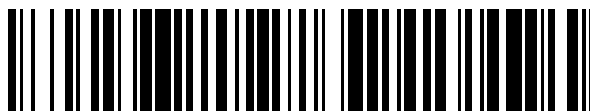


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 627 763**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/63** (2006.01)

**C12N 15/113** (2010.01)

**C07H 21/00** (2006.01)

**A61K 48/00** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.03.2010 PCT/US2010/027403**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.09.2010 WO10107740**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.03.2010 E 10753955 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.03.2017 EP 2408920**

54 Título: **Tratamiento de enfermedades relacionadas con el homólogo tipo delta 1 (DLK1) por inhibición de transcrito antisentido natural a DLK1**

30 Prioridad:

**17.03.2009 US 160758 P**

**14.05.2009 US 178195 P**

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

**31.07.2017**

73 Titular/es:

**CURNA, INC. (100.0%)  
4400 Biscayne Boulevard  
Miami, FL 33137, US**

72 Inventor/es:

**COLLARD, JOSEPH;  
KHORKOVA SHERMAN, OLGA y  
COITO, CARLOS**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**ES 2 627 763 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Tratamiento de enfermedades relacionadas con el homólogo tipo delta 1 (DLK1) por inhibición de transcrito antisentido natural a DLK1

5

### Referencia a las solicitudes anteriores

La presente solicitud reivindica la prioridad de la solicitud de patente provisional de EE.UU. con nº 61/160.758, titulada "Tratamiento para la parálisis de nervio y trastornos asociados," depositada el 17 de marzo de 2009 y la solicitud de patente provisional de EE.UU. con nº 61/178.195, titulada "Oligonucleótidos antisentido de tipo Delta 1," depositada el 14 de mayo de 2009.

10

### Campo de la divulgación

Aspectos de la divulgación comprenden oligonucleótidos que modulan la expresión y/o la función de DLK1 y moléculas asociadas.

15

### Antecedentes

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

Simao Texeira Da Rocha et al. 2009, PLOS Genetics, vol.5(2):e10000392, describe los efectos de la dosis génica del Dlk1/Pref1 en su desarrollo así como sus implicaciones para la evolución de la impronta.

Sun et al. 2008, Journal of Cell Science, vol.121(22):3815-3823, describe el papel de la eliminación del Dlk1 en la diferenciación y autoregeneración de células musculares.

La 2005/272080 de EE.UU. describe métodos de análisis de las muestras de ácido nucleico degradadas.

20

25

30

35

### Resumen de la invención

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

40

### Compendio de la descripción

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

45

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

50

Un aspecto proporciona un procedimiento de modulación de la función y/o la expresión de un polinucleótido de DLK1 en células o tejidos del paciente *in vivo* o *in vitro* que comprende poner en contacto dichas células o tejidos con un oligonucleótido antisentido de 5 a 30 nucleótidos de longitud, donde dicho oligonucleótido tiene al menos un 50% de identidad de secuencia con un complemento inverso de un polinucleótido que comprende de 5 a 30 nucleótidos consecutivos dentro de los nucleótidos 1 a 1347 de la SEQ ID NO: 3 (Figura 3) modulando de este modo la función y/o la expresión del polinucleótido de DLK1 en células o tejidos del paciente *in vivo* o *in vitro*.

55

En otro caso preferido, un oligonucleótido se dirige a una secuencia antisentido natural de polinucleótidos de DLK1,

60

por ejemplo, nucleótidos expuestos en SEQ ID NO: 3, y cualquier variante, alelo, homólogo, mutante, derivado, fragmento y secuencia complementaria a los mismos. Ejemplos de oligonucleótidos antisentido se exponen como las SEQ ID NO: 4 a 5 (Figura 4).

5 Otro aspecto proporciona un procedimiento de modulación de la función y/o la expresión de un polinucleótido del DLK1 en células o tejidos del paciente in vivo o in vitro, que comprende poner en contacto dichas células o tejidos con un oligonucleótido antisentido de 5 a 30 nucleótidos de longitud, donde dicho oligonucleótido tiene al menos un 50% de identidad de secuencia con un complemento inverso del antisentido del polinucleótido del DLK1; modulando de este modo la función y/o la expresión del polinucleótido del DLK1 en células o tejidos del paciente in vivo o in vitro.

Otro aspecto proporciona un procedimiento de modulación de la función y/o la expresión de un polinucleótido del DLK1 en células o tejidos del paciente in vivo o in vitro, que comprende poner en contacto dichas células o tejidos con un oligonucleótido antisentido de 5 a 30 nucleótidos de longitud, donde dicho oligonucleótido tiene al menos un 50% de identidad de secuencia con un oligonucleótido antisentido para un polinucleótido antisentido del DLK1; modulando de este modo la función y/o la expresión del polinucleótido del DLK1 en células o tejidos del paciente in vivo o in vitro.

En un caso preferido, una composición comprende uno o más oligonucleótidos antisentido que se unen a polinucleótidos de DLK1 sentido y/o antisentido.

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

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

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

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

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

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

Otros aspectos se describen más adelante.

### Breve descripción de los dibujos

45

Figura 1:

La figura 1A es un gráfico de resultados de PCR en tiempo real que muestra el cambio en veces + la desviación estándar en ARNm de DLK1 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 del DLK1 en células HepG2 se incrementan significativamente 48 h después del tratamiento con dos de los oligonucleótidos diseñados para HS.697829 antisentido del DLK1. Las barras indicadas como CUR-0338 y CUR-0340 se corresponden con muestras tratadas con las SEQ ID NO: 4 y 5 respectivamente.

La Figura 2 muestra

la SEQ ID NO: 1: Homólogo (Drosophila) tipo delta 1 de homo sapiens (DLK1), ARNm (Nº de acceso del NCBI NM\_003836)

la SEQ ID NO: 2: Secuencia genómica de DLK1 (se muestran exones en letras mayúsculas, intrones en minúscula).

La Figura 3 muestra la SEQ ID NO: 3: Secuencia antisentido de DLK1 natural (HS.697829)

La Figura 4 muestra los oligonucleótidos antisentido, las SEQ ID NO: 4 al 5. \* indica enlace fosforotioato.

La figura 5 muestra los oligonucleótidos sentido, SEQ ID NO: 6 y 7. Los oligonucleótidos sentido, la SEQ ID NO: 6 y 7 son los complementos inversos de los oligonucleótidos antisentido, SEQ ID NO: 4 y 5 respectivamente.

### Descripción detallada de la divulgación

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

La DLK1 (tipo delta) es una proteína transmembrana y secretada en la familia homeótica tipo factor de crecimiento epidérmico. La glicoproteína transmembrana posee seis motivos tipo factor de crecimiento epidérmico en el dominio extracelular, similares a aquellos presentes en la familia Delta/Notch/Serrate de moléculas de señalización. En contraste a otros ligandos de NOTCH, el DLK1 no tiene el dominio Delta:Serrate:Lin-12 (DSL) que se cree que media en la interacción y activación del receptor NOTCH. Sin embargo, DLK1 puede interactuar con NOTCH a través de repeticiones específicas tipo EGF y puede actuar como un antagonista Notch, tanto en cultivo como in vivo, uniéndose al receptor sin activarlo. In vitro, Dlk1 mantiene poblaciones de células precursoras e inhibe la diferenciación. Dlk1 se expresa en altos niveles en una amplia variedad de tejidos embrionarios. Aunque se expresa ampliamente durante el desarrollo embrionario, sólo unos pocos tejidos retienen la expresión en adultos. La expresión en el mesencéfalo del homólogo tipo delta 1 (DLK1) se regula por el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF) y se asocia con diferenciación dopaminérgica (Christophersen Nicolaj S et al., *Experimental Neurology* 2007;204(2):791-801).

La familia derivada de la glía (GDNF) de factores neurotróficos incluye cuatro miembros: factor neurotrófico derivado de línea de células gliales (GDNF), neurturina, artemina, y persefina (PSPN). Los ligandos de la familia GDNF señalizan a través de receptores que consisten en una subunidad GFRA enlazada a GPI y el receptor transmembrana tirosina-cinasa RET. Con el fin de activar el receptor transmembrana tirosina-cinasa Ret, cada uno de los factores neurotróficos de la familia GDNF se une preferencialmente a uno de los a-receptores de la familia GDNF enlazados a glicosil-fosfatidilinositol (GPI) (GFRA1-4). El GDNF es una proteína que se puede identificar en, u obtener de, células gliales y que muestra actividad neurotrófica. De manera más específica, el GDNF es una proteína neurotrófica dopaminérgica que se caracteriza en parte por su capacidad para incrementar la captación de dopamina en los precursores embrionarios de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra, y además por su capacidad de promover la supervivencia de células nerviosas simpáticas.

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

### Definiciones

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

El término «aproximadamente» significa dentro de un intervalo de error aceptable para el valor particular como se ha determinado por un experto habitual en la materia, que dependerá en parte de cómo se mide o determina el valor, es decir, las limitaciones del sistema de medición. Por ejemplo, «alrededor de» puede significar 1 o más de 1 de desviación estándar, conforme a la práctica de la técnica. Como alternativa, "aproximadamente" puede significar un

intervalo de hasta el 20%, preferentemente hasta el 10%, más preferentemente hasta el 5%, y más preferentemente todavía hasta el 1% de un valor dado. De manera alternativa, en particular con respecto a los sistemas o procesos biológicos, el término pueden significar un orden de magnitud de un valor preferentemente comprendido en 5 veces y más preferentemente, comprendido en 2 veces. En los casos en los que se describen valores particulares en la solicitud y las reivindicaciones, a menos que se exprese lo contrario, el término «alrededor de» significa que se debe asumir que el valor se encuentra comprendido en un intervalo de error aceptable para el valor particular.

5 Tal como se usa en el presente documento, el término "ARNm" significa (el) los transcrito(s) de ARNm actualmente conocidos de un gen elegido como diana, y cualquier transcrito adicional que pueda ser dilucidado.

10 Por "oligonucleótidos antisentido" o "compuesto antisentido" se indica una molécula de ARN o de ADN que se une a otro ARN o ADN (ARN, ADN diana). Por ejemplo, si éste es un oligonucleótido de ARN, se une a otra diana de ARN por medio de interacciones ARN-ARN y altera la actividad del ARN diana (Eguchi et al., (1991) Ann. Rev. Biochem. 60, 631-652). Un oligonucleótido antisentido puede regular positivamente o regular negativamente la expresión y/o  
 15 función de un polinucleótido particular. La definición pretende comprender cualquier molécula de ARN o A DN extraña que es útil desde un punto de vista terapéutico, de diagnóstico u otro. Dichas moléculas incluyen, por ejemplo, moléculas de ARN o A DN antisentido, ARN de interferencia (iARN), micro ARN, moléculas de ARN señuelo, siRNA, ARN enzimático, ARN de edición terapéutica y ARN agonista y antagonista, compuestos oligoméricos antisentido, oligonucleótidos antisentido, oligonucleótidos de secuencia guía externa (EGS), agentes de splicing alternativos, cebadores, sondas y otros compuestos oligoméricos que hibridan con al menos una parte del  
 20 ácido nucleico diana. Por lo tanto, estos compuestos pueden introducirse en forma de compuestos oligoméricos monocatenarios, bicatenarios, parcialmente monocatenarios, o circulares.

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

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

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

Tal como se usa en el presente documento, "DLK1" y "homólogo tipo Delta 1" son incluyentes de todos los miembros de la familia, mutantes, alelos, fragmentos, especies, secuencias codificadoras y no codificadoras, cadenas de  
 55 polinucleótido sentido y antisentido, etc.

Tal como se usa en el presente documento, las palabras "homólogo tipo Delta 1", DLK1, DLK, DLK-1, FA1, pG2, PREF1, Pref-1, homólogo 1 de proteína delta, ZOG se utilizan de manera indistinta en la presente solicitud.

60 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "oligonucleótido específico para" u "oligonucleótido que se

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

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

La interferencia de ARN "iARN" está mediada por moléculas de ARN bicatenario (dsARN) que tienen homología específica de secuencia con sus secuencias de ácido nucleico "diana" (Caplen, N. J., et al. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:9742-9747). En ciertos casos de la presente divulgación, los mediadores son dúplex de A RN "interferente pequeño" (siRNA) de 5-25 nucleótidos. Los siRNA se derivan del procesamiento de dsARN mediante una enzima ARNasa conocida como Dicer (Bernstein, E., et al. (2001) Nature 409:363-366). Los productos dúplex de siRNA se emplean en un complejo de siRNA multiproteína llamado RISC (Complejo Silenciador Inducido por ARN). Sin desear ceñirse a ninguna teoría particular, se cree entonces que un RISC es guiado a un ácido nucleico diana (adecuadamente ARNm), en el que el dúplex de siRNA interactúa de una forma específica de secuencia para mediar en la escisión en un modo catalítico (Bernstein, E., et al. (2001) Nature 409:363-366; Boutla, A., et al. (2001) Curr. Biol. 11:1776-1780). Los ARN interferentes pequeños que pueden usarse de acuerdo con la presente divulgación pueden sintetizarse y usarse de acuerdo con procedimientos que son bien conocidos en la técnica y que serán familiares para el experto en la materia. Los ARN interferentes pequeños para su uso en los procedimientos de la presente divulgación comprenden adecuadamente entre aproximadamente 1 y aproximadamente 50 nucleótidos (nt). En los ejemplos de aspectos no limitantes, los siRNA pueden comprender aproximadamente 5 a aproximadamente 40 nt, aproximadamente 5 a aproximadamente 30 nt, aproximadamente 10 a aproximadamente 30 nt, aproximadamente 15 a aproximadamente 25 nt, o aproximadamente 20-25 nucleótidos.

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

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

Por "ARN señuelo" se indica una molécula de ARN que imita el dominio de unión natural para un ligando. El ARN señuelo compete, por lo tanto, con la diana de unión natural para la unión de un ligando específico. Por ejemplo, se ha mostrado que la sobreexpresión de ARN de respuesta de activación en trans (TAR) de HIV puede actuar como un "señuelo" y se une de forma eficiente a la proteína tat de HIV, impidiendo de este modo que se una a secuencias

TAR codificadas por el ARN de HIV (Sullenger et al. (1990) Cell, 63, 601- 608). Esto se indica que es un ejemplo específico. Los expertos en la materia reconocerán que esto es solo un ejemplo, y fácilmente pueden generarse otros aspectos usando técnicas generalmente conocidas en la técnica.

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

10

El término "nucleótido" cubre nucleótidos de origen natural, así como nucleótidos no de origen natural. Debe ser evidente para el experto en la materia que diversos nucleótidos que se consideraron anteriormente "no de origen natural" se han descubierto posteriormente en la naturaleza. De este modo, "nucleótidos" incluye no solamente las moléculas que contienen heterociclos de purina y pirimidina conocidas, sino también análogos heterocíclicos y tautómeros de las mismas. Ejemplos ilustrativos de otros tipos de nucleótidos son moléculas que contienen adenina, guanina, timina, citosina, uracilo, purina, xantina, diaminopurina, 8-oxo- N6-metiladenina, 7-deazaxantina, 7-deazaguanina, N4,N4-etanocitosina, N6,N6-etano-2,6- diaminopurina, 5-metilcitosina, 5-alquilil(C3-C6)-citosina, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, seudoisocitosina, 2-hidroxi-5-metil-4-triazolopiridina, isocitosina, isoguanina, inosina y los nucleótidos "no de origen natural" descritos en Benner y col., patente de EE.UU. nº 5.432.272. El término "nucleótido" pretende cubrir todos y cada uno de estos ejemplos, además de análogos y tautómeros de los mismos. Nucleótidos especialmente interesantes son aquellos que contienen adenina, guanina, timina, citosina y uracilo, que se consideran como los nucleótidos de origen natural en relación con la aplicación terapéutica y diagnóstica en seres humanos. Los nucleótidos incluyen los azúcares naturales 2'-desoxi y 2'-hidroxilo, por ejemplo, como se describe en Kornberg y Baker, DNA Replication, 2nd Ed. (Freeman, San Francisco, 1992), además de sus análogos.

25

"Análogos", en referencia a nucleótidos, incluye nucleótidos sintéticos que tienen restos de bases modificados y/o restos de azúcar modificados (véase, por ejemplo, descrito generalmente por Scheit, Nucleotide Analogs, John Wiley, New York, 1980; Freier & Altmann, (1997) Nucl. Acid. Res., 25(22), 4429- 4443, Toulmé, J.J., (2001) Nature Biotechnology 19:17-18; Manoharan M., (1999) Biochemica et Biophysica Acta 1489:117-139; Freier S. M., (1997) Nucleic Acid Research, 25:4429-4443, Uhlman, E., (2000) Drug Discovery & Development, 3: 203-213, Herdewin P., (2000) Antisense & Nucleic Acid Drug Dev., 10:297-310); 2'-O, 3'-C-enlazados [3.2.0] biclorabinonucleósidos (véase, por ejemplo, N.K Christensen., et al, (1998) J. Am. Chem. Soc., 120: 5458-5463; Prakash TP, Bhat B. (2007) Curr Top Med Chem. 7(7):641-9; Cho EJ, et al. (2009) Annual Review of Analytical Chemistry, 2, 241-264). Dichos análogos incluyen nucleótidos sintéticos diseñados para potenciar propiedades de unión, por ejemplo, la estabilidad especificidad del dúplex o el tríplex, o similares.

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

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

50

Tal como se usa en el presente documento, la frase "condiciones de hibridación astringentes" o "condiciones astringentes" se refiere a condiciones en las que un compuesto de la divulgación hibridará con su secuencia diana, pero con un número mínimo de otras secuencias. Las condiciones astringentes son dependientes de secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias y en el contexto de esta divulgación, "condiciones astringentes" en las que compuestos oligoméricos hibridan con una secuencia diana se determinan mediante la naturaleza y la composición de los compuestos oligoméricos y los ensayos en los que están siendo investigados. En general, las condiciones de hibridación astringentes comprenden bajas concentraciones (<0,15 M) de sales con cationes inorgánicos tales como Na<sup>++</sup> o K<sup>++</sup> (es decir, baja fuerza iónica), temperatura superior a 20 °C - 25 °C por debajo de la Tm del complejo de compuesto oligomérico: secuencia diana, y la presencia de desnaturalizantes tales como formamida, dimetilformamida, dimetilsulfóxido, o el detergente dodecilsulfato de sodio (SDS). Por ejemplo, la tasa de

60

hibridación disminuye un 1,1% por cada 1% de formamida. Un ejemplo de una condición de hibridación de alta astringencia es 0,1X tampón cloruro sódico-citrato sódico (SSC)/0,1 % (peso/volumen) de SDS a 60 °C durante 30 minutos.

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

Se entiende en la técnica que no es necesario que la secuencia de un compuesto oligomérico sea un 100 % complementaria a la de su ácido nucleico diana para ser específicamente hibridable. Además, un oligonucleótido puede hibridarse sobre uno o más segmentos, de modo que segmentos intermedios o adyacentes no estén  
 20 implicados en el acontecimiento de hibridación (por ejemplo, una estructura en bucle, desapareamiento o estructura de horquilla). Los compuestos oligoméricos de la presente divulgación comprenden al menos aproximadamente el 70%, o al menos aproximadamente el 75%, o al menos aproximadamente el 80%, o al menos aproximadamente el 85%, o al menos aproximadamente el 90%, o al menos aproximadamente el 95%, o al menos aproximadamente el 99%, de complementariedad de secuencia con una región diana dentro de la secuencia de ácidos nucleicos diana a  
 25 la que se dirigen. Por ejemplo, un compuesto antisentido en el que 18 de los 20 nucleótidos del compuesto antisentido son complementarios a una región diana y, por lo tanto, hibridarían específicamente, representaría el 90 por ciento de complementariedad. En este ejemplo, los nucleótidos no complementarios restantes pueden agruparse o intercalarse con nucleótidos complementarios y no necesitan ser contiguos entre sí o a nucleótidos complementarios. Por lo tanto, un compuesto antisentido que tiene 18 nucleótidos de longitud que tiene 4 (cuatro)  
 30 nucleótidos no complementarios que están flanqueados por dos regiones de complementariedad completa con el ácido nucleico diana tendría el 77,8% de complementariedad global con el ácido nucleico diana y de este modo estaría dentro del alcance de la presente divulgación. El porcentaje de complementariedad de un compuesto antisentido con una región de un ácido nucleico diana puede determinarse rutinariamente usando programas BLAST (herramientas de búsqueda de alineamientos locales básicos) y programas PowerBLAST conocidos en la técnica  
 35 (Altschul et al., (1990) J. Mol. Biol., 215, 403-410; Zhang y Madden, (1997) Genome Res., 7, 649-656). El porcentaje de homología, identidad de secuencias o complementariedad pueden determinarse por, por ejemplo, el programa Gap (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison Wis.), usando parámetros por defecto, que usa el algoritmo de Smith y Waterman (Adv. Appl. Math., (1981) 2, 482-489).

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

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

El término "variante", cuando se usa en el contexto de una secuencia de polinucleótidos, puede englobar una secuencia de polinucleótidos relacionada con un gen de tipo silvestre. Esta definición también puede comprender, por ejemplo, variantes "alélicas", de "splicing", de "especie" o "polimórficas". Una variante de splicing puede tener  
 55 identidad significativa con una molécula de referencia, pero generalmente tendrá un mayor o menor número de polinucleótidos debido al splicing alterno de exones durante el procesamiento de ARNm. El polipéptido correspondiente puede poseer dominios funcionales adicionales o una ausencia de dominios. Las variantes de especie son secuencias de polinucleótidos que varían de una especie a otra. Son de particular utilidad en la divulgación variantes de productos génicos de tipo silvestre (wild type). Las variantes pueden resultar de al menos  
 60 una mutación en la secuencia de ácidos nucleicos y pueden producir ARNm alterados o polipéptidos cuya estructura



o función puede o puede no alterarse. Cualquier gen natural o recombinante dado puede tener ninguna, una o muchas formas alélicas. Cambios mutacionales comunes que dan lugar a variantes se atribuyen generalmente a deleciones, adiciones o sustituciones naturales de nucleótidos. Cada uno de estos tipos de cambios puede producirse solo, o en combinación con los otros, una o más veces en una secuencia dada.

