

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 640 755**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/113** (2010.01)

**A61K 48/00** (2006.01)

**A61K 31/7088** (2006.01)

**C12N 15/63** (2006.01)

**C12N 9/24** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.10.2011 PCT/US2011/054858**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.04.2012 WO12047956**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.10.2011 E 11831494 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.07.2017 EP 2625274**

54 Título: **Tratamiento de enfermedades relacionadas con la Sialidasa 4 (neu4) mediante inhibición del transcrito antisentido natural al gen neu4**

30 Prioridad:

**06.10.2010 US 390216 P**

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

**06.11.2017**

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 2 640 755 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).

**DESCRIPCION**

Tratamiento de enfermedades relacionadas con la Sialidasa 4 (neu4) mediante inhibición del transcrito antisentido natural al gen neu4

5

**CAMPO DE LA DESCRIPCIÓN**

La presente solicitud reivindica la prioridad de la solicitud de patente provisional de EE.UU. N.º 61/390216 depositada el 6 de octubre de 2010.

10

Aspectos de la divulgación comprenden oligonucleótidos que modulan la expresión y/o la función del gen NEU4 y moléculas asociadas.

**ANTECEDENTES**

15

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.

25

El documento WO 2005/116250 describe miARN virales y asociados a virus y sus usos.

El documento WO 2004/048511 describe un gen viral detectable bioinformáticamente.

30

Yamanami et al. 2007, Cancer Science, vol. 98(3):299-307 describe que la regulación negativa del gen de la Sialidasa (NEU4) puede contribuir a las propiedades invasivas de los cánceres de colon humano.

**RESUMEN DE LA INVENCION**

35

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

**RESUMEN DE LA DIVULGACIÓN**

40

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

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

50

Un aspecto proporciona un procedimiento de modulación de la función y/o la expresión de un polinucleótido del gen NEU4 en sistemas biológicos, incluyendo entre otros, células o tejidos del paciente *in vivo* o *in vitro* que comprenden poner en contacto dicho sistema biológicos o dichas células o tejidos con un oligonucleótido antisentido de aproximadamente 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 2119 de la SEQ ID NO: 2 o 1 a 1245 de SEQ ID NO: 3 o 1 a 490 de SEQ ID NO: 4 o 1 a 527 de SEQ ID NO: 5 o 1 a 946 de SEQ ID NO: 6 o 1 a 703 de SEQ ID NO: 7 modulando de este modo la función y/o la expresión del polinucleótido del gen NEU4 en células o tejidos del paciente *in vivo* o *in vitro*.

55

En otro aspecto, un oligonucleótido se dirige a una secuencia antisentido natural de polinucleótidos del gen NEU4 presentes en un sistema biológico, por ejemplo, los nucleótidos expuestos en SEQ ID NOS: 2 a 7, y cualquier variante, alelo, homólogo, mutante, derivado, fragmento y secuencia complementaria a los mismos. Ejemplos de oligonucleótidos antisentido se exponen como las SEQ ID NOS: 8 al 11.

5

Otro aspecto proporciona un procedimiento de modulación de la función y/o la expresión de un polinucleótido del gen NEU4 en células o tejidos del paciente *in vivo* o *in vitro*, que comprende poner en contacto dichas células o tejidos con un oligonucleótido antisentido de 5 a 30 nucleótidos de longitud, donde dicho oligonucleótido tiene al menos un 50 % de identidad de secuencia con un complemento inverso del antisentido del polinucleótido del gen

10

NEU4; modulando de este modo la función y/o la expresión del polinucleótido del gen NEU4 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 gen NEU4 en células o tejidos del paciente *in vivo* o *in vitro*, que comprende poner en contacto dichas células o

15

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 con respecto a un polinucleótido antisentido del gen NEU4; modulando de este modo la función y/o la expresión del polinucleótido del gen NEU4 en células o tejidos del paciente *in vivo* o *in vitro*.

20

En otro aspecto, la divulgación comprende un procedimiento para la modulación de la función o expresión de un polinucleótido del gen NEU4 en un sistema biológico que comprende ponerse en contacto dicho sistema biológico con al menos un oligonucleótido antisentido dirigido a una transcrito antisentido natural del polinucleótido del gen NEU4 modulando así la función y/o expresión del polinucleótido del gen NEU4 en dicho sistema biológico.

25

En otro aspecto, la divulgación comprende un procedimiento para la modulación de la función o expresión de un polinucleótido del gen NEU4 en un sistema biológico que comprende poner en contacto dicho sistema biológico con al menos un oligonucleótido antisentido dirigido a una región de un transcrito antisentido natural del polinucleótido del gen NEU4 modulando de este modo la función y/o expresión del polinucleótido del gen NEU4 en dicho sistema biológico.

30

En un aspecto, la divulgación comprende un procedimiento para aumentar la función y/o expresión de un polinucleótido del gen NEU4 que tiene la SEQ ID NO. 1 en un sistema biológico que comprende poner en contacto dicho sistema biológico con al menos un oligonucleótido antisentido dirigido a un transcrito antisentido natural de dicho polinucleótido del gen NEU4 aumentando así la función y/o expresión de dicho polinucleótido del gen NEU4 o el producto de expresión del mismo.

35

En otro aspecto, la divulgación comprende un procedimiento para aumentar la función y/o expresión de un polinucleótido del gen NEU4 que tiene la SEQ ID NO. 1 en un sistema biológico que comprende poner en contacto dicho sistema biológico con al menos un oligonucleótido antisentido dirigido a una transcrito antisentido natural de dicho polinucleótido del gen NEU4 aumentando así la función y/o expresión de dicho polinucleótido del gen NEU4 o la expresión producto del mismo, donde los transcritos antisentido naturales se seleccionan a partir de las SEQ ID N.º. 2 al 7.

40

En otro aspecto, la divulgación comprende un procedimiento para aumentar la función y/o expresión de un polinucleótido del gen NEU4 que tiene la SEQ ID NO. 1 en un sistema biológico que comprende poner en contacto dicho sistema biológico con al menos un oligonucleótido antisentido dirigido a una transcrito antisentido natural de dicho polinucleótido del gen NEU4 aumentando así la función y/o expresión de dicho polinucleótido del gen NEU4 o la expresión producto del mismo, donde los transcritos antisentido naturales se seleccionan a partir de las SEQ ID N.º. 2 a 7 y donde los oligonucleótidos antisentido se seleccionan a partir de al menos una de las SEQ ID N.º. 8 al

50

11.

En un aspecto, una composición comprende uno o más oligonucleótidos antisentido que se unen a polinucleótidos del gen NEU4 sentido y/o antisentido.

55

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

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

En otro aspecto más, los nucleótidos modificados comprenden bases modificadas que comprenden fosforotioato, metilfosfonato, ácidos nucleicos peptídicos, 2'-O-metilo, fluoro- o carbono, metileno u otras moléculas de ácido

60

nucleico bloqueado (LNA). Preferentemente, los nucleótidos modificados son moléculas de ácido nucleico bloqueado, que incluyen  $\alpha$ -L-LNA.

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

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

Otros aspectos se describen más adelante.

### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 es un gráfico de resultados de PCR en tiempo real que muestra el cambio en veces en ARNm de NEU4 + desviación estándar después del tratamiento de células HepG2 con oligonucleótidos de fosforotioato introducidos usando Lipofectamine 2000, en comparación con el control. Los resultados de PCR en tiempo real muestran que los niveles de ARNm de NEU4 en células HepG2 se incrementan significativamente 48 h después del tratamiento con uno de los oligonucleótidos antisentido diseñados para Hs.678184 antisentido de NEU4. Las barras indicadas como CUR-1789 a CUR-1792 corresponden a muestras tratadas con las SEQ ID NO: 8 a 11 respectivamente.

Descripción del listado de secuencias: SEQ ID NO: 1: Gen de Sialidasa 4 de *Homo sapiens* (NEU4), variante 3 del ARNm transcrito, (entrada número de NCBI: NM\_001167600); SEQ ID NO: 2: Secuencia antisentido natural de NEU4 (HS.678184); SEQ ID NO: 3: Secuencia antisentido natural de NEU4 (BC038567); SEQ ID NO: 4: Secuencia antisentido natural de NEU4 (CR747539); SEQ ID NO: 5: Secuencia antisentido natural de NEU4 (BF527387); SEQ ID NO: 6: Secuencia antisentido natural de NEU4 (BF528789); SEQ ID NO: 7: Secuencia antisentido natural de NEU4 (BG913694) y SEQ ID NO: 8 al 11; Oligonucleótidos antisentido \* indica enlace fosforotioato.

### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA DIVULGACIÓN

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

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 aspectos 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 un aspecto, los genes o secuencias de ácidos nucleicos son humanos.

### 55 **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.»

5 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.

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

20 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. 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 (ARNi), micro ARN, moléculas de ARN señuelo, ARNip, 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.

30 En el contexto de esta divulgación, el término "oligonucleótido" se refiere a un oligómero o polímero de ácido ribonucleico (ARN) o ácido desoxirribonucleico (ADN) o miméticos de los mismos. El término "oligonucleótido" también incluye oligómeros lineales o circulares de monómeros o enlaces naturales y/o modificados, que incluyen desoxirribonucleósidos, ribonucleósidos, formas sustituidas y alfa-anómeras de los mismos, ácidos nucleicos peptídicos (PNA), ácidos nucleicos bloqueados (LNA), fosforotioato, metilfosfonato y similares. Los oligonucleótidos son capaces de unirse específicamente a un polinucleótido diana 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.

40 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.

55 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.

60 Tal como se usa en el presente documento, "NEU4 y "Sialidasa 4" son incluyentes de todos los miembros de la

familia, mutantes, alelos, fragmentos, especies, secuencias codificantes y no codificantes, cadenas de polinucleótido sentido y antisentido, etc.

Tal como se usan en el presente documento, los términos LP5125, MGC102757, MGC18222, N-acetil-alfa-neuraminidasa 4 y Sialidasa-4, son considerados lo mismo en la bibliografía y se usan indistintamente 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 ARNm) transcrito a partir de dicho ADN, y también ADNc derivado de dicho ARN, secuencias codificantes, no codificantes, polinucleótidos sentido o antisentido. La hibridación específica de un compuesto oligomérico con su ácido nucleico diana interfiere en la función normal del ácido nucleico. Esta modulación de la función de un ácido nucleico diana por compuestos, que se hibridan específicamente con él, se denomina generalmente "antisentido". Las funciones de ADN con las que interferirán incluyen, por ejemplo, la replicación y transcripción. Las funciones de ARN con las que interferirán incluyen todas las funciones vitales tales como, por ejemplo, translocación del ARN al sitio de traducción de proteína, traducción de proteína del ARN, splicing del ARN para dar una o más especies de ARNm, y actividad catalítica que puede acoplarse en o facilitarse por el ARN. El efecto global de dicha interferencia con las funciones del ácido nucleico diana es la modulación de la expresión de un producto codificado u oligonucleótidos.

El ARN de interferencia "ARNi" está mediada por moléculas de ARN bicatenario (ARNdc) que tienen homología específica de secuencia con sus secuencias de ácido nucleico «diana». En ciertos aspectos de la presente divulgación, los mediadores son dúplex de ARN "de interferencia pequeño" (ARNip) de 5-25 nucleótidos. Los ARNip se derivan a partir del procesamiento del ARNdc mediante una enzima conocida como Dicer. Los productos dúplex son reclutados en un ARNip multiproteína denominado RISC (complejo de silenciamiento 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 ARNip interactúa de una forma específica de secuencia para mediar en la escisión en un modo catalítico. Los ARN de interferencia 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 de interferencia 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 ARNip 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 compete, por lo tanto, con la diana de unión natural para la unión de un ligando específico. Por ejemplo, se ha mostrado que la sobreexpresión de ARN de respuesta de activación en trans (TAR) de HIV puede actuar como un "señuelo" y se une de forma eficiente a la proteína tat de HIV, impidiendo de este modo que se una a secuencias TAR codificadas por el ARN de HIV. 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.

10 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, 15 fosforoselenoato, fosforamidoato 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 20 moléculas que contienen heterociclos de purina y pirimidina conocidas, sino también análogos heterocíclicos y tautómeros de las mismas. Ejemplos ilustrativos de otros tipos de nucleótidos son moléculas que contienen adenina, guanina, timina, citosina, uracilo, purina, xantina, diaminopurina, 8-oxo- N6-metiladenina, 7-deazaxantina, 7-deazaguanina, N4,N4-etanocitosina, N6,N6-etano-2,6- diaminopurina, 5-metilcitosina, 5-alquil(C3-C6)-citosina, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, seudoisocitosina, 2-hidroxi-5-metil-4-triazolopiridina, isocitosina, isoguanina, inosina y 25 los nucleótidos "no de origen natural" descritos en Benner y col., patente de EE.UU. N.º 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 30 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, Nueva York, 1980; Freier & Altmann, (1997) Nucl. Acid. Res., 25(22), 4429- 4443; Toulmé, J.J., (2001) Nature 35 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-linked [3.2.0] bicycloarabinonucleosides. Dichos análogos incluyen nucleótidos sintéticos diseñados para potenciar propiedades de unión, por ejemplo, la estabilidad 40 especificidad del dúplex o el triplex, 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, Hoogsteen o de Hoogsteen inverso, entre bases de nucleósidos o de nucleótidos (nucleótidos) complementarias de las cadenas de compuestos oligoméricos. Por 45 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 50 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.

