximadamente 70, al menos aproximadamente 80, al menos aproximadamente 90, o al menos aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal. Ciertas dosificaciones inyectadas de oligonucleótidos antisentido se describen, por ejemplo, en la Pat. de Estados Unidos n.º 7.563.884, "Antisense modulation of PTP1B expression".

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

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

EJEMPLOS

45

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ejemplo 2: Modulación de un polinucleótido de un gen de colágeno

Tratamiento de células HepG2 con oligonucleótidos antisentido

- Se cultivaron células HepG2 de ATCC (cat. n.º HB-8065) en medio de crecimiento (MEM/EBSS (Hyclone, cat. n.º SH30024 o Mediatech, cat. n.º MT-10-010-CV) + FBS al 10 % (Mediatech, cat. n.º MT35-011-CV) + penicilina/estreptomicina (Mediatech, cat. n.º MT30-002-CI)) a 37 °C y CO2 al 5 %. Un día antes del experimento, las células volvieron a sembrarse a la densidad de 1,5 x 10⁵/ml en placas de 6 pocillos y se incubaron a 37 °C y CO2 al 5 %. El día del experimento, el medio en las placas de 6 pocillos se cambió a medio de crecimiento nuevo. Todos los oligonucleótidos antisentido se diluyeron a la concentración de 20 µM. Se incubaron dos µl de esta solución con 400 µl de medio Opti-MEM (Gibco, cat. n.º 31985-070) y 4 µl de Lipofectamine 2000 (Invitrogen, cat. n.º 11668019) a temperatura ambiente durante 20 min y se aplicó a cada pocillo de las placas de 6 pocillos con células HepG2. Se usó una mezcla similar que incluía 2 µl de agua en lugar de la solución de oligonucleótido para los controles transfectados con vector vacío. Después de 3-18 h de incubación a 37 °C y CO2 al 5 %, el medio se cambió a medio de crecimiento nuevo. 48 h después de la adición de oligonucleótidos antisentido, el medio se eliminó y se extrajo ARN de las células usando el sistema de aislamiento de ARN total SV de Promega (cat. n.º Z3105) o el kit de aislamiento de ARN total RNeasy de Qiagen (cat. n.º 74181) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se añadieron 600 ng de ARN a la reacción de transcripción inversa realizada usando el kit de ADNc Verso de Thermo Scientific (cat. n.º AB1453B) o el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (cat. n.º 4368813) como se describe en el protocolo del fabricante. El ADNc de esta reacción de transcripción inversa se usó para monitorizar la expresión génica por PCR en tiempo real usando mezcla de expresión génica Taqman de ABI (cat. n.º 4369510) y cebadores/sondas diseñados por ABI (ensayo de expresión génica Taqman de Applied Biosystems: Hs00164004_m1, Hs00164310_m1, por Applied Biosystems Inc., Foster City CA). Se usó el siguiente ciclo de PCR: 50 °C durante 2 min, 95 °C durante 10 min, 40 ciclos de (95 °C durante 15 segundos, 60 °C durante 1 min) usando el ciclador térmico Mx4000 (Stratagene).
- 25 Se calculó el cambio en veces en la expresión génica después del tratamiento con oligonucleótidos antisentido basándose en la diferencia en valores de dCt normalizados con 18S entre muestras tratadas y transfectadas con vector vacío.

Resultados

- 30 Los resultados de PCR en tiempo real muestran que los niveles del ARNm de Col1a1 en las células HepG2 se aumentan significativamente 48 h después de tratamiento con uno de los oligos diseñados para Col1a1 antisentido DW440457 (Fig. 1).
- 35 Los resultados de PCR en tiempo real muestran que los niveles de ARNm de Col7a1 en las células HepG2 se aumentan significativamente 48 h después de tratamiento con dos de los oligos diseñados para Col7a1 como be142537 y bg998538 (Fig. 4).

Tratamiento de células HUVEC con oligonucleótidos antisentido

- 40 Las células HUVEC de la ATCC (Promo Cell cat. n.º C-12253) se cultivaron en medio de crecimiento epitelial (Promo Cell cat. n.º C-22010) a 37 °C y CO2 al 5 %. Un día antes del experimento, las células volvieron a sembrarse usando el kit Promo Cell Detach (cat. n.º C-41200) a la densidad de 1,5 x 10⁵/ml en placas de 6 pocillos y se incubaron a 37 °C y CO2 al 5 %. El día del experimento, el medio en las placas de 6 pocillos se cambió a medio de crecimiento epitelial nuevo. Todos los oligonucleótidos antisentido se diluyeron a la concentración de 20 µM. Se incubaron dos µl de esta solución con 400 µl de medio Opti-MEM (Gibco, cat. n.º 31985-070) y 4 µl de Lipofectamine 2000 (Invitrogen, cat. n.º 11668019) a temperatura ambiente durante 20 min y se aplicó a cada pocillo de las placas de 6 pocillos con células HUVEC. Se usó una mezcla similar que incluía 2 µl de agua en lugar de la solución de oligonucleótido para los controles transfectados con vector vacío. Después de 3-18 h de incubación a 37 °C y CO2 al 5 %, el medio se cambió a medio de crecimiento nuevo. 48 h después de la adición de oligonucleótidos antisentido, el medio se eliminó y se extrajo ARN de las células usando el sistema de aislamiento de ARN total SV de Promega (cat. n.º Z3105) o el kit de aislamiento de ARN total RNeasy de Qiagen (cat. n.º 74181) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se añadieron 600 ng de ARN a la reacción de transcripción inversa realizada usando el kit de ADNc Verso de Thermo Scientific (cat. n.º AB1453B) como se describe en el protocolo del fabricante. El ADNc de esta reacción de transcripción inversa se usó para monitorizar la expresión génica por PCR en tiempo real usando mezcla de expresión génica Taqman de ABI (cat. n.º 4369510) y cebadores/sondas diseñados por ABI (ensayos de expresión génica Taqman de Applied Biosystems: Hs01028970_m1 y Hs00164310_m1, por Applied Biosystems Inc., Foster City CA). Se usó el siguiente ciclo de PCR: 50 °C durante 2 min, 95 °C durante 10 min, 40 ciclos de (95 °C durante 15 segundos, 60 °C durante 1 min) usando la máquina de PCR en tiempo real StepOne Plus (Applied

Biosystems Inc.) o un ciclador térmico Mx4000 (Stratagene).

Se calculó el cambio en veces en la expresión génica después del tratamiento con oligonucleótidos antisentido basándose en la diferencia en valores de dCt normalizados con 18S entre muestras tratadas y transfectadas con 5 vector vacío.

Resultados:

Los resultados de PCR en tiempo real muestran que los niveles del ARNm de Col1a2 en las células HUVEC se 10 aumentan significativamente 48 h después de tratamiento con uno de los oligos diseñados para Col1a2 antisentido Hs.571263 (Fig. 2).

Los resultados de PCR en tiempo real muestran que los niveles de ARNm de Col7a1 en las células HUVEC se 15 aumentan significativamente 48 h después de tratamiento con uno de los siRNA diseñados para Col7a1 como CV425857 (CV425857.1_1, CV425857.1_2), y un siRNA para BU615800.1 (U615800.1_1) (Fig. 3).

Además, aunque puede haberse desvelado una característica particular de la invención con respecto únicamente a una de varias implementaciones, dicha característica puede combinarse con una o más características diferentes de otras implementaciones según pueda desearse y sea ventajoso para cualquier aplicación determinada o particular.

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

25 LISTA DE SECUENCIAS

<110> CuRNA, Inc.