5

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

10

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

15

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

20

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

25

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

30

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

35

Tal como se usa en el presente documento, "cáncer" se refiere a todo tipo de cáncer o neoplasia o tumores malignos descubiertos en mamíferos, incluyendo, aunque sin limitarse a: leucemias, linfomas, melanomas, carcinomas y sarcomas. El propio cáncer se manifiesta como un "tumor" o tejido que comprende células malignas del cáncer. Los ejemplos de tumores incluyen sarcomas y carcinomas como tales, pero no limitado a: fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomioma, rhabdomioma, carcinoma de colon, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer ovárico, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándula sudorípara, carcinoma de glándula sebácea, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de conductos biliares, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrional, tumor de Wilms, cáncer cervical, tumor testicular, carcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón de células pequeñas, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma, y retinoblastoma. Los cánceres adicionales que se pueden tratar para la composición descrita de acuerdo a la divulgación incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, mieloma múltiple, neuroblastoma, cáncer de mama, cáncer ovárico, cáncer de pulmón, rhabdomioma, trombocitosis primaria, macroglobulinemia primaria, tumores de pulmón de células pequeñas, tumores primarios de cerebro, cáncer de estómago, cáncer de colon, insulinooma pancreático maligno, carcinoma maligno, cáncer de vejiga urinaria, lesiones premalignas cutáneas, cáncer testicular, linfomas, cáncer de tiroides, neuroblastoma, cáncer

45

50

55

60

esofágico, cáncer de tracto genitourinario, hipercalcemia maligna, cáncer cervical, cáncer endometrial, cáncer cortical adrenal, y cáncer de próstata.

"Enfermedad o trastorno neurológico" se refiere a cualquier enfermedad o trastorno del sistema nervioso y/o sistema visual. "Enfermedad o trastorno neurológico" incluye enfermedades o trastornos que implican al sistema nervioso central (cerebro, tronco del encéfalo y cerebelo), el sistema nervioso periférico (incluyendo los nervios craneales), y el sistema nervioso autónomo (partes del cual están ubicadas en el sistema nervioso tanto central como periférico). Los ejemplos de trastornos neurológicos incluyen, aunque sin limitarse a, cefalea, estupor y coma, demencia, convulsiones, trastornos del sueño, traumatismo, infecciones, neoplasias, neurooftalmología, trastornos del movimiento, enfermedades desmielinizantes, trastornos de la médula espinal, y trastornos de los nervios periféricos, el músculo y las uniones neuromusculares. La adicción y la enfermedad mental, incluyen, aunque sin limitarse a, trastorno bipolar y esquizofrenia, se incluyen también en la definición de trastorno neurológico. La siguiente es una lista de varios trastornos, síntomas, signos y síndromes neurológicos que pueden ser tratados usando las composiciones y procedimientos de acuerdo con la presente divulgación: afasia adquirida epileptiforme; encefalomiелitis diseminada aguda; adrenoleucodistrofia; degeneración macular relacionada con la edad; agenesia del cuerpo calloso; agnosia; síndrome de Aicardi; enfermedad de Alexander; enfermedad de Alpers; hemiplejía alterna; demencia vascular; esclerosis lateral amiotrófica; anencefalia; síndrome de Angelman; angiomatosis; anoxemia; afasia; apraxia; quistes aracnoideos; aracnoiditis; malformación de Chiari Anroni; malformación arteriovenosa; síndrome de Asperger; telegiectasia ataxia; trastorno de hiperactividad y déficit de atención; autismo; disfunción autónoma; dolor de espalda; enfermedad de Batten; enfermedad de Behcet; parálisis de Bell; blefaroespasma esencial benigno; focal benigna; amiotrofia; hipertensión intracraneal benigna; enfermedad de Binswanger; blefaroespasma; síndrome de Bloch Sulzberger; lesión del plexo braquial; absceso cerebral; lesión cerebral; tumores cerebrales (incluyendo glioblastoma multiforme); tumor medular; síndrome de Brown-Sequard; enfermedad de Canavan; síndrome del túnel carpiano; causalgia; síndrome de dolor central; mielínolisis pontina central; trastorno encefálico; aneurisma cerebral; arteriosclerosis cerebral; atrofia cerebral; gigantismo cerebral; parálisis cerebral; enfermedad de Charcot-Marie-Tooth; neuropatía inducida por quimioterapia y dolor neuropático; malformación de Chiari; corea; polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica; dolor crónico; síndrome de dolor crónico regional; síndrome de Coffin Lowry; coma, incluyendo estado vegetativo persistente; diplejía facial congénita; degeneración corticobasal; arteritis craneal; craneosinostosis; enfermedad de Creutzfeldt-Jakob; trastornos por traumatismo acumulativo; síndrome de Cushing; enfermedad de cuerpos de inclusión citomegálicos; infección por citomegalovirus; síndrome de ojos danzantes y pies danzantes; síndrome DandyWalker; enfermedad de Dawson; síndrome de Morsier; parálisis de Dejerine-Klumke; demencia; dermatomiositis; neuropatía diabética; esclerosis difusa; disautonomía; disgrafía; dislexia; distonías; encefalopatía epiléptica infantil temprana; síndrome de la silla vacía; encefalitis; encefaloceles; 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 globosas; síndrome de Guillain-Barré; mielopatía asociada HTLV-1; enfermedad Hallervorden-Spatz; traumatismo craneoencefálico; cefalea; espasmo hemifacial; paraplejía espástica; hereditaria atáctica polineurítica; herpes zóster óptico; herpes zóster; síndrome de Hirayama; demencia y la neuropatía asociadas a HIV (también manifestaciones neurológicas del SIDA); holoprosencefalia; enfermedad de Huntington y otras enfermedades de repetición de poliglutamina; hidranencefalia; hidrocefalia; hipercortisolismo; hipoxia; encefalomiелitis mediada por inmunidad; miositis por cuerpos de inclusión; incontinencia pigmentaria; enfermedad de almacenamiento de ácido fitánico infantil; enfermedad de Refsum infantil; espasmos infantiles; miopatía inflamatoria; quiste intracraneal; hipertensión intracraneal; síndrome de Joubert; síndrome de Kearns-Sayre; enfermedad de Kennedy, síndrome de Kinsbourne; síndrome de Klippel Feil; enfermedad de Krabbe; enfermedad Kugelberg-Welander; kuru; enfermedad de Lafora; síndrome miasténico de Lambert-Eaton; síndrome de Landau-Kleffner; síndrome lateral medular (Wallenberg); dificultades de aprendizaje; enfermedad de Leigh; síndrome de Lennox-Gustaut; síndrome de Lesch-Nyhan; leucodistrofia; demencia con cuerpos de Lewy; lisencefalia; síndrome de enclaustramiento; enfermedad de Lou Gehrig (es decir, enfermedad de las neuronas motoras o esclerosis lateral amiotrófica); enfermedad del disco lumbar; La enfermedad de Lyme - secuelas neurológicas; enfermedad de Machado-Joseph; macrocefalia; megalocefalia; síndrome de Melkesson-Rosenthal; enfermedad de Meniere; meningitis; enfermedad de Menkes; leucodistrofia metacromática; microcefalia; migraña; síndrome de Miller Fisher; mini derrames; miopatías mitocondriales; síndrome de Moebius; amiotrofia monomérica; enfermedad de la neuronas motoras; enfermedad de Moyamoya; mucopolisacaridosis; demencia multiinfarto; neuropatía motora multifocal; esclerosis múltiple y otras enfermedades desmielinizantes; atrofia de múltiples sistemas con hipotensión postural; distrofia muscular; miastenia grave; esclerosis difusa mielínoclastica; encefalopatía mioclónica de los lactantes; mioclonía; miopatía; mionía congénita; narcolepsia; neurofibromatosis; síndrome neuroléptico maligno; manifestaciones neurológicas del SIDA; secuelas neurológicas del lupus; neuromiotonía; lipofuscinosis cerioidea; trastornos de la migración neuronal; enfermedad de Niemann-Pick; síndrome de McLeod- O'Sullivan; neuralgia occipital; secuencia de espina bífida

oculta; síndrome Ohtahara; atrofia olivopontocerebelosa; opsoclonio-mioclonio; neuritis óptica; hipotensión ortostática; síndrome de sobreuso; parestesia; enfermedad o trastorno neurodegenerativo (enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica (ALS), demencia, esclerosis múltiple y otras enfermedades y trastornos asociados con la muerte celular neuronal); paramiotonía congénita; enfermedades paraneoplásicas; ataques paroxísticos; síndrome de Parry Romberg; enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher; parálisis periódicas; neuropatía periférica; neuropatía dolorosa y dolor neuropático; estado vegetativo persistente; trastornos profundos del desarrollo; reflejo de estornudo fótico; enfermedad de almacenamiento de ácido fitánico; enfermedad de Pick; nervio pinzado; tumores de la hipófisis; polimiositis; pencefalía; síndrome post-polio; neuralgia postherpética; encefalomiелitis postinfecciosa; hipotensión postural; síndrome de Prader-Willi; esclerosis lateral primaria; enfermedades priónicas; atrofia hemifacial progresiva; leucoencefalopatía multifocal progresiva; poliodistrofia esclerosante progresiva; parálisis supranuclear progresiva; seudotumor cerebral; síndrome de Ramsay-Hunt (tipos I y II); encefalitis de Rasmussen; síndrome de distrofia simpática refleja; enfermedad de Refsum; trastornos por movimientos repetitivos; lesiones por esfuerzo repetitivo; síndrome de piernas inquietas; mielopatía asociada a retrovirus; síndrome de Rett; síndrome de Reye; baile de San Vito; enfermedad de Sandhoff; enfermedad de Schilder; esquizencefalía; displasia septo-óptica; síndrome del bebé zarandeado; herpes; síndrome de Shy-Drager; síndrome de Sjogren; apnea del sueño; síndrome de Soto; espasticidad; espina bífida; lesión de la médula espinal; tumores de la médula espinal; atrofia muscular en la columna; síndrome de Stiff-Person; accidente cerebrovascular; síndrome de Sturge-Weber; panencefalitis esclerosante subaguda; encefalopatía arteriosclerótica subcortical; corea de Sydenham; síncope; siringomielia; discinesia tardía; enfermedad de Tay-Sachs; arteritis temporal; síndrome de médula espinal anclada; enfermedad de Thomsen; síndrome del opérculo torácico; Tic Douloureux; parálisis de Todd; Síndrome de Tourette; ataque isquémico transitorio; encefalopatías espongiiformes transmisibles; mielitis transversa; lesión cerebral traumática; temblor; neuralgia trigeminal; paraparesia espástica tropical; esclerosis tuberosa; demencia vascular (demencia multiinfarto); vasculitis incluyendo arteritis temporal; enfermedad de Von Hippel-Lindau; síndrome de Wallenberg; enfermedad de Werdniger-Hoffman; síndrome de West; latigazo cervical; síndrome de Williams; enfermedad de Wilson; y síndrome de Zellweger.

Una "inflamación" se refiere a condiciones inflamatorias sistémicas y condiciones asociadas localmente con migración y atracción de monocitos, leucocitos y/o neutrófilos. Los ejemplos de inflamación incluyen, pero no se limitan a, inflamación que resulta de infección con organismos patógenos (incluyendo bacterias gram-positivas, bacterias gram-negativas, virus, hongos, y parásitos protozoarios y helmintos), rechazo de trasplante (incluyendo rechazo de órganos sólidos como riñón, hígado, corazón, pulmón o córnea, así como rechazo de trasplantes de médula ósea incluyendo enfermedad del injerto contra (GVHD)), o de reacciones autoinmunitarias o alérgicas crónicas o agudas, localizadas. Las enfermedades autoinmunitarias incluyen glomerulonefritis aguda; artritis reumatoide o reactiva; glomerulonefritis crónica; enfermedades inflamatorias del intestino como la enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa y enterocolitis necrotizante; síndromes asociados a transfusión de granulocitos; dermatosis inflamatoria como dermatitis por contacto, dermatitis atópica, psoriasis; lupus eritematoso sistémico (LES), tiroiditis autoinmunitaria, esclerosis múltiple, y algunas formas de diabetes, u otro estado autoinmunitario donde el ataque del propio sistema inmunitario del sujeto resulte en destrucción patológica del tejido. Las reacciones alérgicas incluyen asma alérgico, bronquitis crónica, hipersensibilidad aguda y retrasada. Los estados de enfermedad inflamatoria sistémica incluyen inflamación asociada con traumatismo, quemaduras, reperfusión después de eventos isquémicos (por ejemplo, eventos trombóticos en corazón, cerebro, intestinos o vasculatura periférica, incluyendo infarto de miocardio y accidente cerebrovascular), sepsis, SDRA o síndrome de disfunción en múltiples órganos. El reclutamiento de las células inflamatorias también se presenta en placas ateroscleróticas. La inflamación incluye, pero no se limita a, linfoma no Hodgkin, granulomatosis de Wegener, tiroiditis de Hashimoto, carcinoma hepatocelular, atrofia del timo, pancreatitis crónica, artritis reumatoide, hiperplasia linfocítica reactiva, osteoartritis, colitis ulcerativa, colecistitis aguda, colecistitis crónica, cirrosis, sialadenitis crónica, peritonitis, pancreatitis aguda, pancreatitis crónica, gastritis crónica, adenomiosis, endometriosis, cervicitis aguda, cervicitis crónica, hiperplasia linfocítica, esclerosis múltiple, hipertrofia secundaria a púrpura trombocitopénica idiopática, neuropatía de IgA primaria, lupus eritematoso sistémico, psoriasis, enfisema pulmonar, pielonefritis crónica, y cistitis crónica.

Una enfermedad o trastorno endocrino incluye trastornos de glándulas suprarrenales, mama, gónadas, páncreas, paratiroides, pituitaria, tiroides, enanismo, etc. Los trastornos suprarrenales incluyen, pero no se limitan a, enfermedad de Addison, hirsutismo, cáncer, neoplasia endocrina múltiple, hiperplasia suprarrenal congénita, y feocromocitoma. Los trastornos de la mama incluyen, pero no se limitan a, cáncer de mama, enfermedad fibroquística de la mama, y ginecomastia. Los trastornos de las gónadas incluyen, pero no se limitan a, hiperplasia suprarrenal congénita, síndrome de ovario poliquístico, y síndrome de Turner. Los trastornos del páncreas incluyen, pero no se limitan a, diabetes (tipo I y tipo II), hipoglicemia, y resistencia a la insulina. Los trastornos paratiroides incluyen, pero no se limitan a, hiperparatiroidismo, e hipoparatiroidismo. Los trastornos de pituitaria incluyen, pero no se limitan a, acromegalia, síndrome de Cushing, diabetes insípida, síndrome de la silla turca vacía, hipopituitarismo, y prolactinoma. Los trastornos de tiroides incluyen, pero no se limitan a, cáncer, bocio, hipertiroides, hipotiroides,

nódulos, tiroiditis, y síndrome de Wilson. Los ejemplos de trastornos neuroendocrinos incluyen, pero no se limitan a, depresión y trastornos de ansiedad relacionados a desequilibrio hormonal, epilepsia catamenial, menopausia, migraña menstrual, trastornos endocrinos reproductivos, trastornos gastrointestinales como, tumores endocrinos del intestino incluyendo carcinoide, gastrinoma, somatostatina, acasia y enfermedad de Hirschsprung. En algunos aspectos, los trastornos endocrinos y neuroendocrinos incluyen hiperplasia nodular, tiroiditis de Hashimoto, 5 insulinoma, y carcinoma papilar. Una enfermedad o trastorno endocrino o neuroendocrino en niños incluye condiciones endocrinológicas de trastorno de crecimiento y diabetes insípida. Se puede observar retraso de crecimiento con localización ectópica congénita o aplasia/hipoplasia de la glándula pituitaria, como en holoprosencefalia, displasia septo-óptica y encefalocele basal. Las condiciones adquiridas, como el craneofaringioma, glioma óptico/hipotalámico pueden estar presentes con talla clínica baja y síndrome diencefálico. Pubertad precoz y exceso de crecimiento se pueden ver en las siguientes condiciones: quiste aracnoide, hidrocefalo, hamartoma hipotalámico y germinoma. La hipersecreción de hormona de crecimiento y hormona adrenocorticotrófica por un adenoma de pituitaria puede dar como resultado talla patológicamente alta y obesidad troncal en niños. La diabetes insípida puede presentarse como secundaria a procesos infiltrativos tales como células 10 de Langerhans de histiocitosis, tuberculosis, germinoma, lesión postraumática/quirúrgica del tallo de pituitaria y encefalopatía isquémica hipóxica.

Una enfermedad o trastorno cardiovascular incluye aquellos trastornos que pueden causar isquemia o son causados por reperfusión del corazón. Los ejemplos incluyen, aunque sin limitarse a, aterosclerosis, enfermedad de la arteria 20 coronaria, miocarditis granulomatosa, miocarditis crónica (no granulomatosa), cardiomiopatía hipertrófica primaria, enfermedad arterial periférica (PAD), accidente cerebrovascular, angina de pecho, infarto de miocardio, daño tisular cardiovascular provocado por paro cardíaco, daño tisular cardiovascular provocado por bypass cardíaco, choque cardíaco, y afecciones relacionadas que serían conocidas por los expertos en la materia o que implican disfunción de o daño tisular al corazón o la vasculatura, especialmente, aunque sin limitarse a, daño tisular relacionado con la 25 activación de DLK1. Las enfermedades CVS incluyen, aunque sin limitarse a, aterosclerosis, miocarditis granulomatosa, infarto de miocardio, fibrosis miocárdica secundaria a enfermedad valvular cardíaca, fibrosis miocárdica sin infarto, cardiomiopatía hipertrófica primaria, y miocarditis crónica (no granulomatosa).

### **Composiciones y moléculas de polinucleótidos y oligonucleótidos**

30 *Dianas:* En un aspecto, las dianas comprenden secuencias de ácido nucleico del homólogo tipo Delta 1 (DLK1), incluyendo sin limitación secuencias no codificantes y/o codificantes, sentido y/o antisentido asociadas con DLK1.

El homólogo tipo delta 1 (DLK1; también conocido como cinasa 1 que tiene cremallera dual de leucina), un gen 35 paternalmente marcado con varias isoformas de empalme alternativo, es un importante regulador del desarrollo natal y postnatal.

La modulación de la expresión y/o función de DLK1 es efectiva en la regeneración de los nervios. Por ejemplo, la regeneración de neuronas dañadas puede restaurar la función, pero la mayoría de las neuronas se regeneran 40 escasamente o nada en absoluto. Esta falta de regeneración en algunos casos es debida a una carencia de activación de las rutas de regeneración intrínsecas a la célula. Estas rutas se pueden seleccionar como objetivo para el desarrollo de terapias que puedan restaurar la función neuronal después de una lesión o enfermedad. La ruta de cinasa de proteína activada por mitógeno (MAP) de DLK1 es esencial para la regeneración de neuronas motoras de *Caenorhabditis elegans*. La pérdida de esta ruta elimina la regeneración, ya que si se activa se mejora la 45 regeneración. Además, estas proteínas también regulan el paso tardío de migración de conos de crecimiento. De esta manera, después de la lesión axónica, se necesitará la activación de esta cascada de cinasa MAP para cambiar la neurona madura de un estado aplástico a un estado capaz de crecimiento.

La modulación de este polinucleótido es importante en el tratamiento de enfermedades o trastornos que se asocian 50 con la expresión y/o función del homólogo tipo delta 1 (DLK1). Las enfermedades y trastornos de ejemplo y que están mediados por el homólogo tipo Delta 1 (DLK1) que se pueden tratar con células/tejidos regenerados de células madre obtenidas usando los compuestos antisentido comprenden: una enfermedad o trastorno neurológico, una enfermedad o trastorno neurodegenerativo, cáncer, una enfermedad o trastorno asociado con reparación deteriorada de nervios y/o regeneración deteriorada de nervios; parálisis, una enfermedad o trastorno asociado con 55 diferenciación neuroendocrina deteriorada, disomía uniparental de origen materno (cromosoma 14), disomía uniparental de origen paterno (cromosoma 14), una enfermedad o trastorno cardiovascular, obesidad, una enfermedad o trastorno asociado con adipogénesis, una enfermedad o trastorno asociado con metabolitos incrementados de lípidos en suero, una enfermedad o trastorno asociado con expresión de hormona de crecimiento (por ejemplo, retraso de crecimiento, etc.), blefarofimosis, malformación esquelética, diabetes, inflamación, una 60 enfermedad o trastorno asociado con respuesta inmunitaria deteriorada, una enfermedad o trastorno endocrino, una

enfermedad o trastorno asociado con Hematopoyesis deteriorada y una enfermedad o trastorno asociado con diferenciación deteriorada de células madre.

5 Como un ejemplo del tratamiento de un trastorno neurológico, la modulación de la expresión y función de DLK1 en un paciente por un compuesto antisentido, se trata este paciente que padece de, por ejemplo, enfermedad de Parkinson. Los compuestos también se contemplan en el uso de la prevención de pacientes en riesgo de desarrollar enfermedades como el Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, otras enfermedades o trastornos neurológicos, parálisis y daño de nervios, cáncer y similares.

10 En un aspecto preferido, la modulación de DLK1 atenúa y repara el daño en nervios y la parálisis de nervios en una célula o paciente.

En un aspecto preferido, la modulación de DLK1 impide y/o trata pacientes en riesgo de desarrollar, o quienes han desarrollado, un trastorno neurológico.

15 En otro aspecto preferido, la modulación de DLK1 impide o trata pacientes en riesgo de desarrollar, o quienes tienen, tumores.

20 En otro aspecto preferido, la modulación de DLK1 modula la supervivencia celular, la excrecencia de neuritas, la diferenciación celular y la migración celular.

En un aspecto preferido, los polinucleótidos de DLK1 se modulan por un oligonucleótido antisentido.

25 En una modalidad preferida, los polinucleótidos de DLK1 se favorecen en la expresión y/o función por los oligonucleótidos antisentido que toman como diana los polinucleótidos antisentido y sentido.

En una modalidad preferida, los polinucleótidos de DLK1 se reducen en expresión y/o función por los oligonucleótidos antisentido que toman como diana los polinucleótidos antisentido y sentido.

30 En un aspecto preferido, los oligonucleótidos son específicos para polinucleótidos de DLK1, lo que incluye, sin limitación regiones no codificantes. Las dianas de DLK1 comprenden variantes de DLK1; mutantes de DLK1, incluyendo SNP; secuencias no codificantes de DLK1; alelos, fragmentos y similares. Preferentemente, el oligonucleótido es una molécula de ARN antisentido.

35 De acuerdo con aspectos de la divulgación, la molécula de ácido nucleico diana no está limitada a polinucleótidos de DLK1 en solitario, sino que se extiende a cualquiera de las isoformas, receptores, homólogos, regiones no codificantes y similares de DLK1.

40 En otro aspecto preferido, un oligonucleótido está dirigido a una secuencia antisentido natural (antisentido natural a las regiones codificantes y no codificantes) de dianas de DLK1, incluyendo, sin limitación, variantes, alelos, homólogos, mutantes, derivados, fragmentos y secuencias complementarias a estos. Preferentemente el oligonucleótido es una molécula de ARN o ADN antisentido.