55 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 60 composición de los compuestos oligoméricos y los ensayos en los que están siendo investigados. En general, las

condiciones de hibridación astringentes comprenden bajas concentraciones (<0,15 M) de sales con cationes inorgánicos tales como Na<sup>+</sup> o K<sup>+</sup> (es decir, baja fuerza iónica), temperatura superior a 20 °C - 25 °C por debajo de la T<sub>m</sub> del complejo de compuesto oligomérico: secuencia diana, y la presencia de desnaturizantes 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 °C 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. El porcentaje de homología, identidad de secuencias o complementariedad pueden determinarse por, por ejemplo, el programa Gap (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison Wis.), usando parámetros por defecto, que usa el algoritmo de Smith y Waterman (Adv. Appl. Math., (1981) 2, 482-489).

Tal como se usa en el presente documento, la expresión “punto de fusión térmico (T<sub>m</sub>)” 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<sup>+</sup> (u otras sales) de al menos aproximadamente 0,01 a 1,0 M a pH de 7,0 a 8,3 y la temperatura es al menos aproximadamente 30°C para oligonucleótidos cortos (por ejemplo, de 10 a 50 nucleótidos). También pueden lograrse condiciones 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. El polipéptido correspondiente puede poseer dominios funcionales adicionales o una ausencia de dominios. Las variantes de

especie son secuencias de polinucleótidos que varían de una especie a otra. Son de particular utilidad en la divulgación variantes de productos génicos de tipo silvestre (wild type). Las variantes pueden resultar de al menos 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 delecciones, adiciones o sustituciones naturales de nucleótidos. Cada uno de estos tipos de cambios puede producirse solo, o en combinación con los otros, una o más veces en una secuencia dada.

Los polipéptidos resultantes generalmente tendrán identidad significativa de aminoácidos los unos con respecto a los otros. Una variante polimórfica es una variación en la secuencia de polinucleótidos de un gen particular entre individuos de una especie dada. Las variantes polimórficas también pueden 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.).

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

trombocitosis primaria, macroglobulinemia primaria, tumores de pulmón de células pequeñas, tumores primarios del cerebro, cáncer de estómago, cáncer de colon, tumores pancreáticos, insuloma carcinóide maligno, vejiga urinaria, cáncer gástrico, lesiones cutáneas premalignas, cáncer testicular, linfomas, cáncer de tiroides, neuroblastoma, cáncer de esófago, cáncer del tracto genitourinario, hipercalcemia maligna, cáncer de cuello uterino, 5 cáncer endometrial, cáncer suprarrenal cortical, y cáncer de próstata.

Tal como se usa en el presente documento "enfermedad o trastorno neurológico" se refiere a cualquier enfermedad o trastorno del sistema nervioso y/o del sistema visual. «Enfermedad o trastorno neurológico» incluyen enfermedades o trastornos que involucra al sistema nervioso central (cerebro, tronco encefálico y cerebelo), al 10 sistema nervioso periférico (incluyendo nervios craneales), y al sistema nervioso autónomo (partes del cual están ubicadas en el sistema nervioso central y periférico). Una enfermedad o trastorno neurológico incluye, pero sin limitarse a, afasia epileptiforme adquirida; encefalomiелitis aguda diseminada; adrenoleucodistrofia; degeneración macular relacionada con la edad; agenesia del cuerpo calloso; agnosia; síndrome de Aicardi; enfermedad de Alexander; enfermedad de Alpers; hemiplejia alternante; enfermedad de Alzheimer; demencia vascular; esclerosis 15 lateral amiotrófica; anencefalia; síndrome de Angelman; angiomatosis; anoxemia; afasia; apraxia; quistes aracnoides; aracnoiditis; malformación de Anronl-Chiari; malformación arteriovenosa; síndrome de Asperger; ataxia-telangiectasia; trastorno por déficit de atención con hiperactividad; autismo; disfunción autónoma; dolor de espalda; enfermedad de Batten; enfermedad de Behcet; parálisis de Bell; blefaroespasma esencial benigno; focal benigna; amiotrofia; hipertensión intracraneal benigna; enfermedad de Binswanger; blefaroespasma; síndrome de Bloch 20 Sulzberger; lesión del plexo braquial; absceso cerebral; daño cerebral; tumores cerebrales (incluyendo glioblastoma multiforme); tumor espinal; síndrome de Brown-Sequard; enfermedad de Canavan; síndrome del túnel carpiano; causalgia; síndrome de dolor central; mielínolisis pontina central; trastorno cefálico; aneurisma cerebral; arteriosclerosis cerebral; atrofia cerebral; gigantismo cerebral; parálisis cerebral; enfermedad de Charcot-Marie-Tooth; neuropatía inducida por quimioterapia y dolor neuropático; malformación de Chiari; corea; polineuropatía 25 desmielinizante inflamatoria crónica; dolor crónico; síndrome de dolor regional crónico; síndrome de Coffin Lowry ; coma, incluyendo estado vegetativo persistente; diplejía facial congénita; degeneración corticobasal; arteritis craneal; craneosinostosis; enfermedad de Creutzfeldt-Jakob; trastornos traumáticos acumulativos; síndrome de Cushing; enfermedad del cuerpo de inclusión citomegálica; infección por citomegalovirus; síndrome de los ojos y pies danzantes; síndrome de Dandy Walker; enfermedad de Dawson; síndrome de Morsier; parálisis de Dejerine-Klumke; 30 demencia; dermatomiositis; neuropatía diabética; esclerosis difusa; disautonomía; disgrafía dislexia; distonias; encefalopatía epiléptica infantil temprana; síndrome de la silla vacía; encefalitis; encefalocelos; angiomatosis encefalotrigeminal; epilepsia; parálisis de Erb; temblor esencial; enfermedad de Fabry; síndrome de Fahr; desmayo; parálisis espástica familiar; convulsiones febriles; síndrome de Fisher; ataxia de Friedreich; demencia fronto-temporal y otras "tauopatías"; enfermedad de Gaucher; síndrome de Gerstmann; arteritis de células gigantes; enfermedad de 35 inclusión celular gigante; leucodistrofia de células globoides; síndrome de Guillain-Barré; mielopatía asociada al HTLV-1; enfermedad de Hallervorden-Spatz; lesión craneal; dolor de cabeza; espasmo hemifacial; paraplejía espástica hereditaria; heredopatía atáctica polineurítica; herpes Zoster ótico; infección por herpes; síndrome de Hirayama; demencia y neuropatía asociada al VIH (también manifestaciones neurológicas del sida); holoprosencefalia; enfermedad de Huntington y otras enfermedades de repetición de poliglutamina; hidranencefalia; 40 hidrocefalia; hipercortisolismo; hipoxia; encefalomiелitis mediada por inmunidad; miositis del cuerpo de inclusión; incontinenia pigmenti; enfermedad de almacenamiento de ácido fitánico infantil; enfermedad de Refsum infantil; espasmos infantiles; miopatía inflamatoria; quiste intracraneal; hipertensión intracraneal; síndrome de Joubert; síndrome de Keams-Sayre; enfermedad de Kennedy síndrome de Kinsboume; síndrome de Klippel Feil; enfermedad de Krabbe; enfermedad de Kugelberg-Welander; kuru; enfermedad de Lafora; síndrome miasténico de Lambert- 45 Eaton; síndrome de Landau-Kleffner; síndrome medular lateral (Wallenberg); dificultades de aprendizaje; enfermedad de Leigh; síndrome de Lennox-Gustaut; síndrome de Lesch-Nyhan; leucodistrofia; demencia del cuerpo de Lewy; lisencefalia; síndrome de enclaustramiento; enfermedad de Lou Gehrig (es decir, enfermedad de las neuronas motoras o esclerosis lateral amiotrófica); enfermedad del disco lumbar; enfermedad de Lyme - secuelas neurológicas; enfermedad de Machado-Joseph; macronefalia; megalencefalia; síndrome de Melkersson-Rosenthal; I 50 enfermedad de Meniere; meningitis; enfermedad de Menkes; leucodistrofia metacromática; microcefalia; migraña; síndrome de Miller Fisher; mini-trazos; miopatías mitocondriales; síndrome de Mobius; amiotrofia monomérica; enfermedad de la neuronas motoras; enfermedad de Moyamoya; mucopolisacaridosis; demencia de infarto multi; neuropatía motora multifocal; esclerosis múltiple y otros trastornos desmielinizantes; atrofia de múltiples sistemas con hipotensión postural; distrofia muscular; miastenia gravis; esclerosis difusa mielínoclastica; encefalopatía 55 mioclónica de lactantes; mioclono; miopatía; miotonía congénita; narcolepsia; neurofibromatosis; síndrome neuroléptico maligno; manifestaciones neurológicas del sida; secuelas neurológicas del lupus; neuromiotonía; lipofuscinosis ceróide neuronal; trastornos de migración neuronal; enfermedad de Niemann-Pick; síndrome de O'sullivan-Mcleod; neuralgia occipital; secuencia de disrafismo espinal oculto; síndrome de Ohtahara; atrofia olivopontocerebelosa; opsoclonos mioclono; neuritis óptica; hipotensión ortostática; síndrome de sobreuso; 60 parestesias; enfermedad o trastorno neurodegenerativo (enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington,

enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), demencia, esclerosis múltiple y otras enfermedades y trastornos asociados con la muerte celular neuronal); paramiotonía congénita; enfermedades paraneoplásicas; ataques paroxísticos; síndrome de Parry Romberg; enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher; parálisis periódicas; neuropatía periférica; neuropatía dolorosa y dolor neuropático; estado vegetativo persistente; trastornos profundos del desarrollo; reflejo estornado fótico; enfermedad de almacenamiento de ácido fitánico; enfermedad de Pick; nervio pinzado; tumores pituitarios; polimiositis; porencefalia; síndrome post-polio; neuralgia postherpética; encefalomiелitis postinfecciosa; hipotensión postural; síndrome de Prader-Willi; esclerosis lateral primaria; enfermedades priónicas; atrofia hemifacial progresiva; multifocaleukoencefalopatía progresiva; poliodistrofia esclerosante progresiva; parálisis supranuclear progresiva; pseudotumor cerebral; síndrome de Ramsay-Hunt (tipos I y II); encefalitis de Rasmussen; 10 síndrome de distrofia simpática refleja; enfermedad de Refsum; trastornos del movimiento repetitivo; lesiones por estrés repetitivo; síndrome de piernas inquietas; mielopatía asociada a retrovirus; síndrome de Rett; síndrome de Reye; baile de San Vito; enfermedad de Sandhoff; enfermedad de Schilder; esquizencefalia; displasia septo-óptica; síndrome del bebé sacudido; herpes; síndrome de Shy-Drager; síndrome de Sjogren; apnea del sueño; síndrome de Soto; espasticidad; espina bífida; lesión de la médula espinal; tumores de la médula espinal; atrofia muscular en la 15 columna; síndrome de Stiff-Person; ictus; síndrome de Sturge-Weber; panencefalitis esclerosante subaguda; encefalopatía arteriosclerótica subcortical; corea de Sydenham; síncope; siringomielia; discinesia tardía; enfermedad de Tay-Sachs; arteritis temporal; síndrome de la médula espinal atada; enfermedad de Thomsen; síndrome de la salida torácica; tic doloroso; parálisis de Todd; síndrome de Tourette; ataque isquémico transitorio; encefalopatías espongiiformes transmisibles; mielitis transversa; lesión cerebral traumática; temblor; neuralgia trigeminal; 20 paraparesia espástica tropical; esclerosis tuberosa; demencia vascular (demencia de múltiples infartos); vasculitis incluyendo arteritis temporal; enfermedad de Von Hippel-Lindau; síndrome de Wallenberg; enfermedad de Werdnig-Hoffman; síndrome de West; latigazo; síndrome de Williams; enfermedad de Wildon; y I síndrome de Zellweger.

Una "enfermedad o trastorno proliferativo" incluye, pero sin limitarse a, trastornos neoplásicos hematopoyéticos que involucran células hiperplásicas/neoplásicas de derivados de origen hematopoyético de líneas mieloides, linfoides o 25 eritroides, o células precursoras de las mismas. Estas incluyen, pero no se limitan a leucemia eritroblástica, leucemia promielocítica aguda (LPMA), leucemia mielógena crónica (LMC), malignidades linfoides, incluyendo, pero sin limitarse a, leucemia linfoblástica aguda (LLA), la cual incluye TODAS las líneas B y TODAS las líneas T, leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia prolinfocítica (LPL), leucemia de células pilosas (LCP) y la macroglobulinemia de Waldenstrom (MW). Formas adicionales de linfomas malignos incluyen, pero no se limitan a, linfoma no Hodgkin y 30 variantes, linfomas de células T periféricas, leucemia/linfoma de células T adultas (LTA), linfoma cutáneo de células T (LCCT), leucemia linfocítica granular de células grandes (LFG), enfermedad de Hodgkin y enfermedad de Reed-Sternberg.

