(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 629 630**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)
C12N 15/85 (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: **03.12.2009 PCT/US2009/066659**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **10.06.2010 WO10065792**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.12.2009 E 09831152 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.03.2017 EP 2370579**

(54) Título: **Tratamiento de enfermedades relacionadas con eritropoyetina (EPO) mediante inhibición del transcrito antisentido natural a EPO**

(30) Prioridad:

04.12.2008 US 119961 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.08.2017

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

COLLARD, JOSEPH y
KHORKOVA SHERMAN, OLGA

(74) Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 629 630 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 eritropoyetina (EPO) mediante inhibición del transcrito antisentido natural a EPO

REIVINDICACIÓN DE PRIORIDAD

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud de patente provisional de Estados Unidos con nº. de serie 61/119.961, depositada el 4 de diciembre de 2008, titulada "Moléculas de ARN que se dirigen a eritropoyetina y moléculas relacionadas".

CAMPO DE LA INVENCIÓN

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

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.

Una producción aumentada de eritrocitos mediada por la hormona eritropoyetina (EPO) es una respuesta adaptativa bien conocida de los humanos a la hipoxia (Bunn et al. (1996) Physiological Rev. 76, 839-845). Normalmente producida por el riñón adulto y el hígado fetal, la EPO estimula el desarrollo del receptor de EPO (EpoR) que expresa precursores de eritrocitos en la médula ósea.

La EPO es una hormona glucoproteínica (46 kDa) producida por células intersticiales renales dentro del riñón que regula la producción de eritrocitos en la médula. Estas células son sensibles a una concentración baja de oxígeno arterial y liberarán eritropoyetina cuando el oxígeno está bajo (hipoxia). La eritropoyetina estimula a la médula ósea para que produzca más eritrocitos con lo que se incrementa la capacidad de transporte de oxígeno de la sangre. La EPO ejerce su efecto al unirse al EpoR sobre la superficie de precursores eritrocíticos en la médula ósea. Sin embargo, la expresión de EPO se ha observado en células de otros tejidos normales, además de las células intersticiales renales, que incluyen enterocitos, trofoblastos y células neuronales.

La medición de EPO en el torrente circulatorio puede indicar trastornos en la médula ósea o enfermedad renal. Los niveles normales de eritropoyetina son de 0 a 19 mU/ml (miliunidades por mililitro). Se pueden observar niveles elevados en la policitemia rubra vera, una condición caracterizada por agrandamiento del bazo y una producción aumentada de eritrocitos por la médula ósea. Se observan valores menores a los normales en el fallo renal crónico, lo que genera anemia. El fallo renal crónico genera anemia, en parte, debido a la ausencia progresiva de producción adecuada de EPO para el mantenimiento de eritropoyesis.

La hipoxia es una característica predominante de los tumores sólidos, los cuales comprenden aproximadamente el noventa por ciento de todos los cánceres humanos. Las respuestas adaptativas a la hipoxia en tumores sólidos se ha correlacionado con la agresividad potenciada, muerte celular y reducida respuesta tumoral disminuida por radiación y quimioterapia. La expresión de EPO se ha observado en diferentes tumores malignos hematopoyéticos y no hematopoyéticos, y se ha demostrado que media el crecimiento autónomo de células de leucemia eritrocíticas que expresan el EpoR.

Muchos cánceres humanos comunes sobreexpresan el factor de transcripción inducible por hipoxia HIF-1, el cual regula la expresión de EPO, así como varios genes que se requieren para incrementar la supervivencia hipóxica de células cancerosas que incluyen genes que codifican para enzimas glucolíticas, transportadoras de glucosa, y factor de crecimiento endotelial vascular (Semenza) (1999) Ann. Rev. Cell. Dev. Biol. 15.551-578). La hipoxia tumoral se

reconoce como un factor principal en la resistencia del tumor a la quimioterapia y radioterapia, aunque no se conocen los mecanismos subyacentes. La hipoxia induce respuestas adaptativas en células, principalmente al activar la expresión de varios genes bajo la regulación del factor 1 inducible por hipoxia (HIF-1), un factor de transcripción heterodimérico compuesto de subunidades HIF-1α y HIF-1β.

RESUMEN

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

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

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

Un aspecto proporciona un procedimiento de modulación de la función y/o la expresión de un polinucleótido de EPO u otro producto en gen en células o tejidos del paciente in vivo o in vitro que comprende poner en contacto dichas células o tejidos con, al menos, 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 156 de la SEQ ID NO: 2 (Figura 3) modulando de este modo la función y/o la expresión del polinucleótido de EPO en células o tejidos del paciente *in vivo* o *in vitro*.

En otro caso preferido, un oligonucleótido se dirige a una secuencia antisentido natural de polinucleótidos de EPO, por ejemplo, nucleótidos expuestos en SEQ ID NO: 2, 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: 3 a 5 (Figura 4).

Otro aspecto proporciona un procedimiento de modulación de la función y/o la expresión de un polinucleótido de EPO en células o tejidos del paciente in vivo o in vitro, que comprende poner en contacto dichas células o tejidos con, al menos, 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 antisentido del polinucleótido de EPO; modulando de este modo la función y/o la expresión del polinucleótido de EPO 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 EPO 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 EPO; modulando de este modo la función y/o la expresión del polinucleótido del EPO 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 EPO 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 α-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).

Otro aspecto proporciona un procedimiento de modulación de una función y/o la expresión de un polinucleótido para eritropoyetina (EPO) en células o tejidos del paciente in vivo o in vitro, que comprende poner en contacto dichas células o tejidos con, al menos, 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 de eritropoyetina (EPO); modulando de este modo una función y/o una expresión del polinucleótido para eritropoyetina (EPO) en células o tejidos del paciente in vivo o in vitro.

Otro aspecto proporciona un procedimiento de modulación de una función y/o la expresión de un polinucleótido para eritropoyetina (EPO) en células o tejidos del paciente in vivo o in vitro, que comprende poner en contacto dichas células o tejidos con por lo menos un oligonucleótido antisentido que se dirige a una región de un oligonucleótido antisentido natural del polinucleótido para eritropoyetina (EPO); modulando de este modo una función y/o la expresión del polinucleótido de eritropoyetina (EPO) en células o tejidos del paciente in vivo o in vitro.

En otro aspecto, la expresión y/o la función de la eritropoyetina (EPO) se incrementa in vivo o in vitro con respecto a un control.

En otro aspecto, al menos un oligonucleótido antisentido se dirige a una secuencia antisentido natural de un polinucleótido para eritropoyetina (EPO).

En otro aspecto, al menos un único oligonucleótido antisentido se dirige a una secuencia de ácido nucleico que comprende secuencias de ácido nucleico codificantes y/o no codificantes de un polinucleótido para eritropoyetina (EPO).

En otro aspecto, al menos un único oligonucleótido antisentido se dirige a las secuencias que se solapan y/o que no se solapan de un polinucleótido para eritropoyetina (EPO).

En otro aspecto, al menos un único oligonucleótido antisentido comprende una o más modificaciones que se seleccionan de entre: al menos un resto de azúcar modificado, al menos un enlace internucleósido modificado, al menos un nucleótido modificado, y combinaciones de los mismos.

En un aspecto relacionado, una o más modificaciones comprenden 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.

En otro aspecto relacionado, una o más modificaciones comprenden, al menos, un enlace internucleosídico modificado seleccionado de entre: un fosforotioato, 2'- O-metoxietilo (MOE), 2'-fluoro, alquilfosfonato, fosforoditioato, alquilfosfonotioato, fosforamidato, carbamato, carbonato, triéster de fosfato, acetamidata, éster carboximetílico, y combinaciones de los mismos.

En otro aspecto relacionado, una o más modificaciones comprenden, al menos, un nucleótido modificado seleccionado de entre: un ácido nucleico peptídico (PNA), un ácido nucleico bloqueado (LNA), un ácido arabino-nucleico (FANA), análogos, derivados, y combinaciones de los mismos.

En otro aspecto, al menos un oligonucleótido comprende una de las secuencias oligonucleótidas expuestas como las SEQ ID NO: 3 a 5.

Otro aspecto proporciona un procedimiento para modular una función de y/o la expresión de un gen para eritropoyetina (EPO) en células o tejido de mamífero in vivo o in vitro que comprende poner en contacto las células o tejidos con al menos un oligonucleótido de ARN interferente pequeño (siRNA) con una longitud de 5 a 30 nucleótidos, por lo menos un siRNA es específico para un oligonucleótido antisentido de un polinucleótido para eritropoyetina (EPO), donde el oligonucleótido siRNA tiene al menos un 50% de identidad de secuencia con una

secuencia complementaria de, al menos, aproximadamente cinco ácidos nucleicos consecutivos de la molécula de ácido nucleico antisentido y/o directo de una molécula de ácido nucleico de polinucleótido para eritropoyetina (EPO); y modular una función de y/o la expresión del gen para eritropoyetina (EPO) en células o tejidos de mamífero in vivo o in vitro.

En un aspecto, dicho oligonucleótido tiene al menos 80% de identidad de secuencia con una secuencia complementaria de, al menos, aproximadamente cinco ácidos nucleicos consecutivos que es complementaria de la molécula de ácido nucleico antisentido y/o sentido para eritropoyetina (EPO).

Otro aspecto proporciona un procedimiento de modulación de y/o la expresión de un gen para eritropoyetina (EPO) en células o tejidos de mamífero in vivo o in vitro que comprende poner en contacto dichos tejidos o células con, al menos, un oligonucleótido antisentido con una longitud aproximadamente de 5 a 30 nucleótidos específico para secuencias no codificantes y/o secuencias codificantes de una cadena sentido y/o antisentido natural de un polinucleótido que codifica para una molécula de eritropoyetina (EPO), donde, al menos, un oligonucleótido antisentido tiene, al menos, 50% de identidad de secuencia con al menos una secuencia de ácido nucleico como se expone en las SEQ ID NO: 1 y 2; y, modular la expresión y/o función del gen para eritropoyetina (EPO) en células o tejidos de mamífero in vivo o in vitro.

Otro aspecto de la divulgación proporciona un oligonucleótido modificado sintético que comprende, al menos, una modificación, donde al menos se selecciona una modificación de entre: al menos un resto de azúcar modificado; al menos un enlace internucleotídico modificado; al menos un nucleótido modificado; y combinaciones de los mismos; donde dicho nucleótido, es un compuesto antisentido el cual hibridiza con y modula la expresión y/o función de un gen para eritropoyetina (EPO) in vivo o in vitro en comparación con un control normal.

En otro aspecto relacionado, una o más modificaciones comprenden, al menos, un enlace internucleotídico seleccionado de entre el grupo que consiste de: un fosforotioato, alquil fosfonato, fosforoditioato, alquilfosfonotioato, fosforamidato, carbamato, carbonato, triéster de fosfato, acetamidata, éster carboximetílico, y combinaciones de los mismos.

En otro aspecto, el oligonucleótido comprende al menos un enlace internucleotídico fosforotioato.

En un aspecto relacionado, dicho oligonucleótido comprende un esqueleto de enlaces internucleotídicos fosforotioato.

En otro aspecto, el oligonucleótido comprende, al menos, un nucleótido modificado y seleccionado de entre: un ácido nucleico peptídico, un ácido nucleico bloqueado (LNA), un análogo, un derivado, y combinaciones de los mismos.

En otro aspecto, el oligonucleótido comprende un resto de azúcar modificado seleccionado de entre: un resto de azúcar modificado 2'-O-metoxietilo, un resto de azúcar modificado 2'-metoxi, un resto de azúcar modificado 2'-O-alquilo, un resto de azúcar bicíclico, y combinaciones de los mismos.

En otro aspecto, el oligonucleótido es de una longitud de al menos aproximadamente 5 a 30 nucleótidos y se hibridiza con una cadena sentido y/o antisentido de un polinucleótido para eritropoyetina (EPO) y donde dicho compuesto antisentido tiene al menos aproximadamente 20% de identidad de secuencia con una secuencia complementaria de al menos 5 ácidos nucleicos consecutivos de las secuencias de ácido nucleico codificantes y/o no codificantes antisentido y/o sentido de polinucleótido para eritropoyetina (EPO).

En otro aspecto, el oligonucleótido tiene al menos aproximadamente un 80% de identidad de secuencia con una secuencia complementaria de, al menos, aproximadamente cinco ácidos nucleicos consecutivos de las secuencias de ácido nucleico codificantes y/o no codificantes antisentido y/o sentido de polinucleótido para eritropoyetina (EPO).

En otro aspecto, el oligonucleótido hibridiza con y modula la expresión y/o función de, al menos, un polinucleótido de eritropoyetina (EPO) in vivo o in vitro, en comparación a un control normal.

En un aspecto relacionado, el oligonucleótido comprende una de las secuencias expuestas como las SEQ ID NO: 3 a 5.

Un aspecto de la divulgación proporciona una composición que comprende uno o más oligonucleótidos específicos para uno o más polinucleótidos para eritropoyetina (EPO), dichos polinucleótidos comprenden secuencias antisentido, secuencias complementarias, alelos, homólogos, isoformas, variantes, derivados, mutantes, fragmentos,

o combinaciones de los mismos.