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

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

60

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

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

15 En otro aspecto preferido, la elección como diana del DLK1, incluyendo sin limitación, secuencias antisentido que se identifican y se expanden, usando, por ejemplo, PCR, hibridación etc., una o más de las secuencias expuestas como las SEQ ID NO: 3, y similares, modulan la expresión o función de DLK1. En un aspecto, la expresión o función está regulada positivamente en comparación con un control. En otro aspecto preferido, la expresión o función está regulada negativamente en comparación con un control.

20 En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos comprenden secuencias expuestas como las SEQ ID NO: 4 a 5 incluyendo 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 25 fosforotioato, fosforoditioato o similares. En otro aspecto preferido, los nucleótidos comprenden un derivado de fósforo. El derivado de fósforo (o grupo fosfato modificado) que puede unirse al resto de azúcar o de análogo de azúcar en los oligonucleótidos modificados de la presente divulgación puede ser un monofosfato, difosfato, trifosfato, alquilfosfato, alcanofosfato, fosforotioato y similares. La preparación de los análogos de fosfato indicados anteriormente, y su incorporación en nucleótidos, nucleótidos modificados y oligonucleótidos, también es en sí 30 conocida y no es necesario describirla aquí.

La especificidad y sensibilidad de antisentido también es empleada por los expertos en la materia para usos terapéuticos. Se han empleado oligonucleótidos antisentido como restos terapéuticos en el tratamiento de patologías en animales y el ser humano. Los oligonucleótidos antisentido se han administrado con seguridad y eficazmente a 35 seres humanos y numerosos ensayos clínicos están actualmente en marcha. De este modo, se establece que los oligonucleótidos pueden ser modalidades terapéuticas útiles que pueden configurarse para ser útiles en regímenes de tratamiento para el tratamiento de células, tejidos y animales, especialmente seres humanos.

En aspectos de la presente divulgación, los compuestos antisentido oligoméricos, particularmente oligonucleótidos, se unen a moléculas de ácidos nucleicos diana y modulan la expresión y/o función de moléculas codificadas por un gen diana. Las funciones de ADN con las que interferirán comprenden, por ejemplo, replicación y transcripción. Las funciones de ARN con las que interferirán comprenden todas las funciones vitales tales como, por ejemplo, translocalización del ARN al sitio de traducción de proteína, traducción de proteína desde ARN, splicing del ARN para dar una o más especies de ARNm, y actividad catalítica que puede acoplarse en o facilitarse por el ARN. Las 45 funciones pueden regularse positivamente o inhibirse dependiendo de las funciones deseadas.

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

El direccionamiento de un compuesto antisentido a una molécula de ácido nucleico particular, en el contexto de esta divulgación, puede ser un proceso multietapa. El proceso normalmente empieza con la identificación de un ácido 55 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 para el homólogo tipo Delta 1 (DLK1).

60 El proceso de direccionamiento normalmente también incluye la determinación de al menos una región diana,

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

En un aspecto preferido, los oligonucleótidos antisentido se unen a las secuencias antisentido naturales del homólogo tipo Delta 1 (DLK1) y modulan la expresión y/o función del homólogo tipo Delta 1 (DLK1) (SEQ ID NO: 1).  
10 Los ejemplos de secuencias antisentido incluyen las SEQ ID NO: 3 a 5.

En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos antisentido se unen a uno o más segmentos de los polinucleótidos del homólogo tipo Delta 1 (DLK1) y modulan la expresión y/o función del homólogo tipo Delta 1 (DLK1). Los segmentos comprenden al menos cinco nucleótidos consecutivos de los polinucleótidos sentido o antisentido del homólogo tipo  
15 Delta 1 (DLK1).

En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos antisentido son específicos para secuencias antisentido naturales del homólogo tipo Delta 1 (DLK1) donde la unión de los oligonucleótidos a las secuencias antisentido naturales del homólogo tipo Delta 1 (DLK1) modulan la expresión y/o la función del homólogo tipo Delta 1 (DLK1).  
20

En otro aspecto preferido, los compuestos de oligonucleótido comprenden secuencias expuestas como las SEQ ID NO: 4 a 5, 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  
25 fosforotioato, fosforoditioato o similares. En otro aspecto preferido, los nucleótidos comprenden un derivado de fósforo. El derivado de fósforo (o grupo fosfato modificado) que puede unirse al resto de azúcar o de análogo de azúcar en los oligonucleótidos modificados de la presente divulgación puede ser un monofosfato, difosfato, trifosfato, alquilfosfato, alcanofosfato, fosforotioato y similares. La preparación de los análogos de fosfato indicados anteriormente, y su incorporación en nucleótidos, nucleótidos modificados y oligonucleótidos, también es en sí  
30 conocida y no es necesario describirla aquí.

Ya que, tal como se conoce en la técnica, el codón de iniciación de la traducción normalmente es 5'-AUG (en moléculas de ARNm transcrito; 5'-ATG en la molécula de ADN correspondiente), el codón de iniciación de la traducción también se denomina el "codón AUG", el "codón de iniciación" o el "codón de iniciación AUG". Una  
35 minoría de genes tiene un codón de iniciación de la traducción que tiene la secuencia de ARN 5'-GUG, 5'-UUG o 5'-CUG; y se ha demostrado que 5'-AUA, 5'-ACG y 5'-CUG funcionan in vivo. De este modo, las expresiones "codón de iniciación de la traducción" y "codón de iniciación" pueden englobar muchas secuencias de codón, aun cuando el aminoácido iniciador en cada caso normalmente sea metionina (en eucariotas) o formilmetionina (en procariotas). Los genes eucariotas y procariotas pueden tener dos o más codones de iniciación alternativos, uno cualquiera de los  
40 cuales puede utilizarse preferencialmente para la iniciación de la traducción en un tipo particular de célula o tejido, o en un conjunto particular de condiciones. En el contexto de la divulgación, "codón de iniciación" y "codón de iniciación de la traducción" se refieren al codón o codones que se usan in vivo para iniciar la traducción de un ARNm transcrito de un gen que codifica para el homólogo tipo Delta 1 (DLK1), a pesar de la(s) secuencia(s) de dichos codones. Un codón de terminación de la traducción (o "codón de terminación") de un gen puede tener una de tres  
45 secuencias, es decir, 5'-UAA, 5'-UAG y 5'-UGA (las secuencias de ADN correspondientes son 5'-TAA, 5'-TAG y 5'-TGA, respectivamente).

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

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

es la región intragénica que engloba el codón de iniciación o de terminación de la traducción del marco de lectura abierto (ORF) de un gen.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

60



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

5

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

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

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

25

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

30

En un aspecto, se prefiere dirigirse a ácidos nucleicos específicos por oligonucleótidos antisentido. El direccionamiento de un compuesto antisentido a un ácido nucleico particular es un proceso multietapa. El proceso normalmente empieza con la identificación de una secuencia de ácidos nucleicos cuya función va a modularse. Ésta puede ser, por ejemplo, un gen celular (o ARNm transcrito a partir del gen) cuya expresión está asociada a un

35 trastorno o patología particular, o un polinucleótido no codificante tal como, por ejemplo, ARN no codificante (ARNnc).

- Los ARN pueden clasificarse en (1) ARN mensajeros (ARNm), que se traducen en proteínas, y (2) ARN no codificantes de proteína (ARNnc). Los ARNnc comprenden microARN, transcritos antisentido y otras unidades
- 40 transcripcionales (TU) que contienen una alta densidad de codones de terminación y que carecen de cualquier amplio "marco de lectura abierto". Muchos ARNnc parecen empezar a partir de sitios de iniciación en regiones no traducidas 3' (3'UTRs) de loci codificantes de proteínas. Los ARNnc son frecuentemente raros y al menos la mitad de los ARNnc que se han secuenciado por el consorcio FANTOM no parecen estar poliadenilados. La mayoría de los investigadores se han basado, por motivos obvios, en ARNm poliadenilados que se procesan y se exportan al
- 45 citoplasma. Recientemente, se demostró que el conjunto de ARN nucleares no poliadenilados puede ser muy grande, y que muchos de dichos transcritos surgen de las llamadas regiones intergénicas (Cheng, J. et al. (2005) Science 308 (5725), 1149-1154; Kapranov, P. et al. (2005). Genome Res 15 (7), 987-997). El mecanismo por el que los ARNnc pueden regular la expresión génica es por apareamiento de bases con transcritos diana. Los ARN que funcionan por apareamiento de bases pueden agruparse en (1) ARN codificados en cis que están codificados en la
- 50 misma ubicación genética, pero en la cadena opuesta a los ARN en los que actúan y, por lo tanto, muestran complementariedad perfecta con su diana, y (2) ARN codificados en trans que están codificados en una ubicación cromosómica distinta de los ARN en los que actúan y generalmente no presentan potencial de apareamiento de bases perfecto con sus dianas.

- 55 Sin desear ceñirse a ninguna teoría, la perturbación de un polinucleótido antisentido por los oligonucleótidos antisentido descritos en el presente documento puede alterar la expresión de los ARN mensajeros sentido correspondientes. Sin embargo, esta regulación puede tanto ser discordante (la inactivación antisentido produce elevación de ARN mensajero) como concordante (la inactivación antisentido produce reducción concomitante de ARN mensajero). En estos casos, los oligonucleótidos antisentido pueden ser dirigidos a partes solapantes o no
- 60 solapantes del transcrito antisentido que producen su inactivación o secuestro. El antisentido codificante, además de

no codificante, puede ser dirigido de una manera idéntica y que cualquier categoría es capaz de regular los transcritos sentido correspondientes - tanto de una manera concordante como discordante. Las estrategias que se emplean en identificar nuevos oligonucleótidos para su uso contra una diana pueden basarse en la inactivación de transcritos de ARN antisentido por oligonucleótidos antisentido o cualquier otro medio de modulación de la diana deseada.

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

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

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

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

ARN antisentido, ADN antisentido, oligonucleótidos antisentido quiméricos, oligonucleótidos antisentido que comprenden enlaces modificados, ARN de interferencia (iARN), ARN interferente pequeño (siRNA); un microARN interferente (miARN); un ARN temporal pequeño (ARNtp); o un ARN de horquilla corta (ARNhc); activación génica

inducida por ARN pequeño (aARN); ARN activantes pequeños (ARNap), o combinaciones de los mismos.

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

Se ha descubierto que el ARN bicatenario pequeño (dsARN), tal como ARN interferente pequeño (siRNA) y microARN (miARN), es el desencadenante de un mecanismo evolutivamente conservado conocido como interferencia de ARN (iARN). La iARN conduce invariablemente al silenciamiento génico mediante la remodelación de cromatina para suprimir de este modo la transcripción, degradación de ARNm complementario, o bloqueo de la traducción de proteínas. Sin embargo, en los 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 del homólogo tipo Delta 1 (DLK1) y productos codificados por los mismos. Los dsARN también pueden actuar como ARN activantes pequeños (ARNap). Sin desear ceñirse a ninguna teoría, direccionando secuencias a promotores génicos, los ARNap inducirán la expresión de genes diana en un fenómeno denominado activación transcripcional inducida por dsARN (aARN).

En un aspecto adicional, los "segmentos diana preferidos" identificados en el presente documento pueden emplearse en un cribado para compuestos adicionales que modulan la expresión de polinucleótidos del homólogo tipo Delta 1 (DLK1). Los "moduladores" son aquellos compuestos que disminuyen o aumentan la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica para el homólogo tipo Delta 1 (DLK1) y que comprenden al menos una parte de 5 nucleótidos que es complementaria a un segmento diana preferido. El procedimiento de cribado comprende las etapas de poner en contacto un segmento diana preferido de una molécula de ácido nucleico que codifica polinucleótidos sentido o antisentido naturales del homólogo tipo Delta 1 (DLK1) con uno o más moduladores candidatos, y seleccionar uno o más moduladores candidatos que disminuyen o aumentan la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica polinucleótidos del homólogo tipo Delta 1 (DLK1), por ejemplo, SEQ ID NO: 4 a 5. Una vez que se demuestra que el modulador o moduladores candidatos son capaces de modular (por ejemplo, tanto disminuir como aumentar) la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica polinucleótidos del homólogo tipo Delta 1 (DLK1), el modulador puede entonces emplearse en estudios de investigación adicionales de la función de polinucleótidos del homólogo tipo Delta 1 (DLK1), o para su uso como un agente de investigación, diagnóstico o terapéutico de acuerdo con la presente divulgación.

El direccionamiento de la secuencia antisentido natural modula preferentemente la función del gen diana. Por ejemplo, el gen DLK1 (por ejemplo, número de acceso: NM\_003836.4, Figura 2). En un aspecto preferido, la diana es un polinucleótido antisentido del gen DLK1. En un aspecto preferido, un oligonucleótido antisentido se dirige a secuencias sentido y/o antisentido naturales de los polinucleótidos del homólogo tipo Delta 1 (DLK1) (por ejemplo, número de acceso: NM\_003836.4, Figura 2), variantes, alelos, isoformas, homólogos, mutantes, derivados, fragmentos y secuencias complementarias a los mismos. Preferentemente, el oligonucleótido es una molécula antisentido y las dianas incluyen regiones codificantes y no codificantes de polinucleótidos antisentido y/o sentido de DLK1.

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

Se ha demostrado en la materia que dichos restos de oligonucleótido bicatenario modulan la expresión de la diana y regulan la traducción, además del procesamiento de ARN mediante un mecanismo antisentido. Además, los restos de doble cadena se pueden someter a modificaciones químicas (Fire et al., (1998) Nature, 391, 806-811; Timmons y Fire, (1998) Nature, 395, 854; Timmons et al., (2001) Gene, 263, 103-112; Tabara et al., (1998) Science, 282, 430-431; Montgomery et al., (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 15502-15507; Tuschl et al., (1999) Genes Dev., 13, 3191-3197; Elbashir et al., (2001) Nature, 411, 494-498; Elbashir et al., (2001) Genes Dev. 15, 188-200). Por ejemplo, se ha demostrado que dichos restos bicatenarios inhiben la diana por la hibridación clásica de la cadena antisentido del dúplex con la diana, produciendo de este modo la degradación enzimática de la diana (Tijsterman et al., (2002) Science, 295, 694-697).

En un aspecto preferido, un oligonucleótido antisentido se dirige a polinucleótidos del homólogo tipo Delta 1 (DLK1) (por ejemplo número de acceso: NM\_003836.4), variantes, alelos, isoformas, homólogos, mutantes, derivados, fragmentos y secuencias complementarias a los mismos. Preferentemente, el oligonucleótido es una molécula antisentido.

De acuerdo con aspectos de la divulgación, la molécula de ácido nucleico diana no se limita al homólogo tipo Delta 1 (DLK1) solo, sino que se extiende a cualquiera de las isoformas, receptores, homólogos y similares de las moléculas del homólogo tipo Delta 1 (DLK1).

5

En otro aspecto preferido, un oligonucleótido se dirige a una secuencia antisentido natural de polinucleótidos de DLK1, por ejemplo, polinucleótidos expuestos como SEQ ID NO: 3, y cualquier variante, alelo, homólogo, mutante, derivado, fragmento y secuencia complementaria a los mismos. Ejemplos de oligonucleótidos antisentido se exponen como las SEQ ID NO: 4 a 5.

10

En un aspecto, los oligonucleótidos son complementarios a, o se unen a, secuencias de ácido nucleico del homólogo tipo Delta 1 (DLK1) antisentido, incluyendo sin limitación secuencias sentido y/o antisentido no codificantes asociadas con polinucleótidos del homólogo tipo Delta 1 (DLK1) y modulan la expresión y/o función de moléculas del homólogo tipo Delta 1 (DLK1).

15

En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos son complementarios a, o se unen a, secuencias de ácido nucleico del antisentido natural de DLK1, expuesto como SEQ ID NO: 3 y modula la expresión y/o la función de moléculas de DLK1.

20 En un aspecto preferido, los oligonucleótidos comprenden secuencias de al menos 5 nucleótidos consecutivos de las SEQ ID NO: 4 a 5 y modulan la expresión y/o la función de moléculas del homólogo tipo Delta 1 (DLK1).

Las dianas de polinucleótido comprenden DLK1, que incluyen miembros de la familia del mismo, variantes del DLK1; mutantes del DLK1, que incluyen SNP; secuencias no codificantes del DLK1; alelos del DLK1; variantes de especies, fragmentos y similares. Preferentemente, el oligonucleótido es una molécula antisentido.

25

En otro aspecto preferido, el oligonucleótido que se dirige a polinucleótidos del homólogo tipo Delta 1 (DLK1), comprende: ARN antisentido, ARN de interferencia (iARN), ARN interferente pequeño (siRNA); microARN interferente (miARN); un ARN temporal pequeño (ARNtp); o un ARN de horquilla corta (ARNhc); activación génica inducida por ARN pequeño (aARN); o, ARN activante pequeño (ARNap).

30

En otro aspecto preferido, la selección como diana de los polinucleótidos del homólogo tipo Delta 1 (DLK1), por ejemplo, SEQ ID NO: 3, modula la expresión o función de estas dianas. En un aspecto, la expresión o función está regulada positivamente en comparación con un control. En otro aspecto preferido, la expresión o función está regulada negativamente en comparación con un control.

35

En otro aspecto preferido, los compuestos antisentido comprenden secuencias expuestas como SEQ ID NO: 4 a 5. Estos oligonucleótidos pueden comprender uno o más nucleótidos modificados, fragmentos más cortos o más largos, enlaces modificados y similares.

40

En otro aspecto preferido, las SEQ ID NO: 4 a 5 comprenden uno o más nucleótidos de LNA.

La Tabla 1 muestra oligonucleótidos antisentido de ejemplo útiles en los métodos de la divulgación.

ID de secuencia	Nombre de secuencia antisentido	Secuencia
SEQ ID NO:4	CUR-0338	rArArGrArCrCrUrCrCrCrUrGrUrGrGrUrArArUrUrGrGrGrArGrArG
SEQ ID NO:5	CUR-0340	rCrArCrGrCrUrUrCrArCrArUrArUrCrArGrCrArArGrUrUrArCrCrC

45

La modulación de un ácido nucleico diana deseado puede llevarse a cabo de varias formas conocidas en la técnica. Por ejemplo, oligonucleótidos antisentido, siRNA, etc. Las moléculas de ácidos nucleicos enzimáticos (por ejemplo, ribozimas) son moléculas de ácidos nucleicos capaces de catalizar una o más de diversas reacciones, que incluyen la capacidad para escindir repetidamente otras moléculas de ácidos nucleicos separadas en un modo específico de secuencia de bases de nucleótidos. Estas moléculas de ácido nucleico, enzimáticas, se pueden usar, por ejemplo, para seleccionar como diana virtualmente cualquier transcrito de ARN (Zaug et al., 324, Nature 429 1986; Cech, 260

50

JAMA 3030, 1988; y Jefferies et al., 17 Nucleic Acids Research 1371, 1989).

Debido a su especificidad de secuencia, las moléculas de ácidos nucleicos enzimáticos que se escinden en trans muestran promesa como agentes terapéuticos para enfermedad humana (Usman & McSwiggen, (1995) Ann. Rep. Med. Chem. 30, 285-294; Christoffersen y Marr, (1995) J. Med. Chem. 38, 2023-2037). Las moléculas de ácidos nucleicos enzimáticos pueden diseñarse para escindir dianas de ARN específicas dentro del fondo del ARN celular. Un acontecimiento de escisión de este tipo convierte el ARNm en no funcional y anula la expresión de proteínas de ese ARN. De este modo puede inhibirse selectivamente la síntesis de una proteína asociada a una patología.

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

20 Se han usado varias estrategias como la selección in vitro (evolución) (Orgel, (1979) Proc. R. Soc. London, B 205, 435) para desarrollar nuevos catalizadores de ácido nucleico capaces de catalizar una variedad de reacciones, como la escisión y ligación de enlaces de fosfodiéster y enlaces amida, (Joyce, (1989) Gene, 82, 83-87; Beaudry et al., (1992) Science 257, 635-641; Joyce, (1992) Scientific American 267, 90-97; Breaker et al., (1994) TIBTECH 12, 268; Bartel et al., (1993) Science 261:1411- 1418; Szostak, (1993) TIBS 17, 89-93; Kumar et al., (1995) FASEB J., 9, 1183; Breaker, (1996) Curr. Op. Biotech., 7, 442).

25 El desarrollo de ribozimas que son óptimas para la actividad catalítica contribuiría significativamente a cualquier estrategia que empleara ribozimas que escinden ARN con el fin de regular la expresión génica. La ribozima de cabeza de martillo, por ejemplo, funciona con una velocidad catalítica (k<sub>cat</sub>) de aproximadamente 1 min<sup>-1</sup> en presencia de concentraciones saturantes (10 mM) de cofactor de Mg<sup>2+</sup>. Se ha demostrado que una ribozima de "ligasa de ARN" artificial cataliza la reacción de auto-modificación correspondiente con una velocidad de aproximadamente 100 min<sup>-1</sup>. Además, se sabe que ciertas ribozimas de cabeza de martillo modificadas que tienen brazos de unión al sustrato hechos de ADN catalizan la escisión de ARN con múltiples velocidades de recuperación que se aproximan a 100 min<sup>-1</sup>. Finalmente, la sustitución de un residuo específico dentro del núcleo catalítico de la cabeza de martillo con ciertos análogos de nucleótido da ribozimas modificadas que muestran una mejora de hasta 35 10 veces en la velocidad catalítica. Estos descubrimientos demuestran que las ribozimas pueden promover transformaciones químicas con velocidades catalíticas que son significativamente superiores a aquellas mostradas in vitro por la mayoría de las ribozimas que se auto-escinden naturales. Entonces es posible que las estructuras de ciertas ribozimas que se auto-escinden puedan optimizarse para dar la máxima actividad catalítica, o que puedan prepararse motivos de ARN completamente nuevos que muestran velocidades significativamente más rápidas para 40 la escisión de fosfodiéster de ARN.

La escisión intermolecular de un sustrato de ARN por un catalizador de ARN que se ajusta al modelo de "cabeza de martillo" se demostró por primera vez en 1987 (Uhlenbeck, O. C. (1987) Nature, 328: 596-600). Se recuperó el catalizador de ARN y se hizo reaccionar con múltiples moléculas de ARN, demostrando que era verdaderamente 45 catalítico.