35 Una "inflamación" se refiere a las condiciones inflamatorias sistémicas y condiciones asociadas con la migración a nivel local y la atracción de monocitos, leucocitos y/o neutrófilos. Ejemplos de la inflamación incluyen, pero no se limitan a, inflamación resultante de la infección con microorganismos patógenos (incluyendo bacterias gram-positivas y gram-negativas, virus, hongos y parásitos como protozoos y helmintos), rechazo al trasplante (incluido el rechazo a 40 órganos sólidos como riñón, hígado, corazón, pulmón o córnea, así como rechazo a los trasplantes de médula ósea incluyendo enfermedad injerto-contrahuésped (EICH), o por reacciones alérgicas autoinmunitarias localizadas agudas o crónicas. Las enfermedades autoinmunitarias incluyen glomerulonefritis aguda; artritis o artritis reactiva; glomerulonefritis crónica; enfermedad inflamatoria intestinal, como enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa y enterocolitis necrotizante; hepatitis; sepsis; enfermedad hepática alcohólica, esteatosis hepática no alcohólica; transfusiones de granulocitos síndromes asociados; dermatosis inflamatorias como la dermatitis de contacto, 45 dermatitis atópica, psoriasis, lupus eritematoso sistémico (LES), tiroiditis autoinmune, esclerosis múltiple, y algunas formas de diabetes autoinmune, o cualquier otro estado donde el ataque del propio sistema inmunológico del sujeto se traduce en la destrucción del tejido patológico. Las reacciones alérgicas incluyen asma alérgico, bronquitis crónica y aguda de hipersensibilidad retardada. Estados de enfermedad inflamatoria sistémica incluyen inflamación asociada con trauma, quemaduras, reperfusión tras eventos isquémicos (por ejemplo, eventos trombóticos en el 50 corazón, el cerebro, el intestino o los vasos periféricos, incluyendo infarto de miocardio e ictus), sepsis, síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA) o síndrome de disfunción orgánica múltiple. El reclutamiento de células inflamatorias también se produce en placas ateroscleróticas. Inflamación incluye, pero sin limitarse a, linfoma no Hodgkin, enfermedad de Wegener, tiroiditis de Hashimoto, carcinoma hepatocelular, atrofia del timo, pancreatitis crónica, artritis reumatoide, osteoartritis, hiperplasia linfoide reactiva, carcinoma papilar, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, colecistitis aguda, colecistitis crónica, cirrosis, sialoadenitis crónica, peritonitis, pancreatitis 55 aguda, pancreatitis crónica, gastritis crónica, adenomiosis, endometriosis, cervicitis aguda, cervicitis crónica la hiperplasia linfoide, esclerosis múltiple, hipertrofia secundaria a la púrpura trombocitopénica idiopática, nefropatía por IgA primaria, lupus eritematoso sistémico, soriasis, enfisema pulmonar, pielonefritis crónica y cistitis crónica.

60 **Polinucleótidos y composiciones de oligonucleótidos y moléculas**

*Dianas:* en un aspecto, la dianas incluyen secuencias de ácido nucleico de la Sialidasa 4 (NEU4), incluyendo sin limitarse a, secuencias sentido y/o antisentido no codificantes y/o secuencias codificantes asociadas con NEU4.

5 La Sialidasa es una enzima glucosidolítica presente en los organismos vivos, que elimina un residuo de ácido siálico desde un terminal no reductor de cadenas sacáridas de glicoproteínas o glicolípidos. Se ha sabido que, cuando se elimina el ácido siálico de moléculas de cadenas sacáridas, no solo comienza la degradación de estas moléculas, sino también la conformación molecular y se pueden modificar muchas funciones celulares importantes como el mecanismo de reconocimiento por parte de los receptores, la adhesión celular, y mecanismos  
10 inmunosupresores. También se ha aclarado que la Sialidasa muestra un cambio de actividad rápido en relación con la proliferación y cancerización de células, y está involucrado en la capacidad metastásica de las células cancerosas. Sin embargo, hay poco conocimiento acerca de cómo se elimina el ácido siálico *in vivo*. Esto es porque los estudios de las sialidasas en mamíferos a nivel molecular avanzan lentamente, y por ende hay muchos aspectos desconocidos sobre sus estructuras y mecanismos de expresión.

15 Como la Sialidasa de mamíferos solo muestra actividad baja, y es extremadamente inestable, el aislamiento y purificación de la enzima ha resultado difícil. La Sialidasa frecuentemente se ha considerado por mucho tiempo una de las meras enzimas lisosómicas involucradas en la desasimilación y degradación. En dicha situación, hemos aislado y purificado la enzima utilizando principalmente tejidos de rata como fuente de la enzima, y descubrimos que  
20 hay cuatro tipos de sialidasas que difieren de las sialidasas de bacterias, virus, protozoos y similares en sus naturalezas. Cada una de estas enzimas se localizan en la matriz lisosómica, la membrana lisosómica, la membrana plasmática (membrana de la superficie celular), en el interior de la célula y el citoplasma, respectivamente, y son muy diferentes entre sí, no sólo por sus características enzimológicas como la especificidad de sustrato, sino también por sus propiedades inmunológicas. Entre estas sialidasas, la sialidasa localizada en el citoplasma se  
25 puede obtener como un producto purificado homogéneo a partir de músculos esqueléticos de rata. La clonación de su ADNc se ha logrado por primera vez en el mundo respecto a las sialidasas de origen animal y se ha determinado su estructura primaria. También se ha realizado el análisis de su estructura genómica, y en cuanto a su función, se ha aclarado que la enzima participa en la diferenciación y el crecimiento de las células del músculo esquelético utilizando ADNc como sonda. Estos estudios pueden considerarse una parte de las investigaciones pioneras en el  
30 mundo en estudios sobre sialidasas.

En estudios anteriores se había aclarado que existe la posibilidad de que la sialidasa localizada en la membrana plasmática muestre un aumento de la actividad después de la proliferación y cancerización de las células, y también está profundamente implicada en la diferenciación de las células nerviosas y la transducción de señales celulares.  
35 Sin embargo, hasta la fecha, no se ha comprendido nada sobre la estructura de esta enzima, el mecanismo que provoca el cambio de actividad y similares. Para responder a estas preguntas, lo que muchos investigadores en este campo han deseado durante mucho tiempo es la clonación de su ADNc. Por ejemplo, si pudiera explicarse el mecanismo de cambio canceroso debido a esta enzima, sería posible utilizar los resultados en el diagnóstico y terapia contra el cáncer. Además, debido a que los gangliósidos existen en las membranas de superficie de muchas  
40 células y participan en funciones celulares importantes como la adhesión celular y la comunicación de información, y también son componentes principales del cerebro, se estima que la Sialidasa, utilizándolos como sustrato específico, participa en ciertas funciones importantes de los nervios craneales.

En un aspecto, se utilizan oligonucleótidos antisentido para prevenir o tratar enfermedades o trastornos asociados  
45 con miembros de la familia NEU4. Ejemplos de enfermedades y trastornos mediados por Sialidasa 4 (NEU4) que pueden tratarse con los oligonucleótidos antisentido de la divulgación y/o con la células/tejidos regenerados a partir de células madre obtenidas utilizando y/o comprendiendo los compuestos antisentido: una enfermedad o trastorno asociado con anomalías en la función y/o expresión de la Sialidasa, cáncer, una enfermedad o trastorno proliferativo; apoptosis, una enfermedad o trastorno asociado con trastornos de la regulación de la apoptosis, diabetes, una  
50 enfermedad o trastorno cardiovascular, enfermedad de Tay Sachs, un trastorno por almacenamiento lisosómico, una enfermedad o trastorno inflamatorio (p. ej. enfermedad intestinal inflamatoria, incluyendo enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, psoriasis, artritis, etc.), inflamación; una enfermedad o trastorno metabólico, síndrome metabólico, síndrome de resistencia a la insulina, diabetes, hiperlipidemia, enfermedad de hígado graso, caquexia, obesidad, aterosclerosis, arteriosclerosis, una enfermedad o trastorno asociado con la alteración del metabolismo del  
55 colesterol, presión arterial elevada, una enfermedad o trastorno neurológico; una enfermedad o trastorno asociado con alteraciones en la diferenciación de las células neuronales; una enfermedad o trastorno asociado con trastornos en la formación de neuritas; una enfermedad o trastorno asociado con alteraciones en la desialización de glicoproteínas y una infección (por ejemplo, infección viral, infección sistémica, etc.).

60 En un aspecto, la modulación de NEU4 por uno o varios oligonucleótidos antisentido se administra a un paciente que

los necesite, para prevenir o tratar cualquier enfermedad o trastorno relacionado con la expresión, función o actividad anómalas de NEU4 en comparación con un control normal.

5 En un aspecto, los oligonucleótidos son específicos para polinucleótidos del gen NEU4, lo que incluye, sin limitación regiones no codificantes. Las dianas NEU4 incluyen variantes de NEU4; mutantes de NEU4, incluidos polimorfismos de un solo nucleótido (SNP); secuencias no codificantes de NEU4; alelos, fragmentos y similares. Preferentemente, el oligonucleótido es una molécula de ARN antisentido.

10 De acuerdo con aspectos de la divulgación, la molécula de ácido nucleico diana no está limitada a polinucleótidos del gen NEU4 en solitario, sino que se extiende a cualquiera de las isoformas, receptores, homólogos, regiones no codificantes y similares del gen NEU4.

15 En un aspecto, un oligonucleótido está dirigido a una secuencia antisentido natural (antisentido natural a las regiones codificantes y no codificantes) de dianas del gen NEU4, 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.

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

25 En un aspecto, 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 %.

35 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*.

45 Un compuesto antisentido, ya sea ADN, ARN, químico, 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.

50 En un aspecto, la elección como diana del gen NEU4, 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 a 7, y similares, modulan la expresión o función de NEU4. En un aspecto, la expresión o función está regulada positivamente en comparación con un control. En un aspecto, la expresión o función está regulada negativamente en comparación con un control.

55 En un aspecto, los oligonucleótidos comprenden secuencias expuestas como las SEQ ID NO: 8 a 11 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 un aspecto, los nucleótidos comprenden un derivado de fósforo. El derivado de fósforo (o grupo fosfato modificado) que puede unirse al resto de azúcar o de análogo de azúcar en los

oligonucleótidos modificados de la presente divulgación puede ser un monofosfato, difosfato, trifosfato, alquilfosfato, alcanofosfato, fosforioato 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.

5

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.

20

Los compuestos antisentido incluyen compuestos antisentido oligoméricos, oligonucleótidos antisentido, oligonucleótidos de secuencia de guía externa (EGS), agentes de splicing alternativo, 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.

25

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 el gen de la Sialidasa 4 (NEU4).

30

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.

35

En un aspecto, los oligonucleótidos antisentido se unen a las secuencias antisentido naturales del gen de la Sialidasa 4 (NEU4) y modulan la expresión y/o función del gen NEU4 (SEQ ID NO: 1). Los ejemplos de secuencias antisentido incluyen las SEQ ID NO: 2 al 11.

45

En un aspecto, los oligonucleótidos antisentido se unen a uno o más segmentos de los polinucleótidos del gen de la Sialidasa 4 (NEU4) modulan la expresión y/o función del gen NEU4. Los segmentos comprenden al menos cinco nucleótidos consecutivos de los polinucleótidos sentido o antisentido del gen NEU4.

En un aspecto, los oligonucleótidos antisentido son específicos para secuencias antisentido naturales del gen NEU4 donde la unión de los oligonucleótidos a las secuencias antisentido naturales del gen NEU4 modulan la expresión y/o la función del gen NEU4.

50

En un aspecto, los compuestos de oligonucleótido comprenden secuencias expuestas como las SEQ ID NO: 8 a 11, 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 fosforioato, fosforoditioato o similares. En un aspecto, los nucleótidos comprenden un derivado de fósforo. El derivado de fósforo (o grupo fosfato modificado) que puede unirse al resto de azúcar o de análogo de azúcar en los oligonucleótidos modificados de la presente divulgación puede ser un monofosfato, difosfato, trifosfato, alquilfosfato,

60

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.

5 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 ARNm transcrito de un gen que codifica el gen de la Sialidasa 4 (NEU4) a pesar de la(s) secuencia(s) de dichos codones. Un codón de terminación de la traducción (o "codón de terminación") de un gen puede tener una de tres secuencias, es decir, 5'-UAA, 5'-UAG y 5'-UGA (las secuencias de ADN correspondientes son 5'-TAA, 5'-TAG y 5'-TGA, respectivamente).

20 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.

30 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 delección es otro aspecto de un sitio diana. Los ARNm transcritos producidos mediante el proceso de splicing de dos (o más) ARNm de diferentes fuentes de genes se conocen como "transcritos de fusión". Los intrones pueden ser eficazmente elegidos como diana usando compuestos antisentido dirigidos a, por ejemplo, ADN o pre-ARNm.

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

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

- 5 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 corte y empalme, 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 corte y empalme. 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.

20 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.

30 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).

10 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. 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 ARNip, compuestos de interferencia (ARNi) de ARN mono- o bicatenario tales como compuestos de ARNip, 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 ARNdc 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 ARNdc puede ser completa o parcialmente bicatenario. Puede lograrse modulación específica de la expresión génica por expresión estable de horquillas de ARNdc en líneas celulares transgénicas, sin embargo, en algunos casos, la expresión o función génica está regulada positivamente. Cuando se forma a partir de dos cadenas, o una única cadena que adopta la forma de una molécula de tipo horquilla auto-complementaria que se dobla sobre sí misma para formar un dúplex, las dos cadenas (o regiones formadoras de dúplex de una sola cadena) son cadenas de ARN complementarias que se aparean con bases en el modo de Watson-Crick.