En un aspecto relacionado, los oligonucleótidos tienen, al menos, aproximadamente 40% de identidad de secuencia en comparación con cualquiera de las secuencias nucleotídicas expuestas en las SEQ ID NO: 3 a 5.

En un cierto aspecto, los oligonucleótidos comprenden cualquiera de las secuencias nucleotídicas expuestas en las SEQ ID NO: 3 a 5.

En un aspecto, los oligonucleótidos expuestos en las SEQ ID NO: 3 a 5 comprenden una o más modificaciones o sustituciones nucleotídicas.

En otro aspecto, una o más modificaciones o sustituciones de nucleótido se seleccionan de entre: moléculas de fosforotioato, metilfosfonato, ácido péptido nucleico, ácido nucleico bloqueado (LNA), y combinaciones de los mismos.

Un aspecto de la divulgación proporciona un procedimiento para evitar o tratar una enfermedad o trastorno asociados con, al menos, un polinucleótido para eritropoyetina (EPO) y/o al menos un producto codificado por el mismo, que comprende:
administrar a un paciente una dosis terapéuticamente eficaz de, al menos, un oligonucleótido antisentido que se une a una secuencia antisentido natural de, al menos, un polinucleótido para eritropoyetina (EPO) y que modula la expresión de, al menos, un polinucleotido de eritropoyetina (EPO); por lo que se evita o se trata la enfermedad o trastorno asociados con, al menos, un polinucleótido para eritropoyetina (EPO) y/o al menos un producto codificado del mismo.

En aspectos, una enfermedad o trastorno asociado con, al menos, un polinucleótido para eritropoyetina (EPO) se selecciona de entre: una enfermedad, trastorno o estado de irregularidad hematológica, un trastorno de la sangre caracterizado por producción baja o defectuosa de eritrocitos, una anemia, anemia de células falciformes, beta-talasemia, eritropoyesis anormal, un trastorno del embarazo o menstrual, anemia temprana de premadurez, insuficiencia renal, fallo renal crónico, hipertensión, una enfermedad o trastorno asociado con cirugía, una enfermedad o trastorno en un paciente pediátrico sometido a diálisis, una enfermedad o condición asociada con niveles insuficientes de hematocrito, SIDA, un trastorno relacionado con tratamientos de quimioterapia, fibrosis quística, un cáncer o tumor, una enfermedad infecciosa, una enfermedad venérea, una enfermedad relacionada inmunológicamente con una enfermedad o trastorno autoinmune, una enfermedad cardiovascular, por ejemplo: apoplejía, hipotensión, parada cardiaca, isquemia en particular daño por isquemia-reperfusión, infarto al miocardio como infarto de miocardio agudo, fallo cardiaco crónico, angina, hipertrofia cardiaca, enfermedad cardiopulmonar, derivación (bypass) corazón-pulmón, enfermedad respiratoria, riñón, una enfermedad urinaria/reproductiva, una anormalidad endocrina/metabólica, una enfermedad gastrointestinal, una enfermedad del sistema nervioso central (SNC) o sistema nervioso periférico el cual tiene principalmente síntomas neurológicos o psiquiátricos, pérdida de la función cognitiva relacionada con la edad, parálisis cerebral, enfermedades neurodegenerativas, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Leigh, demencia, pérdida de memoria, esclerosis lateral amiotrófica, alcoholismo, trastorno emocional, trastornos de ansiedad, trastorno de déficit de atención, hiperactividad, autismo, esquizofrenia, depresión, traumatismo o isquemia del cerebro o médula espinal, enfermedad de Creutzfeld-Jakob, enfermedades oftálmicas, trastorno de ataques, esclerosis múltiple, inflamación, daño por radiación, degeneración macular, neuropatía diabética, retinopatía diabética, glaucoma, isquemia de la retina y traumatismo de la retina, daño de la médula espinal, vuelo espacial, pérdida de sangre aguda, envejecimiento y estados de enfermedad neoplásicos.

Un aspecto de la divulgación proporciona un procedimiento para identificar y seleccionar, al menos, un oligonucleótido para administración in vivo, que comprende: seleccionar un polinucleótido diana asociado con un estado de enfermedad; identificar oligonucleótidos que comprendan, al menos, cinco nucleótidos consecutivos los cuales son complementarios a, o en una orientación antisentido al polinucleótido diana seleccionado; y, medir el punto de fusión térmico de un híbrido de un oligonucleótido antisentido y el polinucleótido diana bajo condiciones de hibridación astringentes, y seleccionar, al menos, un oligonucleótido para administración in vivo, basándose en la información obtenida.

Otros aspectos se describen más adelante.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un gráfico de resultados de PCR en tiempo real que muestra el cambio en veces en ARNm para EPO

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 para EPO en células HepG2 se incrementan significativamente 48 h después del tratamiento con dos de los siRNA diseñados como epoas (epoas _1, P = 0,02, y epoas _2, P = 0,04, Fig.1A). En las mismas muestras los niveles de ARN epoas posiblemente están disminuidos después del tratamiento con los siRNA para epoas (Fig. 1B). Las barras indicadas como epoas_1, epoas_2, epoas_3 se corresponden a muestras tratadas con las SEQ ID NO: 3, 4, y 5 respectivamente.
La Figura 2 muestra la SEQ ID NO: 1: Eritropoyetina (EPO) de Homo sapiens, ARNm. (Número de acceso del NCBI: NM_000799.2) y SEQ ID NO: 1a muestra la secuencia genómica de EPO (se muestran exones en letras mayúsculas, intrones en minúscula).
La Figura 3 muestra la SEQ ID NO: 2: La secuencia antisentido natural EPO-AS (número de acceso del NCBI: AW798641.1)
La Figura 4 muestra los oligonucleótidos antisentido, las SEQ ID NO: 3 al 5. "r" indica ARN
La Figura 5 muestra los oligonucleótidos sentido, SEQ ID NO: 6 al 8. "r" indica ARN Estos son los complementos inversos de las SEQ ID NO: 3 a 5.
La Figura 6 muestra el cebador directo (SEQ ID NO: 9), el cebador inverso (SEQ ID NO: 10) y la secuencia indicadora (SEQ ID NO: 11) de los ensayos Custom diseñados por el análisis de expresión de gen Applied Biosystems Taqman (Hs00171267_ml).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

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.

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 puede 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.

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

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

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

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

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

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

Tal como se usa en el presente documento, las palabras eritropoyetina, epoyetina, EPO y hEPO (eritropoyetina humana), se utilizan de manera intercambiable en la presente solicitud.

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

Tal como se usa en el presente documento, la expresión “ácido nucleico diana” engloba ADN, ARN (que comprende pre-ARNm y ARN) 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 ARN “interferente pequeño” (siRNA) de 5-25 nucleótidos. Los siRNA se derivan del procesamiento de dsARN mediante una enzima ARNasa conocida como Dicer (Bernstein, E., 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 alinean automáticamente secuencias de ácido nucleico e indican regiones de identidad u homología. Dichos programas se usan para comparar secuencias de ácidos nucleicos obtenidas, por ejemplo, buscando en bases de datos tales como GenBank o secuenciando productos de PCR. La comparación de secuencias de ácidos nucleicos de un intervalo de especies permite la selección de secuencias de ácidos nucleicos que muestran un grado de identidad apropiado entre especies. En el caso de genes que no han sido secuenciados, se realizan Southern blots para permitir una determinación del grado de identidad entre genes en especies diana y otras especies. Realizando Southern blots a grados de astringencia variables, tal como es muy conocido en la técnica, es posible obtener una medida aproximada de la identidad. Estos procedimientos permiten la selección de oligonucleótidos que muestran un alto grado de complementariedad con secuencias de ácido nucleico diana en un sujeto a controlar y un menor grado de complementariedad con secuencias de ácido nucleico correspondientes en otras especies. Un experto en la materia se dará cuenta de que hay libertad considerable en la selección de regiones apropiadas de genes para su uso en la presente divulgación.

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

Por “ARN señuelo” se indica una molécula de ARN que imita el dominio de unión natural para un ligando. El ARN señuelo compite, por lo tanto, con la diana de unión natural para la unión de un ligando específico. Por ejemplo, se ha mostrado que la sobreexpresión del ARN de respuesta de transactivación (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.

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, fosforamidato y similares, tal como se describe más completamente más adelante.

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 heterocídiclicos y tautómeros de las mismas. Ejemplos ilustrativos de otros tipos de nucleótidos son moléculas que contienen adenina, guanina, timina, citosina, uracilo, purina, xantina, diaminopurina, 8-oxo- N6-metiladenina, 7-deazaxantina, 7-deazaguanina, N4,N4-etanocitosina, N6,N6-etano-2,6- diaminopurina, 5-metilcitosina, 5-alquinil(C3-C6)-citosina, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, seudoisocitosina, 2-hidroxi-5-metil-4-triazolopiridina, isocitosina, isoguanina, inosina y los nucleótidos "no de origen natural" descritos en Benner y col., patente de 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 and Baker, DNA Replication, 2nd Ed. (Freeman, San Francisco, 1992), además de sus análogos.

“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] biciclorabinonucleósidos (véase, por ejemplo, N.K Christiensen., 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.

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++ o K++ (es decir, baja fuerza iónica), temperatura superior a 20 ºC - 25 ºC 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 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 ºC durante 30 minutos.

“Complementario”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad de apareamiento preciso entre dos nucleótidos en una o dos cadenas oligoméricas. Por ejemplo, si una nucleobase en cierta posición de un

compuesto antisentido es capaz de formar puentes de hidrógeno con una nucleobase en cierta posición de un ácido nucleico diana, siendo dicho ácido nucleico diana un ADN, ARN, o molécula de oligonucleótido, entonces la posición de la formación de puentes de hidrógeno entre el oligonucleótido y se considera que el ácido nucleico diana es una posición complementaria. El compuesto oligomérico y el ADN, ARN, o molécula de oligonucleótido, adicional son complementarios entre sí cuando un número suficiente de posiciones complementarias en cada molécula están ocupadas por nucleótidos que pueden formar puentes de hidrógeno entre sí. De este modo, "específicamente hibridable" y "complementariedad" son expresiones que se usan para indicar un grado suficiente de apareamiento preciso o complementariedad sobre un número suficiente de nucleótidos de modo que se produzca unión estable y específica entre el compuesto oligomérico y un ácido nucleico diana.

Se entiende en la técnica que no es necesario que la secuencia de un compuesto oligomérico sea un 100 % complementaria a la de su ácido nucleico diana para ser específicamente hibridable. Además, un oligonucleótido puede hibridarse sobre uno o más segmentos, de modo que segmentos intermedios o adyacentes no estén implicados en el acontecimiento de hibridación (por ejemplo, una estructura en bucle, desapareamiento o estructura de horquilla). Los compuestos oligoméricos de la presente divulgación comprenden al menos aproximadamente el 70%, o al menos aproximadamente el 75%, o al menos aproximadamente el 80%, o al menos aproximadamente el 85%, o al menos aproximadamente el 90%, o al menos aproximadamente el 95%, o al menos aproximadamente el 99%, de complementariedad de secuencia con una región diana dentro de la secuencia de ácidos nucleicos diana a la que se dirigen. Por ejemplo, un compuesto antisentido en el que 18 de los 20 nucleótidos del compuesto antisentido son complementarios a una región diana y, por lo tanto, hibridarían específicamente, representaría el 90 por ciento de complementariedad. En este ejemplo, los nucleótidos no complementarios restantes pueden agruparse o intercalarse con nucleótidos complementarios y no necesitan ser contiguos entre sí o a nucleótidos complementarios. Por lo tanto, un compuesto antisentido que tiene 18 nucleótidos de longitud que tiene 4 (cuatro) nucleótidos no complementarios que están flanqueados por dos regiones de complementariedad completa con el ácido nucleico diana tendría el 77,8% de complementariedad global con el ácido nucleico diana y de este modo estaría dentro del alcance de la presente divulgación. El porcentaje de complementariedad de un compuesto antisentido con una región de un ácido nucleico diana puede determinarse rutinariamente usando programas BLAST (herramientas de búsqueda de alineamientos locales básicos) y programas PowerBLAST conocidos en la técnica (Altschul 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 and Waterman (Adv. Appl. Math., (1981) 2, 482-489).

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 menos aproximadamente 0,01 a 1,0 M a pH de 7,0 a 8,3 y la temperatura es al menos aproximadamente 30ºC para oligonucleótidos cortos (por ejemplo, de 10 a 50 nucleótidos). También pueden lograrse condiciones astringentes con la adición de agentes desestabilizantes tales como formamida.