ARN catalíticos diseñados en base al motivo "cabeza de martillo" se han usado para escindir secuencias diana específicas al producir cambios de bases apropiados en el ARN catalítico para mantener el apareamiento necesario de bases con las secuencias diana (Haseloff y Gerlach, (1988) Nature, 334, 585; Walbot y Bruening, (1988) Nature, 50 334, 196; Uhlenbeck, O. C. (1987) Nature, 328: 596-600; Koizumi, M., et al. (1988) FEBS Lett., 228: 228-230). Esto ha permitido el uso del ARN catalítico para escindir secuencias diana específicas e indica que los ARN catalíticos diseñados según el modelo de "cabeza de martillo" pueden escindir posiblemente ARN de sustrato específico in vivo. (véase Haseloff y Gerlach, (1988) Nature, 334, 585; Walbot y Bruening, (1988) Nature, 334, 196; Uhlenbeck, O. C. (1987) Nature, 328: 596-600).

55 La interferencia de ARN (iARN) se ha convertido en una poderosa herramienta para modular la expresión génica en mamíferos y células de mamífero. Este enfoque requiere la administración de ARN interferente pequeño (siRNA) bien como el propio ARN o bien como ADN, usando un plásmido de expresión o virus y la secuencia codificante para ARN de horquilla pequeño que se procesa a siRNA. Este sistema permite el eficaz transporte de los pre-siRNA al 60 citoplasma en el que son activos y permiten 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 internucleosídicos covalentes (esqueleto), además de oligonucleótidos que tienen partes no de origen natural que funcionan similarmente. Dichos oligonucleótidos modificados o sustituidos son frecuentemente deseados con respecto a formas nativas debido a propiedades deseables tales como, por ejemplo, captación celular potenciada, afinidad potenciada por un ácido nucleico diana y elevada estabilidad en presencia de nucleasas.

De acuerdo con la presente divulgación, los oligonucleótidos o "compuestos antisentido" incluyen oligonucleótidos antisentido (por ejemplo, ARN, ADN, mimético, quimera, análogo u homólogo de los mismos), ribozimas, oligonucleótidos de secuencia de guía externa (EGS), compuestos de siRNA, compuestos de interferencia (iARN) de ARN mono- o bicatenario tales como compuestos de siRNA, ARN<sub>ap</sub>, ARN<sub>a</sub>, y otros compuestos oligoméricos que hibridan con al menos una parte del ácido nucleico diana y modulan su función. Por lo tanto, pueden ser ADN, ARN, similares a ADN, similares a ARN, o mezclas de los mismos, o pueden ser miméticos de uno o más de estos. Estos compuestos pueden ser compuestos oligoméricos monocatenarios, bicatenarios, circulares o de horquilla y pueden contener elementos estructurales tales como protuberancias internas o terminales, desapareamientos o bucles. Los compuestos antisentido se preparan de forma rutinaria linealmente, pero pueden unirse o prepararse de otro modo para ser circulares y/o ramificados. Los compuestos antisentido pueden comprender construcciones tales como, por ejemplo, dos cadenas hibridadas para formar un compuesto completa o parcialmente bicatenario o una única cadena con auto-complementariedad suficiente para permitir la hibridación y formación de un compuesto completa o parcialmente bicatenario. Las dos cadenas pueden enlazarse internamente, dejando los extremos 3' o 5' libres o pueden enlazarse para formar una estructura de horquilla continua o bucle. La estructura de horquilla puede contener un nucleótido protuberante en cualquiera de los extremos 5' o 3' que produce una extensión del carácter monocatenario. Los compuestos bicatenarios opcionalmente pueden comprender nucleótidos protuberantes en los extremos. Modificaciones adicionales pueden comprender grupos conjugados unidos a uno de los extremos, posiciones de nucleótido seleccionadas, posiciones de azúcar o a u no de los enlaces internucleosídicos. Como alternativa, las dos cadenas pueden enlazarse mediante un resto no de ácido nucleico o grupo conector. Cuando se forma a partir de solo una cadena, el dsARN puede tomar la forma de una molécula tipo horquilla auto-complementaria que se dobla sobre sí misma para formar un dúplex. De este modo, el dsARN puede ser completa o parcialmente bicatenario. La modulación específica de la expresión génica se puede lograr por expresión estable de las horquillas de dsARN en líneas de células transgénicas (Hammond et al., (1991) *Nat. Rev. Genet.*, 2, 110-119; Matzke et al., (2001) *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 11, 221-227; Sharp, (2001) *Genes Dev.*, 15, 485-490). Cuando se forma a partir de dos cadenas, o una única cadena que adopta la forma de una molécula de tipo horquilla auto-complementaria que se dobla sobre sí misma para formar un dúplex, las dos cadenas (o regiones formadoras de dúplex de una sola cadena) son cadenas de ARN complementarias que se aparean con bases en el modo de Watson-Crick.

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

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

77, 78, 79 u 80 nucleótidos de longitud, o cualquier intervalo entremedias.

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

En un aspecto, los compuestos antisentido o de oligonucleótido de la divulgación tienen partes antisentido de 12 o 13 a 30 nucleótidos de longitud. Un experto en la materia apreciará que éstos integran compuestos antisentido que tienen partes antisentido de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos de longitud, o cualquier intervalo entremedias.

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

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

En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos antisentido, como, por ejemplo, las moléculas de ácidos nucleicos expuestas en las SEQ ID NO: 3 a 5 comprenden una o más sustituciones o modificaciones. En un aspecto, los nucleótidos están sustituidos con ácidos nucleicos bloqueados (LNA).

En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos se dirigen a una o más regiones de las moléculas de ácidos nucleicos sentido y/o antisentido de secuencias codificantes y/o no codificantes asociadas a DLK1 y las secuencias expuestas como SEQ ID NO: 1, 3. Los oligonucleótidos también se dirigen a regiones solapantes de las SEQ ID NO: 1, 3.

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

Se pueden formar compuestos antisentido quiméricos de la divulgación como estructuras compuestas de dos o más oligonucleótidos, oligonucleótidos modificados, oligonucleósidos y/o miméticos de oligonucleótidos, tal como se ha descrito anteriormente. Como tales, estos compuestos también se han referido en la técnica como híbridos o

gámperos. Las patentes representativas de los Estados Unidos que enseñan la preparación de estas estructuras híbridas comprenden, pero no se limitan a, las patentes de los EE.UU con nos. 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.

- 5 En otro aspecto preferido, la región del oligonucleótido que se modifica comprende al menos un nucleótido modificado en la posición 2' del azúcar, de la forma más preferente un nucleótido modificado con 2'-O-alquilo, 2'-O-alquil-O-alquilo o 2'-flúor. En otros aspectos preferidos, las modificaciones de ARN incluyen modificaciones de 2'-flúor, 2'-amino y 2'-O-metilo en la ribosa de pirimidinas, residuos abásicos o una base invertida en el extremo 3' del ARN. Dichas modificaciones se incorporan rutinariamente en oligonucleótidos y se ha demostrado que estos
- 10 oligonucleótidos tienen una mayor T<sub>m</sub> (es decir, mayor afinidad de unión a diana) que los 2'-desoxi oligonucleótidos contra una diana dada. El efecto de dicha afinidad incrementada es potenciar enormemente la inhibición por oligonucleótidos de iARN de la expresión génica. La ARNasa H es una endonucleasa celular que escinde la cadena de ARN de los dúplex de ARN:ADN; por lo tanto, la activación de esta enzima produce la escisión del ARN diana, y de este modo puede potenciar enormemente la eficiencia de inhibición de iARN. La escisión del ARN diana puede
- 15 demostrarse rutinariamente por electroforesis en gel. En otro aspecto preferido, el oligonucleótido químico también se modifica para potenciar la resistencia a nucleasas. Las células contienen diversas exo- y endo-nucleasas que pueden degradar ácidos nucleicos. Se ha demostrado que varias modificaciones de nucleótidos y nucleósidos hacen que el oligonucleótido en el que se incorporan sea más resistente a la digestión por nucleasa que el oligodesoxinucleótido nativo. La resistencia a nucleasas se mide rutinariamente incubando oligonucleótidos con
- 20 extractos celulares o soluciones de nucleasa aisladas y midiendo el grado de oligonucleótido intacto que queda con el tiempo, normalmente por electroforesis en gel. Los oligonucleótidos que se han modificado para potenciar su resistencia a nucleasas sobreviven intactos durante más tiempo que los oligonucleótidos sin modificar. Se ha demostrado que diversas modificaciones de oligonucleótidos potencian o confieren resistencia a nucleasas. Los oligonucleótidos que contienen al menos una modificación de fosforioato son actualmente más preferidos. En
- 25 algunos casos, las modificaciones de oligonucleótidos que potencian la afinidad de unión a diana son, también, independientemente, capaces de potenciar la resistencia a nucleasas. Algunas modificaciones deseables pueden encontrarse en De Mesmaeker et al. (1995) *Acc. Chem. Res.*, 28:366-374.

- Ejemplos específicos de algunos oligonucleótidos preferidos concebidos por esta divulgación incluyen aquellos que
- 30 comprenden esqueletos modificados, por ejemplo, fosforioatos, fosfotriésteres, metilfosfonatos, enlaces entre azúcares de alquilo o cicloalquilo de cadena corta o enlaces entre azúcares heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta. Los más preferidos son oligonucleótidos con esqueletos de fosforioato y aquellos con esqueletos de heteroátomo, particularmente esqueletos de CH<sub>2</sub>--NH--O--CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>--N(CH<sub>3</sub>)--O--CH<sub>2</sub> [conocido como un esqueleto de metil(metilimino) o MMI], CH<sub>2</sub>--O--N(CH<sub>3</sub>)--CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>--N(CH<sub>3</sub>)--N(CH<sub>3</sub>)--CH<sub>2</sub> y O--N(CH<sub>3</sub>)--CH<sub>2</sub>--
- 35 CH<sub>2</sub>, donde el esqueleto de fosfodiéster nativo se representa como O--P--O--CH<sub>2</sub>. Los esqueletos de amida divulgados por De Mesmaeker et al. (1995) *Acc. Chem. Res.* 28:366-374 también se prefieren. También se prefieren oligonucleótidos que tienen esqueletos de morfolino (Summerton y Weller, Patente de EE.UU. N.º 5.034.506. En otros aspectos preferidos, tal como el esqueleto de ácido nucleico peptídico (PNA), el esqueleto de fosfodiéster del oligonucleótido se sustituye por un esqueleto de poliamida, estando los nucleótidos unidos directamente o
- 40 indirectamente a los átomos de nitrógeno azo del esqueleto de poliamida (Nielsen et al. (1991) *Science* 254, 1497). Los oligonucleótidos también pueden comprender uno o más restos de azúcar sustituidos. Oligonucleótidos preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': OH, SH, SCH<sub>3</sub>, F, OCN, OCH<sub>3</sub>, OCH<sub>3</sub>, OCH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH<sub>2</sub> o O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub> en los que n es de 1 a aproximadamente 10; alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>10</sub> inferior, alcoxilalcoxi, alquilo, alcarilo o aralquilo inferior sustituido; Cl; Br; CN; CF<sub>3</sub>; OCF<sub>3</sub>; O--, S--, o N-alquilo; O--, S--, o N-alqueno; SOCH<sub>3</sub>; SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>; ONO<sub>2</sub>; NO<sub>2</sub>; N<sub>3</sub>; NH<sub>2</sub>; heterocicloalquilo; heterocicloalcarilo; aminoalquilamino; polialquilamino; sililo sustituido; un grupo de escisión de ARN; un grupo reportero; un intercalador; un grupo para
- 45 mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido; o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un oligonucleótido y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. Una modificación preferida incluye 2'-metoxietoxi [2'-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, también conocido como 2'-O-(2'-metoxietilo)] Martin et al.,
- 50 (1995) *Helv. Chim. Acta*, 78, 486). Otras modificaciones preferidas incluyen 2'-metoxi (2'-O--CH<sub>3</sub>), 2'-propoxi(2'-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) y 2'-flúor (2'-F). También pueden hacerse modificaciones similares en otras posiciones sobre el oligonucleótido, particularmente la posición 3' del azúcar en el nucleótido del extremo 3' y la posición 5' del nucleótido del extremo 5'. Los oligonucleótidos también pueden tener miméticos de azúcar tales como ciclobutilos en lugar del grupo pentofuranosilo.

- 55 Los oligonucleótidos también pueden comprender, adicionalmente o como alternativa, modificaciones o sustituciones de nucleobases (frecuentemente denominadas en la técnica simplemente "base"). Tal como se usa en el presente documento, nucleótidos "no modificados" o "naturales" incluyen adenina (A), guanina (G), timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Los nucleótidos modificados incluyen nucleótidos encontrados solo poco frecuentemente o
- 60 transitoriamente en ácidos nucleicos naturales, por ejemplo, hipoxantina, 6-metiladenina, 5-Me-pirimidinas,



particularmente 5-metilcitosina (también denominada 5-metil-2'-desoxicitosina y frecuentemente denominada en la técnica 5-Me-C), 5-hidroximetilcitosina (HMC), glicosil HMC y gentobiosil HMC, además de nucleótidos sintéticos, por ejemplo, 2-aminoadenina, 2-(metilamino)adenina, 2-(imidazolilalquil)adenina, 2-(aminoalquilamino)adenina u otras alquiladeninas heterosustituidas, 2-tiouracilo, 2-tiotimina, 5-bromouracilo, 5-hidroximetiluracilo, 8-azaguanina, 5 7-deazaguanina, N6(6-aminohexil)adenina y 2,6-diaminopurina (Kornberg, A., DNA Replication, W. H. Freeman & Co., San Francisco, 1980, pp75-77; Gebeyehu, G., (1987) et al. Nucl. Acids Res. 15:4513). Puede incluirse una base "universal" conocida en la técnica, por ejemplo, inosina. Se ha mostrado que las sustituciones de 5-Me-C incrementan la estabilidad dúplex del ácido nucleico alrededor de 0,6-1,2 °C. (Sanghvi, Y. S., in Crooke, S. T. y Lebleu, B., eds., Antisense Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278) y actualmente 10 son las sustituciones base preferidas.

Otra modificación de los oligonucleótidos de la divulgación implica enlazar químicamente al oligonucleótido uno o más restos o conjugados que potencian la actividad o captación celular del oligonucleótido. Estos restos incluyen, pero no se limitan a, restos de lípidos como es un resto de colesterol, un resto de colesterilo (Letsinger et al., (1989) 15 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 6553), cholic acid (Manoharan et al. (1994) Bioorg. Med. Chem. Lett. 4, 1053), un tioéter, por ejemplo, hexil-S-tritilol (Manoharan et al. (1992) Ann. N.Y. Acad. Sci. 660, 306; Manoharan et al. (1993) Bioorg. Med. Chem. Lett. 3, 2765), un tiocolesterol (Oberhauser et al., (1992) Nucl. Acids Res. 20, 533), una cadena alifática, por ejemplo, residuos de d odecandiol o undecilol (Saison-Behmoaras et al. EMBO J. 1991, 10, 111; Kabanov et al. (1990) FEBS Lett. 259, 327; Svinarchuk et al. (1993) Biochimie 75, 49), un fosfolípido, por ejemplo, di- 20 hexadecil-rac-glicerol o trietilamonio 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero- 3-H-fosfonato (Manoharan et al. (1995) Tetrahedron Lett. 36, 3651; Shea et al. (1990) Nucl. Acids Res. 18, 3777), una poliamina o una cadena de polietilenglicol (Manoharan et al. (1995) Nucleosides & Nucleotides, 14, 969), o un ácido adamantano-acético (Manoharan et al. (1995) Tetrahedron Lett. 36, 3651). Los oligonucleótidos que comprenden restos lipófilos, y procedimientos para preparar dichos oligonucleótidos, son conocidos en la técnica, por ejemplo, las patentes de 25 Estados Unidos Nos. 5,138,045, 5,218,105 y 5,459,255.

No es necesario que todas las posiciones en un oligonucleótido dado estén uniformemente modificadas, y de hecho más de una de las modificaciones mencionadas anteriormente puede incorporarse en un único oligonucleótido o incluso dentro de un único nucleósido dentro de un oligonucleótido. La presente divulgación también incluye 30 oligonucleótidos que son oligonucleótidos quiméricos, tal como se ha definido anteriormente en el presente documento.

En otro aspecto, la molécula de ácido nucleico de la presente divulgación está conjugada con otro resto que incluye, aunque no se limita a, nucleótidos abásicos, poliéter, poliamina, poliamidas, péptidos, hidratos de carbono, lípido, o 35 compuestos de polihidrocarburo. Los expertos en la materia reconocerán que estas moléculas pueden enlazarse a uno o más de cualquiera de los nucleótidos que comprenden la molécula de ácido nucleico en varias posiciones en el azúcar, base o grupo fosfato.

Los oligonucleótidos usados de acuerdo con esta divulgación pueden prepararse cómoda y rutinariamente mediante 40 la técnica muy conocida de síntesis en fase sólida. Equipo para dichas síntesis es comercializado por varios proveedores que incluyen Applied Biosystems. También puede emplearse cualquier otro medio para dicha síntesis; la síntesis real de los oligonucleótidos está perfectamente dentro de las aptitudes de un experto en la materia. También es muy conocido usar técnicas similares para preparar otros oligonucleótidos tales como fosforotioatos y derivados alquilados. También es muy conocido usar técnicas similares y amiditos modificados disponibles en el 45 mercado y productos de vidrio de poro controlado (CPG) tales como biotina, fluoresceína, acridina o amiditos modificados con psoraleno y/o CPG (disponible de Glen Research, Sterling VA) para sintetizar oligonucleótidos marcados de forma fluorescente, biotinilados u otros oligonucleótidos modificados tales como oligonucleótidos modificados con colesterol.

De acuerdo con la divulgación, el uso de modificaciones tales como el uso de monómeros de LNA para potenciar la potencia, especificidad y duración de la acción y ampliar las vías de administración de oligonucleótidos comprende 50 químicas actuales tales como MOE, ANA, FANA, PS, etc. (Uhlman, et al. (2000) Current Opinions in Drug Discovery & Development Vol. 3 No 2). Esto puede lograrse sustituyendo algunos de los monómeros en los presentes oligonucleótidos por monómeros de LNA. El oligonucleótido modificado con LNA puede tener un tamaño similar al 55 compuesto parental o puede ser más grande o preferentemente más pequeño. Se prefiere que dichas oligonucleótidos modificados con LNA contengan menos de aproximadamente el 70%, más preferentemente menos de aproximadamente el 60%, de la manera más preferente menos de aproximadamente el 50% de monómeros de LNA y que sus tamaños estén entre aproximadamente 5 y 25 nucleótidos, más preferentemente entre aproximadamente 12 y 20 nucleótidos.

60

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

Las patentes representativas de los Estados Unidos que enseñan la preparación de los enlaces anteriores que contienen fósforo comprenden, pero no se limitan a, las patentes de los EE.UU. con nos. 3,687,808; 4,469,863; 4,476,301; 5,023,243; 5, 177,196; 5,188,897; 5,264,423; 5,276,019; 5,278,302; 5,286,717; 5,321,131; 5,399,676; 5,405,939; 5,453,496; 5,455, 233; 5,466,677; 5,476,925; 5,519,126; 5,536,821; 5,541,306; 5,550,111; 5,563, 253; 5,571,799; 5,587,361; y 5,625,050.

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

Las patentes representativas de los Estados Unidos que enseñan la preparación de los oligonucleósidos comprenden, pero no se limitan a, las patentes de los EE.UU. con nos. 5,034,506; 5,166,315; 5,185,444; 5,214,134; 5,216,141; 5,235,033; 5,264, 562; 5, 264,564; 5,405,938; 5,434,257; 5,466,677; 5,470,967; 5,489,677; 5,541,307; 5,561,225; 5,596, 086; 5,602,240; 5,610,289; 5,602,240; 5,608,046; 5,610,289; 5,618,704; 5,623, 070; 5,663,312; 5,633,360; 5,677,437; y 5,677,439.

En otros miméticos de oligonucleótidos preferidos, tanto el azúcar como el enlace internucleosídico, es decir, el esqueleto, de las unidades de nucleótido se sustituyen por grupos novedosos. Las unidades de base se mantienen para la hibridación con un compuesto de ácido nucleico diana apropiado. Dicho compuesto oligomérico, un oligonucleótido mimético que se ha demostrado que tiene excelentes propiedades de hibridación, se denomina ácido nucleico peptídico (PNA). En compuestos de PNA, el esqueleto de azúcar de un oligonucleótido se sustituye por un esqueleto que contiene amida, en particular un esqueleto de aminoetilglicina. Las nucleobases son retenidas y se unen directamente o indirectamente a átomos de nitrógeno azo de la parte de amida del esqueleto. Las patentes representativas de los Estados Unidos que enseñan la preparación de compuestos PNA comprenden, pero no se limitan a, las patentes de los EE.UU. con nos. 5,539,082; 5,714,331; y 5,719,262. Enseñanzas adicionales de compuestos de PNA pueden encontrarse en Nielsen, et al. (1991) Science 254, 1497-1500.

En otro aspecto preferido de la divulgación, los oligonucleótidos con esqueletos de fosforotioato y oligonucleósidos con esqueletos de heteroátomo, y en particular -CH<sub>2</sub>-NH-O-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)-O-CH<sub>2</sub>-, conocidos como un esqueleto de metileno (metilimino) o MMI, -CH<sub>2</sub>-O-N(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)-N(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>- y -O-N(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- donde el esqueleto de fosfodiéster nativo se representa como -O-P-O-CH<sub>2</sub>- de la patente de EE.UU. n° 5.489.677, citada anteriormente, y los esqueletos de amida de la patente de EE.UU. n° 5.602.240, citada anteriormente. También se prefieren oligonucleótidos que tienen esqueletos de morfolino de la patente de EE.UU. n° 5.034.506, citada anteriormente.

Los oligonucleótidos modificados también pueden contener uno o más restos de azúcar sustituidos. Oligonucleótidos preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': OH; F; O-, S- o N-alquilo; O-, S-, o N-alqueno; O-, S- o N-alquinilo; o O-alquil-O-alquilo, donde el alquilo, alqueno y alquinilo pueden ser alquilo C a CO sustituido o sin sustituir o alqueno y alquinilo C<sub>2</sub> a CO. Se prefieren particularmente O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> OmCH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, OCH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH<sub>2</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ONH<sub>2</sub> y O(CH<sub>2</sub>nON(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> en las que n y m pueden ser de 1 a aproximadamente 10. Otros oligonucleótidos preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': C a CO, (alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, alcarilo, aralquilo, O-alcarilo o O-aralquilo, SH, SCH<sub>3</sub>, OCN, Cl, Br, CN, CF<sub>3</sub>, OCF<sub>3</sub>, SOCH<sub>3</sub>, SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, ONO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub>, heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, polialquilamino, sililo sustituido, un grupo de escisión de ARN, un grupo indicador, un intercalador, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido, o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un oligonucleótido, y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. Una modificación preferida comprende 2'-metoxietoxi (2'-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, también conocido como 2'-O-(2-metoxietilo) o 2'-MOE)

(Martin et al., (1995) *Helv. Chim. Acta*, 78, 486-504) por ejemplo, un grupo alcoxialcoxi. Otra modificación preferida comprende 2'-dimetilaminooxietoxi, es decir, un grupo  $O(CH_2)_2ON(CH_3)_2$ , también conocido como 2'-DMAOE, tal como se describe en los ejemplos en el presente documento más adelante, y 2'-dimetilaminoetoxietoxi (también conocido en la técnica como 2'-O-dimetilaminoetoxietilo o 2'-DMAEOE), es decir, 2'-O-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>.