<120> TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES RELACIONADAS CON UN GEN DE COLÁGENO MEDIANTE LA INHIBICIÓN DE UN TRANSCRITO ANTISENTIDO NATURAL A UN GEN DE COLÁGENO

30

<130> P38232EP-PCT

<140> EP10790092.0

<141> 16-06-2010

35

<150> US 61/187.384

<151> 16-06-2009

<150> US 61/286.939

40

<151> 16-12-2009

<150> US 61/286.965

<151> 16-12-2009

45 <160> 33

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

50

<211> 5927

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<300>

55

<308> NM_000088.3

<309> 06-06-2010

<313> (1)..(5927)

<400> 1

ES 2 620 960 T3

tcgtcggagc agacgggagt ttctcctcgg ggtcggagca ggaggcacgc ggagtgtgag 60
gccacgcatg agcgggacgct aacccccctcc ccagccacaa agagtctaca tgtctagggt 120
ctagacatgt tcagctttgt ggacctccgg ctctgctcc tcttagcggc caccgccctc 180
ctgacgcacg gccaaagagga aggccaagtc gagggccaag acgaagacat cccaccaatc 240
acctgcgtac agaacggcct caggtacat gaccgagacg tgtggaaacc cgagccctgc 300
cggatctgcg tctgcgacaa cggcaaggtg ttgtgcatg acgtgatctg tgacgagacc 360
aagaactgcc ccggcgccga agtccccgag ggcgagtgt gtcccgtctg ccccgacggc 420
tcagagtcac ccaccgacca agaaaccacc ggcgtcagag gacccaaggg agacactggc 480
ccccgaggcc caaggggacc cgcaggcccc cctggccgag atggcatccc tggacagcct 540
ggacttcccg gaccccccg accccccgga cctcccggac cccctggcct cggaggaaac 600
tttgctcccc agctgtctta tggctatgat gagaaatcaa ccggaggaat ttccgtgcct 660
ggccccatgg gtccctctgg tcctcgtggt ctccctggcc cccctggtgc acctggtccc 720
caaggcttcc aagggtcccc tggtgagcct ggcgagcctg gagcttcagg tcccatgggt 780
ccccgaggtc cccaggtcc ccctggaaag aatggagatg atggggaagc tggaaaacct 840

ES 2 620 960 T3

ggtcgtcctg gtgagcgtgg gcctcctggg cctcagggtg ctcgaggatt gcccggaaca 900
 gctggcctcc ctggaatgaa gggacacaga ggtttcagtg gtttgatgg tgccaagga 960
 gatgctggtc ctgctggtcc taagggtgag cctggcagcc ctggtgaaaa tggagctcct 1020
 ggtcagatgg gccccctgg cctgcctggt gagagaggtc gccctggagc ccctggccct 1080
 gctggtgctc gtggaatga tgggtgctact ggtgctgccg ggccccctgg tcccaccggc 1140
 cccgctggtc ctctggtctt ccctggtgct gttggtgcta aggggtgaagc tggccccaa 1200
 gggccccgag gctctgaagg tcccaggggt gtgctggtg agcctggccc ccctggccct 1260
 gctggtgctg ctggccctgc tggaaaccct ggtgctgatg gacagcctgg tgctaaaggt 1320
 gccaatggtg ctctggtat tgctggtgct cctggcttcc ctggtgcccg aggccctct 1380
 ggaccccagg gccccggcgg ccctcctggt cccaagggtg acagcgggtg acctggtgct 1440
 cctggcagca aaggagacac tgggtgctaag ggagagcctg gccctggttg tgttcaagga 1500
 ccccctggcc ctgctggaga ggaaggaaag cgaggagctc gaggtgaacc cggaccact 1560
 ggctgcccg gaccccctgg cgagcgtggt ggacctggtg gccctggttt ccctggcgca 1620
 gatggtgttg ctggtcccaa gggctccgct ggtgaacgtg gttctcctgg ccctgctggc 1680
 cccaaaggat ctctggtga agctggtcgt cccggtgaag ctggtctgcc tggtgccaag 1740
 ggtctgactg gaagccctgg cagccctggt cctgatggca aaactggccc ccctggtccc 1800
 gccggtcaag atggtcgccc cggacccccca ggcccacctg gtgcccgtgg tcaggctggt 1860
 gtgatgggat tccctggacc taaaggtgct gctggagagc ccggcaaggc tggagagcga 1920
 ggtgttcccg gaccccctgg cgctgtcgggt cctgctggca aagatggaga ggctggagct 1980
 cagggacccc ctggccctgc tggctccgct ggcgagagag gtgaacaagg ccctgctggc 2040
 tcccccgat tccagggtct ccctggtcct gctggtcctc caggtgaagc aggcaaacct 2100
 ggtgaacagg gtgttctgag agacctggc gccctggcc cctctggagc aagaggcgag 2160
 agaggttcc ctggcgagcg tgggtgcaaa ggtcccctg gtctctgctg tccccgaggg 2220
 gccaacggtg ctcccggcaa cgatggtgct aagggtgatg ctggtgcccc tggagctccc 2280
 ggtagccagg gcgcccctgg ccttcaggga atgcctggtg aacgtggtgc agctggtctt 2340
 ccagggccta agggtgacag aggtgatgct ggtcccaaag gtgctgatgg ctctcctggc 2400
 aaagatggcg tccctggtct gactggcccc attggtcctc ctggccctgc tggtgcccct 2460
 ggtgacaagg gtgaaagtgg tcccagcggc cctgctggtc ccactggagc tcgtggtgcc 2520
 cccggagacc gtggtgagcc tgggtccccc ggccctgctg gctttgctgg cccccctggt 2580
 gctgacggcc aacctggtgc taaagcgaa cctggtgatg ctggtgctaa aggcgatgct 2640
 ggtccccctg gccctgccgg acccgctgga ccccctggcc ccattggtaa tgttggtgct 2700

ES 2 620 960 T3

cctggagcca aaggtgctcg cggcagcgt ggtccccctg gtgctactgg tttccctggt 2760
 gctgctggcc gagtcggtcc tcctggcccc tctggaaatg ctggaccccc tggccctcct 2820
 ggtcctgctg gcaaagaagg cggcaaaggt ccccggtgtg agactggccc tgctggacgt 2880
 cctggtgaag ttggtcccc tggtccccct ggcctgctg gcgagaaagg atccccctgt 2940
 gctgatggtc ctgctggtgc tcctggtact cccgggcctc aaggtattgc tggacagcgt 3000
 ggtgtggtcg gcctgcctgg tcagagagga gagagaggct tccctggtct tcctggcccc 3060
 tctggtgaac ctggcaaaca aggtccctct ggagcaagtg gtgaacgtgg tccccctggt 3120
 cccatgggcc cccctggatt ggctggacc cctggtgaat ctggacgtga gggggctcct 3180
 ggtgcccgaag gttccccctgg acgagacggt tctcctggcg ccaaggggta ccgtggtgag 3240
 accggccccg ctggaccccc tgggtgctcct ggtgctcctg gtgccccctg ccccgttggc 3300
 cctgctggca agagtgtgta tcgtggtgag actggtcctg ctggtcccgc cggctcctgc 3360
 ggccctgttg ggcgccgtgg ccccgccgga ccccaaggcc cccgtggtga caaggggtgag 3420
 acaggcgaac agggcgacag aggcataaag ggtcaccgtg gcttctctgg cctccagggt 3480
 ccccctggcc ctctggctc tcctggtgaa caaggtccct ctggagcctc tggctcctgt 3540
 ggtccccgag gtccccctgg ctctgctggt gctcctggca aagatggact caacggtctc 3600
 cctggccccca ttgggcccc tggtcctcgc ggtcgcaact gtgatgctgg tcctgttgg 3660
 cccccggcc ctctggacc tcctggtccc cctggtcctc ccagcgctgg tttcgacttc 3720
 agcttcctgc cccagccacc tcaagagaag gctcacgatg gtggccgcta ctaccgggt 3780
 gatgatgcca atgtggttcg tgaccgtgac ctcgaggtgg acaccaccct caagagcctg 3840
 agccagcaga tcgagaacat ccggagccca gagggcagcc gcaagaacct cgcgccacc 3900
 tgccgtgacc tcaagatgtg ccaactctgac tggaaagtgt gagagtactg gattgacccc 3960
 aaccaaggct gcaacctgga tgccatcaaa gtcttctgca acatggagac tgggtgagacc 4020
 tgcgtgtacc ccaactcagcc cagtgtggcc cagaagaact ggtacatcag caagaacccc 4080
 aaggacaaga ggcatgtctg gttcggcgag agcatgaccg atggattcca gttcgagtat 4140
 ggcggccagg gctccgacc tgccgatgtg gccatccagc tgacctcct cgcctgatg 4200
 tccaccgagg cctcccagaa catcacctac cactgcaaga acagcggtgc ctacatggac 4260
 cagcagactg gcaacctcaa gaaggccctg ctctccagc gctccaacga gatcgagatc 4320
 cgcgcccagg gcaacagccg cttcacctac agcgtcactg tcgatggctg cacgagtcac 4380
 accggagcct ggggcaagac agtgattgaa taaaaacca ccaagacctc cgcctgccc 4440
 atcatcgatg tggccccctt ggacgttggg gcccagacc aggaattcgg cttcgacgtt 4500
 ggccctgtct gcttcctgta aactccctcc atcccaacct ggtccctcc cacccaacca 4560
 actttcccc caaccggaa acagacaagc aaccctaaact gaacccccctc aaaagccaaa 4620