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

El término "variante", cuando se usa en el contexto de una secuencia de polinucleótidos, puede englobar una secuencia de polinucleótidos relacionada con un gen de tipo silvestre. Esta definición también puede comprender, por ejemplo, variantes "alélicas", de "splicing", de "especie" o "polimórficas". Una variante de splicing puede tener identidad significativa con una molécula de referencia, pero generalmente tendrá un mayor o menor número de polinucleótidos debido al splicing alterno de exones durante el procesamiento de ARNm. Los polipéptidos correspondientes pueden poseer dominios funcionales adicionales o una ausencia de dominios. Las variantes de especie son secuencias de polinucleótidos que varían de una especie a otra. Son de particular utilidad en la divulgación variantes de productos génicos de tipo silvestre (wild type). Las variantes pueden resultar de al menos una mutación en la secuencia de ácidos nucleicos y pueden producir ARNm alterados o polipéptidos cuya estructura o función puede o puede no alterarse. Cualquier gen natural o recombinante dado puede tener ninguna, una o muchas formas alélicas. Cambios mutacionales comunes que dan lugar a variantes se atribuyen generalmente a deleciones, adiciones o sustituciones naturales de nucleótidos. Cada uno de estos tipos de cambios puede producirse solo, o en combinación con los otros, una o más veces en una secuencia dada.

Los polipéptidos resultantes generalmente tendrán identidad significativa de aminoácidos los unos con respecto a los

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

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

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.

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

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

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

Composiciones y moléculas de polinucleótidos y oligonucleótidos

Dianas: En un aspecto, las dianas comprenden secuencias de ácido nucleico de eritropoyetina (EPO), incluyendo sin limitación secuencias no codificantes y/o codificantes, sentido y/o antisentido asociadas con EPO.

La eritropoyetina (EPO) es un miembro de la familia del factor de crecimiento hematopoyético que actúa como una hormona. La EPO regula la producción de eritrocitos (eritropoyesis) y mantiene la masa corporal de los eritrocitos en un nivel óptimo. La producción de EPO es estimulada por un contenido de oxígeno reducido en la circulación arterial renal, mediada por un factor de transcripción que es sensible al oxígeno. La EPO se produce principalmente por células del endotelio capilar peritubular del riñón. La EPO secretada se une a receptores de EPO sobre la superficie de precursores de médula ósea-eritroides y resulta en una replicación y maduración rápidas para eritrocitos funcionales. Esta estimulación resulta en un incremento rápido en las cuentas eritrocíticas y un consecuente aumento en el hematocrito (% de eritrocitos en sangre) (D'Andrea et al. (1989) Cell 57: 277-285; Lodish et al. (1995) Cold Spring Harb Symp Quant Biol 60: 93-104).

La eritropoyetina estimula a la médula ósea para que produzca más eritrocitos. El aumento resultante en eritrocitos incrementa la capacidad de transporte de oxígeno en sangre. Como el regulador principal de la producción de eritrocitos, las funciones principales de la eritropoyetina son: promover el desarrollo de eritrocitos; iniciar la síntesis de hemoglobina, la molécula dentro de los eritrocitos que transporta oxígeno.

La EPO estimula la división mitótica y la diferenciación de células precursoras eritrocíticas y por lo tanto asegura la producción de eritrocitos. Se produce en los riñones cuando prevalecen condiciones hipóxicas. Durante la diferenciación de las células precursoras eritrocíticas inducida por la EPO, existe una inducción de síntesis de globulina y un incremento en la síntesis del complejo hemo y en el número de receptores de ferritina. Esto vuelve posible que la célula tome más iones y sintetice hemoglobina funcional. La hemoglobina de eritrocitos maduros se

une a oxígeno. De esta manera, los eritrocitos y la hemoglobina contenida en los mismos juegan un papel fundamental en el suministro de oxígeno al cuerpo. Este complejo proceso al que ha sido descrito se inicia por la interacción de EPO con un receptor apropiado sobre la superficie celular de las células precursoras eritrocíticas.

La EPO está presente en concentraciones muy bajas en el plasma cuando el cuerpo está en un estado sano donde los tejidos reciben oxigenación suficiente a partir del número existente de eritrocitos. Esta concentración normal baja es suficiente para estimular la sustitución de eritrocitos, los cuales se pierden normalmente debido al envejecimiento.

La cantidad de EPO en la circulación se incrementa bajo condiciones de hipoxia cuando se reduce el transporte de oxígeno por eritrocitos en la circulación. La hipoxia puede ser causada por: pérdida de grandes cantidades de sangre por hemorragia, destrucción de eritrocitos por exposición excesiva a radiación, reducción de la entrada de oxígeno debido a una elevada altitud o inconsciencia prolongada, o diversas formas de anemia. En respuesta a que los tejidos experimentan estrés hipóxico, la EPO incrementará la producción de eritrocitos por estimulación de proliferación de células progenitoras eritroides. Cuando el número de eritrocitos en circulación es mayor que el necesario para los requerimientos de oxígeno de tejido normal, la EPO en circulación disminuye.

Debido a que la EPO es esencial en el proceso de formación de eritrocitos, la hormona tiene aplicaciones potencialmente útiles tanto en diagnóstico como en el tratamiento de trastornos de la sangre caracterizados por una producción baja o defectuosa de células sanguíneas. Los ejemplos de enfermedades y trastornos mediados por eritropoyetina, los cuales pueden ser tratados con células/tejidos regenerados de células madre obtenidas utilizando los compuestos antisentido, comprenden enfermedades o condiciones que utilizan actividades protectoras de tejido de un polipéptido de EPO para protección contra daño o restauración de la función posterior al daño a células, tejidos u órganos de mamífero que responden. Los ejemplos de dichas enfermedades o condiciones incluyen, pero no se limitan a estados de enfermedad, trastornos y estados de irregularidades hematológicas, trastornos de la sangre caracterizados por producción baja o defectuosa de eritrocitos, anemia, anemia de células falciformes, beta-talasemia, eritropoyesis anormal, trastornos del embarazo o menstruales, anemia temprana de premadurez, insuficiencia renal, fallo renal crónico, hipertensión, una enfermedad o trastorno asociado con cirugía, una enfermedad o trastorno en un paciente pediátrico sometido a diálisis, enfermedades o condiciones asociadas con niveles insuficientes de hematocrito, SIDA, trastornos relacionados con tratamientos de quimioterapia, fibrosis quística, cánceres y tumores, enfermedades infecciosas, enfermedades venéreas, una enfermedad relacionada inmunológicamente y/o enfermedades o trastornos autoinmunes, enfermedades cardiovasculares, tales como: apoplejía, hipotensión, parada cardiaca, isquemia en particular daño por isquemia-reperfusión, infarto al miocardio como infarto de miocardio agudo, fallo cardiaco crónico, angina, hipertrofia cardiaca, enfermedades cardiopulmonares, derivación (bypass) de corazón-pulmón, enfermedades respiratorias, enfermedades renales, urinarias y reproductivas, anomalías endocrinas y metabólicas, enfermedades gastrointestinales, enfermedades del sistema nervioso central (SNC) o sistema nervioso periférico los cuales tienen principalmente síntomas neurológicos o psiquiátricos, pérdida de la función cognitiva relacionada con la edad, parálisis cerebral, enfermedades neurodegenerativas, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Leigh, demencia, pérdida de memoria, esclerosis lateral amiotrófica, alcoholismo, trastornos emocionales, trastornos de ansiedad, trastornos de déficit de atención, hiperactividad, autismo, esquizofrenia, depresión, traumatismo o isquemia del cerebro o médula espinal, enfermedad de Creutzfeld-Jakob, enfermedades oftálmicas, trastorno de ataques, esclerosis múltiple, inflamación, daño por radiación, degeneración macular, neuropatía diabética, retinopatía diabética, glaucoma, isquemia de la retina y traumatismo de la retina, daño de la médula espinal, vuelo espacial, pérdida de sangre aguda, envejecimiento y diversos estados de enfermedad neoplásicos.

En aspectos, los procedimientos y composiciones de la divulgación se utilizan para modular cualquier función de eritropoyetina. Los ensayos para determinar modulación de las funciones de eritropoyetina se conocen en la técnica y se han descrito en la bibliografía. Por ejemplo, la patente de EE.UU. nº. 5.688.679, "Gen de eritropoyetina humana; alto nivel de expresión en células de mamíferos transfectadas de forma estable" , informa del uso de un ensayo in vitro para determinar actividad biológica de eritropoyetina que se basa en la formación de colonias eritroides (a partir de CFU-E; células formadoras de colonias eritroides) en cultivos de células de médula ósea de ratón en coágulos de plasma (Blood Cells 4:89-103, 1978). Se ha informado que la sensibilidad de este ensayo es de aproximadamente 5 miliunidades/ml. La eritropoyetina utilizada como el estándar para el ensayo es una preparación purificada parcialmente a partir de plasma de ovejas anémicas. Los sobrenadantes se analizan a partir de líneas de células sometidas a pasaje que crecen durante 24 horas en un medio fresco sin metotrexato. El sobrenadante se diluye 1:200 con el medio, y se agregan cantidades entre 1 y 10 microlitros por mililitro de cultivo de ensayo que contiene 2 x 10 5 células de médula, 10% de plasma citritado bovino, 20% de suero bovino fetal, 1% de albúmina sérica bovina y 1,6% de extracto de embrión de carne de vacuno (Gibco). Después de incubación durante 36 a 48 horas, los coágulos de plasma se fijan en portaobjetos de microscopio, se tiñen con bencidina para determinación de hemoglobina y se enumeran las colonias eritroides.

La patente de EE.UU. con nº. 5.688.679 también informó del uso de sobrenadantes a partir de líneas de células seleccionadas para ensayos en radioinmunoensayo competitivo utilizando un antisuero de conejo antieritropoyetina humana polivalente (J.Cell.Physiol. 118:87-96, 1984). La eritropoyetina también se puede detectar utilizando otros procedimientos inmunológicos, por ejemplo: transferencia Western e inmunofluorescencia.

Además, la misma patente describe como realizar un ensayo de eritropoyetina secretada en sobrenadante de células para efectos proliferativos y otras células progenitoras de la médula ósea. La eritropoyetina se puede analizar por su efecto en una diversidad de progenitores a partir de médula de ratón y de humano que incluyen células formadoras de colonias eritroides (CFU-E), células formadoras de descarga eritroide (BFU-E), precursores de granulocito-macrófago (CFU-GM), y células formadoras de colonias de células mixtas (CFU-Mixto) (J.Cell.Physiol.Suppl. 1:79-85, 1982; J.Cell.Physiol. 118:87-96, 1984).

También se ha informado de que la eritropoyetina altera otros tipos de células además de aquellos de la línea eritrocítica. Por ejemplo, Lifshitz, et al., 2009, "Non-erythroid activities of erythropoietin: Functional effects on murine dendritic cells," Mol Immunol. 46(4): 713-21, también informa de experimentos in vivo en ratones a los que se les ha inyectado EPO y en ratones transgénicos que sobreexpresan EPO humana que muestran una población DC aumentada en bazo con una expresión de superficie celular mayor de CD80 y CD86. Prutchi, et al., 2008, "erythropoietin effects on dendritic cells: potential mediators in its function as an immunomodulator?" Exp Hematol. 36(12):1682-90, indicó que cuando se aplica in vitro, la EPO aumenta el porcentaje de DC en sangre periférica y DC derivada de monocitos (MoDC) que expresan las moléculas coestimuladoras de CD80 y CD86.

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

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

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 EPO, incluyendo, sin limitación, variantes, alelos, homólogos, mutantes, derivados, fragmentos y secuencias complementarias a estos. Preferentemente el oligonucleótido es una molécula de ARN o ADN antisentido.

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

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

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

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

En otro aspecto preferido, la elección como diana del EPO, 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: 2, y similares, modulan la expresión o función de EPO. 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.

En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos comprenden secuencias expuestas como las SEQ ID NO: 3 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 fosforotioato, fosforoditioato o similares. En otro aspecto preferido, los nucleótidos comprenden un derivado de fósforo. El derivado de fósforo (o grupo fosfato modificado) que puede unirse al resto de azúcar o de análogo de azúcar en los oligonucleótidos modificados de la presente divulgación puede ser un monofosfato, difosfato, trifosfato, alquilfosfato, alcanofosfato, fosforotioato y similares. La preparación de los análogos de fosfato indicados anteriormente, y su incorporación en nucleótidos, nucleótidos modificados y oligonucleótidos, también es en sí conocida y no es necesario describirla aquí.

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

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

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

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

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

En un aspecto preferido, los oligonucleótidos antisentido se unen a las secuencias antisentido naturales de eritropoyetina (EPO) y modulan la expresión y/o función de eritropoyetina (EPO) (SEQ ID NO: 1). Los ejemplos de secuencias antisentido incluyen las SEQ ID NO: 2 al 5.

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

En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos antisentido son específicos para secuencias antisentido naturales de la eritropoyetina (EPO) donde la unión de los oligonucleótidos a las secuencias antisentido naturales de la eritropoyetina (EPO) modulan la expresión y/o la función de la eritropoyetina (EPO).

En otro aspecto preferido, los compuestos de oligonucleótido comprenden secuencias expuestas como las SEQ ID NO: 3 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 fosforotioato, fosforoditioato o similares. En otro aspecto preferido, los nucleótidos comprenden un derivado de fósforo. El derivado de fósforo (o grupo fosfato modificado) que puede unirse al resto de azúcar o de análogo de azúcar en los oligonucleótidos modificados de la presente divulgación puede ser un monofosfato, difosfato, trifosfato, alquilfosfato, alcanofosfato, fosforotioato y similares. La preparación de los análogos de fosfato indicados anteriormente, y su incorporación en nucleótidos, nucleótidos modificados y oligonucleótidos, también es en sí conocida y no es necesario describirla aquí.