5

Otras modificaciones preferidas comprenden 2'-metoxi (2'-OCH<sub>3</sub>), 2'-aminopropoxi (2'-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>) y 2'-flúor (2'-F). También pueden hacerse modificaciones similares en otras posiciones en el oligonucleótido, particularmente la posición 3' del azúcar en el nucleótido del extremo 3' o en oligonucleótidos enlazados 2'-5' y la posición 5' del nucleótido del extremo 5'. Los oligonucleótidos también pueden tener miméticos de azúcar tales como restos ciclobutilo en lugar del azúcar pentofuranosilo. Las patentes representativas de los Estados Unidos que enseñan la preparación de dichas estructuras de azúcar modificadas comprenden, pero no se limitan a, las patentes de los EE.UU. con nos. 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.

15

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

20

25

Además, los nucleótidos comprenden los divulgados en la patente de Estados Unidos nº 3.687.808, aquellos divulgados en 'The Concise Encyclopedia of Polymer Science And Engineering', páginas 858-859, Kroschwitz, J.I., ed. John Wiley & Sons, 1990, aquellos divulgados por Englisch et al., 'Angewandte Chemie, International Edition', 1991, 30, página 613, y aquellos divulgados por Sanghvi, Y.S., Capítulo 15, 'Antisense Research and Applications', páginas 289-302, Croke, S.T. y Lebleu, B. ea., CRC Press, 1993. Algunos de estos nucleótidos son particularmente útiles para incrementar la afinidad de unión de los compuestos oligoméricos de la divulgación. Estos comprenden pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y purinas sustituidas en N-2, N-6 y O -6, que comprenden 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. Se ha mostrado que las sustituciones de 5-metilcitosina incrementan la estabilidad del dúplex de ácido nucleico alrededor de 0,6-1,2 °C. (Sanghvi, Y. S., Croke, S. T. y Lebleu, B., eds., *Antisense Research and Applications*, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278) y actualmente son las sustituciones base preferidas, de manera aún más particular cuando se combinan con modificaciones de azúcar de 2'-Ometoxietilo

35

40

Las patentes representativas de los Estados Unidos que enseñan la preparación de los nucleótidos modificados citados anteriormente, así como otros nucleótidos modificados, comprenden, pero no se limitan a, las patentes de los EE.UU. con nos. 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

50

55

60

Dichos restos comprenden, aunque no se limitan a, restos de lípido tales como un resto colesterol (Letsinger et al., (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 86, 6553-6556), ácido cólico (Manoharan et al., (1994) *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 4, 1053-1060), un tioéter, por ejemplo, hexil-S-tritilol (Manoharan et al., (1992) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 660, 306-309; Manoharan et al., (1993) *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 3, 2765-2770), un tiocolesterol (Oberhauser et al., (1992) *Nucl. Acids Res.*, 20, 533-538), una cadena alifática, por ejemplo, residuos de dodecandiol o undecilo (Kabanov et al., (1990) *FEBS Lett.*, 259, 327-330; Svinarchuk et al., (1993) *Biochimie* 75, 49-54), un fosfolípido, por ejemplo, dihexadecil-rac-glicerol o 1, 2-di-O- hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato de trietilamonio (Manoharan et al., (1995) *Tetrahedron Lett.*, 36, 3651-3654; Shea et al., (1990) *Nucl. Acids Res.*, 18, 3777-3783), una poliamina o una cadena de polientilenglicol (Mancharan et al., (1995) *Nucleosides & Nucleotides*, 14, 969-973), o ácido adamantano-acético (Manoharan et al., (1995) *Tetrahedron Lett.*, 36, 3651-3654), un resto de palmitilo (Mishra et al., (1995) *Biochim. Biophys. Acta*, 1264, 229-237), o un resto de octadecilamina o hexilamino-carbonil-t-oxicoesterol (Croke et al.,

(1996) J. Pharmacol. Exp. Ther., 277, 923-937).

Las patentes representativas de los Estados Unidos que enseñan la preparación de estos conjugados de oligonucleótidos comprenden, pero no se limitan a, las patentes de los EE.UU con nos. 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; 10 5,585,481; 5,587,371; 5,595,726; 5,597,696; 5,599,923; 5,599, 928 y 5,688,941.

*Descubrimiento de fármacos:* Los compuestos de la presente divulgación también pueden aplicarse en las áreas del descubrimiento de fármacos y validación de dianas. La presente divulgación comprende el uso de los compuestos y segmentos diana preferidos e identificados en el presente documento en un esfuerzo para descubrir fármacos para 15 esclarecer relaciones que existen entre polinucleótidos del homólogo tipo Delta 1 (DLK1) y una patología, fenotipo o afección. Estos procedimientos incluyen detectar o modular los polinucleótidos del homólogo tipo Delta 1 (DLK1) que comprenden poner en contacto una muestra, tejido, célula u organismo con los compuestos de la presente divulgación, medir el nivel de ácido nucleico o de proteína de los polinucleótidos del homólogo tipo Delta 1 (DLK1) y/o un criterio de valoración fenotípico o químico relacionado en algún momento después del tratamiento, y 20 opcionalmente comparar el valor medido con una muestra no tratada o muestra tratada con otro compuesto de la divulgación. Estos procedimientos también pueden realizarse en paralelo o en combinación con otros experimentos para determinar la función de genes desconocidos para el proceso de validación de dianas o para determinar la validez de un producto génico particular como diana para el tratamiento o prevención de una enfermedad, afección o fenotipo particular.

25

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

La transferencia de un ácido nucleico exógeno a una célula u organismo huésped puede evaluarse detectando directamente la presencia del ácido nucleico en la célula u organismo. Dicha detección puede lograrse mediante 30 varios procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la presencia del ácido nucleico exógeno puede detectarse por Southern blot o por una técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando cebadores que amplifican específicamente secuencias de nucleótidos asociadas al ácido nucleico. La expresión de los ácidos nucleicos exógenos también puede medirse usando procedimientos convencionales que incluyen análisis de expresión génica. Por ejemplo, el ARNm producido a partir de un ácido nucleico exógeno puede detectarse y 35 cuantificarse usando una Northern blot y PCR con transcripción inversa (RT-PCR).

La expresión de ARN del ácido nucleico exógeno también puede detectarse midiendo una actividad enzimática o una actividad de proteína reportera. Por ejemplo, puede medirse la actividad moduladora antisentido indirectamente como una disminución o aumento en la expresión de ácido nucleico diana como una indicación de que el ácido 40 nucleico exógeno está produciendo el ARN efector. Basándose en conservación de secuencias, pueden diseñarse cebadores y usarse para amplificar regiones codificantes de los genes diana. Inicialmente, la región codificante más altamente expresada de cada gen puede usarse para construir un gen de control modelo, aunque puede usarse cualquier región codificante o no codificante. Cada gen de control se ensambla insertando cada región codificante entre una región codificante reportera y su señal de poli(A). Estos plásmidos producirían un ARNm con un gen 45 reportero en la parte cadena arriba del gen y una posible diana de iARN en la región no codificante 3'. La eficacia de oligonucleótidos antisentido individuales se ensayaría por modulación del gen reportero. Genes reporteros útiles en los procedimientos de la presente divulgación incluyen acetohidroxiácido sintasa (AHAS), fosfatasa alcalina (AP), beta-galactosidasa (LacZ), beta-glucuronidasa (GUS), cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), proteína verde fluorescente (GFP), proteína roja fluorescente (RFP), proteína amarilla fluorescente (YFP), proteína cian fluorescente 50 (CFP), peroxidasa de rábano picante (HRP), luciferasa (Luc), nopalina sintasa (NOS), octopina sintasa (OCS), y derivados de los mismos. Están disponibles múltiples marcadores de selección que confieren resistencia a ampicilina, bleomicina, cloranfenicol, gentamicina, higromicina, kanamicina, lincomicina, metotrexato, fosfotricina, puromicina y tetraciclina. Los procedimientos de determinación de la modulación de un gen reportero son muy conocidos en la técnica, e incluyen, aunque no se limitan a, procedimientos fluorimétricos (por ejemplo, 55 espectroscopía de fluorescencia, clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), microscopía de fluorescencia), determinación de la resistencia a antibióticos.

La expresión de la proteína DLK1 y del ARNm se pueden valorar usando procedimientos conocidos por los expertos en la materia y descritos en otra parte en el presente documento. Por ejemplo, pueden usarse inmunoensayos tales 60 como ELISA para medir los niveles de proteínas. Están comercialmente disponibles kits de ELISA de DLK1, por

ejemplo de R&D Systems (Minneapolis, MN).

En aspectos, la expresión de DLK1 (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 DLK1 en una muestra de control. Por ejemplo, la expresión de la proteína o ácido nucleico puede compararse usando procedimientos conocidos para los expertos en la materia con aquella en una muestra tratada con vector simulado o sin tratar. Como alternativa, la comparación con una muestra tratada con un oligonucleótido antisentido de control (por ejemplo, una que tiene una secuencia alterada o diferente) puede hacerse dependiendo de la información deseada. En otro aspecto, una diferencia en la expresión de la proteína o ácido nucleico de DLK1 en una muestra tratada frente a sin tratar puede compararse con la diferencia en la expresión de un ácido nucleico diferente (incluyendo cualquier estándar considerado apropiado por el investigador, por ejemplo, un gen de mantenimiento) en una muestra tratada frente a una muestra sin tratar.

Las diferencias observadas pueden expresarse según se desee, por ejemplo, en forma de una relación o fracción, para su uso en una comparación con control. En aspectos, el nivel de ARNm o proteína de DLK1, en una muestra tratada con un oligonucleótido antisentido de la presente divulgación, disminuye o aumenta de aproximadamente 1,25 veces a aproximadamente 10 veces o más con respecto a una muestra sin tratar o una muestra tratada con un ácido nucleico de control. En aspectos, el nivel de ARNm o proteína de DLK1 aumenta o disminuye al menos aproximadamente 1,25 veces, al menos aproximadamente 1,3 veces, al menos aproximadamente 1,4 veces, al menos aproximadamente 1,5 veces, al menos aproximadamente 1,6 veces, al menos aproximadamente 1,7 veces, al menos aproximadamente 1,8 veces, al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 2,5 veces, al menos aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 3,5 veces, al menos aproximadamente 4 veces, al menos aproximadamente 4,5 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 5,5 veces, al menos aproximadamente 6 veces, al menos aproximadamente 6,5 veces, al menos aproximadamente 7 veces, al menos aproximadamente 7,5 veces, al menos aproximadamente 8 veces, al menos aproximadamente 8,5 veces, al menos aproximadamente 9 veces, al menos aproximadamente 9,5 veces, o al menos aproximadamente 10 veces o más.

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

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

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

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "sistema biológico" o "sistema" se define como cualquier organismo, célula, cultivo celular o tejido que expresa, o se ha hecho competente para expresar productos de genes del homólogo tipo Delta 1 (DLK1). Éstos incluyen, aunque no se limitan a, seres humanos, animales transgénicos, células, cultivos celulares, tejidos, xenoinjertos, trasplantes y combinaciones de los mismos.

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

Ejemplos de procedimientos de análisis de la expresión génica conocidos en la técnica incluyen matrices o micromatrices de ADN, (Brazma y Vilo, (2000) FEBS Lett., 480, 17-24; Celis, et al., (2000) FEBS Lett., 480, 2-16), SAGE (análisis en serie de expresión génica) (Madden, et al., (2000) Drug Discov. Today, 5, 415- 425), READS (amplificación por enzimas de restricción de los ADNc digeridos) (Prashar y Weissman, (1999) Methods Enzymol., 303, 258-72), TOGA (análisis de expresión génica total) (Sutcliffe, et al., (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 97, 1976-81), matrices de proteínas y proteómicos (Celis, et al., (2000) FEBS Lett., 480, 2-16; Jungblut, et al., Electrophoresis, 1999, 20, 2100-10), secuenciación de marca de secuencia expresada (EST) (Celis, et al., FEBS

Lett., 2000, 480, 2-16; Larsson, et al., J. Biotechnol., 2000, 80, 143-57), huella de ADN sustractiva (SuRF) (Fuchs, et al., (2000) Anal. Biochem. 286, 91-98; Larson, et al., (2000) Cytometry 41, 203-208), clonación sustractiva, presentación 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 procedimientos de espectrometría de masas (To, Comb. (2000) Chem. High Throughput Screen, 3, 235-41).

Los compuestos de la divulgación son útiles para investigación y diagnóstico, debido a que estos compuestos hibridan con ácidos nucleicos que codifican para el homólogo tipo Delta 1 (DLK1). Por ejemplo, los oligonucleótidos que hibridan con dicha eficiencia y en dichas condiciones que se han descrito en el presente documento como moduladores eficaces del homólogo tipo Delta 1 (DLK1) son cebadores o sondas eficaces en condiciones que favorecen la amplificación génica o de transcripción, respectivamente. Estos cebadores y sondas son útiles en procedimientos que requieren la detección específica de moléculas de ácidos nucleicos que codifican para el homólogo tipo Delta 1 (DLK1) y en la amplificación de dichas moléculas de ácidos nucleicos para la detección o para su uso en estudios adicionales del homólogo tipo Delta 1 (DLK1). La hibridación de los oligonucleótidos antisentido, particularmente los cebadores y sondas, de la divulgación con un ácido nucleico que codifica para el homólogo tipo Delta 1 (DLK1) puede detectarse por medios conocidos en la técnica. Dichos medios pueden comprender conjugación de una enzima con el oligonucleótido, radiomarcado del oligonucleótido, o cualquier otro medio de detección adecuado. También pueden prepararse kits que usan dichos medios de detección para detectar el nivel del homólogo tipo Delta 1 (DLK1) en una muestra.

La especificidad y sensibilidad del antisentido también son empleadas por los expertos en la materia para usos terapéuticos. Se han empleado oligonucleótidos antisentido como restos terapéuticos en el tratamiento de patologías en animales, que incluyen seres humanos. Los fármacos de oligonucleótido antisentido se han administrado con seguridad y eficazmente a seres humanos y numerosos ensayos clínicos están actualmente en marcha. De este modo, se establece que los compuestos antisentido pueden ser modalidades terapéuticas útiles que pueden configurarse para ser útiles en regímenes de tratamiento para el tratamiento de células, tejidos y animales, especialmente seres humanos.

Para productos terapéuticos, un animal, preferentemente un ser humano, que se sospecha que tiene una enfermedad o trastorno que puede tratarse modulando la expresión de polinucleótidos del homólogo tipo Delta 1 (DLK1) se trata administrando compuestos antisentido de acuerdo con esta divulgación. Por ejemplo, en un aspecto no limitante, los procedimientos comprenden la etapa de administrar al animal que necesita tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz del modulador del homólogo tipo Delta 1 (DLK1). Los moduladores del homólogo tipo Delta 1 (DLK1) de la presente divulgación modulan de manera efectiva la actividad del homólogo tipo Delta 1 (DLK1) o modulan la expresión de la proteína del homólogo tipo Delta 1 (DLK1). En un aspecto, la actividad o expresión del homólogo tipo Delta 1 (DLK1) en un animal se inhibe aproximadamente el 10% en comparación con un control. Preferentemente, la actividad o expresión del homólogo tipo Delta 1 (DLK1) en un animal se inhibe aproximadamente el 30%. Más preferentemente, la actividad o expresión del homólogo tipo Delta 1 (DLK1) en un animal se inhibe el 50% o más. De este modo, los compuestos oligoméricos modulan la expresión del ARNm del homólogo tipo Delta 1 (DLK1) 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 del homólogo tipo Delta 1 (DLK1) y/o en un animal aumenta aproximadamente el 10% en comparación con un control. Preferentemente, la actividad o expresión del homólogo tipo Delta 1 (DLK1) en un animal aumenta aproximadamente el 30%. Más preferentemente, la actividad o expresión del homólogo tipo Delta 1 (DLK1) en un animal aumenta el 50% o más. De este modo, los compuestos oligoméricos modulan la expresión del ARNm del homólogo tipo Delta 1 (DLK1) 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, se puede medir la reducción de la expresión del homólogo tipo Delta 1 (DLK1) en suero, sangre, tejido adiposo, hígado o cualquier otro líquido corporal, tejido u órgano del animal. Preferentemente, las células contenidas dentro de dichos líquidos, tejidos u órganos que se analizan contienen una molécula de ácido nucleico que codifica péptidos del homólogo tipo Delta 1 (DLK1) y/o la propia proteína del homólogo tipo Delta 1 (DLK1).

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

procedimientos de la divulgación también pueden ser útiles profilácticamente.

### **Conjugados**

- 5 Otra modificación de los oligonucleótidos de la divulgación implica enlazar químicamente al oligonucleótido uno o más restos o conjugados, que potencian la actividad, distribución celular o captación celular del oligonucleótido. Estos restos o conjugados pueden comprender grupos conjugados covalentemente unidos a grupos funcionales tales como grupos hidroxilo primarios o secundarios. Grupos conjugados de la divulgación incluyen intercaladores, moléculas reporteras, poliaminas, poliamidas, polietilenglicoles, poliéteres, grupos que potencian las propiedades
- 10 farmacodinámicas de oligómeros, y grupos que potencian las propiedades farmacocinéticas de oligómeros. Grupos conjugados típicos incluyen colesteroles, lípidos, fosfolípidos, biotina, fenazina, folato, fenantridina, antraquinona, acridina, fluoresceínas, rodaminas, cumarinas y colorantes. Grupos que potencian las propiedades farmacodinámicas, en el contexto de esta divulgación, incluyen grupos que mejoran la captación, potencian la resistencia a la degradación y/o fortalecen la hibridación específica de secuencia con el ácido nucleico diana.
- 15 Grupos que potencian las propiedades farmacocinéticas, en el contexto de esta divulgación, incluyen grupos que mejoran la captación, distribución, metabolismo o eliminación de los compuestos de la presente divulgación. Grupos conjugados representativos se describen en la solicitud de patente internacional n°. PCT/US92/09196, depositada el 23 de 1992, y la patente de EE.UU. con No. 6,287,860. Restos conjugados incluyen, aunque no se limitan a, restos de lípido tales como un resto colesterol, ácido cólico, un tioéter, por ejemplo, hexil-5-tritilol, un tiocolesterol, una
- 20 cadena alifática, por ejemplo, residuos de dodecanodiol o undecilo, un fosfolípido, por ejemplo, di-hexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato de trietilamonio, una poliamina o una cadena de polietilenglicol, o ácido adamantano acético, un resto palmitilo, o un resto octadecilamina o hexilamino-carbonil-oxicolesterol. Los oligonucleótidos de la divulgación también pueden conjugarse con principios activos, por ejemplo, aspirina, warfarina, fenilbutazona, ibuprofeno, suprofen, fenbufeno, ketoprofeno, (S)-(+)-pranoprofeno, carprofeno,
- 25 dansilsarcosina, ácido 2,3,5-triyodobenzoico, ácido flufenámico, ácido folínico, una benzotiadiazida, clortiazida, una diazepina, indometacina, un barbitúrico, una cefalosporina, un fármaco sulfa, un antidiabético, un antibacteriano o un antibiótico.

- Las patentes representativas de los Estados Unidos que enseñan la preparación de estos conjuados de
- 30 oligonucleótidos incluyen, pero no se limitan a, las patentes de los EE.UU. con Nos. 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;
- 35 5,371,241; 5,391,723; 5,416,203; 5,451,463; 5,510,475; 5,512,667; 5,514,785; 5,565,552; 5,567,810; 5,574,142; 5,585,481; 5,587,371; 5,595,726; 5,597,696; 5,599,923; 5,599,928 y 5,688,941.

### **Formulaciones**

- 40 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 representativas de los Estados Unidos que enseñan la preparación de estas formulaciones de ayuda en la captación, distribución y/o absorción incluyen, pero no se limitan a, las patentes de los EE.UU. con
- 45 Nos. 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
- 50 la expresión y/o función de una diana, aspectos de la divulgación se refieren a construcciones de vector de expresión para la expresión de oligonucleótidos antisentido, que comprende promotores, secuencias de genes promotores híbridos y poseen una fuerte actividad promotora constitutiva, o una actividad promotora que puede inducirse en el caso deseado.

- 55 En un aspecto, la práctica de la divulgación implica administrar al menos uno de los oligonucleótidos antisentido anteriores con un sistema de administración de ácidos nucleicos adecuado. En un aspecto, ese sistema incluye un vector no viral enlazado operativamente al polinucleótido. Ejemplos de dichos vectores no virales incluyen el oligonucleótido solo (por ejemplo, una cualquiera o más de las SEQ ID NO: 4 a 5) o en combinación con una formulación de proteína, polisacárido o lípido adecuada.

60

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

Vectores preferidos adicionales incluyen vectores virales, proteínas de fusión y conjugados químicos. Los vectores retrovirales incluyen virus de la leucemia murina de Moloney y virus basados en el HIV. Un vector viral basado en el HIV preferido comprende al menos dos vectores en los que los genes gag y pol son de un genoma del HIV y el gen env es de otro virus. Se prefieren vectores virales de ADN. Estos vectores incluyen vectores de pox tales como vectores de ortopox o avipox, vectores del virus del herpes tales como un vector del virus del herpes simple I (HSV) [Geller, A.I. et al., (1995) J. Neurochem, 64: 487; Lim, F., et al., en la clonación de ADN: Mammalian Systems, D. Glover, Ed. (Oxford Univ. Press, Oxford England) (1995); Geller, A.I. et al., (1993) Proc Natl. Acad. Sci.: EE.UU.,:90 7603; Geller, A.I., et al., (1990) Proc Natl. Acad. Sci EE.UU.,: 87:1149], Adenovirus Vectors (LeGal LaSalle et al., Science, 259:988 (1993); Davidson, et al., (1993) Nat. Genet. 3: 219; Yang, et al., (1995) J. Virol. 69: 2004) y Vectores de Virus Adeno-asociados (Kaplitt, M.G., et al., (1994) Nat. Genet. 8:148).

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

La expresión "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales fisiológicamente y farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la divulgación: es decir, sales que retienen la actividad biológica deseada del compuesto parental y no confieren efectos toxicológicos no deseados al mismo. Para oligonucleótidos, ejemplos preferidos de sales farmacéuticamente aceptables y sus usos se describen adicionalmente en la patente de Estados Unidos No. 6,287,860.