ES 2 620 960 T3

aaatgggaga caatffcaca tggactttgg aaaatatttt tttcctttgc attcatctct 4680
 caaacttagt ttttatcttt gaccaaccga acatgaccaa aaaccaaag tgcatcaca 4740
 cttacaaaa aaaaaaaaa aaaaagaata aataaataac tttttaaaa aggaagcttg 4800
 gtccaactgc ttgaagacc atgagggggt aagtcccttt ctgcccgttg ggcttatgaa 4860
 accccaatgc tgccctttct gctcctttct ccacaccccc cttggggcct cccctccact 4920
 ccttcccaaa tctgtctccc cagaagacac aggaacaat gtattgtctg cccagcaatc 4980
 aaagcaatg ctcaaacacc caagtggccc ccaccctcag cccgctcctg cccgccagc 5040
 acccccaggc cctgggggac ctggggttct cagactgcca aagaagcctt gccatctggc 5100
 gctcccatgg ctcttgcaac atctcccctt cgtttttgag ggggtcatgc cgggggagcc 5160
 accagcccct cactgggttc ggaggagagt caggaagggc cagcaaaaag cagaacatc 5220
 ggatttgggg aacgcgtgtc aatcccttgt gccgcagggc tgggcgggag agactgttct 5280
 gttccttgtg taactgtgtt gctgaaagac tacctcgttc ttgtcttgat gtgtcaccgg 5340
 ggcaactgcc tgggggcggg gatgggggca gggtggaagc ggctcccat tttatacaca 5400
 aggtgctaca tctatgtgat ggggtgggtg gggagggaat cactggtgct atagaaattg 5460
 agatgcccc ccaggccagc aaatgttctt ttttgttcaa agtctatfff tattccttga 5520
 tatttttctt tttttttttt tttttttgtg gatggggact tgtgaatfff tctaaaggtg 5580
 ctatttaaca tgggaggaga gcgtgtgagg ctcacgccc gcccgtgct cactttccac 5640
 cctctctcca cctgcctctg gcttctcagg cctctgctct ccgacctctc tcctctgaaa 5700
 ccctctcca cagctgcagc ccacctccc ggctcccctc tagtctgtcc tgcgtcctct 5760
 gtccccgggt ttcagagaca acttcccaaa gcacaaagca gtttttcccc ctaggggtgg 5820
 gaggaagcaa aagactctgt acctatfff tatgtgtata ataatttgag atgtttttaa 5880
 ttatfffat tgctggaata aagcatgtgg aaatgaccca aacataa 5927

<210> 2
<211> 5411

5 <212> ADN
<213> Homo sapiens

<300>
<308> NM_000089.3

10 <309> 23-05-2010
<313> (1)..(5411)

<400> 2

gtgtcccata gtgtttcaa acttgaaag ggcgggggag ggcgggagga tgcggagggc 60
 ggaggtatgc agacaacgag tcagagtttc cccttgaaag cctcaaaaag gtccacgtcc 120
 15 tcaaaaagaa tggaaccaat ttaagaagcc agccccgtgg ccacgtccct tccccattc 180

ES 2 620 960 T3

gctccctoct ctgcgcccc gcaggctcct cccagctgtg gctgcccggg cccccagccc 240
cagccctocc attggtggag gccttttgg aggcacccta gggccaggga aacttttgcc 300
gtataaatag ggcagatccg ggctttatta ttttagcacc acggcagcag gaggtttcgg 360
ctaagtggga ggtactggcc acgactgcat gcccgcccc gccaggtgat acctccgccc 420
gtgacccagg ggctctgcga cacaaggagt ctgcatgtct aagtgctaga catgctcagc 480
tttgtggata cgggacttt gtgctgctt gcagtaacct tatgcctagc aacatgccaa 540
tctttacaag aggaaactgt aagaaagggc ccagccggag atagaggacc acgtggagaa 600
aggggtccac caggccccc aggcagagat ggtgaagatg gtcccacagg ccctcctggt 660
ccacctggtc ctctggccc ccctggtctc ggtgggaact ttgctgctca gtatgatgga 720
aaaggagtg gacttggccc tggaccaatg ggcttaatgg gacctagagg cccacctggt 780
gcagctggag ccccaggccc tcaaggtttc caaggacctg ctggtgagcc tggtaacct 840
ggtcaaaactg gtctgcagg tgctcgtggt ccagctggcc ctctggcaa ggctggtgaa 900
gatggtcacc ctggaaaacc cggacgacct ggtgagagag gagtgttgg accacaggtt 960
gctcgtggtt tccctggaac tcctggactt cctggcttca aaggcattag gggacacaat 1020
ggtctggatg gattgaaggg acagcccgtt gctcctggtg tgaagggtga acctggtgcc 1080
cctggtgaaa atggaactcc aggtcaaaaca ggagcccgtg ggcttcctgg tgagagagga 1140
cgtgttggtg cccctggccc agctggtgcc cgtggcagtg atggaagtgt gggccccgtg 1200
ggtcctgctg gtccattgg gtctgctggc cctccaggct tcccagggtc ccctggcccc 1260
aagggtgaaa ttggagctgt tggtaacgct ggtcctgctg gtcccggccg tccccgtggt 1320
gaagtgggtc ttccaggcct ctccggcccc gttggacctc ctggtaatcc tggagcaaac 1380
ggccttactg gtgccaaagg tgctgctggc cttcccggcg ttgctggggc tccccgcctc 1440
cctggacccc gcggtattcc tggccctggt ggtgctgccg gtgctactgg tgccagagga 1500
cttgttggtg agcctggtcc agctggctcc aaaggagaga gcgtaaaaa gggtagcccc 1560
ggctctgctg ggccccagg tcctcctggt cccagtgtg aagaaggaaa gagaggccct 1620
aatggggaag ctggatctgc cggccctcca ggacctcctg ggctgagagg tagtcctggt 1680
tctcgtggtc ttctggagc tgatggcaga gctggcgtca tgggccctcc tggtagtctg 1740
ggtgcaagtg gccctgctgg agtccgagga cctaatggag atgctggtcg ccctggggag 1800
cctggtctca tgggaccag aggtcttcct ggtcccctg gaaatatcgg ccccgtgga 1860
aaagaaggtc ctgtcggcct ccctggcatc gacggcaggc ctggccaat tggcccagct 1920
ggagcaagag gagagcctgg caacattgga ttccctggac ccaaaggccc cactggtgat 1980
cctggcaaaa acggtgataa aggtcatgct ggtcttgctg gtgctcgggg tgctccaggt 2040
cctgatggaa acaatggtgc tcagggacct cctggaccac aggggtttca aggtggaaaa 2100

ES 2 620 960 T3

ggtgaacagg gtccccctgg tcctccaggc ttccagggtc tgcctggccc ctcaaggctccc 2160
 gctggtgaag ttggcaaacc aggagaaagg ggtctccatg gtgagtttgg tctccctggt 2220
 cctgctggtc caagagggga acgcggtccc ccaggtgaga gtggtgctgc cggtcctact 2280
 ggtcctattg gaagccgagg tccttctgga cccccagggc ctgatggaaa caagggtgaa 2340
 cctggtgtgg ttggtgctgt gggcactgct ggtccatctg gtcctagtgg actcccagga 2400
 gagaggggtg ctgctggcat acctggaggc aaggagaaaa aggggtgaacc tggctctcaga 2460
 ggtgaaattg gtaaccctgg cagagatggt gctcgtggtg ctcctggtgc tgtagggtgcc 2520
 cctggtcctg ctggagccac aggtgaccgg ggcgaagctg gggctgctgg tcctgctggt 2580
 cctgctggtc ctcggggaag ccctggtgaa cgtggtgagg tcggtcctgc tggccccaat 2640
 ggatttgctg gtcctgctgg tgctgctggt caacctggtg ctaaaggaga aagaggagcc 2700
 aaagggccta agggtgaaaa cgggtgtggt ggtcccacag gccccgttgg agctgctggc 2760
 ccagctggtc caaatggtcc ccccgtcct gctggaagtc gtggtgatgg agggccccct 2820
 ggtatgactg gtttccctgg tgctgctgga cggactggtc ccccaggacc ctctggtatt 2880
 tctggccctc ctggtccccc tggctcctgct gggaaagaag ggcttcgtgg tcctcgtggt 2940
 gaccaaggtc cagttggccg aactggagaa gtaggtgcag ttggtcccc tggttcgct 3000
 ggtgagaagg gtccctctgg agaggctggt actgctggac ctcctggcac tccaggctct 3060
 cagggctctc ttggtgctcc tgggtattctg ggtctccctg gctcgagagg tgaacgtggt 3120
 ctaccaggtg ttgctggtgc tgtgggtgaa cctggtcctc ttggcattgc cggccctcct 3180
 ggggccctg gtcctcctgg tgctgtgggt agtcctggag tcaacgggtgc tcctggtgaa 3240
 gctggtcgtg atggcaacc tggaacgat ggtccccag gtcgcatgg tcaaccggga 3300
 cacaagggag agcgcgggta ccctggcaat atggtcccg ttggtgctgc aggtgcacct 3360
 ggtcctcatg gccccgtggg tcctgctggc aaacatggaa accgtggtga aactggtcct 3420
 tctggtcctg ttggtcctgc tgggtgctgt ggcacaagag gtcctagtgg cccacaaggc 3480
 attcgtggcg ataagggaga gcccgtgaa aaggggcca gaggtcttcc tggcttaaag 3540
 ggacacaatg gattgcaagg tctgcctggt atcgtggtc accatggtga tcaagggtgct 3600
 cctggctccg tgggtcctgc tggctcctagg ggcctgctg gtccttctgg ccctgctgga 3660
 aaagatggtc gcactggaca tcctggtaca gttggacctg ctggcattcg aggcctcag 3720
 ggtcaccaag gccctgctgg cccccctggt cccccggcc ctcctggacc tccagggtga 3780
 agcggtggtg gttatgactt tggttacgat ggagacttct acagggctga ccagcctcgc 3840
 tcagcacctt ctctcagacc caaggactat gaagttgatg ctactctgaa gtctctcaac 3900
 aaccagattg agacccttct tactcctgaa ggctctagaa agaaccagc tcgcacatgc 3960