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

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

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

Se ha descubierto que el ARN bicatenario pequeño (ARNdc), tal como ARN de interferencia pequeño (ARNip) y microARN (miARN), es el desencadenante de un mecanismo evolutivamente conservado conocido como ARN de interferencia (ARNi). El ARNi 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 sialidasa 4 (NEU4) del gen supresor de tumor y productos codificados por los mismos. Los ARNdc 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 ARNdc (ARNa).

En un aspecto adicional, los "segmentos diana preferidos" identificados en el presente documento pueden emplearse en un cribado para compuestos adicionales que modulan la expresión de polinucleótidos del gen 4 NEU4. Los "moduladores" son aquellos compuestos que disminuyen o aumentan la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica el gen NEU4 y que comprenden al menos una parte de 5 nucleótidos que es complementaria a un segmento diana preferido. El procedimiento de cribado comprende las etapas de poner en contacto un segmento diana preferido de una molécula de ácido nucleico que codifica polinucleótidos sentido o antisentido naturales del gen NEU4 con uno o más moduladores candidatos, y seleccionar uno o más moduladores candidatos que disminuyen o aumentan la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica polinucleótidos del gen NEU4, por ejemplo, las SEQ ID NO: 8 al 11. Una vez que se demuestra que el modulador o moduladores candidatos son capaces de modular (por ejemplo, tanto disminuir como aumentar) la expresión de una molécula de ácido nucleico

que codifica polinucleótidos del gen NEU4, el modulador puede entonces emplearse en estudios de investigación adicionales de la función de polinucleótidos del gen NEU4, o para su uso como un agente de investigación, diagnóstico o terapéutico de acuerdo con la presente divulgación.

- 5 Direccional la secuencia antisentido natural preferentemente modula la función del gen diana. Por ejemplo, el gen NEU4 (p.ej. entrada número NM\_001167600). En un aspecto, la diana es un polinucleótido antisentido del gen NEU4. En un aspecto, un oligonucleótido antisentido dirigido a secuencias sentido y/o antisentido naturales de polinucleótidos del gen NEU4 (p. ej. entrada número NM\_001167600), variantes, alelos, isoformas, homólogas, mutantes, derivados, fragmentos y secuencias complementarias correspondientes. Preferentemente, el  
10 oligonucleótido es una molécula antisentido y las dianas incluyen regiones codificantes y no codificantes de polinucleótidos antisentido y/o sentido del gen NEU4.

- 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)  
15 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 bicatenarios pueden estar sujetos a modificaciones químicas. Por ejemplo, se ha demostrado que dichos restos  
20 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.

- En un aspecto, un oligonucleótido antisentido dirigido a polinucleótidos del gen de la Sialidasa 4 (NEU4) (p. ej. entrada número NM\_001167600), variantes, alelos, homólogas, mutantes, derivados, fragmentos y secuencias  
25 complementarias correspondientes. Preferentemente, el oligonucleótido es una molécula antisentido.

- De acuerdo con los aspectos de la divulgación, la molécula de ácido nucleico diana no está limitada solo al gen NEU4, sino que se extiende a cualquier polinucleótido variante del mismo y a cualquier polinucleótido que produzca, afecte, influya o resulte en o se refiera a un producto de expresión del gen NEU4 y/o cualquier isoforma del mismo.  
30

- En un aspecto, un oligonucleótido se dirige a una secuencia antisentido natural de polinucleótidos del gen NEU4, por ejemplo, los nucleótidos expuestos en SEQ ID NO: 2 a 7, y cualquier variante, alelo, homólogo, mutante, derivado, fragmento y secuencia complementaria a los mismos. Ejemplos de oligonucleótidos antisentido se exponen como las  
35 SEQ ID NOS: 8 al 11.

- En un aspecto, los oligonucleótidos son complementarios a, o se unen a, secuencias de ácido nucleico del gen NEU4 antisentido, incluyendo sin limitación secuencias sentido y/o antisentido no codificantes asociadas con polinucleótidos del gen NEU4 y modulan la expresión y/o función de moléculas del gen NEU4.

- 40 En un aspecto, los oligonucleótidos son complementarios a, o se unen a, secuencias de ácido nucleico del antisentido natural del gen NEU4, expuesto como SEQ ID NO: 2 a 7 y modula la expresión y/o la función de moléculas del gen NEU4.

- En un aspecto, los oligonucleótidos comprenden secuencias de al menos 5 nucleótidos consecutivos de las SEQ ID  
45 NO: 8 a 11 y modula la expresión y/o la función de moléculas del gen NEU4.

- Las dianas polinucleótidas comprende NEU4; incluyendo miembros de la familia del mismo, variantes de NEU4, mutantes de NEU4, incluidos polimorfismos de un solo nucleótido (SNP); secuencias no codificantes de NEU4; alelos de NEU4, variantes de especie, fragmentos y similares. Preferentemente, el oligonucleótido es una molécula  
50 antisentido.

- En un aspecto, el oligonucleótido que se dirige a polinucleótidos del gen NEU4, comprende: ARN antisentido, ARN de interferencia (ARNi), ARN de interferencia pequeño (ARNip); microARN de interferencia (miARN); un ARN temporal pequeño (ARNtp); o un ARN de horquilla corta (ARNhc); activación génica inducida por ARN pequeño  
55 (ARNa); o, ARN activante pequeño (ARNap).

- En un aspecto, direccionar a los polinucleótidos de la Sialidasa 4 (NEU4), por ejemplo, las SEQ ID: 2 a 11, modula la expresión o función de estas dianas. En un aspecto, la expresión o función está regulada positivamente en comparación con un control. En un aspecto, la expresión o función está regulada negativamente en comparación  
60 con un control.

En un aspecto, los compuestos antisentido comprenden secuencias expuestas como las SEQ ID NO: 8 al 11. Estos oligonucleótidos pueden comprender uno o más nucleótidos modificados, fragmentos más cortos o más largos, enlaces modificados y similares.

5

En un aspecto, SEQ ID NO: 8 a 11 comprenden uno o más nucleótidos de LNA. La tabla 1 muestra ejemplos de oligonucleótidos antisentido útiles en los procedimientos de la divulgación.

**Tabla 1:**

ID de secuencia	Nombre de la secuencia antisentido	Secuencia
SEQ ID NO: 8	CUR-1789	G*G*G*T*C*T*G*T*G*G*T*C*G*G*A*G*T*C*T*T
SEQ ID NO: 9	CUR-1790	G*G*C*A*G*A*T*T*C*A*G*G*C*A*T*G*G*A
SEQ ID NO: 10	CUR-1791	G*A*C*C*T*A*C*C*T*G*T*T*T*C*C*A*C*A*C
SEQ ID NO: 11	CUR-1792	T*G*T*C*C*A*G*C*A*A*G*C*C*T*T*G*T

10

La modulación de un ácido nucleico diana deseado puede llevarse a cabo de varias formas conocidas en la técnica. Por ejemplo, oligonucleótidos antisentido, ARNip, 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. Dichas moléculas de ácido nucleico enzimático se pueden dirigirse, por ejemplo,

15

contra prácticamente cualquier transcrito de ARN. 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. 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.

20

En general, los ácidos nucleicos enzimáticos con actividad de escisión de ARN 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 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.

25

30

Varias estrategias como la selección *in vitro* (evolución) (Orgel, (1979) Proc. R. Soc. London, B 205, 435) se han utilizado para desarrollar nuevos catalizadores de ácidos nucleicos capaces de catalizar una variedad de reacciones, como el corte y ligación de varios enlaces fosfodiéster y amida.

35

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<sup>-1</sup> en presencia de concentraciones saturantes (10 mM) de cofactor de Mg<sup>2+</sup>. Se ha demostrado que una ribozima de "ligasa de ARN" artificial cataliza la reacción de auto-modificación correspondiente con una velocidad de aproximadamente 100 min<sup>-1</sup>. Además, se sabe que ciertas ribozimas de cabeza de martillo modificadas que tienen brazos de unión al sustrato hechos de ADN catalizan la escisión de ARN con múltiples velocidades de recuperación que se aproximan a 100 min<sup>-1</sup>. Finalmente, la sustitución de un resto 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.

40

45

50

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.

5

Los ARN catalíticos diseñados basado en el motivo "hammerhead" han sido utilizados para cortar secuencias diana específicas haciendo cambios de base apropiado en el ARN catalítico para mantener la base necesaria en el apareamiento con las secuencias diana. Esto ha permitido el uso del ARN catalítico para escindir secuencias diana específicas e indica que los ARN catalíticos diseñados según el modelo de "cabeza de martillo" pueden escindir

10

El ARN interferencia (ARNi) 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 de interferencia pequeño (ARNip) bien como el propio ARN o bien como ADN, usando un plásmido de expresión o virus y la secuencia codificante para

15

ARN de horquilla pequeño que se procesa a ARNip. Este sistema permite el eficaz transporte de los pre-ARNip 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

20

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,

25

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 ARNip, compuestos de interferencia (ARNi) de

30

ARN mono- o bicatenario tales como compuestos de ARNip, ARNap, ARNa, 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

35

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 completo 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

40

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

45

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 ARNdc 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 ARNdc puede ser completa o parcialmente bicatenario. Puede lograrse modulación específica de la expresión génica por expresión estable de horquillas de ARNdc en líneas celulares transgénicas. Cuando se forma a partir de dos cadenas, o una única cadena

50

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

55

enzimas o proteínas estructurales para efectuar la escisión u otra modificación del ácido nucleico diana o pueden trabajar mediante mecanismos basados en la ocupación. En general, los ácidos nucleicos (incluyendo oligonucleótidos) pueden describirse como "similares a ADN" (es decir, que generalmente tienen uno o más 2'-desoxiazúcares y, generalmente, bases T en vez de U) o "similares a ARN" (es decir, que generalmente tienen uno o más 2'-hidroxilazúcares o azúcares modificados en 2' y, generalmente bases U en vez de T). Las hélices de ácido

60

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 aspectos (quiméricos), un compuesto antisentido puede contener tanto regiones en forma A como B.

5 Los compuestos antisentido de acuerdo con esta divulgación pueden comprender una parte antisentido de aproximadamente 5 a aproximadamente 80 nucleótidos (es decir, de aproximadamente 5 a aproximadamente 80 nucleósidos enlazados) de longitud. Esto se refiere a la longitud de la cadena antisentido o parte del compuesto antisentido. En otras palabras, un compuesto antisentido monocatenario de la divulgación comprende de 5 a aproximadamente 80 nucleótidos, y un compuesto antisentido bicatenario de la divulgación (tal como un ARNdc, 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.

15 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.

20 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.

30 En un aspecto, los compuestos oligoméricos de la presente divulgación también incluyen variantes en las que una base diferente está presente en una o más de las posiciones de nucleótido en el compuesto. Por ejemplo, si el primer nucleótido es una adenosina, pueden producirse variantes que contienen timidina, guanósina o citidina en esta posición. Esto puede hacerse en cualquiera de las posiciones de los compuestos antisentido o de ARNdc. 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.

35 En un aspecto, 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 %.

45 En un aspecto, los oligonucleótidos antisentido, como, por ejemplo, las moléculas de ácidos nucleicos expuestas en las SEQ ID NO: 8 a 11 comprenden una o más sustituciones o modificaciones. En un aspecto, los nucleótidos están sustituidos con ácidos nucleicos bloqueados (LNA).

50 En un aspecto, los oligonucleótidos se dirigen a una o más regiones de las moléculas de ácidos nucleicos sentido y/o antisentido de secuencias codificantes y/o no codificantes asociadas al gen NEU4 y las secuencias expuestas como SEQ ID NO: 1 al 7. Los oligonucleótidos también se dirigen a regiones solapantes de las SEQ ID NO: 1 al 7.

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, un oligonucleótido quimérico comprende al menos una región modificada para aumentar la afinidad de unión de la diana, y, normalmente, una región que actúa de sustrato para ARNasa H. La afinidad de un oligonucleótido por su diana (en este caso, un ácido nucleico que codifica ras) se determina rutinariamente midiendo la  $T_m$  de un par de oligonucleótido/diana, que es la temperatura a la que se disocian el oligonucleótido y la diana; la disociación se detecta espectrofotométricamente. Cuanto mayor sea la  $T_m$ , mayor será la afinidad del oligonucleótido por la diana.

Se pueden formar compuestos antisentido quiméricos de la divulgación como estructuras compuestas de dos o más oligonucleótidos, oligonucleótidos modificados, oligonucleósidos y/o miméticos de oligonucleótidos, tal como se ha descrito anteriormente. Como tales, estos compuestos también se han referido en la técnica como híbridos o 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; y5.700.922.

En un aspecto, 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, 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  $T_m$  (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 ARNi 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 ARNi. La escisión del ARN diana puede demostrarse rutinariamente por electroforesis en gel. En un aspecto, 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.