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

Para tratar tejidos en el sistema nervioso central, la administración puede realizarse por, por ejemplo, inyección o infusión en el líquido cefalorraquídeo. La administración del ARN antisentido en el líquido cefalorraquídeo se describe, por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. App. Pub. No. 2007/0117772, "Métodos para desacelerar el progreso de la enfermedad ALS familiar".

Cuando se pretende que el oligonucleótido antisentido de la presente divulgación se administre a células en el sistema nervioso central, la administración puede ser con uno o más agentes capaces de promover la penetración del oligonucleótido antisentido objeto a través de la barrera hematoencefálica. La inyección puede realizarse, por ejemplo, en la corteza entorrinal o hipocampo. La administración de factores neurotróficos mediante la administración de un vector de adenovirus a neuronas motoras en tejido muscular se describe, por ejemplo, en la patente de los EE.UU. nº. 6.632.427, "Transferencia génica mediada por vector adenoviral en neuronas motoras medulares". La distribución de vectores directamente al cerebro, por ejemplo, el cuerpo estriado, el tálamo, el hipocampo, o la sustancia negra, se conoce en la técnica y se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. nº. 6.756.523, "Vectores de adenovirus para la transferencia de genes extraños en células del sistema nervioso central particularmente en el cerebro". La administración puede ser rápida como mediante inyección o realizarse durante un periodo de tiempo como por infusión o administración lenta de formulaciones de liberación lenta.

Los oligonucleótidos antisentido objeto también puede enlazarse o conjugarse con agentes que proporcionan propiedades farmacéuticas o farmacodinámicas deseables. Por ejemplo, el oligonucleótido antisentido puede acoplarse a cualquier sustancia, conocida en la técnica para promover la penetración o transporte a través de la barrera hematoencefálica, tal como un anticuerpo para el receptor de transferrina, y administrarse mediante inyección intravenosa. El compuesto antisentido puede enlazarse con un vector viral, por ejemplo, que hace al compuesto antisentido más eficaz y/o aumenta el transporte del compuesto antisentido a través de la barrera



hematoencefálica. La rotura osmótica de la barrera hematoencefálica también puede llevarse a cabo por, por ejemplo, infusión de azúcares que incluyen, aunque no se limitan a, mesoeritritol, xilitol, D(+) galactosa, D(+) lactosa, D(+) xilosa, dulcitol, mioinositol, L(-) fructosa, D(-) manitol, D(+) glucosa, D(+) arabinosa, D(-) arabinosa, celobiosa, D(+) maltosa, D(+) rafinosa, L(+) ramnosa, D(+) melibiosa, D(-) ribosa, adonitol, D(+) arabitól, L(-) arabitól, D(+) fucosa, L(-) fucosa, D(-) lixosa, L(+) lixosa y L(-) lixosa, o aminoácidos que incluyen, aunque no se limitan a, glutamina, lisina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glicina, histidina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, tirosina, valina y taurina. Los procedimientos y materiales para potenciar la penetración de la barrera hematoencefálica se describen, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos nº 4.866.042, "Método para la distribución de material genético a través de la barrera sanguínea del cerebro," 6.294.520, "Material para el paso a través de la barrera sanguínea del cerebro" y 6.936.589, "Sistemas de administración parenteral".

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

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

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

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

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

Las emulsiones normalmente son sistemas heterogéneos de un líquido dispersado en otro en forma de gotitas que normalmente superan 0,1  $\mu$  m de diámetro. Las emulsiones pueden contener componentes adicionales, además de las fases dispersas, y el fármaco activo que puede estar presente como una solución en o bien la fase acuosa, fase oleosa o bien él mismo como una fase independiente. Las microemulsiones están incluidas como un aspecto de la presente divulgación. Las emulsiones y sus usos son muy conocidos en la técnica y se describen adicionalmente en la patente de Estados Unidos No. 6,287,860.

Formulaciones de la presente divulgación incluyen formulaciones liposomales. Tal como se usa en la presente divulgación, el término "liposoma" significa una vesícula compuesta por lípidos anfifílicos dispuestos en una bicapa o bicapas esféricas. Los liposomas son vesículas unilaminares o multilaminares que tienen una membrana formada por un material lipófilo y un interior acuoso que contiene la composición que va a administrarse. Los liposomas 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.

60

Los liposomas también incluyen liposomas "estéricamente estabilizados", una expresión que, tal como se usa en el presente documento, se refiere a liposomas que comprenden uno o más lípidos especializados. Cuando se incorporan en liposomas, estos lípidos especializados producen liposomas con vidas en circulación mejoradas con respecto a los liposomas que carecen de dichos lípidos especializados. Ejemplos de liposomas estéricamente estabilizados son aquellos en los que parte de la parte de lípido formado de vesícula del liposoma comprende uno o más glucolípidos o se derivatiza con uno o más polímeros hidrófilos, tales como un resto de polietilenglicol (PEG). Los liposomas y sus usos se describen adicionalmente en la patente de Estados Unidos No. 6,287,860.

Las formulaciones y composiciones farmacéuticas de la presente divulgación también pueden comprender tensioactivos. El uso de tensioactivos en medicamentos, formulaciones y en emulsiones es muy conocido en la técnica. Los agentes tensioactivos y sus usos se describen adicionalmente en la patente de EE.UU. No. 6,287,860.

En un aspecto, la presente divulgación emplea diversos potenciadores de la penetración para efectuar la administración eficiente de ácidos nucleicos, particularmente oligonucleótidos. Además de ayudar en la difusión de fármacos no lipófilos a través de membranas celulares, los potenciadores de la penetración también potencian la permeabilidad de fármacos lipófilos. Los potenciadores de la penetración pueden clasificarse como pertenecientes a una de cinco amplias categorías, es decir, tensioactivos, ácidos grasos, sales biliares, agentes quelantes y no tensioactivos no quelantes. Los mejoradores de penetración y sus usos se describen adicionalmente en la patente de EE.UU. No. 6,287,860.

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

Formulaciones preferidas para administración tópica incluyen aquellas en las que los oligonucleótidos de la divulgación están en mezcla con un agente de administración tópica tal como lípidos, liposomas, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, esteroides, agentes quelantes y tensioactivos. Lípidos y liposomas preferidos incluyen neutros (por ejemplo, dioleoil-fosfatidiletanolamina DOPE, dimiristoilfosfatidilcolina DMPC, diestearoilfosfatidilcolina) negativos (por ejemplo, dimiristoilfosfatidilglicerol DMPG) y catiónicos (por ejemplo, dioleiltetrametilaminopropilo 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 patente de Estados Unidos No. 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 minicomprimidos. Pueden ser deseables espesantes, aromatizantes, diluyentes, emulsionantes, adyuvantes de dispersión o aglutinantes. Formulaciones orales preferidas son aquellas en las que los oligonucleótidos de la divulgación se administran conjuntamente con uno o más potenciadores de la penetración, tensioactivos y quelantes. Tensioactivos preferidos incluyen ácidos grasos y/o ésteres o sales de los mismos, ácidos biliares y/o sales de los mismos. Ácidos biliares/sales y ácidos grasos preferidos y sus usos se describen adicionalmente en la patente de Estados Unidos No. 6,287,860. También se prefieren combinaciones de potenciadores de la penetración, por ejemplo, ácidos grasos/sales en combinación con ácidos biliares/sales. Una combinación particularmente preferida es la sal de sodio de ácido láurico, ácido cáprico y UDCA. Potenciadores de la penetración adicionales incluyen éter polioxietilen-9-laurílico, éter polioxietilen-20-cetílico. Los oligonucleótidos de la divulgación pueden administrarse por vía oral, en forma granulada que incluye partículas secadas por pulverización, o complejados para formar micro o nanopartículas. Los agentes complejantes de oligonucleótidos y sus usos se describen adicionalmente en la patente de Estados Unidos No. 6,287,860.

Las composiciones y formulaciones para administración parenteral, intratecal o intraventricular pueden comprender soluciones acuosas estériles que también pueden contener tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados tales como, aunque no se limitan a, potenciadores de la penetración, compuestos portadores y otros vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables

Ciertos aspectos de la divulgación proporcionan composiciones farmacéuticas que contienen uno o más compuestos oligoméricos y uno o más de otros agentes quimioterapéuticos que funcionan por un mecanismo no antisentido. Ejemplos de dichos agentes quimioterapéuticos incluyen, aunque no se limitan a, fármacos quimioterapéuticos para el cáncer tales como daunorrubicina, daunomicina, dactinomomicina, doxorubicina, epirubicina, idarrubicina,

esorrubicina, bleomicina, mafosfamida, ifosfamida, citosina arabinósido, biscloroetil-nitrosurea, busulfano, mitomicina C, actinomicina D, mitramicina, prednisona, hidroxiprogesterona, testosterona, tamoxifeno, dacarbazina, procarbazona, hexametilmelamina, pentametilmelamina, mitoxantrona, amsacrina, clorambucilo, metilciclohexilnitrosurea, mostazas de nitrógeno, melfalan, ciclofosfamida, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, 5 citarabina, 5-azacitidina, hidroxiaurea, desoxicofurmicina, 4-hidroxiperóxido-fosforamida, 5-fluorouracilo (5-FU), 5-fluorodesoxiuridina (5-FUdR), metotrexato (MTX), colchicina, taxol, vincristina, vinblastina, etopósido (VP-16), trimetrexato, irinotecán, topotecán, gemcitabina, tenipósido, cisplatino y dietilestilbestrol (DES). Cuando se usan con los compuestos de la divulgación, dichos agentes quimioterapéuticos pueden usarse individualmente (por ejemplo, 5-FU y oligonucleótido), secuencialmente (por ejemplo, 5-FU y oligonucleótido durante un periodo de tiempo seguido de MTX y oligonucleótido), o en combinación con uno o más de otros de dichos agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, 5-FU, MTX y oligonucleótido, o 5-FU, radioterapia y oligonucleótido). Fármacos antiinflamatorios, que incluyen, aunque no se limitan a, fármacos antiinflamatorios no esteroideos y corticosteroides, y fármacos antivirales, que incluyen, aunque no se limitan a, ribivirina, vidarabina, aciclovir y ganciclovir, también pueden combinarse en composiciones de la divulgación. Las combinaciones de compuestos antisentido y otros fármacos no antisentido también están dentro del alcance de la presente divulgación. Pueden usarse dos o más compuestos combinados juntos o secuencialmente.

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 del homólogo tipo Delta 1 (DLK1), y la segunda diana puede ser una región de otra secuencia de nucleótidos. Como alternativa, las composiciones de la divulgación pueden contener dos o más compuestos antisentido dirigidos a diferentes regiones del mismo ácido nucleico diana del homólogo tipo Delta 1 (DLK1). 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.

#### **Dosificación:**

Se cree que la formulación de composiciones terapéuticas y su posterior administración (dosificación) están dentro de la experiencia de los expertos en la materia. La dosificación depende de la gravedad y sensibilidad de la patología que va a tratarse, durando el ciclo de tratamiento de varios días a varios meses, o hasta que se efectúe una cura o se logre una disminución de la patología. Pueden calcularse programas de dosificación óptimos a partir de mediciones de acumulación de fármaco en el cuerpo del paciente. Los expertos pueden determinar fácilmente dosificaciones óptimas, metodologías de dosificación y tasas de repetición. Las dosificaciones óptimas pueden variar dependiendo de la potencia relativa de oligonucleótidos individuales, y generalmente pueden estimarse basándose en las EC50 que se ha descubierto que son eficaces en modelos animales in vitro e in vivo. En general, la dosificación es de 0,01  $\mu$ g a 100 g por kg de peso corporal, y puede administrarse una vez o más diariamente, semanalmente, mensualmente o anualmente, o incluso una vez cada 2 a 20 años. Los expertos en la materia pueden estimar fácilmente tasas de repetición para la dosificación basándose en tiempos de residencia medidos y concentraciones del fármaco en fluidos corporales o tejidos. Tras el tratamiento satisfactorio, puede desearse que el paciente reciba terapia de mantenimiento para prevenir la reaparición de la patología, en el que el oligonucleótido se administra en dosis de mantenimiento, que oscilan de 0,01  $\mu$ g 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. Se describen ciertas dosis inyectadas de oligonucleótidos antisentido, por ejemplo, en la patente de EE.UU. n.º. 7.563.884, "Modulación antisentido de expresión PTP1B".

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

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

5

## EJEMPLOS

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

10

**Ejemplo 1: Diseño de oligonucleótidos antisentido específicos para una molécula de ácido nucleico antisentido a un homólogo tipo Delta 1 (DLK1) y/o una cadena sentido de polinucleótido de homólogo tipo Delta 1 (DLK1)**

15

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

20

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

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

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

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

50

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

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

60

altamente fluorescentes cuando se unen a dsADN.

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

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

## 20 **Ejemplo 2: Modulación de polinucleótidos de DLK1**

### **Tratamiento de células HepG2 con oligonucleótidos antisentido**

Se cultivaron células HepG2 de ATCC (nº de cat HB-8065) en medio de cultivo (MEM/EBSS (Hyclone nº de cat SH30024, o Mediatech nº de cat MT-10-010-CV) +10% FBS (Mediatech nº de cat MT35- 011-CV)+ penicilina/estreptomomicina (Mediatech nº de cat MT30-002-CI)) a 37°C y el 5% de CO<sub>2</sub>. Un día antes del experimento, las células volvieron a sembrarse a la densidad de  $1,5 \times 10^5$ /ml en placas de 6 pocillos y se incubaron a 37°C y con el 5% de CO<sub>2</sub>. El día del experimento, el medio en las placas de 6 pocillos se cambió a medio de cultivo fresco. Todos los oligonucleótidos antisentido se diluyeron a la concentración de 20 µM. Se incubaron dos µl de esta solución con 400 µl de medio Opti-MEM (Gibco, nº de cat 31985-070) y 4 µl de Lipofectamine 2000 (Invitrogen, nº de cat 11668019) a temperatura ambiente durante 20 min y se aplicaron a cada pocillo de las placas de 6 pocillos con células HepG2. Se usó una mezcla similar que incluye 2 µl de agua en lugar de la solución de oligonucleótido para los controles transfectados con vector simulado. Después de 3-18 horas de incubación a 37°C y con el 5% de CO<sub>2</sub>, el medio se cambió a medio fresco de crecimiento. 48 h después de la adición de oligonucleótidos antisentido, el medio se eliminó y se extrajo ARN de las células usando el sistema de aislamiento de ARN total SV de Promega (nº de cat Z3105) o el kit de aislamiento de ARN total RNeasy de Qiagen (nº de cat 74181) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se añadieron 600 ng de ARN a la reacción de transcripción inversa realizada usando el kit de ADNc Verso de Thermo Scientific (nº de cat AB1453B) o el kit de Transcripción Inversa de ADNc de Alta Capacidad (nº de cat 4368813) de Applied Biosystems, tal como se describe en el protocolo del fabricante. El ADNc de esta reacción de transcripción inversa se usó para monitorizar la expresión génica por PCR en tiempo real usando la mezcla de expresión génica Taqman de ABI (nº de cat 4369510) y cebadores/sondas diseñados por ABI (ensayo de expresión génica Taqman de Applied Biosystems: Hs00171584\_ml by Applied Biosystems Inc., Foster City CA). Se usó el siguiente ciclo de PCR: 50°C durante 2 min, 95°C durante 10 min, 40 ciclos de (95°C durante 15 segundos, 60°C durante 1 min) usando el termociclador Mx4000 (Stratagene).

El cambio de veces en la expresión génica después del tratamiento con oligonucleótidos antisentido se calculó basándose en la diferencia de valores de  $dC_t$  normalizados contra 18S entre las muestras tratadas y las transfectadas de forma simulada.

50 Ensayos de expresión génica usados (ABI cat#s), todas las sondas con MGB:

18S: 4319413E (HEX marcado)

DLK1: Hs00171584\_ml (FAM marcado)

Los resultados de PCR en tiempo real muestran que los niveles de ARNm de DLK1 en células HepG2 se incrementan significativamente 48 h después del tratamiento con dos de los oligos diseñados para HS.697829 antisentido del DLK1 (Fig 1).

Aunque la divulgación se ha ilustrado y descrito con respecto a una o más implementaciones, se presentarán alteraciones y modificaciones equivalentes a los expertos en la técnica, en relación a la lectura y comprensión de esta especificación y los dibujos anexos. Además, aunque se ha descrito una característica particular de la

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

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

**LISTA DE SECUENCIAS**

- 10 <110> CuRNA, Inc.  
 <120> TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES RELACIONADAS CON EL HOMÓLOGO TIPO DELTA 1 (DLK1) POR INHIBICIÓN DE TRANSCRITO ANTISENTIDO NATURAL A DLK1  
 <130> P37697EP-PCT  
 15 <140> EP10753955.3  
 <141> 2010-03-16  
 <150> US61/160,758  
 <151> 2009-03-17  
 <150> US61/178,195  
 20 <151> 2009-05-14  
 <160> 7  
 <170> PatentIn versión 3.5  
 <210> 1  
 <211> 1532  
 25 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <300>  
 <308> NM\_003836  
 <309> 2010-02-28  
 30 <313> (1)..(1532)  
 <400> 1

```

gagagcgcag cgcgcagccc ggtgcagccc tggctttccc ctcgctgcgc gcccgcgcgc      60
cctttcgcgt ccgcaaccag aagcccagtg cggcgccagg agccggaccc gcgcccgcac      120
cgctcccggg accgcgaccc cggccgccca gagatgaccg cgaccgaagc cctcctgcgc      180
gtcctcttgc tcctgctggc tttcggccac agcaacctatg gggctgaatg cttcccggcc      240
tgcaaccccc aaaatggatt ctgcgaggat gacaatgttt gcaggtgcca gcctggctgg      300
cagggctccc tttgtgacca gtgcgtgacc tctcccggct gccttcacgg actctgtgga      360
gaaccogggc agtgcatttg caccgacggc tgggacgggg agctctgtga tagagatggt      420
cgggcctgct cctcggcccc ctgtgccaac aacgggacct gcgtgagcct ggacgatggc      480
ctctatgaat gctcctgtgc ccccgggtac tcgggaaagg actgccagaa aaaggacggg      540
ccctgtgtga tcaacggctc ccctgccag cacggaggca cctgctgtga tgatgagggc      600
cgggcctccc atgcctcctg cctgtgcccc cctggcttct caggcaattt ctgcgagatc      660
gtggccaaca gctgcacccc caaccatgc gagaacgacg gcgtctgcac tgacattggg      720
ggcgacttcc gctgccggtg cccagccggc ttcacgcaca agacctgcag ccgcccggtg      780
accaactgcg ccagcagccc gtgccagaac gggggcacct gcctgcagca caccaggtg      840
agctacgagt gtctgtgcaa gcccaggttc acaggtctca cctgtgtcaa gaagcgcgcg      900
    
```

ES 2 627 763 T3

ctgagccccc agcaggtcac ccgtctgccc agcggctatg ggctggccta ccgcctgacc 960  
 cctgggggtgc acgagctgcc ggtgcagcag ccggagcacc gcatcctgaa ggtgtccatg 1020  
 aaagagctca acaagaaaac ccctctcctc accgagggcc aggccatctg cttcaccatc 1080  
 ctgggogtgc tcaccagcct ggtggtgctg ggcaactgtg gtatcgtctt cctcaacaag 1140  
 tgcgagacct ggggtgtccaa cctgcgctac aaccacatgc tgcggaagaa gaagaacctg 1200  
 ctgcttcagt acaacagcgg ggaggacctg gccgtcaaca tcatcttccc cgagaagatc 1260  
 gacatgacca ccttcagcaa ggaggccggc gacgaggaga tctaagcagc gttcccacag 1320  
 ccccctctag attcttgag ttccgcagag cttactatac gcggctctgtc ctaatctttg 1380  
 tgggtttcgc tatctcttgt gtcaaatctg gtgaacgcta cgcttacata tattgtcttt 1440  
 gtgctgctgt gtgacaaaac caatgcaaaa acaatcctct ttctctctct taatgcatga 1500  
 tacagaataa taataagaat ttcactctta aa 1532

<210> 2

5 <211> 8224

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 2

10

gagagcgcag cgcgcagccc ggtgcagccc tggctttccc ctgctgccc gcccgccc 60  
 cctttcgcgt ccgcaaccag aagcccagtg cggcgccagg agccggaccc gcgcccgcac 120  
 cgctcccggg accgcgaccc cggccgccca gagatgaccg cgaccgaagc cctcctgccc 180  
 gtctcttgc tctgctggc tttcggccac agcaacctatg gtgagttccc cggcgcccg 240  
 gctcggccc cctctgggga agcctgcgac tcccgcggc cggcccggg ccccgcacgc 300  
 cccgtctcgt gagccccaac tccgcccgtc ccgcctagcc ctaagccccg cgctgtgcct 360  
 gtctcgcctt acccaccacg ctgcgatgcc aaggcccgtc ccaggggtcc caggcgcag 420  
 gggatgtgtg agacccccag ccccttccc cctgcagaa gtggcgccag aggggtgtcg 480  
 gtgcgctgag caaggaggta tggaaaaatg ggtgctgtt gtggagtctt ctatgaaat 540  
 actctggggg gcaactttgg ggtgtccctg tgtgagcgtt ctggaacagg tctcggggcg 600  
 ggagtggggg acgactttgc cgtcttagcc cccaattccc agagaagccc agcctgagcc 660  
 cttcctgctg ggcgcgtttc tgtaggtgag gggctgcgac acttctgtct gcagcggcca 720  
 tctgtctctg acagcgagag agttgcccc ttctgcagc gccccccac tcattgcacc 780  
 agtggttgta agggggctgt ctagaaagct ggggagctgg ttgagtaaat gcacacagta 840  
 ggtgcctgtt aaagtgtcag aatctctaag cagtgttgtt gcaacctcag cccgctaagc 900  
 aaaaccctgt gtcgtcatcg ttttttaaat gcgaagatc tggggtaggg gaaagagggg 960  
 agatttgacc tgggtgcccg gcttaatagg gatgaacctt aaaaagaatg cagacgcctt 1020