ES 2 620 960 T3

cgtgacttga gactcagcca cccagagtgg agcagtgggt actactggat tgaccctaac 4020
caaggatgca ctatggatgc tatcaaagta tactgtgatt tctctactgg cgaaacctgt 4080
atccgggccc aacctgaaaa catcccagcc aagaactgggt ataggagctc caaggacaag 4140
aaacacgtct ggctaggaga aactatcaat gctggcagcc agtttgaata taatgtagaa 4200
ggagtgactt ccaaggaaat ggctacccaa cttgccttca tgcgcctgct ggccaactat 4260
gcctctcaga acatcaccta ccactgcaag aacagcattg catacatgga tgaggagact 4320
ggcaacctga aaaaggctgt cattctacag ggctctaata atggtgaact tgttgctgag 4380
ggcaacagca ggttcactta cactgttctt gtatagtggt gctctaaaa gacaaatgaa 4440
tggggaaaga caatcattga atacaaaaca aataagccat cagcctgcc cttccttgat 4500
attgcacctt tggacatcgg tgggtgctgac caggaattct ttgtggacat tggcccagtc 4560
tgtttcaaat aatgaactc aatctaaatt aaaaaagaaa gaaattttaa aaaactttct 4620
ctttgccatt tcttcttctt cttttttaac tgaagctga atccttccat ttcttctgca 4680
catctacttg cttaaattgt gggcaaaaga gaaaagaag gattgatcag agcattgtgc 4740
aatacagttt cattaactcc ttccccgct cccccaaaaa tttgaatttt ttttcaaca 4800
ctcttacacc tgttatggaa aatgtcaacc tttgtaagaa aaccaaata aaaattgaaa 4860
aataaaaacc ataaacattt gcaccacttg tggcttttga atatcttcca cagagggag 4920
tttaaaacc aaacttcaa aggtttaaac tacctcaaaa cactttccca tgagtgtgat 4980
ccacattggt aggtgctgac ctagacagag atgaactgag gtccttgttt tgttttgttc 5040
ataatacaaa ggtgctaatt aatagtattt cagatacttg aagaatgttg atggtgctag 5100
aagaatttga gaagaaatac tcctgtattg agttgtatcg tgtggtgat ttttaaaaa 5160
atgtgattta gcattcatat tttccatott attccaatt aaaagtatgc agattatttg 5220
cccaaatctt cttcagattc agcatttgtt ctttgccagt ctcattttca tcttctcca 5280
tggttccaca gaagctttgt ttcttgggca agcagaaaaa ttaaattgta cctattttgt 5340
atatgtgaga tgtttaaata aattgtgaaa aaaatgaaat aaagcatggt tggttttcca 5400
aaagaacata t 5411

<210> 3
<211> 9169

5 <212> ADN
<213> Homo sapiens

<300>
<308> NM_000094.3

10 <309> 23-03-2010
<313> (1)..(9169)

<300>
<308> NM_000094.3

15 <309> 21-03-2010

ES 2 620 960 T3

<313> (1)..(9169)

<400> 3

```

gatgacgctg cggcttctgg tggcccgct ctgcgccggg atcctggcag aggcgccccg      60
agtgcgagcc cagcacaggg agagagtgac ctgcacgcgc ctttacgccg ctgacattgt      120
gttcttactg gatggctcct catccattgg ccgcagcaat ttccgcgagg tccgcagctt      180
tctcgaaggg ctggtgctgc ctttctctgg agcagccagt gcacagggtg tgcgctttgc      240
cacagtgcag tacagcgatg acccacggac agagttcggc ctggatgcac ttggtctctg      300
gggtgatgtg atccgcgcca tccgtgagct tagctacaag gggggcaaca ctcgcacagg      360
ggctgcaatt ctccatgtgg ctgacatgt cttcctgccc cagctggccc gacctggtgt      420
ccccaaagtc tgcatacctga tcacagacgg gaagtcccag gacctggtgg acacagctgc      480
ccaaaggctg aaggggcagg gggtaagct atttgctgtg gggatcaaga atgtgacccc      540
tgaggagctg aagcgagttg cctcacagcc caccagtgac ttcttcttct tctcaatga      600
cttcagcatc ttgaggacac tactgccct cgtttcccgg agagtgtgca cgactgctgg      660
tgcgctgcct gtgacccgac ctccgatga ctgcacctct gctccacgag acctggtgct      720
gtctgagcca agcagccaat ccttgagagt acagtggaca gcggccagtg gccctgtgac      780
tggctacaag gtccagtaca ctccctctgac ggggctggga cagccactgc cgagtgagcg      840
gcaggaggtg aacgtcccag ctggtgagac cagtgtgcgg ctgcggggtc tccggccact      900
gaccgagtac caagtgactg tgattgccct ctacgccaac agcatcgggg aggtgtgag      960
cgggacagct cggaccactg ccctagaagg gccggaactg accatccaga ataccacagc     1020
ccacagcctc ctggtggcct ggcggagtgt gccagggtgc actggctacc gtgtgacatg     1080
gcgggtcctc agtgggtggc ccacacagca gcaggagctg ggccctgggc agggttcagt     1140
gttctctcgt gacttgagc ctggcacgga ctatgaggtg accgtgagca ccctatttgg     1200
ccgcagtgtg gggcccgcca cttccctgat ggctcgcact gacgcttctg ttgagcagac     1260
cctgcgcccg gtcatacctg gccccacatc catcctcctt tcctggaact tggtgectga     1320
ggcccggtgc taccggttgg aatggcggcg tgagactggc ttggagccac cgcagaaggt     1380
ggtactgccc tctgatgtga cccgctacca gttggatggg ctgcagccgg gactgagta     1440
ccgcctcaca ctctacactc tgctggaggg ccacgaggtg gccaccctg caaccgtggt     1500
tcccactgga ccagagctgc ctgtgagccc tgtaacagac ctgcaagcca ccgagctgcc     1560
cgggcagcgg gtgcgagtgt cctggagccc agtccctggt gccaccagt accgcatcat     1620
tgtgcgcagc acccaggggg ttgagcggac cctggtgctt cctgggagtc agacagcatt     1680
cgacttggat gacgttcagg ctgggcttag ctacactgtg cgggtgtctg ctcgagtggg     1740
tcccctgag ggcagtcca gtgtcctcac tgtccgcccg gagccgaaa ctccacttgc     1800