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  $\text{CH}_2\text{--NH--O--CH}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{--N(CH}_3\text{)--O--CH}_2$  [conocido como un esqueleto de metil(metilimino) o MMI],  $\text{CH}_2\text{--O--N(CH}_3\text{)--CH}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{--N(CH}_3\text{)--N(CH}_3\text{)--CH}_2$  y  $\text{O--N(CH}_3\text{)--CH}_2\text{--CH}_2$ , donde el esqueleto de fosfodiéster nativo se representa como  $\text{O--P--O--CH}_2$ . Los esqueletos de amida divulgados por De Mesmaeker et al. (1995) Acc. Chem. Res. 28:366-374 también se prefieren. También se prefieren oligonucleótidos que tienen esqueletos de morfolino (Summerton and Weller, Patente de EE.UU. N.º. 5.034.506. En otros aspectos, 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. Los oligonucleótidos también pueden comprender uno o más restos de azúcar sustituidos. Oligonucleótidos preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': OH, SH, SCH<sub>3</sub>, F, OCN, OCH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH<sub>2</sub> o O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub> en los que n es de 1 a aproximadamente 10; alquilo C1 a C10 inferior, alcoxialcoxi, alquilo, alcarilo o aralquilo inferior sustituido; Cl; Br; CN; CF<sub>3</sub>; OCF<sub>3</sub>; O-, S-, o N-alquilo; O-, S-, o N-alqueno; SOCH<sub>3</sub>; SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>; ONO<sub>2</sub>; NO<sub>2</sub>; N<sub>3</sub>; NH<sub>2</sub>; heterocicloalquilo; heterocicloalcarilo; aminoalquilamino; polialquilamino; sililo sustituido; un grupo de escisión de ARN; un grupo indicador; un intercalador; un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido; o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un oligonucleótido y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. Una modificación preferida incluye 2'-metoxietoxi [2'-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>]

OCH<sub>3</sub>, también conocido como 2'-O-(2-metoxietilo)]. Otras modificaciones preferidas incluyen 2'-metoxi (2'-O--CH<sub>3</sub>), 2'-propoxi(2'-OCH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) y 2'-flúor (2'-F). También pueden hacerse modificaciones similares en otras posiciones sobre el oligonucleótido, particularmente la posición 3' del azúcar en el nucleótido del extremo 3' y la posición 5' del nucleótido del extremo 5'. Los oligonucleótidos también pueden tener miméticos de azúcar tales como ciclobutilos en 5 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. Puede incluirse una base "universal" conocida en la técnica, por ejemplo, inosina. Se ha demostrado que las sustituciones 5-Me-C aumentan la estabilidad de los dúplex de ácidos nucleicos en 0,6-1,2 °C., y actualmente son las sustituciones de 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. Esas restos incluyen, pero no se limitan a restos lipídicos como restos de colesterol, restos de colesterilo, una cadena alifática, p. ej. restos de dodecandiol o undecilo, una poliamina o una cadena de polietilenglicol, o ácido adamantano acético. Los oligonucleótidos que comprenden restos lipófilos, y procedimientos para preparar dichos oligonucleótidos, son conocidos en la técnica, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N.º. 5.138.045, 5.218.105 y 5.459.255.

No es necesario que todas las posiciones en un oligonucleótido dado estén uniformemente modificadas, y de hecho más de una de las modificaciones 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. Esto puede lograrse sustituyendo algunos de los monómeros en los oligonucleótidos actuales por monómeros 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 se incluyen 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 Estados Unidos N.º 3.687.808; 4.469.863; 10 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 metilformacetilo y tioformacetilo; esqueletos que contienen alqueno; 20 esqueletos de sulfamato; esqueletos de metilnimino y metilhidrazino; esqueletos de sulfonato y sulfonamida; esqueletos de amida; y otros que tienen partes de componentes de N, O, S y CH<sub>2</sub> mixtos.

Las patentes representativas de los Estados Unidos que enseñan la preparación de los oligonucleósidos comprenden, pero no se limitan a, las patentes de los EE.UU. N.º 5.034.506; 5.166.315; 5.185.444; 5.214.134; 25 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. N.º 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 un aspecto de la divulgación, los oligonucleótidos con esqueletos de fosforotioato y oligonucleósidos con esqueletos de heteroátomo, y en particular -CH<sub>2</sub>-NH-O-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)-O-CH<sub>2</sub>-, conocidos como un esqueleto de metileno (metilimino) o MMI, -CH<sub>2</sub>-O-N(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)-N(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>- y -O-N(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- donde el esqueleto de fosfodiéster nativo se representa como -O-P-O-CH<sub>2</sub>- de la patente de EE.UU. N.º 5.489.677, citada anteriormente, y los esqueletos de amida de la patente de EE.UU. N.º 5.602.240, citada anteriormente. También se prefieren oligonucleótidos que tienen esqueletos de morfolino de la patente de EE.UU. N.º 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<sub>1</sub> a C<sub>10</sub> sustituido o sin sustituir o alquenilo y alquinilo C<sub>2</sub> a C<sub>10</sub>. Se prefieren particularmente O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> OmCH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, OCH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH<sub>2</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ONH<sub>2</sub> y O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ON(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> donde n y m pueden ser de 1 a aproximadamente 10. Otros oligonucleótidos preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': C a CO, (alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, alcarilo, aralquilo, O-alcarilo o O-aralquilo, SH, SCH<sub>3</sub>, OCN, Cl, Br, CN, 55 CF<sub>3</sub>, OCF<sub>3</sub>, SOCH<sub>3</sub>, SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, ONO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub>, heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, polialquilamino, sililo sustituido, un grupo de escisión de ARN, un grupo indicador, un intercalador, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido, o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un oligonucleótido, y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. Una modificación preferida comprende 2'-metoxietoxi (2'-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, también conocido como 2'-O-(2'-metoxietilo) o 2'-MOE) es 60 decir, un grupo alcoxialcoxi. Otra modificación preferida comprende 2'-dimetilaminoxietoxi, es decir, un grupo

O(CH<sub>2</sub>)<sub>20</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, también conocido como 2'-DMAOE, tal como se describe en los ejemplos en el presente documento más adelante, y 2'-dimetilaminoetoxietoxi (también conocido en la técnica como 2'-O-dimetilaminoetoxietilo o 2'-DMAEOE), es decir, 2'-O-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>.

- 5 Otras modificaciones preferidas comprenden 2'-metoxi (2'-OCH<sub>3</sub>), 2'-aminopropoxi (2'-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>) y 2'-fluoro (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. N.º. 4.981.957; 5.118.800; 5.319.080; 5.359.044; 5.393.878; 5.446.137; 5.466.786; 5.514.785; 5.519.134; 5.567.811; 5.576.427; 5.591.722; 5.597.909; 5.610.300; 5.627.053; 5.639.873; 5.646. 265; 5.658.873; 5.670.633; y 5.700.920.
- 15 Los oligonucleótidos también pueden comprender modificaciones o sustituciones de nucleobases (frecuentemente denominadas en la técnica simplemente "base"). Tal como se usa en el presente documento, nucleótidos "no modificados" o "naturales" comprenden las bases de purina adenina (A) y guanina (G), y las bases de pirimidina timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Los nucleótidos modificados comprenden otros nucleótidos sintéticos y naturales tales como 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetilcitosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, derivados de 6-metilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, derivados de 2-propilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracilo y citosina, 5-propiniluracilo y citosina, 6-azouracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudo-uracilo), 4-tiouracilo, 8-halógeno, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo y otras adeninas y guaninas sustituidas en 8, 5-halógeno, particularmente 5-bromo, 5-trifluorometilo y otros uracilos y citosinas sustituidos en 5, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-deazaguanina y 7-deazaadenina y 3-deazaguanina y 3-deazaadenina.

Además, los nucleótidos comprenden los divulgados en la patente de Estados Unidos N.º 3.687.808, aquellos divulgados en "The Concise Encyclopedia of Polymer Science And Engineering", páginas 858-859, Kroschwitz, J.I., ed. John Wiley & Sons, 1990, aquellos divulgados por Englisch et al., "Angewandte Chemie, International Edition", 30 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 O-6, que comprenden 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. Se ha mostrado que las sustituciones de 5-metilcitosina incrementan la estabilidad del dúplex de ácido nucleico alrededor de 0,6-1,2 °C. (Sanghvi, Y. S., 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

40 Las patentes representativas de los Estados Unidos que enseñan la preparación de los nucleótidos modificados citados anteriormente, así como otros nucleótidos modificados, comprenden, pero no se limitan a, las patentes de los EE.UU. N.º. 3.687.808, así como 4.845.205; 5.130.302; 5.134.066; 5.175. 273; 5.367.066; 5.432.272; 5.457.187; 5.459.255; 5.484.908; 5.502.177; 5.525.711; 5.552.540; 5.587.469; 5.596.091; 5.614.617; 5.750.692, y 5.681.941.

45 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, ácido cólico, un tioéter, por ejemplo, hexil-S-tritilol, un tiocolesterol, una cadena alifática, por ejemplo, residuos de dodecanodiol o undecilo, un fosfolípido, por ejemplo, di-hexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-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.

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 N.º 4.828.979; 4.948.882; 5.218.105; 5.525.465; 5.541.313; 5.545.730; 5.552. 538; 5.578.717; 5.580.731; 5.580.731; 5.591.584; 5.109.124; 5.118.802; 5.138.045; 5.414.077; 5.486. 603; 5.512.439; 5.578.718; 5.608.046; 4.587.044; 4.605.735; 4.667.025; 4.762. 779; 4.789.737; 4.824.941; 4.835.263; 4.876.335; 4.904.582; 4.958.013; 5.082. 830; 5.112.963; 5.214.136; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5. 245.022; 5.254.469; 5.258.506; 5.262.536; 5.272.250; 5.292.873; 5.317.098; 5.371.241; 5.391. 723; 5.416.203; 5.451.463; 5.510.475; 5.512.667; 5.514.785; 5. 565.552; 5.567.810; 5.574.142;

5.585.481; 5.587.371; 5.595.726; 5.597.696; 5.599.923; 5.599. 928 y 5.688.941.

Los compuestos de la presente divulgación también pueden aplicarse en las áreas del descubrimiento de fármacos y validación de dianas. La presente divulgación comprende el uso de los compuestos y segmentos diana preferidos e identificados en el presente documento en un esfuerzo por descubrir fármacos para esclarecer las relaciones que existen entre polinucleótidos del gen Sialidasa 4 NEU4 y una patología, fenotipo o afección. Estos procedimientos incluyen detectar o modular los polinucleótidos del gen NEU4 que comprenden poner en contacto una muestra, tejido, célula u organismo con los compuestos de la presente divulgación, medir el nivel de ácido nucleico o de proteína de los polinucleótidos del gen NEU4 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.

15

**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 indicador en la parte cadena arriba del gen y una posible diana de ARNi en la región no codificante 3'. La eficacia de oligonucleótidos antisentido individuales se ensayaría por modulación del gen indicador. Los genes indicadores 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, fosfotricina, puromicina y tetraciclina. Los procedimientos de determinación de la modulación de un gen indicador 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.

La expresión de la proteína y del ARNm de NEU4 puede controlarse utilizando procedimientos conocidos por los expertos en la técnica y descritos en este documento. Por ejemplo, pueden usarse inmunoensayos como ELISA para medir los niveles de proteína. Los kits de ensayo ELISA para NEU4 están disponibles comercialmente, p. ej., en R&D Systems (Minneapolis, MN).

En unos aspectos, la expresión del gen NEU4 (p. ej. ARNm o proteína) en una muestra (p. ej. células o tejidos *in vivo* o *in vitro*) tratados con un oligonucleótido antisentido de la divulgación se evalúan por comparación con la expresión de NEU4 en una muestra de control. Por ejemplo, la expresión de la proteína o del ácido nucleico puede compararse usando procedimientos conocidos por los expertos en la técnica, con una muestra tratada de forma simulada y sin tratar. De forma alternativa, puede hacerse una comparación con una muestra tratada con un oligonucleótido antisentido control (p. ej., uno que tenga una secuencia modificada o diferente) dependiendo de la información deseada. En otro aspecto, una diferencia en la expresión de la proteína NEU4 o su ácido nucleico en una muestra tratada frente a una muestra sin tratar puede compararse con la diferencia en la expresión de un ácido

nucleico diferente (incluyendo cualquier estándar que el investigador considere apropiado, p. ej. un gen de mantenimiento) en una muestra tratada frente a una muestra sin tratar.

Las diferencias observadas pueden expresarse como se desee, p. ej. en forma de proporción o fracción, para su uso en comparación con un control. En unos aspectos, el nivel de ARNm o proteína de NEU4, en una muestra tratada con un oligonucleótido antisentido de la presente divulgación, aumenta o disminuye entre aproximadamente 1,25 veces a unas 10 veces o más en relación con una muestra sin tratar o una muestra tratada con un ácido nucleico de control. En unos aspectos, el nivel de ARNm o proteína de NEU4 aumenta o disminuye entre al menos 1,25 veces, al menos 1,3 veces, al menos 1,4 veces, al menos 1,5; al menos 1,6 veces, al menos 1,7 veces, al menos 1,8 veces, al menos 2 veces, al menos 2,5 veces, al menos 3 veces, al menos 3,5 veces, al menos 4-veces, al menos 4,5 veces, al menos 5 veces, al menos 5,5 veces, al menos 6 veces, al menos 6,5 veces, al menos 7 veces, al menos 7,5 veces, al menos 8 veces, al menos 8,5 veces, al menos 9 veces, al menos 9,5 veces, o al menos 10 veces o más.

### 15 **Kits, reactivos de investigación, de diagnóstico 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 Sialidasa 4 (NEU4). 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 expresión génica conocidos en la técnica incluyen matrices de ADN o microarrays, SAGE (análisis en serie de expresión génica), LEE (amplificación de ADN digerido con enzimas de restricción), TOGA (análisis de expresión génica total), matrices de proteínas y proteómica, etiqueta de secuencia expresada (EST), secuenciación, huella genética de ARN sustractivos (SuRF), clonación sustractiva, presentación diferencial (DD), hibridación genómica comparativa, FISH (hibridación fluorescente *in situ*), técnicas y procedimientos de espectrometría de masas.