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

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

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

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 deleción 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.

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

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

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

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

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

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

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

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

Estrategia 1: En el caso de regulación discordante, la inactivación del transcrito antisentido eleva la expresión del gen convencional (sentido). Si el último gen debe codificar un fármaco diana conocido o supuesto, entonces la

inactivación de su homólogo antisentido podría imitar posiblemente la acción de un agonista receptor o una enzima estimulante.

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

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

Una vez introducidos a un sistema, los compuestos de la divulgación pueden provocar la acción de una o más enzimas o proteínas estructurales para efectuar la escisión u otra modificación del ácido nucleico diana o pueden trabajar mediante mecanismos basados en la ocupación. En general, los ácidos nucleicos (incluyendo oligonucleótidos) pueden describirse como "similares a ADN" (es decir, que generalmente tienen uno o más 2'-desoxiazúcares y, generalmente, bases T en vez de U) o "similares a ARN" (es decir, que generalmente tienen uno o más 2'-hidroxilazúcares o azucares 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 de la eritropoyetina (EPO) y productos codificados por los mismos. Los dsARN también pueden actuar como ARN activantes pequeños (ARNap). Sin desear ceñirse a ninguna teoría, direccionando secuencias a promotores génicos, los ARNap inducirán la expresión de genes diana en un fenómeno denominado activación transcripcional inducida por dsARN (aARN).

En un aspecto adicional, los "segmentos diana preferidos" identificados en el presente documento pueden emplearse en un cribado para compuestos adicionales que modulan la expresión de polinucleótidos de eritropoyetina (EPO). "Moduladores" son aquellos compuestos que disminuyen o aumentan la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica para eritropoyetina (EPO) y que comprenden al menos una parte de 5 nucleótidos que es complementaria a un segmento diana preferido. El procedimiento de cribado comprende las etapas de poner en contacto un segmento diana preferido de una molécula de ácido nucleico que codifica polinucleótidos sentido o antisentido naturales de eritropoyetina (EPO) con uno o más moduladores candidatos, y seleccionar uno o más moduladores candidatos que disminuyen o aumentan la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica polinucleótidos de eritropoyetina (EPO), por ejemplo, las SEQ ID NO: 3 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 de eritropoyetina (EPO), el modulador puede entonces emplearse en estudios de investigación adicionales de la función de polinucleótidos de eritropoyetina (EPO), 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 preferentemente modula la función del gen diana, por ejemplo, el gen EPO (por ejemplo, número de acceso NM_000799.2, Fig. 2). En un aspecto preferido, la diana es un polinucleótido antisentido del gen de eritropoyetina. En un aspecto preferido, un oligonucleótido antisentido se dirige a secuencias sentido y/o antisentido naturales de los polinucleótidos de eritropoyetina (EPO) (por ejemplo, número de acceso NM_000799.2, Fig. 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 EPO.

Los polinucleótidos antisentido naturales se pueden identificar como se describe, por ejemplo, en WO 2007/087113 y la patente de EE.UU. App. Pub. con nº. 2009/0258925, ambas tituladas "Transcritos de ARN no codificante y antisentido natural como diana de fármacos."

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 de eritropoyetina (EPO) (por ejemplo, número de acceso: NM_000799.2), 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 a la eritropoyetina (EPO) sola, sino que se extiende a cualquiera de las isoformas, receptores, homólogos y similares de las moléculas de eritropoyetina (EPO).

En otro aspecto preferido, un oligonucleótido se dirige a una secuencia antisentido natural de polinucleótidos de EPO, por ejemplo, polinucleótidos expuestos como SEQ ID NO: 2, 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: 3 a 5.

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

En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos son complementarios a, o se unen a, secuencias de ácido nucleico del antisentido natural de EPO, expuesto como SEQ ID NO: 2 y modula la expresión y/o la función de moléculas de EPO.

En un aspecto preferido, los oligonucleótidos comprenden secuencias de al menos 5 nucleótidos consecutivos de las SEQ ID NO: 3 a 5 y modula la expresión y/o la función de moléculas de eritropoyetina (EPO).

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

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

En otro aspecto preferido, la selección como diana de los polinucleótidos de eritropoyetina (EPO), por ejemplo, la SEQ ID NO: 2, 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.

En otro aspecto preferido, los compuestos antisentido comprenden secuencias expuestas como SEQ ID NO: 3 a 5. Estos oligonucleótidos pueden comprender uno o más nucleótidos modificados, fragmentos más cortos o más largos, enlaces modificados y similares.

En otro aspecto preferido, las SEQ ID NO: 3 a 5 comprenden uno o más nucleótidos de LNA.

La modulación de un ácido nucleico diana deseado puede llevarse a cabo de varias formas conocidas en la técnica. Por ejemplo, oligonucleótidos antisentido, siRNA, etc. Las moléculas de ácidos nucleicos enzimáticos (por ejemplo, ribozimas) son moléculas de ácidos nucleicos capaces de catalizar una o más de diversas reacciones, que incluyen la capacidad para escindir repetidamente otras moléculas de ácidos nucleicos separadas en un modo específico de secuencia de bases de nucleótidos. 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 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.

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

Se han usado 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).

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

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

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 and Gerlach, (1988) Nature, 334, 585; Walbot and Bruening, (1988) Nature, 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 and Gerlach, (1988) Nature, 334, 585; Walbot and Bruening, (1988) Nature, 334, 196; Uhlenbeck, O. C. (1987) Nature, 328: 596-600).

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

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, ARNap, aARN, 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. 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 azucares 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 BLos 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: 2 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 EPO y las secuencias expuestas como SEQ ID NO: 1, 2. Los oligonucleótidos también se dirigen a regiones solapantes de las SEQ ID NO: 1,2.

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 desoxioligonucleótidos de fosforotioato que hibridan con la misma región diana. La escisión del ARN diana puede detectarse rutinariamente por electroforesis en gel y, si fuera necesario, técnicas de hibridación de ácidos nucleicos asociadas conocidas en la técnica. En un aspecto preferido, un oligonucleótido 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 Tm 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 Tm, 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 gapmeros. 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.

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 oligonucleótidos tienen una mayor Tm (es decir, mayor afinidad de unión a diana) que los 2'-desoxioligonucleótidos 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 demostrarse rutinariamente por electroforesis en gel. En otro aspecto preferido, el oligonucleótido quimérico también se modifica para potenciar la resistencia a nucleasas. Las células contienen diversas exo- y endo-nucleasas que pueden degradar ácidos nucleicos. Se ha demostrado que varias modificaciones de nucleótidos y nucleósidos hacen que el oligonucleótido en el que se incorporan sea más resistente a la digestión por nucleasa que el oligodesoxinucleótido nativo. La resistencia a nucleasas se mide rutinariamente incubando oligonucleótidos con extractos celulares o soluciones de nucleasa aisladas y midiendo el grado de oligonucleótido intacto que queda con el tiempo, normalmente por electroforesis en gel. Los oligonucleótidos que se han modificado para potenciar su

resistencia a nucleasas sobreviven intactos durante más tiempo que los oligonucleótidos sin modificar. Se ha demostrado que diversas modificaciones de oligonucleótidos potencian o confieren resistencia a nucleasas. Los oligonucleótidos que contienen al menos una modificación de fosforotioato son actualmente más preferidos. En 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 comprenden esqueletos modificados, por ejemplo, fosforotioatos, fosfotriésteres, metilfosfonatos, enlaces entre azúcares de alquilo o cicloalquilo de cadena corta o enlaces entre azúcares heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta. Los más preferidos son oligonucleótidos con esqueletos de fosforotioato y aquellos con esqueletos de heteroátomo, particularmente esqueletos de CH2 --NH--O--CH2, CH,--N(CH3)--O--CH2 [conocido como un esqueleto de metilen(metilimino) o MMI], CH2 --O--N (CH3)-CH2, CH2 -N (CH3)--N (CH3)--CH2 y O--N (CH3--CH2 --CH2, donde el esqueleto de fosfodiéster nativo se representa como O--P--O--CH,). 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 (Sumrnerton and Weller, Patente de EE.UU. Nº. 5.034.506). En otros aspectos preferidos, tal como el esqueleto de ácido nucleico peptídico (PNA), el esqueleto de fosfodiéster del oligonucleótido se sustituye por un esqueleto de poliamida, estando los nucleótidos unidos directamente o 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, SCH3, F, OCN, OCH3 OCH3, OCH3 O(CH2)n CH3, O(CH2)nNH2 o O(CH2)nCH3 en los que n es de 1 a aproximadamente 10; alquilo C1 a C10 inferior, alcoxialcoxi, alquilo, alcarilo o aralquilo inferior sustituido; Cl; Br; CN; CF3; OCF3; O--, S--, o N-alquilo; O--, S--, o N-alquenilo; SOCH3; SO2 CH3; ONO2; NO2; N3; NH2; heterocicloalquilo; heterocicloalcarilo; aminoalquilamino; polialquilamino; sililo sustituido; un grupo de escisión de ARN; un grupo reportero; un intercalador; un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido; o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un oligonucleótido y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. Una modificación preferida incluye 2'-metoxietoxi [2'-O-CH2 CH2 OCH3, también conocido como 2'-O-(2-metoxietilo)] Martin et al., (1995) Helv. Chim. Acta, 78, 486). Otras modificaciones preferidas incluyen 2'-metoxi (2'-O--CH3), 2'-propoxi(2'-OCH2 CH2CH3) y 2'-flúor (2'-F). También pueden hacerse modificaciones similares en otras posiciones sobre el oligonucleótido, particularmente la posición 3' del azúcar en el nucleótido del extremo 3' y la posición 5' del nucleótido del extremo 5'. Los oligonucleótidos también pueden tener miméticos de azúcar tales como ciclobutilos en lugar del grupo pentofuranosilo.

Los oligonucleótidos también pueden comprender, adicionalmente o como alternativa, modificaciones o sustituciones de nucleobases (frecuentemente denominadas en la técnica simplemente "base"). Tal como se usa en el presente documento, nucleótidos "no modificados" o "naturales" incluyen adenina (A), guanina (G), timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Los nucleótidos modificados incluyen nucleótidos encontrados solo poco frecuentemente o transitoriamente en ácidos nucleicos naturales, por ejemplo, hipoxantina, 6-metiladenina, 5-Me-pirimidinas, particularmente 5-metilcitosina (también denominada 5-metil-2'-desoxicitosina y frecuentemente denominada en la técnica 5-Me-C), 5-hidroximetilcitosina (HMC), glicosil HMC y gentobiosil HMC, además de nucleótidos sintéticos, por ejemplo, 2-aminoadenina, 2-(metilamino)adenina, 2-(imidazolilalquil)adenina, 2-(aminoalquilamino)adenina u otras alquiladeninas heterosustituidas, 2-tiouracilo, 2-tiotimina, 5-bromouracilo, 5-hidroximetiluracilo, 8-azaguanina, 7-deazaguanina, N6(6-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 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) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 6553), cholic acid (Manoharan et al. (1994) Bioorg. Med. Chem. Let. 4, 1053), un tioéter, por ejemplo, hexil-S-tritiltiol (Manoharan et al. (1992) Ann. N.Y. Acad. Sci. 660, 306; Manoharan et al. (1993) Bioorg. Med. Chem. Let. 3, 2765), un tiocolesterol (Oberhauser et al., (1992) Nucl. Acids Res. 20, 533), una cadena alifática, por ejemplo, residuos de dodecandiol o undecilo (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-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 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 oligonucleótidos que son oligonucleótidos quiméricos, tal como se ha definido anteriormente en el presente documento.

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

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

De acuerdo con la divulgación, el uso de modificaciones tales como el uso de monómeros de LNA para potenciar la potencia, especificidad y duración de la acción y ampliar las vías de administración de oligonucleótidos comprende químicas actuales tales como MOE, ANA, FANA, PS, etc. (Uhlman, 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 compuesto parental o puede ser más grande o preferentemente más pequeño. Se prefiere que dichas oligonucleótidos modificados con LNA contengan menos de aproximadamente el 70%, más preferentemente menos de aproximadamente el 60%, de la manera más preferente menos de aproximadamente el 50% de monómeros de LNA y que sus tamaños estén entre aproximadamente 5 y 25 nucleótidos, más preferentemente entre aproximadamente 12 y 20 nucleótidos.