```

5

ES 2 620 960 T3

tgttccaggg ctgcgggttg tgggtgcaga tgcaacgcga gtgaggggtgg cctggggacc 1860
 cgtccctgga gccagtggat ttcggattag ctggagcaca ggcagtggtc cggagtccag 1920
 ccagacactg cccccagact ctactgccac agacatcaca gggctgcagc ctggaaccac 1980
 ctaccaggtg gctgtgtcgg tactgcgagg cagagaggag ggcctgctg cagtcatcgt 2040
 ggctcgaacg gaccactgg gccagtggag gacgggccat gtgactcagg ccagcagctc 2100
 atctgtcacc attacctgga ccagggttcc tggcgccaca ggatacaggg tttcctggca 2160
 ctcagcccac ggcccagaga aatcccagtt ggtttctggg gaggccacgg tggtgagct 2220
 ggatggactg gagccagata ctgagtatac ggtgcatgtg agggcccatg tggtggcgt 2280
 ggatggggccc cctgcctctg tggttgtgag gactgcccct gagcctgtgg gtcgtgtgtc 2340
 gaggctgcag atcctcaatg cttccagcga cgttctacgg atcacctggg taggggtcac 2400
 tggagccaca gcttacagac tggcctgggg ccggagtga ggcggccca tgaggacca 2460
 gatactccca gaaacacag actctgcaga gatccgggt ctcgaagggt gagtcagcta 2520
 ctcagtgcga gtgactgcac ttgtcgggga ccgcgagggc acacctgtct ccattgttgt 2580
 cactacgccg cctgaggctc cgccagccct ggggacgctt cacgtggtgc agcgcgggga 2640
 gcactcgtg aggtcgcgt gggagccggt gccagagcg cagggttcc ttctgactg 2700
 gcaacctgag ggtggccagg aacagtcccg ggtcctgggg cccgagctca gcagctatca 2760
 cctggacggg ctggagccag cgacacagta ccgcgtgagg ctgagtgtcc tagggccagc 2820
 tggagaaggg ccctctgcag aggtgactgc gcgcactgag tcacctcgtg ttccaagcat 2880
 tgaactacgt gtggtggaca cctcgatoga ctcggtgact ttggcctgga ctccagtgtc 2940
 cagggcatcc agctacatcc tatcctggcg gccactcaga ggcctggcc aggaagtgcc 3000
 tgggtccccg cagacacttc cagggatctc aagctcccag cgggtgacag ggetagagcc 3060
 tggcgtctct tacatcttct ccctgacgcc tgcctggat ggtgtgcggg gtccctgaggc 3120
 atctgtcaca cagacgccag tgtgcccccg tggcctggcg gatgtggtgt tcctaccaca 3180
 tgccactcaa gacaatgctc accgtgcgga ggctacgagg agggtcctgg agcgtctggt 3240
 gttggcactt gggcctcttg ggccacaggc agttcaggtt ggcctgctgt cttacagtca 3300
 tcggccctcc cactgttcc cactgaatgg ctcccatgac cttggcatta tcttgcaaag 3360
 gatccgtgac atgccctaca tggaccacaag tgggaacaac ctgggcacag ccgtggtcac 3420
 agctcacaga tacatggtg caccagatgc tcctgggccc cgccagcacg taccaggggt 3480
 gatggttctg ctagtggatg aaccctgag aggtgacata ttcagcccca tccgtgaggc 3540
 ccaggcttct gggcttaatg tggatgatgtt gggaaatggct ggagcggacc cagagcagct 3600
 gcgtcgttg gcgcccggta tggactctgt ccagacctc ttcgccgtgg atgatgggcc 3660

ES 2 620 960 T3

aagcctggac caggcagtca gtggtctggc cacagccctg tgtcaggcat ccttcactac 3720
tcagccccgg ccagagccct gccagtgta ttgtccaaaaggccagaaggggaaacctgg 3780
agagatgggg ctgagaggac aagttggggc tcctggcgac cctggcctcc cgggcaggac 3840
cgggtgctccc ggccccagg ggccccctgg aagtgcact gccaaaggcg agaggggctt 3900
ccctggagca gatgggcgtc caggcagccc tggccgcgcc gggaatcctg ggaccctgg 3960
agcccctggc ctaaagggt ctccagggtt gcctggccct cgtggggacc cgggagagcg 4020
aggacctoga ggcccagg ggagccggg ggctcccga caagtcatcg gagtgaagg 4080
acctgggctt cctgggcgga aaggggacct tggaccatcg ggccccctg gacctcgtgg 4140
accactgggg gaccagac cccgtggccc cccagggtt cctggaacag ccatgaaggg 4200
tgacaaaggc gatcgtgggg agcgggtcc ccctggacca ggtgaaggtg gcatgtctcc 4260
tggggagcct gggctgccgg gtcttcccgg aagccctgga cccaaggcc ccgttggccc 4320
ccctgaaaag aaaggagaaa aaggtgactc tgaggatgga gctccaggcc tcccaggaca 4380
acctgggtct ccgggtgagc agggccacg gggacctcct ggagctattg gcccaggg 4440
tgaccggggc tttccagggc ccctgggtga ggtggagag aaggcggaac gtggaccccc 4500
aggcccagcg ggatcccggg ggtgccagg ggttgcctgga cgtcctggag ccaagggtcc 4560
tgaagggcca ccaggacca ctggcccca aggagagaag ggggagcctg gtcgcccctg 4620
ggacctgca gtggtgggac ctgctgttgc tggaccaaa ggagaaaagg gagatgtggg 4680
gcccgtggg cccagaggag ctaccggagt ccaaggggaa cggggccac ccggcttgg 4740
tcttcctgga gacctggcc ccaagggaga ccctggagac cgggtcca ttgacctac 4800
tggcagagca ggacccccag gtgactcagg gcctcctgga gagaaggag accctgggcg 4860
gcctggccc ccaggacctg ttggcccccg aggacgagat ggtgaagttg gagagaaagg 4920
tgacgagggc cctccgggtg acccgggtt gcctggaaaa gcaggcgagc gtggccttcg 4980
gggggcacct ggagttcggg gcctgtggg tgaaggga gaccaggag atcctggaga 5040
ggatggacga aatggcagcc ctggatcatc tggaccagg ggtgacctg gggagccggg 5100
tccccagga cccccggac ggctggtaga cacaggacct ggagccagag agaagggaga 5160
gcctggggac cgggacaag aggtcctcg agggcccaag ggtgatcctg gcctccctgg 5220
agcccctggg gaaagggca ttgaagggtt tcggggacct ccaggccac aggggacct 5280
aggtgtccga ggcccagcag gagaaaagg tgaccgggt cccctgggc tggatggccg 5340
gagcggactg gatgggaaac caggagccgc tggccctct gggccgaatg gtgctgcagg 5400
caaagctggg gaccagga gagacggct tccaggcctc cgtggagaac agggcctccc 5460
tggccctct ggtccccctg gattaccggg aaagccagc gaggatggca aacctggcct 5520
gaatggaaaa aacggagaac ctggggacct tggagaagac gggaggaagg gagagaaagg 5580

ES 2 620 960 T3

agattcaggc gcctctggga gagaaggtcg tgatggcccc aagggtgagc gtggagctcc 5640
 tggatcctt ggaccccagc ggcctccagg cctcccaggg ccagtgggcc ctctggcca 5700
 gggtttctt ggtgtcccag gaggcacggg cccaagggt gaccgtgggg agactggatc 5760
 caaaggggag cagggcctcc ctggagagcg tggcctgcga ggagagcctg gaagtgtgcc 5820
 gaatgtggat cggttgctgg aaactgctgg catcaaggca tctgccctgc gggagatcgt 5880
 ggagacctg gatgagagct ctggtagctt cctgcctgtg cccgaacggc gtcgaggccc 5940
 caagggggac tcagggcaac agggccccc aggcaaggag ggccccatcg gctttcctgg 6000
 agaacgcggg ctgaagggcg accgtggaga ccctggccct caggggccac ctggtctggc 6060
 ccttggggag agggccccc cggggccttc cggccttgcc ggggagcctg gaaagcctgg 6120
 tattcccggg ctcccaggca gggctggggg tgtgggagag gcaggaaggc caggagagag 6180
 gggagaacgg ggagagaaag gagaacgtgg agaacagggc agagatggcc ctctggact 6240
 ccctggaacc cctgggcccc cgggacccc tggcccaag gtgtctgtgg atgagccagg 6300
 tcctggactc tctggagaac agggacccc tggactcaag ggtgctaagg gggagccggg 6360
 cagcaatggt gaccaaggtc ccaaaggaga caggggtgtg ccaggcatca aaggagaccg 6420
 gggagagcct ggaccgaggg gtcaggacgg caacccgggt ctaccaggag agcgtggtat 6480
 ggctggccct gaagggaaac cgggtctgca ggtccaaga ggccccctg gccagtggg 6540
 tggatcatga gaccctggac cacctggtgc cccgggtctt gctggccctg caggaccca 6600
 aggaccttct ggcctgaagc gggagcctgg agagacagga cctccaggac ggggcctgac 6660
 tggacctact ggagctgtgg gacttcctgg acccccggc ccttcaggcc ttgtgggtcc 6720
 acaggggtct ccaggtttgc ctggacaagt gggggagaca gggaaagccg gagccccagg 6780
 tcgagatggt gccagtggaa aagatggaga cagagggagc cctggtgtgc cagggtcacc 6840
 aggtctgcct ggcctgtcg gacctaaagg agaacctggc cccacgggg ccctggaca 6900
 ggctgtggtc gggctccctg gagcaaagg agagaaggga gccctggag gccttgctgg 6960
 agacctggtg ggtgagccgg gagccaaagg tgaccgagga ctgccagggc cgcgaggcga 7020
 gaagggtgaa gctggccgtg caggggagcc cggagaccct ggggaagatg gtcagaaagg 7080
 ggctccagga cccaaaggtt tcaaggtga cccaggagtc ggggtcccgg gctcccctgg 7140
 gcctcctggc cctccagggt tgaagggaga tctgggcctc cctggcctgc ccggtgctcc 7200
 tgggtgtgtt gggttcccgg gtcagacagg ccctcgagga gagatgggtc agccaggccc 7260
 tagtggagag cggggtctgg caggccccc agggagagaa ggaatcccag gaccctggg 7320
 gccacctgga ccaccggggt cagtgggacc acctggggcc tctggactca aaggagacaa 7380
 gggagaccct ggagtgggc tgcctgggcc ccgaggcgag cgtggggagc caggcatccg 7440