Los compuestos de la divulgación son útiles para investigación y diagnóstico, debido a que estos compuestos hibridan con ácidos nucleicos que codifican el gen de la Sialidasa 4 (NEU4). Por ejemplo, los oligonucleótidos que hibridan con dicha eficiencia y en dichas condiciones que se han descrito en el presente documento como moduladores eficaces del gen NEU4 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 el gen NEU4 y en la amplificación de dichas moléculas de ácidos nucleicos para la detección o para su uso en estudios adicionales del gen NEU4. La hibridación de los oligonucleótidos antisentido, particularmente los cebadores y sondas de la divulgación con un ácido nucleico que codifica el gen NEU4, puede detectarse por medios conocidos en la técnica. Dichos medios pueden comprender conjugación de una enzima con el oligonucleótido, radiomarcado del oligonucleótido, o cualquier otro medio de detección adecuado. También pueden prepararse kits que usan dichos medios de detección para detectar el nivel del gen NEU4 en una muestra.

La especificidad y sensibilidad de 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 del gen NEU4 se trata administrando compuestos antisentido de acuerdo con esta divulgación. Por ejemplo, en un aspecto no limitante, los procedimientos comprenden la etapa de administrar al animal que necesita tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz del modulador del gen NEU4. Los moduladores del gen NEU4 de la presente divulgación modulan de manera efectiva la actividad del gen NEU4 o modulan la expresión de la proteína del gen NEU4. En un aspecto, la actividad o expresión del gen NEU4 en un animal se inhibe aproximadamente el 10 % en comparación con un control. Preferentemente, la actividad o expresión del gen NEU4 en un animal se inhibe aproximadamente el 30 %. Más preferentemente, la actividad o expresión del gen NEU4 en un animal se inhibe el 50 % o más. De este modo, los compuestos oligoméricos modulan la expresión del ARNm del gen de la Sialidasa 4 (NEU4) al menos el 10 %, al menos el 50 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o el 100 % en comparación con un control.

En un aspecto, la actividad o expresión del gen de la Sialidasa 4 (NEU4) en un animal aumenta aproximadamente el 10 % en comparación con un control. Preferentemente, la actividad o expresión del gen NEU4 en un animal aumenta aproximadamente el 30 %. Más preferentemente, la actividad o expresión del gen NEU4 en un animal aumenta el 50 % o más. De este modo, los compuestos oligoméricos modulan la expresión del ARNm del gen NEU4 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 el aumento de la expresión del gen de la Sialidasa 4 (NEU4) en suero, sangre, tejido adiposo, hígado o cualquier otro líquido corporal, tejido u órgano del animal. Preferentemente, las células contenidas dentro de dichos líquidos, tejidos u órganos que se analizan contienen una molécula de ácido nucleico que codifica péptidos del gen NEU4 y/o la propia proteína del gen NEU4

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 de genes indicadores, 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 colesterol, 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 N.º PCT/US92/09196, depositada el 23 de octubre de 1992, y la patente de EE.UU. No. 6,287,860. Restos conjugados incluyen, aunque no se limitan a, restos de lípido tales como un resto colesterol, ácido cólico, un tioéter, por ejemplo, hexil-5-triitilol, un tiocolésterol, una cadena alifática, por ejemplo, residuos de dodecanodiol o undecilo, un fosfolípido, por ejemplo, dihexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato de trietilamonio, una poliamina o una cadena de polietilenglicol, o ácido adamantano acético, un resto palmitilo, o un resto octadecilamina o hexilamino-carbonil-oxicolesterol. Los oligonucleótidos de la divulgación también pueden conjugarse con principios activos, por ejemplo, aspirina, warfarina, fenilbutazona, ibuprofeno, suprofen, fenbufeno, ketoprofeno, (S)-(+)-pranoprofeno, carprofeno,

dansilsarcosina, ácido 2,3,5-triyodobenzoico, ácido flufenámico, ácido folínico, una benzotiadiazida, clorotiazida, una diazepamina, indometacina, un barbitúrico, una cefalosporina, un fármaco sulfa, un antidiabético, un antibacteriano o un antibiótico.

- 5 Las patentes representativas de los Estados Unidos que enseñan la preparación de estos conjugados de oligonucleótidos incluyen, pero no se limitan a, las Patentes de los EE.UU. N.º 4.828.979; 4.948.882; 5.218.105; 5.525.465; 5.541.313; 5.545.730; 5.552.538; 5.578.717.5.580.731; 5.580.731; 5.591.584; 5.109.124; 5.118.802; 5.138.045; 5.414.077; 5.486.603; 5.512.439; 5.578.718; 5.608.046; 4.587.044; 4.605.735; 4.667.025; 4.762.779; 4.789.737; 4.824.941; 4.835.263; 4.876.335; 4.904.582; 4.958.013; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.082.830;
- 10 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**

- 15 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
- 20 de ayuda en la captación, distribución y/o absorción incluyen, pero no se limitan a, las patentes de los EE.UU. N.º 5.108.921; 5.354.844; 5.416.016; 5.459.127; 5.521.291; 5.543.165; 5.547.932; 5.583.020; 5.591.721; 4.426.330; 4.534.899; 5.013.556; 5.108.921; 5.213.804; 5.227.170; 5.264.221; 5.356.633; 5.395.619; 5.416.016; 5.417.978; 5.462.854; 5.469.854; 5.512.295; 5.527.528; 5.534.259; 5.543.152; 5.556.948; 5.580.575; y 5.595.756.

- 25 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.

- 30 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: 8 a 11) o en combinación con una
- 35 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
- 40 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
- 45 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), vectores de adenovirus y vectores de virus asociados a adenovirus.

- 50 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.

- 55 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.

60

- 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.
- 10 Para el tratamiento de los tejidos en el sistema nervioso central, la administración puede realizarse, p. ej. por inyección o perfusión en el líquido cefalorraquídeo. La administración de ARN antisentido en el líquido cefalorraquídeo se describe, p. ej. en la solicitud de patente de EE.UU. N.º 2007/0117772, "Methods for slowing familial ALS disease progression».
- 15 Cuando lo que se pretende es que los oligonucleótidos antisentido de la presente divulgación pueden administrarse a células del sistema nervioso central, la administración puede ser con uno o más agentes capaces de facilitar la penetración de los oligonucleótidos antisentido a través de la barrera hematoencefálica del sujeto. La inyección puede realizarse p. ej. en la corteza entorrinal o en el hipocampo. La aplicación de factores neurotróficos mediante la administración de un vector adenovirus en las neuronas motoras del tejido muscular se describe, p. ej., en la patente de EE.UU. N.º 6.632.427, "Adenoviral-vector-mediated gene transfer into medullary motor neurons». La aplicación de vectores directamente al cerebro, p. ej., el cuerpo estriado, el tálamo, el hipocampo, o la sustancia negra es conocida en la técnica y se describe, p. ej. en la patente de EE.UU. N.º. 6.756.523, "Adenovirus vectors for the transfer of foreign genes into cells of the central nervous system particularly in brain". La administración puede ser rápida como por inyección o realizarse a lo largo de un período de tiempo ya sea por perfusión lenta o mediante la
- 20 administración de formulaciones de liberación lenta.
- 25

El oligonucleótidos antisentido sujeto también pueden unirse o conjugarse con agentes que proporcionen unas propiedades farmacéuticas o farmacodinámicas deseables. Por ejemplo, el oligonucleótido antisentido puede acoplarse a cualquier sustancia, conocida en la técnica por favorecer la penetración o el transporte a través de la barrera hematoencefálica, como un anticuerpo contra el receptor de la transferrina, y administrarse por inyección intravenosa. El compuesto antisentido puede unirse a un vector viral, por ejemplo, que hace que el compuesto antisentido resulte más eficaz y/o aumente el transporte del compuesto antisentido a través de la barrera hematoencefálica. La alteración de la barrera hematoencefálica osmótica también puede llevarse a cabo mediante perfusión, p. ej. de azúcares incluyendo, pero sin limitarse a, mesoeritritol, xilitol, D(+)-galactosa, D(+)-lactosa, D(+)-xilosa, dulcitol, mioinositol, L(-)-fructosa, D(-)-manitol, D(+)-glucosa, D(+)-arabinosa, D(-)-arabinosa, celobiosa, D(+)-maltosa, D(+)-rafinosa, L(+)-ramnosa, D(+)-melibiosa, D(-)-ribosa, adonitol, D(+)-arabitol, L(-)-arabitol, D(+)-fucosa, L(-)-fucosa, D(-)-lixosa, L(+)-lixosa y L(-)-lixosa o aminoácidos, incluyendo, pero sin limitarse a, glutamina, lisina, arginina, asparagina, cisteína, ácido aspártico, ácido glutámico, glicina, histidina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, Valina, tirosina y taurina. Los procedimientos y materiales para aumentar la penetración en la barrera hematoencefálica se describen, p. ej. en las patentes de EE.UU. N.º 4.866.042, "Method for the delivery of genetic material across the blood brain barrier,"6.294.520, "Material for passage through the blood-brain barrier," y6.936.589, "Parenteral delivery systems,".

30

35

40

Los compuestos antisentido sujetos 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. Por ejemplo, pueden incluirse lípidos catiónicos en la formulación para facilitar la absorción de oligonucleótidos. Una de dichas composiciones que se ha demostrado que facilita la absorción es LIPOFECTIN (disponible en GIBCO BRL, Bethesda, MD).

45

50

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.

55

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

60

íntimamente los principios activos con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos, o ambos, y luego, si fuera necesario, moldeando el producto.

5 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.

10 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.

15 Las emulsiones normalmente son sistemas heterogéneos de un líquido dispersado en otro en forma de gotitas que normalmente superan 0,1 □m de diámetro 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 N.º 6.287.860.

25 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

30 catiónicos para administrar ADN 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 N.º 6.287.860.

40 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. N.º 6.287.860.

45 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

50 de EE.UU. N.º 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.

55 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, dioleoil-tetrametilaminopropilo

60 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 N.º 6.287.860.

Las composiciones y formulaciones para administración por vía oral incluyen polvos o gránulos, micropartículas, nanopartículas, suspensiones o soluciones en agua o medios no acuosos, cápsulas, cápsulas de gel, sobres, comprimidos o 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 N.º 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 polioxietileno-9-laurílico, éter polioxietileno-20-cetílico. Los oligonucleótidos de la divulgación pueden administrarse por vía oral, en forma granulada que incluye partículas secadas por pulverización, o complejados para formar micro o nanopartículas. Los agentes complejantes de oligonucleótidos y sus usos se describen adicionalmente en la patente de Estados Unidos N.º 6.287.860.

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

Ciertos aspectos de la divulgación proporcionan composiciones farmacéuticas que contienen uno o más compuestos oligoméricos y uno o más de otros agentes quimioterapéuticos que funcionan por un mecanismo no antisentido. Ejemplos de dichos agentes quimioterapéuticos incluyen, aunque no se limitan a, fármacos quimioterapéuticos para el cáncer tales como daunorrubicina, daunomicina, dactinomomicina, doxorubicina, epirubicina, idarubicina, esorubicina, bleomicina, mafosfamida, ifosfamida, citosina arabinósido, biscloroetil-nitrosurea, busulfano, mitomicina C, actinomicina D, mitramicina, prednisona, hidroxiprogesterona, testosterona, tamoxifeno, dacarbazina, procarbazona, hexametilmelamina, pentametilmelamina, mitoxantrona, amsacrina, clorambucilo, metilciclohexilnitrosurea, mostazas de nitrógeno, melfalan, ciclofosfamida, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-azacitidina, hidroxiaurea, 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, ribavirina, vidarabina, aciclovir y ganciclovir, también pueden combinarse en composiciones de la divulgación. Las combinaciones de compuestos antisentido y otros fármacos no antisentido también están dentro del alcance de la presente divulgación. Pueden usarse dos o más compuestos combinados juntos o secuencialmente.

En otro aspecto relacionado, las composiciones de la divulgación pueden contener uno o más compuestos antisentido, particularmente oligonucleótidos, dirigidos a un primer ácido nucleico y uno o más compuestos antisentido adicionales dirigidos a un segundo ácido nucleico diana. Por ejemplo, la primera diana puede ser una secuencia antisentido particular del gen de la Sialidasa 4 (NEU4), y la segunda diana puede ser una región de otra secuencia de nucleótidos. Como alternativa, las composiciones de la divulgación pueden contener dos o más compuestos antisentido dirigidos a diferentes regiones del mismo ácido nucleico diana del gen de la Sialidasa 4 (NEU4). 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:**

60

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 10 mg 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 10 mg por kg de peso corporal, una vez o más diariamente, a una vez cada 2-20 años.

En algunos aspectos, se trata un paciente con una dosis de fármaco que sea al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 35, al menos 40, al menos 45, al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90, o al menos 10 mg/kg de peso corporal. Ciertas dosis inyectadas de oligonucleótidos antisentido se describen, p. ej., en la patente de EE.UU. N.º 7.563.884, "Antisense modulation of PTP1B expression,".

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. Aspectos de composiciones y procedimientos inventivos se ilustran en los siguientes ejemplos.