Esqueletos de oligonucleótidos modificados preferidos comprenden, aunque no se limitan a, fosforotioatos, fosforotioatos quirales, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, metil y otros alquil fosfonatos que comprenden 3'-alquilenfosfonatos y fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidatos que comprenden 3'-amino fosforamidato y aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionoalquilfosfonatos, tionoalquilfosfotriésteres y 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 metilenimino y metilenhidrazino; esqueletos de sulfonato y sulfonamida;

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

Las patentes representativas de los Estados Unidos que enseñan la preparación de los oligoncleósidos 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 -CH2-NH-O-CH2-, -CH2-N(CH3)-O-CH2-, conocidos como un esqueleto de metileno (metilimino) o MMI, -CH2-O-N(CH3)-CH2-, -CH2N(CH3)-N(CH3)CH2- y -O-N(CH3)-CH2-CH2- donde el esqueleto de fosfodiéster nativo se representa como –O-P-O-CH2- de la patente de EE.UU. nº 5.489.677, citada anteriormente, y los esqueletos de amida de la patente de EE.UU. nº 5.602.240, citada anteriormente. También se prefieren oligonucleótidos que tienen esqueletos de morfolino de la patente de EE.UU. nº 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-alquenilo; O-, S- o N-alquinilo; o O-alquil-O-alquilo, donde el alquilo, alquenilo y alquinilo pueden ser alquilo C a CO sustituido o sin sustituir o alquenilo y alquinilo C2 a CO. Se prefieren particularmente O(CH2)n OmCH3, O(CH2)n, OCH3, O(CH2)nNH2, O(CH2)nCH3, O(CH2)nONH2 y O(CH2nON(CH2)nCH3)2 en las que n y m pueden ser de 1 a aproximadamente 10. Otros oligonucleótidos preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': C a CO, (alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, alcarilo, aralquilo, O-alcarilo o O-aralquilo, SH, SCH3, OCN, CI, Br, CN, CF3, OCF3, SOCH3, SO2CH3 ONO2, NO2 N3, NH2, heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, polialquilamino, sililo sustituido, un grupo de escisión de ARN, un grupo indicador, un intercalador, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido, o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un oligonucleótido, y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. Una modificación preferida comprende 2'-metoxietoxi (2'-O-CH2CH2OCH3, también conocido como 2'-O-(2-metoxietilo) o 2'-MOE) (Martin 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(CH2)2ON(CH3)2, también conocido como 2'-DMAOE, tal como se describe en los ejemplos en el presente documento más adelante, y 2'-dimetilaminoetoxietoxi (también conocido en la técnica como 2'-O-dimetilaminoetoxietilo o 2'-DMAEOE), es decir, 2'-O-CH2-O-CH2-N(CH2)2..

Otras modificaciones preferidas comprenden 2'-metoxi (2'-OCH3), 2'-aminopropoxi (2'-OCH2CH2CH2NH2) y 2'-flúor (2'-F). También pueden hacerse modificaciones similares en otras posiciones en el oligonucleótido, particularmente la posición 3' del azúcar en el nucleótido del extremo 3' o en oligonucleótidos enlazados 2'-5' y la posición 5' del nucleótido del extremo 5'. Los oligonucleótidos también pueden tener miméticos de azúcar tales como restos ciclobutilo en lugar del azúcar pentofuranosilo. 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.

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-hidroxietilcitosina, 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-metilquanina y 7-metiladenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-deazaguanina y 7-deazaadenina y 3-deazaguanina y 3-deazaadenina.

Además, los nucleótidos comprenden los divulgados en la patente de Estados Unidos 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., 'Angewandle Chemie, International Edition', 1991, 30, página 613, y aquellos divulgados por Sanghvi, Y.S., Capítulo 15, 'Antisense Research and Applications', páginas 289-302, Crooke, S.T. and Lebleu, B. ea., CRC Press, 1993. Algunos de estos nucleótidos son particularmente útiles para incrementar la afinidad de unión de los compuestos oligoméricos de la divulgación. Estos comprenden pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y purinas sustituidas en N-2, N-6 y 0-6, que comprenden 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. Se ha mostrado que las sustituciones de 5-metilcistosina incrementan la estabilidad del dúplex de 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 son las sustituciones base preferidas, de manera aún más particular cuando se combinan con modificaciones de azúcar de 2'-Ometoxietilo

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

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. Let., 4, 1053-1060), un tioéter, por ejemplo, hexil-S-tritiltiol (Manoharan et al., (1992) Ann. N. Y. Acad, Sci., 660, 306-309; Manoharan et al., (1993) Bioorg. Med. Chem. Let., 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, di-hexadecil-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-oxicolesterol. (Crooke 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; 5,585,481; 5,587,371; 5,595,726; 5,597,696; 5,599,923; 5,599, 928 y 5,688,941.

Descubrimiento de fármacos: Los compuestos de la presente divulgación también pueden aplicarse en las áreas del descubrimiento de fármacos y validación de dianas. La presente divulgación comprende el uso de los compuestos y segmentos diana preferidos identificados en el presente documento en un esfuerzo por el descubrimiento de fármacos para esclarecer relaciones que existen entre los polinucleótidos de eritropoyetina (EPO) y una patología, fenotipo o afección. Estos procedimientos incluyen detectar o modular los polinucleótidos de eritropoyetina (EPO) que comprenden poner en contacto una muestra, tejido, célula u organismo con los compuestos de la presente divulgación, medir el nivel de ácido nucleico o de proteína de los polinucleótidos de eritropoyetina (EPO) y/o un criterio de valoración fenotípico o químico relacionado en algún momento después del tratamiento, y opcionalmente

comparar el valor medido con una muestra no tratada o muestra tratada con otro compuesto de la divulgación. Estos procedimientos también pueden realizarse en paralelo o en combinación con otros experimentos para determinar la función de genes desconocidos para el proceso de validación de dianas o para determinar la validez de un producto génico particular como diana para el tratamiento o prevención de una enfermedad, afección o fenotipo particular.

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

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

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

Kits, reactivos de investigación, diagnósticos y terapéuticos

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

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

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "sistema biológico" o "sistema" se define como cualquier organismo, célula, cultivo celular o tejido que expresa, o se ha hecho competente para expresar productos de genes de la eritropoyetina (EPO). 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 and 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 ARN 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 eritropoyetina (EPO). Por ejemplo, los oligonucleótidos que hibridan con dicha eficiencia y en dichas afecciones descritas en el presente documento como moduladores eficaces de eritropoyetina (EPO) son cebadores o sondas eficaces en condiciones que favorecen la amplificación génica o detección, respectivamente. Estos cebadores y sondas son útiles en procedimientos que requieren la detección específica de moléculas de ácidos nucleicos que codifican para eritropoyetina (EPO) y en la amplificación de dichas moléculas de ácidos nucleicos para la detección o para su uso en estudios adicionales de eritropoyetina (EPO). La hibridación de los oligonucleótidos antisentido, particularmente los cebadores y sondas de la divulgación con un ácido nucleico que codifica para eritropoyetina (EPO), 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 de eritropoyetina (EPO) 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 terapéuticos, un animal, preferentemente un ser humano, que se sospecha o tiene una enfermedad o trastorno que puede tratarse modulando la expresión de la eritropoyetina (EPO) se trata administrando compuestos antisentido de acuerdo con esta divulgación. Por ejemplo, en un aspecto no limitante, los procedimientos comprenden la etapa de administrar al animal que necesita tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz del modulador de la eritropoyetina (EPO). Los moduladores de eritropoyetina (EPO) de la presente divulgación modulan eficazmente la actividad de la eritropoyetina (EPO) o modulan la expresión de la proteína de la eritropoyetina (EPO). En un aspecto, la actividad o expresión de la eritropoyetina (EPO) en un animal se inhibe aproximadamente el 10% en comparación con un control. Preferentemente, la actividad o expresión de la eritropoyetina (EPO) en un animal se inhibe aproximadamente el 30%. Más preferentemente, la actividad o expresión de la eritropoyetina (EPO) en un animal se inhibe el 50% o más. De este modo, los compuestos oligoméricos modulan la expresión del ARNm de la eritropoyetina (EPO) al menos el 10%, al menos el 50%, al menos el 25%, al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 98%, al menos el 99%, o el 100% en comparación con un control.

En un aspecto, la actividad o expresión de la eritropoyetina (EPO) y/o en un animal aumenta aproximadamente el 10% en comparación con un control. Preferentemente, la actividad o expresión de la eritropoyetina (EPO) en un animal aumenta aproximadamente el 30%. Más preferentemente, la actividad o expresión de la eritropoyetina (EPO) en un animal aumenta el 50% o más. De este modo, los compuestos oligoméricos modulan la expresión del ARNm de la eritropoyetina (EPO) 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 de eritropoyetina (EPO) en suero, sangre, tejido adiposo,

hígado o cualquier otro líquido corporal, tejido u órgano del animal, utilizando los procedimientos descritos en la bibliografía y conocidos por aquellos expertos en la materia. Preferentemente, las células contenidas dentro de dichos líquidos, tejidos u órganos que se analizan contienen una molécula de ácido nucleico que codifica péptidos de la eritropoyetina (EPO) y/o la propia proteína de la eritropoyetina (EPO).

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

Otra modificación de los oligonucleótidos de la divulgación implica enlazar químicamente al oligonucleótido uno o más restos o conjugados, que potencian la actividad, distribución celular o captación celular del oligonucleótido Estos restos o conjugados pueden comprender grupos conjugados covalentemente unidos a grupos funcionales tales como grupos hidroxilo primarios o secundarios. Grupos conjugados de la divulgación incluyen intercaladores, moléculas reporteras, poliaminas, poliamidas, polietilenglicoles, poliéteres, grupos que potencian las propiedades farmacodinámicas de oligómeros, y grupos que potencian las propiedades farmacocinéticas de oligómeros. Grupos conjugados típicos incluyen 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. 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 nº. PCT/US92/09196, depositada el 23 de 1992, y la patente de EE.UU. con nº. 6.287.860, "Inhibición antisentido de expresión MEKK2". Restos conjugados incluyen, aunque no se limitan a, restos de lípido tales como un resto colesterol, ácido cólico, un tioéter, por ejemplo, hexil-5-tritiltiol, un tiocolesterol, una cadena alifática, por ejemplo, residuos de dodecanodiol o undecilo, un fosfolípido, por ejemplo, di-hexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato de trietilamonio, una poliamina o una cadena de polietilenglicol, o ácido adamantano acético, un resto palmitilo, o un resto octadecilamina o hexilamino-carbonil-oxicolesterol. Los oligonucleótidos de la divulgación también pueden conjugarse con principios activos, por ejemplo, aspirina, warfarina, fenilbutazona, ibuprofeno, suprofeno, fenbufeno, ketoprofeno, (S)-(+)-pranoprofeno, carprofeno, dansilsarcosina, ácido 2,3,5-triyodobenzoico, ácido flufenámico, ácido folínico, una benzotiadiazida, clorotiazida, una diazepina, indometacina, un barbitúrico, una cefalosporina, un fármaco sulfa, un antidiabético, un antibacteriano o un antibiótico.

Las patentes representativas de los Estados Unidos que enseñan la preparación de estos conjuados de 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; 5,371,241, 5,391,723; 5,416,203, 5,451,463; 5,510,475; 5,512,667; 5,514,785; 5,565,552; 5,567,810; 5,574,142; 5,585,481; 5,587,371; 5,595,726; 5,597,696; 5,599,923; 5,599,928 y 5,688,941.

Formulaciones

Los compuestos de la divulgación también pueden mezclarse, encapsularse, conjugarse o asociarse de otro modo a otras moléculas, estructuras de molécula o mezclas de compuestos, como, por ejemplo, liposomas, moléculas dirigidas a receptor, formulaciones orales, rectales, tópica u otras, para ayudar en la captación, distribución y/o absorción. Las patentes 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 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 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.

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: 3 a 5) o en combinación con una formulación de proteína, polisacárido o lípido adecuada.

Sistemas de administración de ácidos nucleicos adecuados adicionales incluyen vector viral, normalmente secuencia de al menos uno de un adenovirus, virus asociado a adenovirus (AAV), adenovirus dependiente de cooperador, retrovirus, o complejo de virus hemaglutinante de Japón-liposoma (HVJ). Preferentemente, el vector viral comprende 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.: U.S.A.:90 7603; Geller, A.I., et al., (1990) Proc Natl. Acad. Sci USA: 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. 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 μm de diámetro. Las emulsiones pueden contener componentes adicionales, además de las fases dispersas, y el fármaco activo que puede estar presente como una solución en o bien la fase acuosa, fase oleosa o bien él mismo como una fase independiente. Las microemulsiones están incluidas como un aspecto de la presente divulgación. Las emulsiones y sus usos son muy conocidos en la técnica y se describen adicionalmente en la patente de Estados Unidos 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 ARN a células.

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, dioleoiltetrametilaminopropilo DOTAP y dioleoil-fosfatidiletanolamina DOTMA).

Para administración tópica u otra, los oligonucleótidos de la divulgación pueden encapsularse dentro de liposomas o pueden formar complejos con los mismos, en particular con liposomas catiónicos. Como alternativa, los oligonucleótidos pueden estar complejados con lípidos, en particular con lípidos catiónicos. Ácidos grasos y ésteres preferidos, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, y sus usos se describen adicionalmente en la 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. La administración in vivo de los ARN de interferencia ha sido descrita, por ejemplo, en la patente de EE.UU. nº. 7.528.118, "Modulación del iARN de ApoB y usos de las mismas".