ES 2 620 960 T3

gggatgaagat ggccgccccg gccaggaggg accccgagga ctcacggggc cccttgccag 7500
 caggggagag cgtggggaga agggatgatgt tgggagtgca ggactaaagg gtgacaaggg 7560
 agactcagct gtgatcctgg ggcctccagg cccacggggg gccaaagggg acatgggtga 7620
 acgagggcct cggggcttgg atggtgacaa aggacctcgg ggagacaatg gggaccctgg 7680
 tgacaagggc agcaagggag agcctggtga caagggctca gccgggttgc caggactgcg 7740
 tggactcctg ggaccccagg gtcaacctgg tgcagcaggg atccctggtg acccgggatc 7800
 cccaggaaaag gatggagtgc ctggtatccg aggagaaaaa ggagatggtg gcttcatggg 7860
 tccccggggc ctcaaggtg aacggggagt gaagggagcc tgtggccttg atggagagaa 7920
 gggagacaag ggagaagctg gtcccccagg ccgccccggg ctggcaggac acaaaggaga 7980
 gatgggggag cctggtgtgc cggggccagtc gggggccctt ggcaaggagg gcctgatcgg 8040
 tccaaggggt gaccgaggct ttgacgggca gccaggcccc aagggtgacc agggcgagaa 8100
 aggggagcgg ggaaccccag gaattggggg cttcccaggc cccagtggaa atgatggctc 8160
 tgctggtccc ccagggccac ctggcagtgt tggtcccaga ggccccgaag gacttcaggg 8220
 ccagaaggggt gagcgaggtc cccccggaga gagagtgggt ggggctcctg gggccctgg 8280
 agctcctggc gagagagggg agcagggggc gccagggcct gccggtcctc gaggcgagaa 8340
 gggagaagct gcaactgacgg aggatgacat ccggggcttt gtgcgccaag agatgagtca 8400
 gcaactgtcc tgccagggcc agttcatcgc atctggatca cgaccctcc ctagttatgc 8460
 tgacagacact gccggctccc agctccatgc tgtgcctgtg ctccgctct ctcatgcaga 8520
 ggaggaagag cgggtacccc ctgaggatga tgagtactct gaatactccg agtattctgt 8580
 ggaggagtac caggaccctg aagctccttg ggatagtgat gaccctgtt ccctgccact 8640
 ggatgagggc tcctgcactg cctacacctt gcgctggtac catcgggctg tgacaggcag 8700
 cacagaggcc tgtcaccctt ttgtctatgg tggtgtgga gggaatgcca accgttttgg 8760
 gaccctgtag gcctgcgagc gccgctgccc acccgggtg gtccagagcc aggggacagg 8820
 tactgcccag gactgaggcc cagataatga gctgagattc agcatcccct ggaggagtcg 8880
 gggctctcagc agaaccccac tgtccctccc cttggtgcta gaggcttgtg tgcacgtgag 8940
 cgtgcgtgtg cacgtccgtt atttcagtga cttggtcccg tgggtctagc cttccccct 9000
 gtggacaaac cccattgtg gctcctgcca ccctggcaga tgactcactg tgggggggtg 9060
 gctgtgggca gtgagcggat gtgactggcg tctgaccgc cccttgacct aagcctgtga 9120
 tgacatggtg ctgattctgg ggggcattaa agctgctggt ttaaaaggc 9160

<210> 4

<211> 387

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 4

ES 2 620 960 T3

ggccattacg gccgggcagc caggccccag ctgagaataa tgcactggat gggggtggtt 60
 gttgtgtag gggaccccag ttctcactgc tgctctctgg tagtcagaag tgaggggtca 120
 gcccacatctt tcctgctgga gtgagctccc agctgggtag ctggcagcct ttctgtcata 180
 tccctccctg ctctgatgt ctggaggcag tgtagttctt cttaaaagt ggcttggcag 240
 ggcgcggtg ctcacacctg taatcccaac attttgggag gctgaggcag tcgatcacc 300
 tgaggctcag agtttgagac cccagcctat ccaacatggt gaaactccat ctctactaaa 360
 aatacaaaaa ttagcccggc atggtgg 387

<210> 5

5 <211> 561

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 5

10

atthtgggtg gaggccctgg acctagaaac agaaaatgaa agtggagaaa accaaacaag 60
 aatctttctt tcttaaagta aacatcggac tgacatctcc tttcaaacat tcattgagga 120
 tctactctgt gagaagaagc aataccatgt tatctcattc tagttccagt tctagttgac 180
 ttgattgtca aacgactgct aagaagtaga gaggaggctt caccatgttt gccaggctag 240
 tctggaactc ttgacctcag gtgatccacc cacctcggcc tcccaaagtg ctaggattac 300
 aggcatgagc cacctcggcc agctgtttct gtgtcacggt ttgatacttg aataaaaatg 360
 acactttgga gcottgaaaa atggactttc cttctgaagt acccaggaga gtaggatgga 420
 cttcttctc tctccctaca ctatcccttg gagaaaacct tttatcaaga agataccgaa 480
 tatcatcact gatataatgt cagaggaggt cactctctat agcccaacct ccaggatttc 540
 agcacttcgt ggacatggag g 561

<210> 6

<211> 335

15 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 6

20

gggaccagag agctgcgata tggctgaaaa aagtgagtgc aagacaagga cataggatga 60
 aaggggccag tgatggtcag ggacactgga ggacaggagt ctgtgggatc ttagcatgta 120
 ggatgacagg agtcagtgga ctgcagtgag aactgatgag ccattgacag aactgatgt 180
 gggatggcag aggtcagtgc tggatgggga catgcaatga gaggttggtg tacagtggtc 240
 accactaggg taacagaaaag acaggtgatt gagcttgtgg ctgtgcagag gtgaaagccg 300
 aggatgggtg gtgggcagat aggagattgg ttgtt 335

<210> 7

ES 2 620 960 T3

<211> 613
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5 <400> 7

```

    tttttttttt ttttttttaa gagaagatgt ctcgctccgt cgtccaggct ggagcgcagt      60
    ggcgcaatca tggatcactg cagccttgac cttcccgggc tcaagcgatc ctcccggctc      120
    acccccagta gctggaacca caggcgcgct tccacaccgg aaagcccatt ttctagaggc      180
    ggaaaccgaa gcgccctagt ggaaaggcga cccgccgggg atgcgggggtg ctcaacgcgc      240
    tgccacctgg ggccaacgc gttgacctcg cggtcagggt gcttccgcgg actacggttc      300
    tggctcgcta gctctggaac aggcaggaag gagtggggct atctgatagg ggaagatgat      360
    gggagtctaa caggagacgg gaatttgata gaggagatgg tgaataggtc cagtggagga      420
    gtggggaggt ggaggtttta ggaagcagtg agcaggctctg atggaggaga aagtgtaaat      480
    ctacagaggag atttgggtcc agcaaaaaag ggatggggta gggtaggggc agacacaccc      540
    tgttgacagt tcagggctca gtgccatctt ggaagcaga tggataacga gacagggagg      600
    agactatagg gac                                             613
    
```