ES 2 627 763 T3

actggggcgc ccaccagggtg aacctgtctg ggctttcccg gagttgaaca cctcaaaatc 1080  
 tgctcctcctt ttcagctcag gttgcaaaaag tgacggctcag gctgcatgcc cagggctcaa 1140  
 catatttccc tccacgggtcc ccgtccccgc tgtaggagg acttgagggtg tcgtatttgc 1200  
 ttttgggagt ccgaggagaa ggtgtttctc ctgctcctaa gaacgaggga gagtgtactg 1260  
 tggtcatttc attgctggga acgtggcaga gatgttttcc ctgagtgcac tgagcccat 1320  
 ccatgctcgg ataggaagtg cctactgtgt gccaggctgg taggacccaa gagggctgtt 1380  
 ggtgccctcg agggcagtgg tgggctgtgt gggcgaagac agcctttgcc ttggcctggg 1440  
 gcctggtggg gtgaattgta taacctttct tgtacctcag gggetgaatg cttccccgcc 1500  
 tgcaaccccc aaaatggatt ctgcgaggat gacaatgttt gcaggttaata gagtggctcc 1560  
 tcagaggcag cttgtagggg ccacgcagaa gcctggggag tcgtgaagtc aggcagaaaa 1620  
 aaataggggg cttggccact acgctgcagc aaacagcttc cgggccctg cagaaaactg 1680  
 gtggggcgag ctggggagat gggggggcg ggggggggc agccacagct cctgtctgcg 1740  
 ttctcagagg tggggggca ggtgggacca ctgcaggcca ctgcggcaa acgcagcact 1800  
 cccccgggat ctggggccc ctccaagtgc gccccctcag cttggcatgt tttctctta 1860  
 agttttccca ttcaggtggc tgggtgttac ttcccaggac caccggctgc cactgtgcaa 1920  
 agacccccaa ggtccttgg ttccacagaa agtagcctga gctgcctctc taccctgcc 1980  
 ctcttcatat gtccccacct ttctccccca cccattgcag gtgccagcct ggctggcagg 2040  
 gtccccttg tgaccagtgc gtgacctctc ccggctgcct tcacggactc tgtggagaac 2100  
 ccgggcagtg catttgcaac gacggctggg acggggagct ctgtgataga ggttggcact 2160  
 cgcctttggt cacctcagct ctgctcctt acctgcctgc cctagccctt accacctcct 2220  
 cccagtctcc tgttgctggg gttcctcact tcctcattcc tgcacactcc gtgccctgta 2280  
 ttctaaagat ctgtttataa atttctgtg ggtaccgaat gcctcctcag aggtagggac 2340  
 tttatattgc tcttctctgc gccatcagca cccagcacct agaggaaca tggcgtgggg 2400  
 gccagggagc tgccctgtga ataaagagtc acaaaataca catacagctg gggcgggtggg 2460  
 accacagacc ccaggctgcc tgtccaggtc atggaagccc agtgatggac agggctctgg 2520  
 ggatctcaga gctaagactc cctagaaaag cacacgcaag actgtaaaga ggctgcaaac 2580  
 aaacaaacgg ggtggggggg gccagcact gctcagtggg tgaggggag gtgctgagtc 2640  
 agggccagga ggacagggct ggggggcctg gactgagtgg gtcagggtgta gggggaggct 2700  
 gcagttggga aaagctgaga aagggttaa gtgaagatgg gtgttatctg ttgatttcat 2760  
 taatttatgc aatctttgcc tccattacc caagcaattg agagttggct gtcactgcat 2820  
 tttcaggctg cgaaatgttc gtctaagccc attttcattt ggcaaaaacca gccetaacgt 2880  
 ttgagcaaac tgaagtccac aaaaaaactc ccagctgtgt agcagcctgc cctcagggcc 2940



ES 2 627 763 T3

cctgtccctc agtccccaac attagtaaag acggtacaga tagggaaact gaggatcaga 3000  
gaagcacaag tgtctgctaa ggaatatgaa agaagttggg caaaaagcca gctacaaccc 3060  
tttccccag cccagaaaag agagttaatt tttatcttcg attgcatcta acatccttc 3120  
ttaaggaaca cctaagagca ttttgttggt gccctgccc tgtacagcca gggcagccgt 3180  
ggttctgaag ctgagctccc tcccaccca aattgtctct ggtccttaat tccagcccct 3240  
gcaatatggt gcaaggttta cccgcagctg actcatgctc tggccagcat ctctgctgcc 3300  
cctcacagaa gcagcggcag cagctctgag tcgtttgagg atctggggga tccagcaaa 3360  
gccaccattt gggatcaggg ttaggctttt agcttgaggc ccatcttttt ggtatctaaa 3420  
tgccgtacac ccttgctgaa attttccgga caaatgcctc ccttctcatg ggcccttggt 3480  
atgtcccctc cccaccaagt tgacaaaagg agccagcttg gggatggcca gagagtctgg 3540  
ggtcccagag aagacatagc cctccctctc cctttttgcc catctttgag gctgtcgtgg 3600  
ccacagctgc tgtcccagca gagaccccca agcagccttt tcctcagagc agcttaattc 3660  
accctgtct tggggttga ggctcaggag ggctgatcca ggattggcat agcagggaga 3720  
gctgcagga caagctggg gtggctgcca gctttttagc ttaaatttaa gattctgagt 3780  
gacaggagag tcgggtgcag agaataagga gcctgacgcg gaggcgccac gtgctaatgc 3840  
cttgccggtg ccgtccgta aagataaatc ctctttatgt gtccttgcaac caagccgggc 3900  
ttccatgaa caccacgggg tagtccatca acacaacgtt caggctcttc ctcttgatt 3960  
gattgcagtc tcccctccac gaggggtggt gtctctctga gagggggaaa aaatacgcac 4020  
atgtgtggcc tcagcacggg ggatttcccc tccccacc ccctccagcc tgccttagct 4080  
tgctgtgtct ctactggcc ctggctttct gtttggcagg tacagcagct caaattatag 4140  
aaaatcaaag ctgaagagtc cctcagagat tggccaggga aagaccctct ttttataagt 4200  
agggaaactg aggccagaa tgggtaggag ctgaactctg ctgccacatg gcagcaggcc 4260  
ggatacaggg caggacaggg gtcccttctt ggcccactg gggagctggg gtctccatca 4320  
tcagagagcc cctgactcag gcccttgtgt tcagctcatc cctggcttgc tgaacctgaa 4380  
taatgaagtg tgctgatgg aagggttaa aagatgggtg gaatatacca gtgctcatgg 4440  
aaacctgtgc tgataggaga gcgctcaata gttctaattt ccctggcttt aaaagatgaa 4500  
gcctttttac cagggacccc ttgagttcag agcctgagtg cagaaagaga gaccacaggg 4560  
acacgtggtg gtgctgggg taacaggttt cttgattcct gacggagggg ggtcgttaca 4620  
tctccatccc cccactgcc cctctttgat ggaaaagtat gaagagctgg tggtttttct 4680  
gagggttggg ctgtattcat ccccggtctg gccaggaccc ctcccctaac aggagagggt 4740  
ggagatgcag tcttgtctgg tggagacagg ccttagggaa tctcagctag gcacgctgtt 4800

ES 2 627 763 T3

gcagggaggg gcatgatgtc cacagtgaac gtcacggaca tgtcgctgga tatgggggtga 4860  
cctggtgcca ggcaaagga acagctatcc tggcctgaat atcagtggcc acgactttct 4920  
gatctgtgac cttaggaag gaaaccctt cagcttcctg agcctcagct tactcacttc 4980  
atgggttttt ttgagggggc tcctaaaacc ctctactcc agacccact cggtgccat 5040  
agagccattt taaagccac tggggcccgc atcacgctcg tgtatggaga ggaagctaag 5100  
ttctcgtcct ccccgtcacc ccgcagatgt tcgggcctgc tcctcggccc cctgtgcca 5160  
caacaggacc tgcgtgagcc tggacgatgg cctctatgaa tgctcctgtg cccccggta 5220  
ctcgggaaa gactgccaga aaaaggacgg gcctgtgtg atcaacgggt aaatcctt 5280  
cctgtgtgtg atctaataa tgctgctttt catgcccga ccaaagacc tttcagccta 5340  
accctgctgg acctgctgc tgacaaaaga tgaagtaag gctcatcctg gcagccccgt 5400  
aggggaccgc cctggatgg agtattcac ggggaatgt tcattgccat aatttttca 5460  
aatgatcctg aaggcgattt catattccc tgatgttctc aagtccgat gcgtgtgagt 5520  
gacagtogat cggaatgat aactgacact cggagctgc taattttcta aaggcaact 5580  
agtaaaagat tggagctccg cggggctgag gctgtttgt aaaccactt gctgtatctc 5640  
agggggtggt tttggggaac tgggtggctc tgcaattgga tttctggga tgtctgtgga 5700  
gggagttgcc aggctgagag gtgaagagat tgggcttctg ccagcacgag aggaggtggg 5760  
ccagctgtgc gctatcctca gtggggaagg gggctttggg actcctggg agcggacata 5820  
acagacagag tggccactgt ctccacttg acctccctga acaatgctc ccagcagctc 5880  
agcctctgcc caeccattt ctctttggg gcctgagcc atccctccc gctggatggg 5940  
gcttagcctg aagccaagg agatcttgac agaggcagg tccgaatgta agaatccaaa 6000  
cttgaaccca gtccctggcc tgtagttgg gggcaggggt gtcccttcc tctgaagaaa 6060  
cagaagctaa catgcaata agcttatctt gaccggacat cgcaggtg cagagagacc 6120  
ccagtgtct gtaagagctg taaacagaca ttaacggggc ttccaaagat cagtcttcag 6180  
acggggtcag agtgggggct ggtgaagact gaactccatt tctgcttatt agcaggaagg 6240  
agaaaaacag agcgagacct ttaaatatt ttgcttttct cgcgaatgga cttaaaccag 6300  
tgtgtcaaaa tagagcctaa ggccttgaa atctctcag agcccagctc ccatgcagcc 6360  
cacaccctga agcagcagtg ctgatttctt gtgttactg ccccttctc cccggagttt 6420  
tgccatttat cggatgaaa agggctcgtc cgtttaaag cacttacatt aatgctcct 6480  
tgtactccac tttgagcaaa cagctttggt ttgcaagctg cacttggtg aatggaccac 6540  
tattaacag cctggtacag acgctggctt gtgccaccgt agacagacct cgtattgctt 6600  
tctctttgag agtcccacag cgcttcctgc acaatagcct gtggatccac accgtaata 6660  
ataataataa taataatgag gttggcggc aacagtggac ataggcatga aggacgacag 6720

ES 2 627 763 T3

cgggtcccgg gatagagtga ggggcgcccc ttgcttggtt cttctgcccc agcagtccag 6780  
 ggatggagct aaggggaagg ggcttgetcc agtcctgggc tgtcactgac ttttcctctc 6840  
 ctacgctcag tttccccagt tggctagtga ctaaccgggt ggagactaac ctctggttgg 6900  
 agaggtgcag taagaggtgg gagaggacgt gggcatcctg gcatgggagg tcgggtgtgt 6960  
 cccaggttag catcgagatg ggggtgaggt gggcaccacc ccaccacccc ccagagctac 7020  
 tggtgagctt ctgcgagaca ggggtcacgg ccccgggcac ctctctgtgc ctccctggct 7080  
 ggcgttcocct ccctcgctcc ctcatcacc tgatgtgttt taagcacctg ccccttagtc 7140  
 aggcacagga ccttctgccc tgagcccctg gcctgcagc gctgtttag cctagcccct 7200  
 gaggccggtt actatgtccc tgttgtgtg cagctcccc tgccagcacg gaggcacctg 7260  
 cgtggatgat gagggccggg cctcccctgc ctctgcctg tgccccctg gcttctcagg 7320  
 caatttctgc gagatcgtgg ccaacagctg ccccccaac ccatgcgaga acgacggcgt 7380  
 ctgcaactgac attggggcg acttccgctg ccggtgcccc gccggctca tcgacaagac 7440  
 ctgcagccgc ccggtgacca actgcgccag cagcccgtgc cagaacgggg gcacctgcct 7500  
 gcagcacacc caggtgagct acgagtgtct gtgcaagccc gagttcacag gtctcacctg 7560  
 tgtcaagaag cgcgcgctga gccccagca ggtcaccctg ctgcccagcg gctatgggct 7620  
 ggcctaccgc ctgaccctg ggggtcacga gctgccgggt cagcagccgg agcaccgcat 7680  
 cctgaagggtg tccatgaaag agctcaaaa gaaaaccct ctctcaccg agggccaggc 7740  
 catctgcttc accatcctgg gcgtgctcac cagcctgggt gtgctgggca ctgtgggtat 7800  
 cgtcttctc aacaagtgcg agacctgggt gtccaacctg cgctacaacc acatgctgcg 7860  
 gaagaagaag aacctgctgc ttcagtacaa cagcggggag gacctggccg tcaacatcat 7920  
 cttccccgag aagatcgaca tgaccacctt cagcaaggag gccggcgacg aggagatcta 7980  
 agcagcgttc ccacagcccc ctctagattc ttggagttcc gcagagctta ctatacggg 8040  
 tctgtcctaa tctttgtggt gttcgtatc tcttgtgtca aatctggtga acgctacgct 8100  
 tacatatatt gtctttgtgc tgctgtgtga caaacgcaat gcaaaaacaa tcctctttct 8160  
 ctctcttaat gcatgataca gaataataat aagaatttca tctttaaatg agtaagagaa 8220  
 ataa 8224

<210> 3  
 <211> 1347  
 5 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 3

10 gatgaaattc ttattattat tctgtatcat gcattaagag agagaaagag gattgttttt 60  
 gcattgcggt tgtcacacag cagcacaag acaatatatg taagcgtagc gttcaccaga 120

ES 2 627 763 T3

tttgacacaa gagatagcga acaccacaaa gattaggaca gaccgcgtat agtaagctct 180  
 gcggaactcc aagaatctag agggggctgt gggaacgctg cttagatctc ctcgtcgccg 240  
 gcctccttgc tgaaggtggt catgtcgatc ttctcgggga agatgatggt gacggccagg 300  
 tcctccccgc tgttgactg aagcagcagg ttcttcttct tccgcagcat gtggttgtag 360  
 cgcaggttgg acaccaggt ctcgcaactg ttgaggaaga cgataccac agtgcccagc 420  
 accaccaggc tggtagcac gcccaggatg gtgaagcaga tggcctggcc ctcggtgagg 480  
 agaggggttt tcttggtgag ctcttcatg gacacctca ggatgcggtg ctccggtgctc 540  
 tgcaccggca gctcgtgcac cccaggggtc aggcggtagg ccagcccata gccgctgggc 600  
 agacgggtga cctgctgggg gctcagcggc cgcttcttga cacaggtgag acctgtgaac 660  
 tcgggcttgc acagacactc gtagctcacc tgggtgtgct gcaggcaggt gccccgctc 720  
 tggcacgggc tgctggcgca gttggtcacc gggcggtgct aggtcttctc gatgaagccg 780  
 gctgggcacc ggcagcggaa gtcgccccca atgtcagtg cagcgcctc gttctcgcat 840  
 gggttggggg tgcagctgtt ggccacgatc tcgcagaaat tgcctgagaa gccagggggg 900  
 cacaggcagg aggcattgga ggccccggcc tcatcatcca cgcaggtgcc tccgtgctgg 960  
 cccgttgatc acacagggcc cgtccttttt ctggcagtc tttcccaggt acccgggggc 1020  
 acaggagcat tcatagaggc catcgtccag gctcagcag gtcctgttgt tggcacaggg 1080  
 ggccgaggag caggccccaa catctctatc acagagctcc ccgtcccagc cgtcggtgca 1140  
 aatgcactgc ccgggttctc cacagagtcc gtgaaggcag ccgggagagg tcacgcactg 1200  
 gtcacaaagg ggaccctgcc agccaggctg gcacctgcaa acattgtcat cctcgcagaa 1260  
 tccattttgg gggttgcagg ccgggaagca ttcagccccca taggtgctgt ggccgaaagc 1320  
 cagcaggagc aagaggacgc gcaggag 1347

<210> 4

<211> 27

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido antisentido

10 <400> 4

gccuccuugc ugaagguggu caugucg 27

<210> 5

15 <211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido antisentido

20

<400> 5

cuguggaac gcugcuuaga ucuccuc 27

## ES 2 627 763 T3

<210> 6

<211> 25

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Complemento inverso de los oligonucleótidos antisentido, SEQ ID NO: 4

<400> 6

10

acaugaccac cuucagcaag gaggc 25

<210> 7

<211> 25

15 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Complemento inverso de los oligonucleótidos antisentido, SEQ ID NO: 5

20 <400> 7

ggagaucuaa gcagcguucc cacag 25

## REIVINDICACIONES

1. Un oligonucleótido antisentido que se dirige a un transcrito antisentido natural de homólogo tipo Delta 1 (DLK1) para uso como compuesto terapéutico, donde el transcrito antisentido natural del DLK1 tiene la secuencia del ácido nucleico tal y como se expone en la SEQ ID NO: 3, y donde el oligonucleótido antisentido aumenta la expresión del homólogo tipo Delta 1 (DLK1).
2. Un oligonucleótido antisentido que se dirige a un transcrito antisentido natural de homólogo tipo Delta 1 (DLK1), donde el transcrito antisentido natural del DLK1 tiene la secuencia del ácido nucleico tal y como se expone en la SEQ ID NO: 3, para su uso en la prevención o tratamiento de un trastorno o enfermedad asociadas a un homólogo tipo Delta 1 (DLK1), donde el oligonucleótido antisentido aumenta la expresión del homólogo tipo Delta 1 (DLK1), donde se selecciona la enfermedad o trastorno del grupo constituido por una enfermedad o trastorno asociados con la reparación de nervios dañados y/o la regeneración de nervios, parálisis, una enfermedad o trastorno asociados con diferenciación neuroendocrina dañada, trastornos de los nervios periféricos, articulaciones neuromusculares y musculares, manifestaciones neurológicas del SIDA, atrofia muscular espinal, miopatía.
3. El uso de un oligonucleótido antisentido que se dirige a un transcrito antisentido natural de homólogo tipo Delta 1 (DLK1), donde el transcrito antisentido natural del DLK1 tiene la secuencia del ácido nucleico tal y como se expresa en SEQ ID NO: 3, para la fabricación de un medicamento para la prevención o tratamiento de un trastorno o enfermedad asociadas a un homólogo tipo Delta 1 (DLK1), donde dicho oligonucleótido antisentido aumenta la expresión del homólogo tipo Delta 1 (DLK1), donde se selecciona la enfermedad o trastorno del grupo constituido por una enfermedad o trastorno asociados con la reparación de nervios dañados y/o la regeneración de nervios, parálisis, una enfermedad o trastorno asociados con diferenciación neuroendocrina dañada, trastornos de los nervios periféricos, articulaciones neuromusculares y musculares, manifestaciones neurológicas del SIDA, atrofia muscular espinal, miopatía.
4. Un procedimiento *in vitro* de aumento de la expresión de homólogo tipo Delta 1(DLK1) en células o tejidos de un paciente que comprende: poner en contacto dichas células o tejidos con un oligonucleótido antisentido que se dirige a un transcrito antisentido natural del homólogo tipo Delta 1 (DLK1), donde el transcrito antisentido natural del DLK1 tiene una secuencia de ácido nucleico tal como se expone en la SEQ ID NO: 3; aumentando, de este modo, la expresión del homólogo tipo Delta 1 (DLK1).
5. El oligonucleótido antisentido para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, o para el uso de acuerdo con la reivindicación 3, o el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, donde el oligonucleótido antisentido es monocatenario o donde el oligonucleótido antisentido es un compuesto de siRNA.
6. El oligonucleótido para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 5, o el uso de acuerdo con la reivindicación 3 o la reivindicación 5, o el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, o la reivindicación 5, donde el oligonucleótido antisentido comprende al menos una de las SEQ ID NO: 4 y 5.
7. El oligonucleótido antisentido para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 5 u 6, o el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3, 5 o 6 o el procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, donde la expresión del homólogo tipo Delta 1 (DLK1) es aumentada, al menos, un 10%.
8. El oligonucleótido antisentido para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 5 a 7, o el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3, o 5 a 7, o el procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, donde el oligonucleótido comprende, además, una o más modificaciones que comprenden
  - a. un enlace internucleosídico modificado seleccionado de entre: un fosforotioato, 2'-fluoro, alquilfosfonato, fosforoditioato, alquilfosfonotioato, fosforamidato, carbamato, carbonato, triéster de fosfato, acetamidata, éster carboximetílico, y combinaciones de los mismos;
  - b. al menos un nucleótido modificado seleccionado de entre: un ácido nucleico peptídico (PNA), un ácido nucleico bloqueado (LNA), un ácido arabino-nucleico, un análogo, un derivado, y combinaciones de los mismos; o
  - c. al menos un resto de azúcar modificado seleccionado de entre: un resto de azúcar modificado con 2'-O-metoxietilo, un resto de azúcar modificado con 2'-metoxi, un resto de azúcar modificado con 2'-O-alquilo, un resto de azúcar bicíclico, y combinaciones de los mismos.
9. Un oligonucleótido antisentido que se dirige a un transcrito antisentido natural de homólogo tipo Delta 1 (DLK1), donde el transcrito antisentido natural del DLK1 tiene la secuencia del ácido nucleico tal y como se expone

en la SEQ ID NO: 3, donde el oligonucleótido aumenta la expresión del homólogo tipo Delta 1 (DLK1), donde el oligonucleótido antisentido es un compuesto de siRNA.

10. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con la reivindicación 9, donde el oligonucleótido antisentido  
5 comprende, además, una o más de las modificaciones que comprenden:
- a. un enlace internucleosídico modificado seleccionado de entre: un fosforotioato, 2'-fluoro, alquifosfonato, fosforoditioato, alquifosfonotioato, fosforamidato, carbamato, carbonato, triéster de fosfato, acetamidato, éster carboximetílico, y combinaciones de los mismos;
  - b. al menos un nucleótido modificado seleccionado de entre: un ácido nucleico peptídico (PNA), un ácido nucleico  
10 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  
25 azúcar bicíclico, y combinaciones de los mismos.
- 15 11. Un oligonucleótido antisentido que se dirige a un transcrito antisentido natural de homólogo tipo Delta 1 (DLK1), donde el transcrito antisentido natural del DLK1 tiene la secuencia del ácido nucleico tal y como se expone en la SEQ ID NO: 3, donde el oligonucleótido comprende una o más de las modificaciones que comprenden:
- a. un enlace internucleosídico modificado seleccionado de entre: un fosforotioato, 2'-fluoro, alquifosfonato, fosforoditioato, alquifosfonotioato, fosforamidato, carbamato, carbonato, triéster de fosfato, acetamidato, éster  
20 carboximetílico, y combinaciones de los mismos;
  - b. 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  
25 azúcar bicíclico, y combinaciones de los mismos.
12. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con la reivindicación 11, donde el oligonucleótido antisentido es monocatenario o donde el oligonucleótido antisentido es un compuesto de siRNA.
- 30 13. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 1 2, donde el oligonucleótido antisentido comprende, al menos, una de las SEQ ID NO: 4 y 5.
14. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 1 3, donde la expresión del homólogo tipo Delta 1 (DLK1) es aumentada, al menos, un 10%.
- 35 15. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 1 4, donde el oligonucleótido antisentido tiene una longitud de entre 10 a 30 nucleótidos.
16. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 1 5, donde el  
40 oligonucleótido antisentido tiene, al menos, una complementariedad de secuencia del 90% con el transcrito antisentido natural del homólogo tipo Delta 1 (DLK1).
17. Una composición farmacéutica que comprende al menos un oligonucleótido antisentido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 16, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 45

(SEQ ID NO: 2)

FIGURA 1

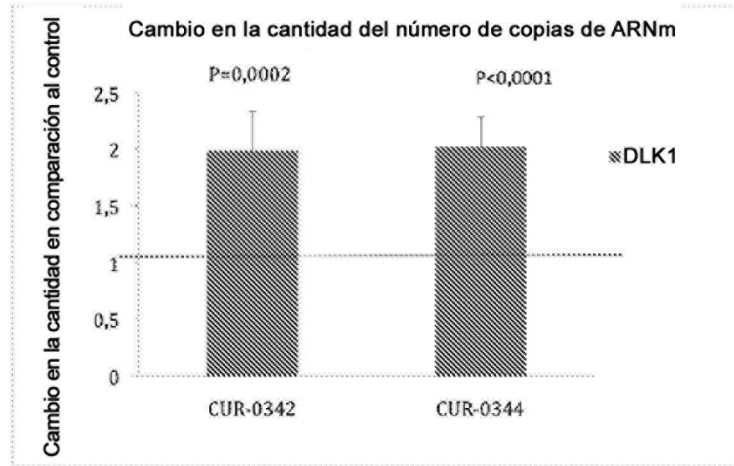


FIGURA 2

(SEQ ID NO: 1)

>gi|4136022|ref|NM\_003836.4| Homo sapiens delta-like 1 homolog (Drosophila) (DLK1),

ARNm Homólogo (Drosophila) tipo delta 1 de homo sapiens (DLK1), ARNm  
gagagcgcagcgcagcccgggtgcagccctggctttcccctcgctgcgcgcccgcgccccctttcgcgtccgca  
accagaagcccagtgccggcgccaggagccggaccgcgcccgcaccgctcccgggaccgcgaccccggccgcca  
gagatgaccgcgaccgaagccctcctgcgctcctcttgctcctgctggctttcggccacagcacctatggggct  
gaatgcttcccggcctgcaacccccaaaatggattctgcgaggatgacaatgtttgaggtgccagcctgggtg  
caggggtcccctttgtgaccagtgctgacctctcccggctgccttcacggactctgtggagaaccgggagctgc  
atgtgcaccgacggctgggacggggagctctgtgatagagatgttcgggctgctcctcggccccctgtgccaac  
aacgggacctgctgagcctggacgatggcctctatgaatgctcctgtgccccgggtactcgggaaaggactgc  
cagaaaaaggacgggcccctgtgtgatcaacggctccccctgccagcacggaggcacctgctggatgatgagggc  
cgggctcccctgctcctgctgctgccccctggcttctcaggcaatttctgagagatcgtggccaacagctgc  
acccccaaacctgagagaacgacggcgtctgcaactgacattgggggagacttccgctgcccgtgcccagccggc  
ttcatcgacaagacctgcagcccgggtgaccaactgcgccagcagcccgtgccagaacgggggacactgctg  
cagcacaccaggtgagctacgagtgctgtgcaagcccaggttcacaggtctcacctgtgtcaagaagcgcgcg  
ctgagccccagcaggtcaccgctctgcccagcggctatgggctggcctaccgctgaccctgggggtgcacgag  
ctgcccgtgagcagccggagcaccgcatcctgaaggtgtccatgaaagagctcaacaagaaaaccctctcctc  
accgagggccaggccatctgcttcaccatcctgggctgctcaccagcctggtggtgctgggcactgtgggtatc  
gtcttctcaacaagtgcgagacctgggtgtccaacctgcgctacaaccacatgctgcggaagaagaacactg  
ctgcttcagtacaacagcggggaggacctggcctcaacatcatcttccccgagaagatcgacatgaccaccttc  
agcaaggaggccggcgacgaggagatctaagcagcgttcccacagccccctctagattcttgaggtccgagag  
cttactatacgggctctgtcctaattttgtgggtgctcgctatctctgtgtcaaatctgggtgaacgctacgctt  
acatatattgtctttgtgctgctgtgtgacaaacgcaatgcaaaaacaatcctcttctctcttaatgcatga  
tacagaataataataagaatttcatctttaa



# ES 2 627 763 T3

>hg18\_knownGene\_uc001yhu.2 range=chr14:100263006-100271229 5'pad=0 3'pad=0  
strand=+ repeatMasking=none

GAGAGCGCAGCGCGCAGCCCGGTGCAGCCCTGGCTTTCCCTCGCTGCGCGCCCGCGCCCCCTTTCGCGTCCGCA  
ACCAGAAGCCAGTGCAGCGCCAGGAGCCGGACCCGCGCCCGCACCGCTCCCGGGACCGCGACCCCGGCCGCCA  
GAGATGACCGCGACCGAAGCCCTCCTGCGCGTCCCTTTGCTCCTGCTGGCTTTCGGCCACAGCACCTATGgtgag  
ttccccggcgccccggctcgccccctctggggaagcctgcgactccccgccccggccccgggtccccgcacgc  
ccccctctgtagccccaaactccgccccgtccccgctagccctaagccccgctgtgctgtctcgccctacca  
ccacgctcgcatgccaaagccccgtcccaggggtcccagggcgaggggatgtgtgagacccccagccccctcccg  
ccctgcagaagtggcgccagaggggtgtcggtgogctgagcaaggaggtatggaaaaatgggggtgctgtgtgga  
gtcttctatgaaaatactctgggggtgcaactttgggggtgcccctgtgtgagcgttctggaacaggtctcggggcg  
ggagtgggggagcactttgcccgtcttagcccccaattcccagagaagcccagcctgagcccttctcgctggcgc  
gttctgtaggtgaggggtgagcacttctgtctgcagcggccatctgtctctgacagcgagagagttgcccc  
ttctctgagcgccccccaactcattgcaccagtgggtgtgtaagggggctgtctagaaagctggggagctgggtgag  
taaatgcacacagtaggtgcctgttaaagtgtcagaatctctaagcaggtgtgttgcaacctcagccccgctaagc  
aaaaacctgtgtcgtcatcgtttttaatgcaagagtctggggtaggggaaagagggaaagatttgacctgggt  
gccccgcttaatagggatgaaccttaaaaaaagatgcagacgccttactggggcgcccaccaggtgaacctgtctg  
ggctttccccgagttgaaacctcaaatctgctcctctttcagctcaggttgcaaaagtgcaggtcaggtctgc  
atgcccagggctcaacatatttccctccacggtccccgctccccgctgttagaggacttgaggtgctgatttgc  
tttgggagtcgaggaagaaggtgttctcctgctcctaagaacgagggagagtgactgtggctatttccattgc  
tgggaacgtggcagagatgttttctgagtgcaactgagccccatccatgctcgataggaagtgcctactgtgt  
gccaggtggttaggacccaagagggctgttgggtgcctcgagggcagtggtgggtgtgtggggaagacagcct  
ttgccttggcctggggcctgggtgggtgaaattgtataacctttctgtacctcagGGGTGAATGCTCCCGGCC  
TGCAACCCCAAAATGGATTCTGCGAGGATGACAATGTTTGCAGGtaatagagtggtcctcagaggcagcttgt  
aggggccacgcagaagcctggggagtcgtgaagtgcagcagaaaaaataaggggcttggccactacgtgcagc  
aaacagcttccccggccccctgcagaaaactggtggggcgagctggggagatggggggggcgggggggggcagcca  
cagctcctgtctcgcttctcagaggtggggggcaggtgggaccactgcagggccactgcggcaaaacgcagcact  
ccccgggatctcgggggccccctcaagtccgccccctcagcttggcatgttttctcttaagttttcccattcag  
gtggctggtgttacttcccaggaccaccggtgccactgtgcaaaagacccccaaagggctccttgggtccacagaa  
agtagcctgagctgectctctaccctgcccctcttcatatgtccccacctttctccccaccattgcagGTGCC  
AGCCTGGCTGGCAGGGTCCCCTTTGTGACCAGTGCCTGACCTTCCCGGCTGCCTTACGGACTCTGTGGAGAAC  
CCGGCAGTGCATTTGCACCGGCTGGGACGGGAGCTCTGTGATAGAGgttggcactcgcctttgttccact  
cagctctgctccttaccctgcccctagcccctaccacctcctcccagctcctctgttctgctgggttctcact  
tcctcattctgcacactccgtgcccctgtattctaaagatctgtttataaatttctgtgggtaccgaaatgcctc  
ctcagaggtagggactttattttctctctctgccccatcagcaccacagcctagagggaaacatggcgtgggg  
gccagggagctgctgttgaataaagagtcacaaaatacacatacagctgggcccgggtgggaccacagacccccag  
ctgctgtccaggtcatggaagcccagtgatggacagggctctggggatctcagagctaagactccctagaaaag  
cacacgcaagactgtaaaagggctgcaaaaacaaacgggggtgggggggtggccagcactgctcagtggtgagg  
ggcaggtgctgagtcagggccagaggacagggctggggggcctggactgagtggtcaggtgtagggggaggct  
gcagttgggaaaagctgagaaaggttaaagtgaagatgggtgttatctgttgatttcatatattatgcaatct  
ttgctccattacccccagcaattgagagttggctgtcactgcattttcaggctgcgaaatgttcgtctaagccc  
attttcatttggcaaaaccagcccataacgtttgagcaaaactgaagtccacaaaaaactcccagctgtgtgagcag  
cctgccctcagggccccctgtcccctcagtcccccacattagtaaaagacggtaacagatagggaaactgaggatcaga  
gaagcacaagtgtctgctaaggaatagaaagaagttgggcaaaaagccagctacaacctttccccagccccca  
gaaagagagtaatttttctctcgattgcatctaacatccttcttaaggaacacctaagagcattttgtgtg  
gcccctgcccgtacagccagggcagccgtgttctgaaagctgagctccctccccccccaaattgtctctggtcc  
ttaattccagccccctgcaatatggtgcaaggtttaccgcagctgactcatgctctggccagcatctctgctgcc  
cctcacagaagcagcggcagcagctctgagctgttggagatctgggggatccagcaaaagccaccatttgggat  
caggggttagcttttagcttggagcccctcttttgggtatctaaatgcccgtacaccccttctgaaattttccgga  
caaatgcctcccttctcatgggccccttgggtatgtcccctccccaccaagttgcaaaagccagcagcttggggat  
ggccagagagctctgggtcccagagaagacatagcccctccctctcccttttggccatctttgaggtctgctg  
ccacagctgctgtcccagcagagacccccaaagcagccttttctcagagcagcttaattcaccctgtcttgggg  
ttggaggctcagggaggtgatccaggattggcatagcagggagagctgcagggacaagctgggggtggtcgcca

gcttttagcttaaatttaagattctgagtgacaggagagtcgggtgcagagaataaggagcctgacgcggagggc  
gccacgtgctaatagccttgcgggtgocgtcccgtaaagataaatcctctttatgtgtccttgaccaagccgggc  
ttccatggaacaccacgggtagtccatcaacacaacgttcaggctcttccctccttgattgattgcagctctccc  
tccacgaggggtgtgggtctctctgagagggggaaaaatacgcacatgtgtggcctcagcagggggatttcccc  
tcccccaacccctccagcctgccttagcttgcctgctctctcactggccctggctttctgtttggcaggtacag  
cagctcaaattatagaaaaatcaaagctgaagagtcctcagagattggccagggaaagaccctcttttataagt  
agggaaactgagggccagaatgggtaggagctgaactctgctgccacatggcagcagccggatacagggcagga  
caggggtcccttctgcccactgggagctggggtctccatcatcagagagcccctgactcagggcccttgtgt  
tcagctcatccctggcttgcgaacctgaataatgaagtgtgctgatggaagggtttaaagatgggtgggaata  
taccagtgctcatggaacctgtgctgataggagagcctcaatagttctaatttccctggctttaaagatgaa  
gcctttttaccagggacccttgagttcagagcctgagtgacagaaagagagaccacagggacacgtggtagtgt  
ggggtaaacaggtttcttgattcctgacggagggggctggtacatctccatccccccactgcccctctttgat  
ggaaaagtatgaagagctggtgggttttctgaggggtgggctgtattcatccccggctggccagggaccctccc  
ctaacagggaggggtggagatgcagtctgtctgggtggagacagcccttagggaatctcagctaggcacgctgtt  
gcagggaggggcatgatgtccacagtgacgtcacggacatgtcgtggatgaggggtgacctggtgccagggcaa  
agggaaacagctatcctggcctgaatacagtgccacagactttctgatctgtgaccttaggcaaggaaacccctt  
cagcttctcagcctcagcttactcacttcatgggttttttgaggggctccctaaaccccttactccagacc  
ccactcgggtggccatagagccattttaaagcccactggggcccgcacagctcgtgtatggagaggaagctaag  
ttctcgtcttccccgtcaccocgcagATGTTTCGGGCTTGCCTCCTCGGCCCTGTGCAACAACAGGACCTGCGT  
GAGCCTGGACGATGGCCTCTATGAATGCTCCTGTGCCCCCGGCTACTCGGGAAAGGACTGCCAGAAAAAGGACGG  
GCCCTGTGTGATCAACGGGtaaatatccttctcgtgtgtgatctaatgaatgctgcttttcatgcccaccacaa  
gacctttcagcctaaccctgctggacctgctgctgacaaaagatgaagtaagcctcatcctggcagccocgt  
aggggaccccccctggatgggagttacacgggggaatgtgtcattgccataatttttcfaatgatcctgaaggc  
gatttcatattcccctgatgttctcaagtcccagatgcgtgtgagtgacagtcgatcggaaatgatgaactgacact  
cggagctgcgtaatttctaaaggcaacgtagtaaaagattggagctcccgggggctgagggctgtttgtgaaacc  
cacttgcgtatctcaggggggtgggttttggggaaactggtgggctctgcaattggattttctgggatgtctgtgga  
gggagttgccagggctgagaggtgaagagattgggcttctgccagcacagagaggaggtggccagctgtcggctat  
cctcagtggggaagggggctttgggactcctgggcagcggacataaacagacagagtgccactgtcttacttgg  
acctcctgaacaatgcttcccagcagctcagcctctgcccaccattatctcttggcggccctgagccatccc  
tccccgtggatggggcttagcctgaagcgaaggagatcttgacagagggcagggctccgaatgtaagaatccaaa  
cttgaaccagctcctgggctgtagtggggggcaggggtgtcccttctctgaagaaacagaagctaacatgc  
aaataagcttatctgacccgacatcgcaggggtggcacagagaccccagtagtctgtaagagctgtaaacagaca  
ttaacggggcttccaaagatcagctctcagacggggctcagagtgggggctggtgaagactgaactccatttctgc  
ttattagcaggaaggagaaaaacagagcagagacctttaaataattttgccttctcgcgaatggacttaaaccag  
tgtgtcaaaaatagagcctaaggccctgaaattccttcagagcccagctcccagcagcccacacccctgaagcag  
cagtgctgatttctgtgtttactgccccttctccccggagttttgccatttatcggatgacaaagggctcgt  
cgtttaaagcacttacattaaatgctccttgaactcactttgagcaaacagctttgggttgcaagctgcactt  
gggtgaatggaccactattaaacagcctgggtacagacgctggcttgtgccaccgtagacagacctcgtattgctt  
tctctttgagagtcocccaagccttctcgcacaatagcctgtggatccacaccgctaataataataataata  
atgaggggttggcggcaacagtgacatagggcatgaaggacagcagcgggtccgggtagagtgagggggcggccc  
ttgcttgggtctctgccccagcagtcocaggatggagctaaagggaagggggcttgcctcagctcctggctgtca  
ctgacttttctcctcagcctcagtttccccagttggctagtgaactaacgggttgagactaacctctggttgg  
agaggtgcagtaagaggtgggagaggacgtgggcatcctggcatgggaggtcgggtgtgtcccaggttagcatcg  
agatgggggtgaggtgggcaaccacccacccacccacagagctactggtgagcttctcgcagacaggggtcaggg  
ccccgggcaacctctctgtgcctccctggctggcgttccctccctcgtcctcattcactgatgtgttttaagc  
acctgccccttagtcaggccagggaccttctgcccctgagcccctgcccctgcagcgtgttttagccttagcccct  
gaggecgtttactatgtccctgttgtgtgacgTCCCCCTGCCAGCACGGAGGCACCTGCGTGGATGATGAGGG  
CCGGCCCTCCCATGCCTCCTGCCTGTGCCCCCTGGCTTCTCAGGCAATTTCTGCGAGATCGTGGCCAACAGCTG  
CACCCCAACCCATGCGAGAACGACGGCGTCTGCACTGACATTGGGGGCGACTTCCGCTGCCGGTGCACGCGG  
CTTCATGCAAGACCTGACGCCGCCGGTGACCAACTGCCAGCAGCAGCCGCTGCCAGAACGGGGCACCTGCCT  
GCAGCACACCCAGTgagctacagtgctgtgcaagcccgagttcacaggtctcactgtgtcaagaagcgcgc  
gctgagccccagcaggtcacccgtctgcccagcggctatgggctggcctaccgctgacccctgggggtgacga  
gctgccggtgcagcagccggagcaccgcatcctgaaggtgtccatgaaagagctcaacaagaaaaacccctctcct  
caccgagGGCCAGGCCATCTGCTTACCATCTGGGCGTGCTCACCAGCCTGGTGGTGTGCGGCACCTGTGGGTAT

CGTCTTCCCTCAACAAGTGCAGACCTGGGTGTCCAACCTGCGCTACAACCACATGCTGCGGAAGAAGAAGAACCT  
 GCTGCTTCAGTACAACAGCGGGGAGGACCTGGCCGTCAACATCATCTTCCCCGAGAAGATCGACATGACCACCTT  
 CAGCAAGGAGGCCGCGGACGAGGAGATCTAAGCAGCGTTCCACAGCCCCCTCTAGATTCTTGGAGTTCCGCAGA  
 GCTTACTATACGCGGTCTGTCTAATCTTTGTGGTGTTCGTATCTCTTGTGTCAAATCTGGTGAACGCTACGCT  
 TACATATATTGTCTTTGTGCTGTGTGTGACAAACGCAATGCAAAAACAATCCTCTTTCTCTCTTAATGCATG  
 ATACAGAATAATAAAGAATTTTCATCTTTAAATGAGTAAGAGAAATAA

**FIGURA 3**

**Secuencia antisentido natural (Hs. 697829): SEQ ID NO:3**

GATGAAATCTTATTATTATTCTGTATCATGCATTAAGAGAGAGAAAGAGGATTGTTTTTGCATTGCGTTTGTCA  
 CACAGCAGCACAAAGACAATATATGTAAGCgTagcgTTCACCAGATtTgACACAAGAgATAGCgAACaCCACAAA  
 GATTAGaCagaCCGCGTATAGTAagctctgCGgaaCTCCAAGaaTCTAGAGGgGGcTGTgGGAaCGcTGCTTAG  
 ATCTCCTCGTcGCCGGCcTCCTTGCTGAAGTgGTCATGTCGATCTTCTCGGGGAAGATGATGTTGACGGCCAGG  
 TCCTCCCCGCTGTTGTACTGAAGCAGCAGGTTCTTCTTCTCCGCAGCATGTGGTTGTAGCGCAGGTTGGACACC  
 CAGGTCTCGCACTTGTGAGGAAGACGATACCCACAGTGCCAGCACCACCAGGCTGGTGAGCAGCCCCAGGATG  
 GTGAAGCAGATGGCCTGGCCCTCGGTgAgGAGAGGGGTTTTCTTGTGAGCTCTTTCATGGACACCTTCAGGATG  
 CGGTGTCTCCGGCTGctGCACCGGCAGCTCGTGCACCCCAGGGGTGAGGCGGTAGGCCAGCCATAGCCGCTGGGC  
 AGACGGGTGACCTGctGGGGGCTCAGCGCGCCTTCTTGACACAGGTGAGACCTGTgAACTcGgGCTTGCACAGA  
 CACTCGTAGCTCACCTGGgTGTgCtGCAGGCAGGtGCCCCGTTCTGGCACGGgCTGCTGGCGCAGTTGGTCACC  
 GGGCGGCTGCAGGTCTTGTGATGAAGCCGGCTGGgCACCGGCAGCGGAAGTCGCCCCCaATGTCAGTGCAGACG  
 CCGTCGTTCTCGCATGGgTTGGGGTGCAGCTGTTGGCCACGATCTCGCAGAAAATTGCCTGAgAAGCcaggggGG  
 CACAGGcAGGAGGCATGGGAGGCCCGCCCTCATCATCcAGcAGGTGCCCTCCGTGCTGGCCCGTTGATCACACA  
 GGGCCCGTCTTTTTcTGCGAGTCcTTTCCCGAGTAcCCGGGGGCACAGGAGcATTcATAGAGGcCATCGTCCAG  
 GCTCACGCAGgTCctGTTGTTGGcACAGGGGGcCGAGGAGcAGGcCCGAACATCTCTATCACAGAGCTCCCCGTC  
 CCAGCCGTCGGTGCAAATGCACTGCCCGGGTCTCCACAGAGTCCGTGAAGGCAGCCGGGAGAGGTCACGCACTG  
 GTCACAAAGGGGACCCTGCCAGCCAGGCTGGCACCTGCAAACATTGTcATCCTCGCAGAATCCATTTGGGGGTT  
 GCAGGCCGGGAAGCATTcAGCCCCATAGGTGCTGTGGCCGAAAGCCAGCAGGAGCAAGAGGACGCGCAGGAG

**FIGURA 4**

Sequence ID	Antisense Sequence Name	Sequence
SEQ ID NO:4	CUR-0342	rGrCrCrUrCrCrUrGrCrUrGrArArGrGrUrGrGrUrCrArUrGrUrCrG
SEQ ID NO:5	CUR-0344	rCrUrGrUrGrGrArArCrGrCrUrGrCrUrUrArGrArUrCrUrCrCrUrC

**FIGURA 5**

Sequence ID	Sense Sequence Name	Sequence
SEQ ID NO:6	CUR-0342	rArCrArUrGrArCrCrArCrCrUrUrCrArGrCrArArGrGrArGGC
SEQ ID NO:7	CUR-0344	rGrGrArGrArUrCrUrArArGrCrArGrCrGrUrUrCrCrCrArCAG