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, dactinomicina, doxorrubicina, epirrubicina, idarrubicina, esorrubicina, bleomicina, mafosfamida, ifosfamida, citosina arabinósido, biscloroetil-nitrosurea, busulfano, mitomicina C, actinomicina D, mitramicina, prednisona, hidroxiprogesterona, testosterona, tamoxifeno, dacarbazina, procarbazina, hexametilmelamina, pentametilmelamina, mitoxantrona, amsacrina, clorambucilo, metilciclohexilnitrosurea, mostazas de nitrógeno, melfalan, ciclofosfamida, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-azacitidina, hidroxiurea, desoxicoformicina, 4-hidroxiperoxiciclo-fosforamida, 5-fluorouracilo (5-FU), 5-fluorodesoxiuridina (5-FUdR), metotrexato (MTX), colchicina, taxol, vincristina, vinblastina, etopósido (VP-16), trimetrexato, irinotecán, topotecán, gemcitabina, tenipósido, cisplatino y dietilestilbestrol (DES). Cuando se usan con los compuestos de la 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 de la eritropoyetina (EPO), y la segunda diana puede ser una región de otra secuencia de nucleótidos. Como alternativa, las composiciones de la divulgación pueden contener dos o más compuestos antisentido dirigidos a diferentes regiones del mismo ácido nucleico diana de la eritropoyetina (EPO). 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 CE50 que se ha descubierto que son eficaces en modelos animales in vitro e in vivo. En general, la dosificación es de 0,01 µg a 100 g por kg de peso corporal, y puede administrarse una vez o más diariamente, semanalmente, mensualmente o anualmente, o incluso una vez cada 2 a 20 años. Los expertos en la 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 µg a 100 g por kg de peso corporal, una vez o más diariamente, a una vez cada 20 años. La administración de un oligonucleótido antisentido para ribonucleótido reductasa a pacientes que presentan leucemia mieloide aguda en un estudio de aumento de dosis ha sido descrito por Klisovic, et al., 2008, "Phase I study of GTI-2040, an antisense to ribonucleotide reductase, in combination with high-dose cytarabine in patients with acute myeloid leukemia," Clin Cancer Research:14(12):3889-95.

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

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

EJEMPLOS

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

Ejemplo 1: Diseño de oligonucleótidos antisentido específicos para una molécula de ácido nucleico antisentido para una cadena sentido del polinucleótido para eritropoyetina (EPO)

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

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

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

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

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

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 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 95ºC 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 95ºC 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(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 Tm y es directamente proporcional a la intensidad de la interacción entre las dos moléculas. Normalmente, la Tm superará los 40ºC.

Ejemplo 2: Modulación de polinucleótidos de EPO

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/estreptomicina (Mediatech nº de cat MT30-002-CI)) a 37°C y el 5% de CO_2. Un día antes del experimento, las células volvieron a sembrarse a la densidad de 1,5 x 10^5/ml en placas de 6 pocillos y se incubaron a 37ºC y con el 5% de CO_2. 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 contenía 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 37ºC y con el 5% de CO_2, 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 High Capacity ADNc Reverse Transcription (nº de cat 4368813) tal como se describe en el protocolo del fabricante. El ADNc de esta reacción de transcripción inversa se usó para monitorizar la expresión génica por PCR en tiempo real usando la mezcla de expresión génica Taqman de ABI (nº de cat 4369510) y cebadores/sondas diseñados por ABI (ensayo de expresión génica Taqman de Applied Biosystems: Hs00171267_ml by Applied Biosystems Inc., Foster City CA). Se usó el siguiente ciclo de PCR: 50ºC durante 2 min, 95ºC durante 10 min, 40 ciclos de (95ºC durante 15 segundos, 60ºC durante 1 min) usando la

máquina de PCR en tiempo real StepOne Plus (Applied Biosystems).

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

Los cebadores y la sonda para el ensayo Taqman diseñado y adaptado para EPO natural antisentido EPOAS (SEQ ID NO: 2)

Secuencia de cebador directo ACCACCCCGGTGTCAAG (SEQ ID NO: 9)
Secuencia de cebador inverso TTTACCTGTTTTCGCACCTACCAT (SEQ ID NO: 10)
Secuencia indicadora CAAGCTGTGACTTCTC (SEQ ID NO: 11)
Colorante de indicador 1: FAM

Resultado:

Los resultados de PCR en tiempo real muestran que los niveles de ARNm para EPO en células HepG2 se incrementan significativamente 48 h después del tratamiento con dos de los siRNA diseñados para epoas (epoas _1, P = 0,02, y epoas_2, P = 0,04, Fig.1A). En las mismas muestras los niveles de ARN epoas posiblemente están disminuidos después del tratamiento con los siRNA para epoas (Fig. 1B).

Ejemplo 3: Modulación del producto de proteína de EPO in vitro

Se analizaron células HepG2 tratadas con oligonucleótidos antisentido EPO como se describe en el Ejemplo 2 con un ensayo para expresión de proteína de EPO. La concentración de proteína de EPO humana y los niveles de secreción presentes en el sobrenadante celular se analizan utilizando un kit de análisis inmunosorbente unido a enzima (ELISA) (disponible comercialmente, por ejemplo, de Quantikine human erythropoietin, R&D Systems, Mineápolis, MN), de acuerdo con las instrucciones del fabricante y en comparación con los niveles en muestras control no transfectadas.

Ejemplo 4: Modulación del polinucleótido para EPO y producto de proteína en ratones ICGN

Los oligonucleótidos antisentido específicos para EPO-AS se administran a ratones ICGN (glomerulonifritis derivado de ICR), un modelo de ratón genéticamente anémico, para supervisar la disminución de anemia. Véase, por ejemplo, Nagasaki, et al., 2009, "Amelioration of Anemia in the ICGN Mouse, a Renal Anemia Model, with a Subcutaneous Bolus Injection of Erythropoietin Adsorbed to Hydroxyapatite Matrix," J. Vet. Med. Sci. 71(10): 1365-1371.

Los oligonucleótidos se administran por inyección en la vena de la cola utilizando una aguja de calibre 27G. La dosificación en bolo de los oligonucleótidos antisentido (las SEQ ID NO 3, 4 y 5) se disuelven en PBS a una concentración que permite el suministro de la dosis destinada en 8 ul/g de peso corporal. Los ratones se mantienen bajo una lámpara infrarroja durante aproximadamente 3 minutos, antes de la dosificación, para facilitar la inyección. A los ratones control se les administra el mismo volumen de PBS únicamente.

Se recogen muestras de sangre antes del tratamiento varios días antes de la dosificación mediante la recogida de 4 a 7 gotas de la vena de la cola.

Las muestras de sangre se recogen de la postcava bajo anestesia con CO_2 o éter y se utiliza para análisis hematológico. Los niveles de ARNm para EPO se miden por el ensayo RT-PCR como se ha descrito anteriormente. Se realiza el ensayo inmunosorbente unido a enzima (ELISA) utilizando un kit "Human EPO ELISA" (disponible, por ejemplo, de Quantikine human erythropoietin, R&D Systems, Mineápolis, MN, o Stemcell Technologies, Vancuver, BC, Canadá), para determinar la concentración de rhEPO en plasma. Los análisis hematológicos se realizan con un contador automático (KX-21NV; Sysmex, Kobe, Japón) de acuerdo con el manual de instrucciones. Se cuentan los reticulocitos en los frotis de sangre en portaobjetos teñidos con solución azul nueva de metileno de Brecher y se calcula la proporción de reticulocitos. Se evalúan el número de eritrocitos, la concentración de hemoglobina, el valor de hematocrito y la tasa de sostenimiento, la cual es la relación del valor en el día 21 con respecto a la del día 0, como eficacia sostenida de hematopoyesis. Se sacrifica a los ratones por exceso de inhalación de éter y se extirpan hígado, riñones y bazo, y se pesan. Se fijan hígado, bazo y tejido subcutáneo en formalina amortiguada neutra al 10% y se realiza un análisis histopatológico después de la tinción con hematoxilina y eosina.

Ejemplo 5: Modulación del polinucleótido para EPO y producto proteínico en pacientes con anemia

Se trató a pacientes con anemia con oligonucleótidos antisentido EPO. Se administró a estos pacientes oligonucleótidos antisentido (la SEQ ID NO 3, 4 y 5) por infusión i.v. a una tasa de 5 mg/kg de una a cinco veces a la semana. La hemoglobina se mide regularmente, por ejemplo, una vez a la semana por análisis espectrofotométrico estándar. El tratamiento se ajusta, en consecuencia, dependiendo del cambio relativo en el nivel de hemoglobina observado de una semana a otra. La dosificación se reduce a medida que la hemoglobina se aproxima a 12 g/dL o se incrementa en más de l g/dL, en cualquier periodo de dos semanas. (Véanse, por ejemplo, las directrices para la administración de eritropoyetina en el prospecto del envase de Epogen®, disponible en http://www.epogen.com/pdf/epogen_pi.pdf).

La expresión de la proteína EPO y el ARNm se analizaron. La concentración de la proteína EPO y los niveles de secreción se determinaron utilizando un kit de análisis inmunosorbente unido a enzima (ELISA) (disponible comercialmente, por ejemplo, de Quantikine human erythropoietin, R&D Systems, Mineápolis, MN), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se analiza el ARNm utilizando RT-PCR tal como se describe en otra parte de este documento.

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

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

LISTA DE SECUENCIAS

<110> CuRNA, Inc.
<120> TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES RELACIONADAS CON ERITROPOYETINA (EPO) MEDIANTE INHIBICIÓN DEL TRANSCRITO ANTISENTIDO NATURAL A EPO
<130> P37290EP-PCT

<140> EP09831152.5
<141> 03/12/2009

<150> US 61/119,961
<151> 2008-12-04

<160> 12

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 1340
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<300>
<308> NM_000799.2
<309> 25/07/2010
<313> (1)..(1340)

<400> 1

cccggagccg gaccggggcc accgcgcccg ctctgctccg acaccgcgcc ccctggacag 60

ccgccctctc ctccaggccc gtggggctgg ccctgcaccg ccgagcttcc cgggatgagg 120

gcccccggtg tggtcacccg gcgcgcccca ggtcgctgag ggaccccggc caggcgcgga 180

gatgggggtg cacgaatgtc ctgcctggct gtggcttctc ctgtccctgc tgtcgctccc 240

tctgggcctc ccagtcctgg gcgccccacc acgcctcatc tgtgacagcc gagtcctgga 300

gaggtacctc ttggaggcca aggaggccga gaatatcacg acgggctgtg ctgaacactg 360

cagcttgaat gagaatatca ctgtcccaga caccaaagtt aatttctatg cctggaagag 420

gatggaggtc gggcagcagg ccgtagaagt ctggcagggc ctggccctgc tgtcggaagc 480

tgtcctgcgg ggccaggccc tgttggtcaa ctcttcccag ccgtgggagc ccctgcagct 540

gcatgtggat aaagccgtca gtggccttcg cagcctcacc actctgcttc gggctctggg 600

agcccagaag gaagccatct cccctccaga tgcggcctca gctgctccac tccgaacaat 660

cactgctgac actttccgca aactcttccg agtctactcc aatttcctcc ggggaaagct 720

gaagctgtac acaggggagg cctgcaggac aggggacaga tgaccaggtg tgtccacctg 780

ggcatatcca ccacctccct caccaacatt gcttgtgcca caccctcccc cgccactcct 840

gaaccccgtc gaggggctct cagctcagcg ccagcctgtc ccatggacac tccagtgcca 900

gcaatgacat ctcaggggcc agaggaactg tccagagagc aactctgaga tctaaggatg 960

tcacagggcc aacttgaggg cccagagcag gaagcattca gagagcagct ttaaactcag 1020

ggacagagcc atgctgggaa gacgcctgag ctcactcggc accctgcaaa atttgatgcc 1080

aggacacgct ttggaggcga tttacctgtt ttcgcaccta ccatcaggga caggatgacc 1140

tggagaactt aggtggcaag ctgtgacttc tccaggtctc acgggcatgg gcactccctt 1200

ggtggcaaga gcccccttga caccggggtg gtgggaacca tgaagacagg atgggggctg 1260

gcctctggct ctcatggggt ccaagttttg tgtattcttc aacctcattg acaagaactg 1320

aaaccaccaa aaaaaaaaaa 1340

<210> 2
<211> 156
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 2

agcatctcag actgggatta tagacgtgag cctctgcgcc caggcagcct catctctgct 60

gctccgtgtt acctttccct cgatcattct ccctttcatc caaaatcagg ctcgcaaatg 120

agattctcca aaagaaagga aaaaaaaaaa aaaggg 156

<210> 3
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido

<400> 3
ggagaaucuc auuugcgagc cugauuu 27

<210> 4
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido

<400> 4
cucacgucua uaaucccagu cugagau 27

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

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido

<400> 5
cgagggaaag guaacacgga gcagcag 27

<210> 6
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Complemento inverso de los oligonucleótidos antisentido, SEQ ID NO: 3

<400> 6
aucaggcucg caaaugagau ucucc 25

<210> 7
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Complemento inverso de los oligonucleótidos antisentido, SEQ ID NO: 4

<400> 7
cucagacugg gauuauagac gugag 25

<210> 8
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Complemento inverso de los oligonucleótidos antisentido, SEQ ID NO: 5