<210> 8
 10 <211> 177
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 8

15

```

    tcccaccggg tccaggctcag gcccaggggg accagctctg ctcccaccat catcccactc      60
    cccacacagc caagctggac atctgagagc actgcatggc aatcctcatc tgctgtgtg      120
    tctcctcca ctggggacac atgtcatgtg tcagtctctc agcacatgtg tccttct      177
    
```

<210> 9
 <211> 285
 20 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 9

```

    gaactcagac atgcgaccaa gaattggctc acaggagctc agacatgacc atggcctatc      60
    tcaggacagc acagacagag ggacgctcag atactacatc agacaggtgg gagttcaggc      120
    atggcacagg cacagggagc ccacacgcga gtgcagacat ctggctccac agacgtgagt      180
    gcggacacac gggcgctcag aggggaacct caacacgtcc actcccgggt agagcaggca      240
    tggccacagg cttgaacgct gggagccaga ggcagggaca agcag                                             285
    
```

25

<210> 10
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>

	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 10	
5	acatcaggag caggagggga	20
	<210> 11	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 11	
15	ccctaactca acaacatccc	20
	<210> 12	
	<211> 21	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
25	<400> 12	
	tctcaaactc tcgacctcag g	21
	<210> 13	
	<211> 21	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
35	<400> 13	
	gtttcacat gttggctagg c	21
	<210> 14	
	<211> 20	
40	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
45	<400> 14	
	gcctcctctc tacttcttag	20
	<210> 15	
50	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
55	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 15	
	gggatagtgt agggagagag g	21

<210> 16
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 16
 10 cctactctcc tgggtacttc a 21

 <210> 17
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

 20 <400> 17
 ggtgtctgtc ttccttaggg 20

 <210> 18
 <211> 20
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido
 30
 <400> 18
 aattagctgg gcgtggtggc 20

 <210> 19
 35 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 40 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 19
 aatcccagct gctcaggagg 20

 45 <210> 20
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 50 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 20
 55 gcucaaucac cugucuuuucu guuaccc 27

 <210> 21
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido antisentido
 5 <400> 21
 cugccauccc acaucagugu cugucaa 27
 <210> 22
 <211> 27
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido
 15
 <400> 22
 cuccucauc agaccugcuc acugcuu 27
 <210> 23
 20 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Oligonucleótido antisentido
 <400> 23
 gucccuauag ucuccuccu gucucgu 27
 30 <210> 24
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido
 <400> 24
 ggagtgggat gatggtggga 20
 40
 <210> 25
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido
 <400> 25
 50 gcagtgtct cagatgtcca g 21
 <210> 26
 <211> 20
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

ES 2 620 960 T3

<400> 26
 tggagggaga cacacaggca 20

<210> 27
 5 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 10 <223> Oligonucleótido antisentido

<400> 27
 tccctctgtc tggctgtcc t 21

15 <210> 28
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

<400> 28
 gcctgaactc ccacctgtct 20

25 <210> 29
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

<400> 29
 35 ctctggctcc cagcgtcaa 20

<210> 30
 <211> 25
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Complemento inverso del oligonucleótido antisentido de SEQ ID NO: 20

45 <400> 30
 guaacagaaa gacaggugau ugagc 25
 <210> 31
 <211> 25
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Complemento inverso del oligonucleótido antisentido de SEQ ID NO: 21
 <400> 31
 gacagacacu gaugugggau ggcag 25

55 <210> 32
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 620 960 T3

<220>

<223> Complemento inverso del oligonucleótido antisentido de SEQ ID NO: 22

5 <400> 32

gcagugagca ggucugaugg aggag 25

<210> 33

<211> 25

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Complemento inverso del oligonucleótido antisentido de SEQ ID NO: 23

15

<400> 33

gagacagga ggagacuaua gggac 25

REIVINDICACIONES

1. Un oligonucleótido que se dirige a un transcrito antisentido natural de un gen de colágeno para su uso como un compuesto terapéutico, donde el oligonucleótido modula la expresión del gen de colágeno, y donde el transcrito antisentido natural tiene las secuencias de ácido nucleico como se expone en una de las SEQ ID NOs: 4-9.
2. Un oligonucleótido que se dirige a un transcrito antisentido natural de un gen de colágeno para su uso en la prevención o tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado al gen de colágeno, donde el oligonucleótido modula la expresión del gen de colágeno, y donde el transcrito antisentido natural tiene las secuencias de ácido nucleico como se expone en una de las SEQ ID NOs: 4-9.
3. Uso de un oligonucleótido que se dirige a un transcrito antisentido natural de un gen de colágeno para la fabricación de un medicamento para su uso en la prevención o tratamiento de una enfermedad o afección asociada al gen de colágeno, donde el oligonucleótido modula la expresión del gen de colágeno, y donde el transcrito antisentido natural tiene las secuencias de ácido nucleico como se expone en una de las SEQ ID NOs: 4-9.
4. El oligonucleótido para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, o el uso de acuerdo con la reivindicación 3, donde la enfermedad o trastorno asociado al gen de colágeno se selecciona del grupo que consiste en degradación del colágeno relacionado con la edad, osteogénesis imperfecta, otosclerosis (OTSC), osteoporosis, osteoartritis, cáncer de células escamosas del esófago, condrodisplasia, síndrome de Marfan atípico, síndrome de Ehlers-Danlos (EDS), epidermólisis ampullosa distrófica (DEB), enfermedad de Caffey, aneurismas (por ejemplo, aneurismas intracraneales), fibrosis pulmonar idiopática, cirrosis hepática, fibrosis renal, fibrosis hepática, fibrosis del corazón, escleroderma, cicatrices hipertróficas, queloides, cáncer, inflamación, una enfermedad genética (por ejemplo, distrofia muscular de Duchenne), una enfermedad o trastorno neurológico (por ejemplo, enfermedad de Parkinson, de Alzheimer, de Huntington, de Gaucher), una enfermedad metabólica (por ejemplo, diabetes tipo I), una enfermedad o trastorno autoinmune, traumatismo (por ejemplo, lesión medular, quemaduras, etc.), isquemia, y otra enfermedad o trastorno de los vasos sanguíneos, corazón y piel, una enfermedad o trastorno o afección cutánea que requiere reconstrucción de la piel, una enfermedad hepática o renal que requiere trasplante; regeneración de tendón, hueso o tejido; reparación esquelética, reparación de cartílagos y huesos; una afección de la piel causada por inflamación o daño por luz; dermatitis de contacto, dermatitis atópica, queratosis actínica, trastornos de queratinización, una enfermedad de epidermólisis ampullosa, dermatitis exfoliativa, dermatitis seborreica, un eritema, lupus eritematoso discoide, dermatomiositis o cáncer de piel.
5. Un método *in vitro* para modular la expresión de un gen de colágeno en células o tejidos de pacientes que comprende: poner en contacto dichas células o tejido con un oligonucleótido que se dirige a un transcrito antisentido natural de un gen de colágeno; modulando de este modo la expresión del gen de colágeno, donde el transcrito antisentido natural tiene la secuencia de ácidos nucleicos como se expone en una de las SEQ ID NOs: 4-9.
6. El oligonucleótido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 4, o el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 o 4, o el método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 5, donde el oligonucleótido
- a. aumenta la expresión del gen de colágeno; o
a. disminuye la expresión del gen de colágeno.
7. Un oligonucleótido que se dirige a un transcrito antisentido natural de un gen de colágeno, donde el oligonucleótido modula la expresión del gen de colágeno, y donde el transcrito antisentido natural tiene la secuencia de ácido nucleico como se expone en una de las SEQ ID NOs: 4-9.
8. El oligonucleótido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4 o 6, o el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3, 4 o 6, o el método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 5 o la reivindicación 6, o el oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 7, donde el oligonucleótido tiene entre 10 a 30 nucleótidos de longitud.
9. El oligonucleótido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4, 6 u 8, o el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3, 4, 6 u 8, o el método *in vitro* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5, 6 u 8, o el oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 7 o la reivindicación 8, donde el oligonucleótido tiene al menos el 90 % de identidad de secuencia con respecto a un complemento de un transcrito antisentido natural del gen de colágeno.