## EJEMPLOS

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

**Ejemplo 1: Diseño de oligonucleótidos antisentido específicos para una molécula de ácido nucleico antisentido al gen de la Sialidasa 4 (NEU4) y/o una hebra sentido del polinucleótido NEU4.**

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 se ve facilitada por la utilización de programas informáticos (p. ej. IDT AntiSense Design, IDT OligoAnalyzer) que identifican automáticamente en cada secuencia, subsecuencias de 19-25 nucleótidos que formarán híbridos con una secuencia de polinucleótidos diana con una temperatura de fusión deseada (normalmente 50-60 °C) y no formará autodímeros u otras estructuras secundarias complejas. La selección de los oligonucleótidos apropiados se facilita aún más 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 genes y regiones intragénicas de un genoma dado permite la selección de secuencias de ácidos nucleicos que muestran un grado de especificidad respecto al gen de interés. Estos procedimientos permiten la selección de oligonucleótidos que muestran un alto grado de complementariedad con secuencias de ácido nucleico diana y un menor grado de complementariedad con otras secuencias de ácido nucleico en un genoma dado. Un experto en la materia se dará cuenta de que hay libertad considerable en la selección de regiones apropiadas de genes para su uso en la presente divulgación.

Un compuesto antisentido es "específicamente hibridable" cuando la unión del compuesto al ácido nucleico diana interfiere en la función normal del ácido nucleico diana para causar una modulación de la función y/o la actividad, y existe un grado de complementariedad suficiente para evitar unión inespecífica del compuesto antisentido a 5 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 10 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 15 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 20 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 25 ADN bicatenario (ADNdc) (tales como los colorantes ABI HRM, SYBR Green, SYTO, etc.). Las propiedades de los colorantes de ADNdc son tales que casi no emiten fluorescencia en forma libre, pero son altamente fluorescentes cuando se unen a ADNdc.

Para realizar el ensayo, el ADNc o un oligonucleótido correspondiente se mezclan con la molécula en 30 concentraciones definidas por los protocolos del fabricante particulares. La mezcla se calienta a 95 °C para disociar todos los complejos de ADNdc previamente formados, luego se enfría lentamente a temperatura ambiente u otra temperatura menor definida por el fabricante del kit para permitir que se hibriden las moléculas de ADN. Entonces, los complejos recientemente formados se calientan lentamente a 95 °C con recopilación de datos continua simultánea sobre la cantidad de fluorescencia que se produce por la reacción. La intensidad de fluorescencia es 35 inversamente proporcional a las cantidades de ADNdc 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 40 temperatura  $(-d(\text{Fluorescencia})/dT)$  sobre el eje y) contra la temperatura (eje x) usando software apropiado (por ejemplo, LightTyper (Roche) o SDS Dissociation Curve, ABI). Los datos se analizan para identificar la temperatura de la rápida transición del complejo de ADNdc a moléculas monocatenarias. Esta temperatura se llama  $T_m$  y es directamente proporcional a la intensidad de la interacción entre las dos moléculas. Normalmente, la  $T_m$  superará los 40 °C.

#### 45 **Ejemplo 2: Modulación de polinucleótidos NEU4**

Todos los oligonucleótidos antisentido utilizados en el Ejemplo 2 se diseñaron como se describe en el Ejemplo 1. Se encargó al fabricante (IDT Inc. de Coralville, IA) que fabricara los oligonucleótidos con el enlace fosfotioato diseñados 50 y se proporcionó los análogos de fosfotioato mostrados en la Tabla 1. La denominación asterisco entre nucleótidos indica la presencia u enlace fosfotioato. Los oligonucleótidos requeridos para el experimento del Ejemplo 2 pueden sintetizarse utilizando cualquier procedimiento apropiado del estado de la técnica, por ejemplo el procedimiento utilizado por IDT: sobre soporte sólido, como microperlas de vidrio de poro controlado (CPG) de 5 micrómetros, usando monómeros de fosforamidita (nucleótidos normales con todos los grupos activos protegidos 55 con grupos de protección, por ejemplo, grupo tritilo en el azúcar, grupo benzilo en A y C, y N-2-isobutirilo en G). Los grupos de protección impiden las reacciones no deseadas durante la síntesis de oligonucleótidos. Los grupos de protección se eliminan al final del proceso de síntesis. El nucleótido inicial está unido a un soporte sólido a través del carbono 3' y la síntesis continúa en dirección 3' - 5'. La adición de una nueva base a una cadena de oligonucleótidos en elongación se realiza en cuatro etapas: 1) el grupo de protección se elimina del oxígeno 5' del nucleótido 60 inmovilizado con ácido tricloroacético; 2) el nucleótido inmovilizado y el siguiente en la secuencia se unen utilizando

tetrazol; la reacción continúa a través de un intermediario tetrazoifosforamida; 3) se lavan los nucleótidos libres que no hayan reaccionado y otros subproductos de reacción, y los oligonucleótidos inmovilizados que no hayan reaccionado se tapan para evitar su participación en la próxima ronda de síntesis; el tapado se logra acetilando el hidroxilo 5' libre utilizando anhídrido acético y N-metil-imidazol; 4) para estabilizar el enlace entre los nucleótidos, el fósforo se oxida con yodo y agua, si se va a producir un enlace fosfodiéster, o reactivo Beaucage (3H-1,2-benzoditiol-3-ona-1,1-dióxido), si se desea un enlace fosfotioato. Alternando las dos agentes oxidantes, se puede construir un esqueleto quimérico. Se repite el ciclo de cuatro etapas descrito anteriormente para cada nucleótido de la secuencia. Cuando la secuencia completa esté sintetizada, el oligonucleótido escinde sobre un soporte sólido y se desprotege utilizando hidróxido de amonio a alta temperatura. Los grupos de protección se lavan mediante desalinización y el resto de los oligonucleótidos se liofilizan.

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

Para realizar el experimento diseñado en el Ejemplo 2, se cultivaron células HepG2 de ATCC (N.º de cat HB-8065) en medio de cultivo (MEM/EBSS (Hyclone N.º de cat SH30024, o Mediatech N.º de cat MT-10-O10-CV) +10 % FBS (Mediatech N.º de cat MT35- 011-CV)+ penicilina/estreptomina (Mediatech N.º de cat MT30-002-CI)) a 37°C y el 5 % de CO2. Un día antes del experimento, las células volvieron a sembrarse a la densidad de 0,5x10<sup>4</sup>/ml en placas de 6 pocillos y se incubaron a 37 °C y con el 5 % de CO2. El día del experimento, el medio en las placas de 6 pocillos se cambió a medio de cultivo fresco.

Los oligonucleótidos enviados por el fabricante en forma liofilizada se diluyeron a la concentración de 20 µM en agua libre de ARNsa/ADNasa, Se incubaron dos µl de esta solución con 400 µl de medio OptiMEM (Gibco, N.º de cat 31985-070) y 4 µl de Lipofectamine 2000 (Invitrogen, N.º de cat 11668019) a temperatura ambiente durante 20 min y se aplicaron gota a gota a cada pocillo de las placas de 6 pocillos con células HepG2. Se usó una mezcla similar que incluye 2 µl de agua en lugar de la solución de oligonucleótido para los controles transfectados con vector simulado. Después de 3-18 horas de incubación a 37 °C y con el 5 % de CO2, 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 (N.º de cat Z3105) o el kit de aislamiento de ARN total RNeasy de Qiagen (N.º 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 (n.º de cat AB1453B) o el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (n.º 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 (N.º de cat 4369510) y cebadores/sondas diseñados por ABI (ensayos de expresión génica Taqman de Applied Biosystems: Hs00896887\_ml (NEU4) de Applied Biosystems Inc., Foster City CA). Se usó el siguiente ciclo de PCR: 50 °C durante 2 min, 95 °C durante 10 min, 40 ciclos de (95 °C durante 15 segundos, 60 °C durante 1 min) usando 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.

Resultados: los resultados de PCR en tiempo real muestran que los niveles de ARNm de NEU4 en células HepG2 se incrementan significativamente 48 h después del tratamiento con uno de los oligonucleótidos antisentido diseñados para Hs.678184 antisentido de NEU4 (Fig. 1).

A pesar de que la divulgación se ha ilustrado y descrito con respecto a una o más implementaciones, a otros expertos en la materia se le ocurrirán alteraciones y modificaciones equivalentes después de la lectura y comprensión de esta memoria descriptiva y los dibujos adjuntos. 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.

#### **55 LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> OPKO CURNA LLC

<120> TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES RELACIONADAS CON LA SIALIDASA 4 (NEU4) MEDIANTE INHIBICIÓN DEL TRANSCRITO ANTISENTIDO NATURAL AL GEN NEU4

60 <130> NEU4

ES 2 640 755 T3

<150>US61/390216  
<151> 2010-10-06  
<160> 11  
5 <170> PatentIn versión 3.5  
<210> 1  
<211> 2053  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens  
10 <400> 1  
gccgctgctg tggcagccct gtccctgagc ggaacgcagg tcgtctctgg gaggaggagc 60  
gaggggttggg ctcagtggcc gctgcggtgg cagccctgtc cccaggcgtg gactctgccc 120  
tcagcttcac agtcaccgaa gaaatgaagt tacaggagggg gcacaccgtc cttttgtctc 180  
tgcccttgag gttggcggga actgaaactg agcatggggg tcctctgtac ccttcacgg 240  
acagtgtctt tcgagcggga gaggacgggc ctgaactacc gcgtgccctc gctgtcccc 300  
gtgcccccg ggcccacct gctggccttt gtggagcagc ggctcagccc tgacgactcc 360  
cacgcccacc gcctggtgct gaggaggggc acgctggccg ggggctcctg gcgggtgggg 420  
ggcctgcacg tgcggggac agcagccctg gcggagcacc ggtccatgaa cccctgcctt 480  
gtgcacgatg ctggcacggg caccgtctc ctctcttca tcgggtgct gggccacacg 540  
cctgaggcgc tgcagatgc caccggaagg aacgccgcgc gcctctgctg tgtggccagc 600  
cgtgacgccc gcctctgctg gggcagcgc ccggacctca ccgaggaggc catcgggtgt 660  
ggcgtgcagg actggggcac attcgtgtg ggtcccggcc acggcgtgca gctgccctca 720  
ggccgcctgc tggtaaccgc ctacacctac cgcgtggacc gccgagagtg ttttggcaag 780

ES 2 640 755 T3

atctgccgga ccagccctca ctccttcgcc ttctacagcg atgaccacgg ccgcacctgg 840  
 cgctgtggag gccctcgtgcc caacctgcgc tcaggcaggt gccagctggc ggccggtggac 900  
 ggtgggcagg ccggcagctt cctctactgc aatgcccgga gcccaactggg cagccgtgtg 960  
 caggcgctca gcactgacga gggcacctcc ttctgcccg cagagcaggt ggcttccctg 1020  
 cccgagactg cctggggctg ccagggcagc atcgtgggct tccagcccc cgcaccaac 1080  
 aggccacggg atgacagttg gtcagtgggc cccgggagtc cctccagcc tccactctc 1140  
 ggtcctggag tccacgaacc ccagaggag gctgctgtag accccgtgg aggccaggtg 1200  
 cctggggggc ccttcagccg tctgcagcct cggggggatg gccccaggca gcctggcccc 1260  
 aggcctgggg tcagtgggga tgtggggctc tggaccctgg cactcccat gccctttgct 1320  
 gcccccccc agagccccc gtggctgctg tactcccacc cagtggggcg cagggtcctgg 1380  
 ctacacatgg gtatccctt gagccagtc ccgctggacc cgcagcagctg gacagagccc 1440  
 tgggtgatct acgagggccc cagccgctac tccgacctg cgtccatcgg gccgctcct 1500  
 gagggggggc tggttttgc ctgcctgtac gagagcgggg ccaggacctc ctatgatgag 1560  
 aittctttt gtacatttc cctgcgtgag gtcctggaga acgtgcccgc cagccccaag 1620  
 ccgcccaacc ttggggacaa gcctcggggg tgctgctgac cctcctgaca ggccttctgg 1680  
 ccgtgcccc gcccttggg tgctggggc agaggggtgg aatacgttgg ggtgccccac 1740  
 galagctgtg gggggggctc ttagtgcaag atcctgtgga ttagaaacaa gttgctcctc 1800  
 agagctctca agcagggact gctcttagg aagggggagca gcggctggga gtgagcaggg 1860  
 cagggtgggg gcagggtggg ggcacgaagt gggccctggg tgacccccac agctccttc 1920  
 cgaggctgca gggccaggcg cgggaccgca ggtagcccag ggtgtgtgg gtggcagcac 1980  
 ttgttactg gctgcttct ggctcgaat aaaggaatcg tgcttgtgtc gggaaaaaaaa 2040  
 aaaaaaaaa aaa 2053