<400> 8
gcugcuccgu guuaccuuuc ccucg 25

<210> 9
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador directo

<400> 9
accaccccgg tgtcaag 17

<210> 10
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador inverso

<400> 10
tttacctgtt ttcgcaccta ccat 24

<210> 11
<211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia indicadora

<400> 11
caagctgtga cttctc 16

<210> 12
<211> 2901
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 12

cccggagccg gaccggggcc accgcgcccg ctctgctccg acaccgcgcc ccctggacag 60

ccgccctctc ctccaggccc gtggggctgg ccctgcaccg ccgagcttcc cgggatgagg 120

gcccccggtg tggtcacccg gcgcgcccca ggtcgctgag ggaccccggc caggcgcgga 180

gatgggggtg cacggtgagt actcgcgggc tgggcgctcc cgcccgcccg ggtccctgtt 240

tgagcgggga tttagcgccc cggctattgg ccaggaggtg gctgggttca aggaccggcg 300

acttgtcaag gaccccggaa gggggagggg ggtggggcag cctccacgtg ccagcgggga 360

cttgggggag tccttgggga tggcaaaaac ctgacctgtg aaggggacac agtttggggg 420

ttgaggggaa gaaggtttgg gggttctgct gtgccagtgg agaggaagct gataagctga 480

taacctgggc gctggagcca ccacttatct gccagagggg aagcctctgt cacaccagga 540

ttgaagtttg gccggagaag tggatgctgg tagctggggg tggggtgtgc acacggcagc 600

aggattgaat gaaggccagg gaggcagcac ctgagtgctt gcatggttgg ggacaggaag 660

gacgagctgg ggcagagacg tggggatgaa ggaagctgtc cttccacagc cacccttctc 720

cctccccgcc tgactctcag cctggctatc tgttctagaa tgtcctgcct ggctgtggct 780

tctcctgtcc ctgctgtcgc tccctctggg cctcccagtc ctgggcgccc caccacgcct 840

catctgtgac agccgagtcc tggagaggta cctcttggag gccaaggagg ccgagaatat 900

cacggtgaga ccccttcccc agcacattcc acagaactca cgctcagggc ttcagggaac 960

tcctcccaga tccaggaacc tggcacttgg tttggggtgg agttgggaag ctagacactg 1020

ccccccctaca taagaataag tctggtggcc ccaaaccata cctggaaact aggcaaggag 1080

caaagccagc agatcctacg gcctgtgggc cagggccaga gccttcaggg acccttgact 1140

ccccgggctg tgtgcatttc agacgggctg tgctgaacac tgcagcttga atgagaatat 1200

cactgtccca gacaccaaag ttaatttcta tgcctggaag aggatggagg tgagttcctt 1260

tttttttttt tttcctttct tttggagaat ctcatttgcg agcctgattt tggatgaaag 1320

ggagaatgat cgagggaaag gtaaaatgga gcagcagaga tgaggctgcc tgggcgcaga 1380

ggctcacgtc tataatccca ggctgagatg gccgagatgg gagaattgct tgagccctgg 1440

agtttcagac caacctaggc agcatagtga gatcccccat ctctacaaac atttaaaaaa 1500

attagtcagg tgaggtggtg catggtggta gtcccagata tttggaaggc tgaggcggga 1560

ggatcgcttg agcccaggaa tttgaggctg cagtgagctg tgatcacacc actgcactcc 1620

agcctcagtg acagagtgag gccctgtctc aaaaaagaaa agaaaaaaga aaaataatga 1680

gggctgtatg gaatacattc attattcatt cactcactca ctcactcact cattcattca 1740

ttcattcatt caacaagtct tattgcatac cttctgtttg ctcagcttgg tgcttggggc 1800

tgctgagggg caggagggag agggtgacat gggtcagctg actcccagag tccactccct 1860

gtaggtcggg cagcaggccg tagaagtctg gcagggcctg gccctgctgt cggaagctgt 1920

cctgcggggc caggccctgt tggtcaactc ttcccagccg tgggagcccc tgcagctgca 1980

tgtggataaa gccgtcagtg gccttcgcag cctcaccact ctgcttcggg ctctgggagc 2040

ccaggtgagt aggagcggac acttctgctt gccctttctg taagaagggg agaagggtct 2100

tgctaaggag tacaggaact gtccgtattc cttccctttc tgtggcactg cagcgacctc 2160

ctgttttctc cttggcagaa ggaagccatc tcccctccag atgcggcctc agctgctcca 2220

ctccgaacaa tcactgctga cactttccgc aaactcttcc gagtctactc caatttcctc 2280

cggggaaagc tgaagctgta cacaggggag gcctgcagga caggggacag atgaccaggt 2340

gtgtccacct gggcatatcc accacctccc tcaccaacat tgcttgtgcc acaccctccc 2400

ccgccactcc tgaaccccgt cgaggggctc tcagctcagc gccagcctgt cccatggaca 2460

ctccagtgcc agcaatgaca tctcaggggc cagaggaact gtccagagag caactctgag 2520

atctaaggat gtcacagggc caacttgagg gcccagagca ggaagcattc agagagcagc 2580

tttaaactca gggacagagc catgctggga agacgcctga gctcactcgg caccctgcaa 2640

aatttgatgc caggacacgc tttggaggcg atttacctgt tttcgcacct accatcaggg 2700

acaggatgac ctggataact taggtggcaa gctgtgactt ctccaggtct cacgggcatg 2760

ggcactccct tggtggcaag agcccccttg acaccggggt ggtgggaacc atgaagacag 2820

gatgggggct ggcctctggc tctcatgggg tccaagtttt gtgtattctt caacctcatt 2880

gacaagaact gaaaccacca a 2901

REIVINDICACIONES

1. Un oligonucleótido que se dirige a un transcrito antisentido natural de eritropoyetina (EPO) para uso como un compuesto terapéutico, donde el oligonucleótido modula la expresión del gen de eritropoyetina (EPO) y donde el transcrito antisentido natural tiene la secuencia de ácido nucleico tal como se expone en la SEQ ID NO: 2.

2. Un oligonucleótido que se dirige a un transcrito antisentido natural de eritropoyetina (EPO) para uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado a la eritropoyetina (EPO), donde dicho oligonucleótido modula la expresión del gen de la eritropoyetina (EPO) y donde el transcrito antisentido natural tiene la secuencia de ácido nucleico tal como se expone en la SEQ ID NO: 2.

3. Un uso de un oligonucleótido que se dirige a un transcrito antisentido natural de la eritropoyetina (EPO) para la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado a la eritropoyetina (EPO), donde el oligonucleótido modula la expresión del gen de la eritropoyetina (EPO) y donde el transcrito antisentido natural tiene la secuencia de ácido nucleico tal como se expone en la SEQ ID NO: 2.

4. Un uso de acuerdo con la reivindicación 3, o el oligonucleótido para un uso de acuerdo con la reivindicación 2, donde la enfermedad o trastorno es seleccionado de un grupo constituido por una enfermedad, trastorno, o estado de irregularidad hematológica, un trastorno de la sangre **caracterizado por** producción baja o defectuosa de eritrocitos, una anemia, anemia de células falciformes, beta-talasemia, eritropoyesis anormal, un trastorno del embarazo o menstrual, anemia temprana de premadurez, insuficiencia renal, fallo renal crónico, hipertensión, una enfermedad o trastorno asociado con cirugía, una enfermedad o trastorno en un paciente pediátrico sometido a diálisis, una enfermedad o condición asociada con niveles insuficientes de hematocrito, SIDA, un trastorno relacionado con tratamientos de quimioterapia, fibrosis quística, un cáncer o tumor, una enfermedad infecciosa, una enfermedad venérea, una enfermedad relacionada inmunológicamente con una enfermedad o trastorno autoinmune, una enfermedad cardiovascular, por ejemplo: apoplejía, hipotensión, parada cardiaca, isquemia en particular daño por isquemia-reperfusión, infarto al miocardio como infarto de miocardio agudo, fallo cardiaco crónico, angina, hipertrofia cardiaca, enfermedad cardiopulmonar, derivación (bypass) corazón-pulmón, enfermedad respiratoria, enfermedad renal, una enfermedad urinaria/reproductiva, una anormalidad endocrina/metabólica, una enfermedad gastrointestinal, una enfermedad del sistema nervioso central (SNC) o sistema nervioso periférico el cual tiene principalmente síntomas neurológicos o psiquiátricos, pérdida de la función cognitiva relacionada con la edad, parálisis cerebral, enfermedades neurodegenerativas, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Leigh, demencia, pérdida de memoria, esclerosis lateral amiotrófica, alcoholismo, trastorno emocional, trastornos de ansiedad, trastorno de déficit de atención, hiperactividad, autismo, esquizofrenia, depresión, traumatismo o isquemia del cerebro o médula espinal, enfermedad de Creutzfeld-Jakob, enfermedades oftálmicas, trastorno de ataques, esclerosis múltiple, inflamación, daño por radiación, degeneración macular, neuropatía diabética, retinopatía diabética, glaucoma, isquemia de la retina y traumatismo de la retina, daño de la médula espinal, pérdida de sangre aguda y estados de enfermedad neoplásicos.

5. Un procedimiento *in vitro* de modulación de la expresión de la eritropoyetina (EPO) en células o tejidos de un paciente que comprende: poner en contacto dichas células o tejidos con un oligonucleótido que se dirige a un transcrito antisentido natural de la eritropoyetina (EPO); modulando de este modo la expresión de la eritropoyetina (EPO), donde el transcrito antisentido natural tiene la secuencia de ácido nucleico tal como se expone en la SEQ ID NO: 2.

6. Un oligonucleótido que se dirige a un transcrito antisentido natural de eritropoyetina (EPO), donde el oligonucleótido modula la expresión de la eritropoyetina (EPO) y donde el transcrito antisentido natural tiene la secuencia de ácido nucleico tal como se expone en la SEQ ID NO: 2.

7. Un uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 ó 4, o el oligonucleótido para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, ó 4, o el procedimiento *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 5, o el oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 6, donde el oligonucleótido tiene entre 10 y 30 nucleótidos de longitud.

8. Un uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3, 4 ó 7, o el oligonucleótido para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4 ó 7, o el procedimiento *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 5 o la reivindicación 7, o el oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 6 o la reivindicación 7, donde el oligonucleótido tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con un complemento de un transcrito antisentido natural de la eritropoyetina (EPO).

9. Un uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3, 4, 7 u 8, o el oligonucleótido para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4, 7 u 8 o el procedimiento *in vitro* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5, 7 u 8, o el oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, donde el oligonucleótido es monocatenario.

10. Un uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3, 4, 7 u 8, o el oligonucleótido para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4, 7 u 8, o el procedimiento *in vitro* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5, 7 u 8, o el oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, donde el oligonucleótido es un compuesto de siRNA.

11. Un uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3, 4 ó 7 a 10, o el oligonucleótido para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4, ó 7 a 10 o el procedimiento *in vitro* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 ó 7 a 10, o el oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, donde el oligonucleótido comprende al menos una de las SEQ ID NO: 3 a 5.

12. Un uso de acuerdo con la reivindicación 10, o el oligonucleótido para uso de acuerdo con la reivindicación 10, o el procedimiento *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 10, o el oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 10, donde el compuesto de siRNA comprende al menos un oligonucleótido seleccionado de entre las SEQ ID NO: 3 a 5 y una secuencia complemento inversa de dicho oligonucleótido seleccionado de entre las SEQ ID NO: 6 al 8.

13. Un uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3, 4 ó 7 a 12, o el oligonucleótido para uso de acuerdo con las reivindicaciones 1, 2, 4, ó 7 a 12, o el procedimiento *in vitro* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 o 7 a 12, o el oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 12, donde el oligonucleótido incrementa la expresión de la eritropoyetina (EPO).

14. Un uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3, 4 ó 7 a 13, o el oligonucleótido para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4, ó 7 a 13 o el procedimiento *in vitro* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 ó 7 a 13, o el oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 13, donde la expresión de eritropoyetina (EPO) se incrementa al menos un 10%.

15. Un uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3, 4 ó 7 a 14, o el oligonucleótido para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4, ó 7 a 14 o el procedimiento *in vitro* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 ó 7 a 14, o el oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 14, donde el oligonucleótido comprende, además, una o más modificaciones que comprenden:

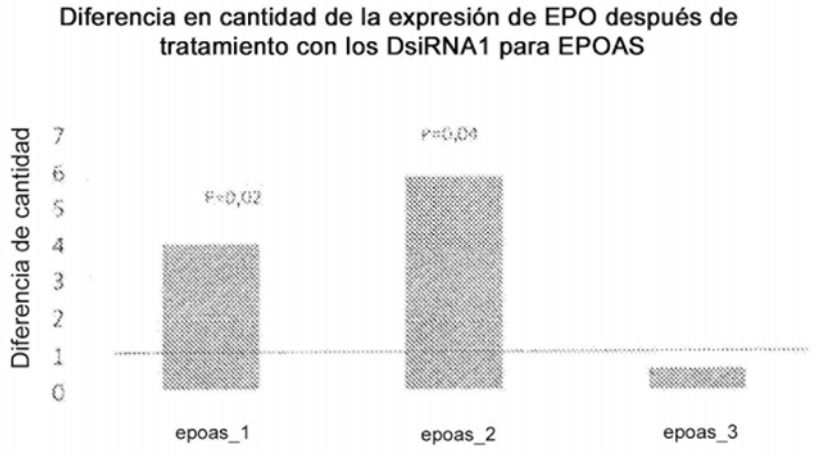
a. al menos un enlace internucleosídico modificado seleccionado de entre: un fosforotioato, 2'- O-metoxietilo (MOE), 2'-fluoro, alquilfosfonato, fosforoditioato, alquilfosfonotioato, fosforamidato, carbamato, carbonato, triéster de fosfato, acetamidata, éster carboximetílico, y combinaciones de los mismos;
b. al menos un nucleótido modificado seleccionado de entre: un ácido nucleico peptídico (PNA), un ácido nucleico bloqueado (LNA), un ácido arabino-nucleico, análogos, derivados, y combinaciones de los mismos; o
c. al menos un resto de azúcar modificado seleccionado de entre: un resto de azúcar modificado con 2'-O-metoxietilo, un resto de azúcar modificado con 2'-metoxi, un resto de azúcar modificado con 2'-O-alquilo, un resto de azúcar bicíclico, y combinaciones de los mismos.