10. El oligonucleótido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4, 6, 8 o 9, o el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3, 4, 6, 8 o 9, o el método *in vitro* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5, 6, 8 o 9, o el oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, donde el oligonucleótido es monocatenario.
11. El oligonucleótido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4, 6, 8 o 9, o el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3, 4, 6, 8 o 9, o el método *in vitro* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5, 6, 8 o 9, o el oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, donde el oligonucleótido es un compuesto de siRNA.
12. El oligonucleótido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4, 6 u 8 a 11, o el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3, 4, 6 u 8 a 11, o el método *in vitro* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5, 6 u 8 a 11, o el oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, donde el oligonucleótido comprende al menos una de las SEQ ID NOs: 10-12 y 14-33.
13. El oligonucleótido para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, o el uso de acuerdo con la reivindicación 11, o el método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 11, o el oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 11, donde el compuesto de siRNA comprende al menos un oligonucleótido seleccionado de entre las SEQ ID NOs: 20 a 23 y una secuencia de complemento inversa de dicho oligonucleótido seleccionada de entre las SEQ ID NOs: 30 a 33.
14. El oligonucleótido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4, 6 u 8 a 13, o el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3, 4, 6 u 8 a 13, o el método *in vitro* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5, 6 u 8 a 13, o el oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 13, donde
- a. la expresión del gen de colágeno se aumenta en al menos el 10 %; o
- b. la expresión de un gen de colágeno se disminuye en al menos el 10 %.
15. El oligonucleótido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4, 6 u 8 a 14, o el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3, 4, 6 u 8 a 14, o el método *in vitro* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5, 6 u 8 a 14, o el oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 14, donde el oligonucleótido comprende además una o más modificaciones que comprenden
- a. al menos un enlace internucleósido modificado seleccionado de entre: un fosforotioato, 2'-ometoxietilo (MOE), 2'-fluoro, alquifosfonato, fosforoditioato, alquifosfonotioato, fosforamidato, carbamato, carbonato, fosfato triéster, acetamidato, carboximetil éster, y combinaciones de los mismos;
- b. al menos un nucleótido modificado seleccionado de entre: un ácido nucleico peptídico (PNA), un ácido nucleico bloqueado (LNA), un ácido arabino-nucleico, un análogo, un derivado, y combinaciones de los mismos; o
- c. al menos un resto de azúcar modificado seleccionado de entre: un resto de azúcar modificado con 2'-O-metoxietilo, un resto de azúcar modificado con 2'-metoxi, un resto de azúcar modificado con 2'-O-alquilo, un resto de azúcar bicíclico, y combinaciones de los mismos.
16. Una composición farmacéutica que comprende al menos un oligonucleótido que tiene las características de un oligonucleótido definido en cualquiera de las reivindicaciones 7 a 15 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
17. Uso de un oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 15 en un método cosmético.
18. Uso de un oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 17 para tratar una indicación cosmética seleccionada de entre envejecimiento de la piel, afección cutánea causada por la edad, el desarrollo de arrugas o un efecto del envejecimiento natural.

Figura 1

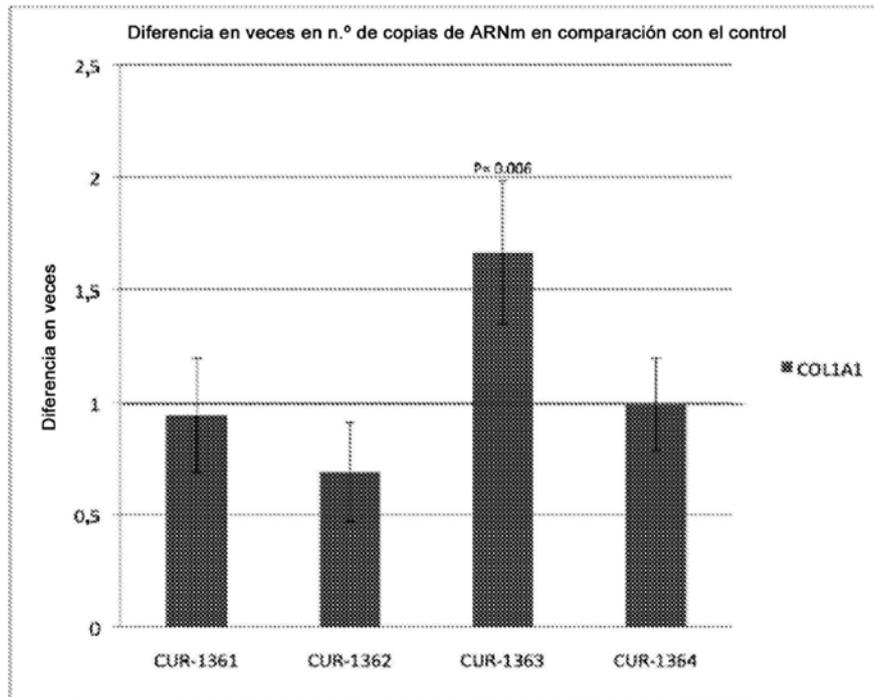


Figura 2

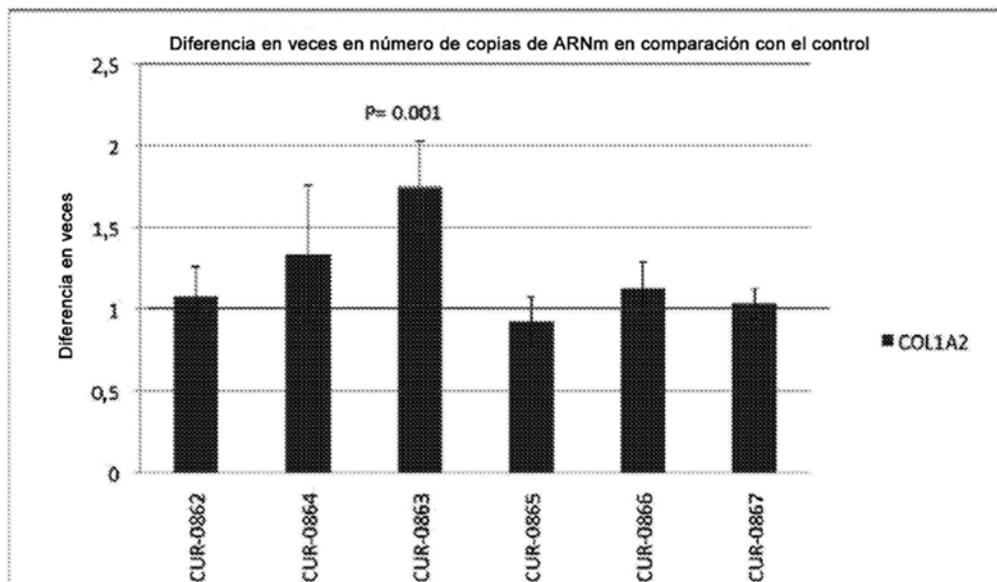


Figura 3

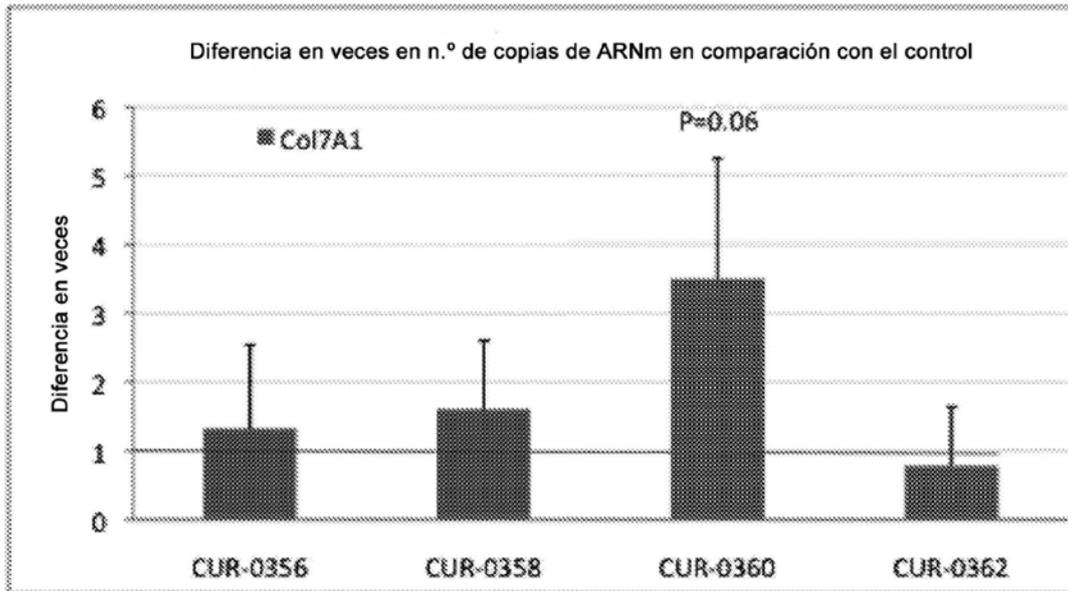


Figura 4