16. Una composición farmacéutica que comprende al menos un oligonucleótido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 15, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

17. Un uso de un oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 15 en un procedimiento estético para tratar el envejecimiento.

FIGURA 1

A



B

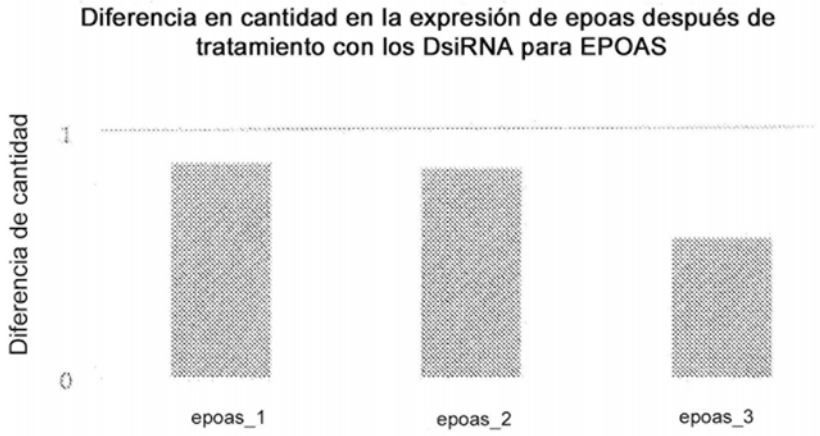


FIGURA 2

(SEQ ID NO:1)

Eritropoyetina de Homo sapiens en secuencia de ARNm

>gi|62240996|ref|NM_000799.2| Homo sapiens erythropoietin (EPO), mRNA

CCCGGAGCCCGACCGGGGCCACCCCCCCCGCTCTGCTCCGACACCCCGCCCCCTGGACAGCCGCCCTCTCCTCCAGG
CCCGTGCGGCTGGCCCTGCACCGCCGAGCTTCCCGGGATGACGGCCCCCGGTCTGGTCACCCGGCGCGCCCCAGGTC
GCTGAGGGACCCCGGCCAGGCCCGGAGATGGGGGTGCACGAATGTCCTGCCTGGCTGTGCCTTCTCCTGTCCCTGCT
GTCGCTCCCTCTGGGCCTCCCAGTCCTGGGCGCCCCACCACGCCTCATCTGTGACAGCCGAGTCCTGGAGAGGTACC
TCTTGGAGGCCAAGGAGGCCGAGAATATCACGACGGGCTGTGCTGAACACTGCAGCTTGAATGAGAATATCACTGTC
CCAGACACCAAAGTTAATTTCTATGCCTGGAAGAGGATGGAGGTCGGGCAGCAGGGCGTAGAAGTCTGGCAGGGCCT
GGCCCTGCTGTCGGAAGCTGTCCTGCTGGGGCCAGGCCCTGTTGGTCAACTCTTCCCAGCCGTGGGAGCCCCTGCAGC
TGCATGTGGATAAAGCCGTCAGTGCCCTTCGCAGCCTCACCACTCTGCTTCGGGCTCTGGCACCCCAGAAGGAAGCC
ATCTCCCCTCCACATGCGGCCTCAGCTGCTCCACTCCGAACAATCACTGCTGACACTTTCCGCAAACTCTTCCGAGT
CTACTCCAATTTCCTCCGGGGAAAGCTGAAGCTGTACACAGGGGAGGCCTGCAGGACAGGGGACAGATGACCAGGTG
TGTCCACCTGGGCATATCCACCACCTCCCTCACCAACATTGCTTGTGCCACACCCTCCCCCGCCACTCCTGAACCCC
GTCGAGGGGCTCTCAGCTCAGCGCCAGCCTGTCCCATGGACACTCCAGTGCCAGCAATGACATCTCAGGGGCCAGAG
GAACTGTCCAGAGACCAACTCTGAGATCTAAGGATGTCACAGGGCCAACTTGAGGGCCCAGAGCAGGAAGCATTCAG
AGAGCAGCTTTAAACTCAGGGACAGAGCCATGCTGGGAAGACGCCTGAGCTCACTCGGCACCCTGCAAAATTTGATG
CCAGGACACGCTTTTGGAGGCGATTTACCTCTTTTCGCACCTACCATCAGGGACAGGATGACCTCGAGAACTTAGGTG
GCAAGCTGTGACTTCTCCAGGTCTCACGGGCATGGGCACTCCCTTGGTGGCAAGAGCCCCCTTGACACCGGGCTGGT
GGGAACCATGAAGACAGGATGGGGGCTGGCCTCTGGCTCTCATGGGGTCCAAGTTTTGTGTATTCTTCAAGCTCATT
GACAAGAACTGAAACCACCAAAAAAAAAAAA

(SEQ ID NO:1a)

```
>hg18_knownGene_uc003uwi.1 range=chr7:100156359-100159259 5'pad=0 3'pad=0
strand=+ repeatMasking=none

CCCGGAGCCGGACCGGGGCCACCGCGCCCGCTCTGCTCCGACACCGCGCCCCCTGGACAGCCGCCCTCTCCTCCAGC
CCCGTGGGCCTGGCCCTGCACCGCCGAGCTTCCCGGGATGAGGGCCCCCGGTGTGGTCACCCGGCGCGCCCCAGGTC
CCTGAGGGACCCCGGCCACGCCGCGGAGATGGGGGTGCACGgtgagtactcgcgggctgggcgctcccgcccgcccgg
gtccctgtttgagcggggatttagcgcccggctattggccaggaggtggctgggttcaaggacccggcgacttgtca
aggacccccggaaggggggagggggtggggcagcctccacgtgccagcggggacttggggagtcctttggggatggca
aaaacctgacctgtgaaggggacacagtttggggttgagggggaagaaggtttggggttctgctgtgccagtggag
aggaagctgataagctgataacctgggcgctggagccaccacttatctgccagaggggaagcctctgtcacaccagg
attgaagtttggcccggagaagtggatgctggtagctggggtggggtgtgcacacggcagcaggattgaatgaaggc
cagggaggcagcacctgagtgcttgcatggttggggacaggaaggacgagctggggcagagacgtggggatgaagga
agctgtccttccacagccacccttctccctccccgcctgactctcagcctggctatctgttctagAATGTCCTGCCT
GGCTGTGGCTTCTCCTGTCCCTGCTGTCGCTCCCTCTGGGCCTCCCAGTCCTGGGCGCCCCACCACGCCTCATCTGT
GACACCCGAGTCCTGGAGAGGTACCTCTTGGACCCCAAGGAGGCCGAGAATATCACGgtgagacccctttccccagca
cattccacagaactcacgctcagggcttcagggaactcctcccagatccaggaacctggcacttggtttggggtgga
gttgggaagctagacactgccccctacataagaataagtctggtggcccccaaaccatacctggaaactaggcaagg
agcaaagccagcagatcctacggcctgtgggccagggccagagccttcagggacccttgactccccgggctgtgtgc
atttcagACGGGCTGTGCTGAACACTGCAGCTTGAATGAGAATATCACTGTCCCAGACACCAAAGTTAATTTCTATG
CCTGGAAGACGATGGACgtgagttcctttttttttttttccttctttttggagaatctcatttgcgagcctgatt
ttggatgaaagggagaatgatcgagggaaaggtaaaatggagcagcagagatgaggctgcctgggcgcagaggctca
cgtctataatcccaggctgagatggccgagatgggagaattgcttgagccctggagtttcagaccaacctaggcagc
atagtgagatccccatctctacaaacatttaaaaaaattagtcaggtgaggtggtgcatggtggtagtcccagata
tttggaaggctgaggcgggaggatcgcttgagcccaggaatttgaggctgcagtgagctgtgatcacaccactgcac
tccagcctcagtgacagagtgaggccctgtctcaaaaaagaaaagaaaaaagaaaaataatgagggctgtatggaat
acattcattattcattcactcactcactcactcattcattcattcattcattcaacaagtcttattgcatacc
ttctgtttgctcagcttggtgcttggggctgctgagggcaggagggagagggtgacatgggtcagctgactcccag
agtccactccctgtagGTCCGGGCAGCAGGCCGTAGAAGTCTGGCACGGCCTGGCCCTGCTGTCCGGAAGCTGTCCTGC
GGGCCCAGGCCCTGTTGGTCAACTCTTCCCACCCGTGGGACCCCCTGCAGCTGCATGTGGATAAAGCCGTCAGTGGC
CTTCGCAGCCTCACCACTCTGCTTCGGGCTCTGGGAGCCCAGgtgagtaggagcggacacttctgcttgccctttct
gtaagaaggggagaagggtcttgctaaggagtacaggaactgtccgtattccttcccttctgtggcactgcagcga
cctcctgttttctccttggcagAAGGAAGCCATCTCCCCTCCAGATCCCGCCTCAGCTGCTCCACTCCCAACAATCA
CTGCTGACACTTTCCGCAAACTCTTCCGAGTCTACTCCAATTTCCTCCGGGGAAAGCTGAAGCTGTACACAGGGGAG
GCCTGCAGGACAGGGGACAGATGACCAGGTGTGTCCACCTGGGCATATCCACCACCTCCCTCACCAACATTGCTTGT
GCCACACCCTCCCCCGCCACTCCTGAACCCCGTCGAGGGGCTCTCAGCTCAGCGCCAGCCTGTCCCATGGACACTCC
AGTGCCAGCAATGACATCTCAGGGCCCAGAGGAACTGTCCAGAGAGCAACTCTGAGATCTAAGGATGTCACAGGGCC
AACTTGAGGGCCCAGAGCAGGAAGCATTCAGAGACCAGCTTTAAACTCAGGGACAGAGCCATGCTGGGAAGACGCCT
GAGCTCACTCGGCACCCTGCAAAATTTGATGCCAGGACACGCTTTGGAGGCGATTTACCTGTTTTCGCACCTACCAT
CAGGGACAGGATGACCTGGATAACTTAGGTGGCAAGCTGTGACTTCTCCAGGTCTCACGGGCATGGGCACTCCCTTG
GTGGCAAGACCCCCCTTGACACCGGGGTGGTGGGAACCATGAAGACAGGATGGGGGCTGGCCTCTGGCTCTCATGGG
GTCCAAGTTTTGTGTATTCTTCAACCTCATTGACAAGAACTGAAACCACCAA
```

FIGURA 3

Secuencia antisentido natural (EPOAS): SEQ ID NO: 2

```
>gi|7850511|gb|AK798641.1|AK798641 RC2-UM0050-090300-014-d05 UM0050 Homo
sapiens cDNA, mRNA sequence
AGCATCTCAGACTCGGATTATAGACGTGAGCCTCTGCGCCCCAGGCAGCCTCATCTCTGCTGCTCCGTGTTACCTTTC
CCTCGATCATTCTCCCTTTCATCCAAAATCAGGCTCGCAAATGAGATTCTCCAAAAGAAAGGAAAAAAAAAAAAAAG
GG
```

FIGURA 4

ID de secuencia	Secuencia
SEQ ID NO:3	rGrGrArGrArArUrCrUrCrArUrUrUrGrCrGrArGrCrCrUrGrArUrUrU
SEQ ID NO:4	rCrUrCrArCrGrUrCrUrArUrArArUrCrCrCrArGrUrCrUrGrArGrArU
SEQ ID NO:5	rCrGrArGrGrGrArArArGrGrUrArArCrArCrGrGrArGrCrArGrCrArG

FIGURA 5

ID de secuencia	Secuencia
SEQ ID NO:6	rArUrCrArGrGrCrUrCrGrCrArArArUrGrArGrArUrUrCrUCC
SEQ ID NO:7	rCrUrCrArGrArCrUrGrGrGrArUrUrArUrArGrArCrGrUrGAG
SEQ ID NO:8	rGrCrUrGrCrUrCrCrGrUrGrUrUrArCrCrUrUrUrCrCrCrUCG

FIGURA 6

ID de secuencia	Secuencia
SEQ ID NO:9	ACCACCCCCGGTGTCAAG
SEQ ID NO:10	TTTACCTGTTTTCGCACCTACCAT
SEQ ID NO:11	CAAGCTGTGACTTCTC