- <210> 2
- <211> 2119
- <212> ADN
- <213> Homo sapiens
- <400> 2

5

# ES 2 640 755 T3

aacatcttgg cgaggggcat tcacatgcac ccacataaag tgcagaggcc ctttgccacag 60  
 aatcccggca gggggccctc ggcggctctg accctcagcc tgcaccgtga gcgtcctggg 120  
 ccctggccag ggcgaagact ccgaccacag acccttcacc tggtagaggg tccccacca 180  
 gcccatctgc agaacgaccc tgtgggctgg ggccggcccc ctgcatggg ccctcacia 240  
 ccagtctgtc tccatccat gccctgaatc tgccccagg aacctcagt gtcacacca 300  
 cctgtgggc caggtcaagg cactcaaac tggggctctg aggacacggg ggtgcacct 360  
 ccaacaaggg ctgtctggg acagggccag ctgtgaggcc gcagttgacc tcccagaggg 420  
 acacgggtct gctgctccag agacgcggcc ctgccaggag ggctccgtga gtgcacactc 480  
 tctctgggc tccccgggtg cggggcctcc cctggcacag cacagccct cacagcacag 540  
 gccctgctgg gctctagctc tgtatctgtg ctctggcag gccagcacc catcgaatg 600  
 tctgtgctc ctcagggccc agggtgacc ctccccagca cagctgacct gcaggactcc 660  
 tgccagtccc attcacctg gccctgcccc agcctgccc cgcaggactc ctgccagtcc 720  
 cattcacgtc ggctgcccc cagcctgtcc ccgaggact cctgccagtc ccttcacgc 780  
 tggcctgccc ccagcctgtc cccgcaggac tctgccagt cctttcacg ctggcctgcc 840  
 cccagcctgc cattcagag gcagccttg taaccaatgc tcaaatgacc actgcccagg 900  
 ccagaatctc agaggaggcc acaggtcccc ggtatgtct gatggggcag cctccgtggg 960  
 ggatccctgg gccctgaaca cctccttc tcactgtccc tccctccct gcgaaggcca 1020  
 tctcagctg cttctgaaac ctggggcgt gtggtgggaa acaggtaggt cacgtggtt 1080  
 ccaggcttt caagccact gtttcaatc tagagattc acagaaaac cctgttttc 1140  
 agcttctct gaaaagttag atctgccctc aggtgccacc cacttccca gggacaaaag 1200  
 gacggtgtgc cctcctgta acttcattc ttcggtagt gtgaagctga gggcagagtc 1260  
 cacgctggg gacagggtg ccaccgcagc ggccactgcg tcaaccctc gctctctc 1320  
 ccagagacga cctgcgttc gctcaggagc agggctgcca acgcagcggc caccgaccc 1380

ES 2 640 755 T3

aacgctcgct cctcctccca gagacaacct gagctctgct cagaagcggc acctcctcat 1440  
 gctggactca ctcgggccca catgtgccaa gggggcctgg tttggggcc ggcgggtct 1500  
 gcctgatgct cagagggtaa ctggatgctg aaaactgta gtctttctc aactcagggg 1560  
 aatgtttcca gggcacgcca ggctcactc acgcaggcct ccgcgacaac tggtcagcac 1620  
 tgactgaggg tgaagtgaat tcctgaaagc tgagagccag cgcctcaca cgagggctgg 1680  
 gacgtaacaa aagccatca agagtttgc ccagggttt cttgggcctt gaagcatgac 1740  
 gagaccagga cccgtttagg attaaacaag ftttactggg ggtctgaaaa aactccccag 1800  
 gcctccacaa acaagtggag aaggaaactc ccaaactcc atgatttagc agaagacaag 1860  
 ataagggtaa acacctgggc ccatttagat caagtaatt tactgagtct tcagaggaag 1920  
 atcttcagga ccagacctca gttagagatg agaagaattg aatcacgtac gtctttagac 1980  
 gaatgcacac tgacacggag acacagagct tagaagggtg gtaagctctg gaaaaactgt 2040  
 aatctggagt tggctggcg atcatttcca ggcttctcc ctgtaaccag ttacagaaat 2100  
 aaaatccctc ttctcccc 2119

<210> 3  
 <211> 1245  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 3

5

cccacgcgc cggaaatcca gaggaggcca caggctcccg gtaagtctg atggggcagc 60  
 ctccgtgggg gatccctggg ccctgaacac cctccttct cactgtccct cctccccctg 120  
 cgaaggcat cctcagctgc tictgaaacc tggggcctg tgggggaaa cagcccagac 180  
 aggcctgtct caaactctc tactgcaaac tacacacagt ttacgtcgc cagaaagacc 240  
 ccaaatttct attcaaaaag accgtaccag tttcagttcc cgccaacctc aaaggcagag 300  
 acaaaaaggac ggtgtgccc lctgtaact tcatttctc ggtgactgig aagctgaggg 360  
 cagagtccac gctggggac agggctgcca ccgcagcggc cactgagtec aacctcgct 420

10

ES 2 640 755 T3

cctcctcca gagacgacct gcgtccgct caggacaggg gctgccaacg cagcggccac 480  
 cgcacccaac gctcgtcct cctcccagag acaacctgag ctctgctcag aagcggcacc 540  
 tcctcatgct ggactcactc gggcccacat gtgccaaggg ggcctggttt tggggccggc 600  
 gggttctgcc tgatgctcag agggtaactg gatgctgaaa actgtgagtc tttctcaac 660  
 tcaggggaaat gtttccaggg cagcccaggc ctactcagc caggccctcg cgacaactgt 720  
 tcagcactga ctgagggtga agtgaatcc tgaaagctga gagccagcgc cctcacacga 780  
 gggctgggac gtaacaaaag cccatcaaga gttttgccca gggcttctt gggccttgaa 840  
 gcatgacgag accaggacc gtttaggatt aagcaagttt tactgggggt ctgaaaaaac 900  
 tcccaggcc tccacaaaca agtggagaag gaactcccca aacctccatg atttagcaga 960  
 aaacaagata agggtaaaca cctgggcca ttagatcaa gtaaatttac tgagtctca 1020  
 gaggaagatc ttcaggacca aacctcagtt agagatgaga agaattgaat cagtcagtc 1080  
 ttagacgaa tgcacactga cagggagaca cagagcttag aagggtgta agctctggaa 1140  
 aaactgtaat ctggagttgg tctggcagtc atttccaggc ctctccctg taaccagtta 1200  
 cagaaataaa atccctctc tcccaggt aaaaaaaaa aaaaa 1245

5 <210> 4  
 <211> 490  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 4

ccacgcgtcc gctcagagga gggccacaggt cccgcccag acaggctgtt ctcaactc 60  
 tctactgcaa actacacaca gttttacgc gccagaaaga ccccaaitt ctattcaaaa 120  
 agaccgtacc agtttcagtt cccgccaacc tcaaaggcag agacaaaagg acggtgtgct 180  
 cctcctgtaa ctcaattct tcggtgactg tgaagctgag ggcagagtc acgctgggg 240  
 acagggctgc caccgcagcg gccactgagt ccaacctcg ctctctcc cagagatgac 300  
 ctgcgtccg ctcagggaca gggctgcca cgcagcggcc accgaccca acgctcctc 360  
 ctctcccag agacaacctg agctctgctc agaagcggca cctctcatg ctggactcac 420  
 tcgggccac atgtgccaag ggggctggt tttggggccg gcgggttctg cctgatgctc 480  
 agagggtaac 490

15 <210> 5  
 <211> 527  
 <212> ADN

ES 2 640 755 T3

<213> Homo sapiens  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (495)\_(495)  
 <223> n is a, c, g, o t  
 <400> 5

cccacgcgtc gccacgcgt ccggaatctc agaggaggcc acagggtccc ggtaagttct 60  
 gatggggcag cctccgtggg ggatccctgg gccctgaaca cctctcttc tcactgtccc 120  
 tcctccct gcgaaggca tctcagctg cttctgaaac ctggggcgct gtggtgggaa 180  
 acagcccaga caggctgttc tcaacactct ctactgcaaa ctacacacag tttacgtcg 240  
 ccagaaagac cccaaatttc tattcaaaa gaccgtacca gtttcagttc ccgccaacct 300  
 caaaggcaga gacaaaagga cgggtgtccc ctccctgtaa cttcatttct tgggtgactg 360  
 tgaagctgag ggccagagtc acgcctgggg acagggtctc caccgcagcg gccactgagt 420  
 ccaacctctg ctctctctcc cagagacgac ctgcgttccg ctcaaggaca gggctgccaa 480  
 cgcagcggcc accgnacca acgctcgtc ctctcccag agacaac 527

10 <210> 6  
 <211> 946  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 6

15 ctcagaggag gccacaggtc cccgccaga caggctgttc tcaacactct ctactgcaaa 60  
 ctacacacag tttacgtcg ccagaaagac cccaaatttc tattcaaaa gaccgtacca 120  
 gtttcagttc ccgccaacct caaaggcaga gacaaaagga cgggtgtccc ctctgtaac 180

ES 2 640 755 T3

ttcatttctt cggtgactgt gaagctgagg gcagagtcca cgctgggga cagggctgcc 240  
 accgcagcgg ccaactgagtc caacctctgc tectctccc agagacgacc tgcgttccgc 300  
 tcagggacag ggctgccaac gcagcggcca ccgcacccaa cgctcgtcc tcctcccaga 360  
 gacaacctga gctctgctca gaagcggcac ctctcatgc tggactcact cgggcccaca 420  
 tgtccaagg gggcctggtt ttggggccgg cgggttctgc ctgatgctca gagggtaact 480  
 ggatgctgaa aactgtgagt ctttctcaa ctgagggaa tgtttccagg gcacgccagg 540  
 cctcactcac gcaggcctcc gcgacaactg ttcagcactg actgagggtg aagtgaatc 600  
 ctgaaagctg agagccagcg cctccacacg agggcttga ccgtaacaaa agccatcaag 660  
 agtatgcca gggcttctt gggcctfag catgacgaga ccaggaccgg ttaggatcac 720  
 ggcagtact gcgggtctga aaaactccca ggctcacaac agtgggcaca ggaatcccaa 780  
 gatcctccag gatttgcgc aaacacacgc atcagtggaac acaccggggg ccattgact 840  
 caggacactc cgagacctga gatgaaaact ctgggcacaa acccgtatga agcagacaaa 900  
 gtacacgcgc gctaagacag gacgctgaca ggaacacaca gggctgc 946

<210> 7  
 <211> 703  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 7

5

ctgagcagag gccacaggtc cccggtcadc ctcaactgct tctgaaacct ggggcgctgt 60  
 ggtgggaaac agcccagaca ggctgtctc aacactctct actgcaact acacacagtt 120  
 ttacgtgcc agaaagacc caaattcta ttacataaa gaccgatacc acgatttcaa 180  
 gttccagcc gaaccgtcaa taggcagagg acaaagagga cgagtgtgcc ccatcctgta 240  
 actttactt tcttcaggt gacctgatga acggccatga cggcgacga cggfccaacc 300  
 gccatggggg aacagggtca tgccagccga catgccgagc cagctgagct ccaaatccct 360  
 cgacatcctg cactcgcga gaaagaacga accgttgcg ctatccggcc atcaagggtc 420

10

# ES 2 640 755 T3

```

acacgcgccc ctgtccagaa cgcacacgcc gcgggccagc ccggcacccc caagagaccg 480
ccttcggtca ttctcgtccc gttctccat gaaagaagca gagcccgttg gaatggcctt 540
ccctggccat tcaaggcaac aaggcgcgtg gtccaccctt ttcgctcca attgcccttg 600
gcgacacctt tacaaccgtt tccggagctg gccccaagc cacttggttg cccccaacg 660
cgcgggagcc ccttggcgct tttaaagggc acacgcgcac ccg 703

```

```

5 <210> 8
  <211> 20
  <212> ADN
  <213> Secuencia artificial
  <220>
  <223> Oligonucleótido antisentido
10 <400> 8
  ggtctgtgg tcggagtctt 20
  <210> 9
  <211> 20
  <212> ADN
  <213> Secuencia artificial
15 <220>
  <223> Oligonucleótido antisentido
  <400> 9
  ggcagattca gggcatggga 20
  <210> 10
20 <211> 21
  <212> ADN
  <213> Secuencia artificial
  <220>
  <223> Oligonucleótido antisentido
25 <400> 10
  gacctacctg ttcccacca c 21
  <210> 11
  <211> 20
  <212> ADN
30 <213> Secuencia artificial
  <220>
  <223> Oligonucleótido antisentido
  <400> 11
35 tgtcccagca cagccctgt 20

```

## REIVINDICACIONES

1. Un oligonucleótido dirigido a un transcrito antisentido natural del gen de la Sialidasa 4 (NEU4) para su uso como un compuesto terapéutico, donde el oligonucleótido aumenta la expresión del gen de la Sialidasa 4 (NEU4).  
5
2. Un oligonucleótido dirigido a un transcrito antisentido natural del gen de la Sialidasa 4 (NEU4) para su uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado con el gen de la Sialidasa 4 (NEU4), donde dicho oligonucleótido aumenta la expresión del gen de la Sialidasa 4 (NEU4).  
10
3. Uso de un oligonucleótido dirigido a un transcrito antisentido natural del gen de la Sialidasa 4 (NEU4) para la fabricación de un medicamento para su uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado con el gen de la Sialidasa 4 (NEU4), donde dicho oligonucleótido aumenta la expresión del gen de la Sialidasa 4 (NEU4).  
15
4. El oligonucleótido para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, o el uso de acuerdo con la reivindicación 3, donde la enfermedad o el trastorno se selecciona del grupo formado por enfermedad de Tay Sachs, trastorno por almacenamiento lisosómico, mucopolisacaridosis, enfermedad o trastorno asociado con anomalías en la función y/o expresión de la Sialidasa, cáncer, cáncer de colon, enfermedad o trastorno proliferativo; apoptosis, enfermedad o trastorno asociado con trastornos de la regulación de la apoptosis, enfermedad de hígado graso, enfermedad asociada con trastorno o afección que altere el metabolismo del colesterol, enfermedad o trastorno neurológico y enfermedad o trastorno asociado con alteraciones de la desialización de glicoproteínas.  
20
5. Un procedimiento *in vitro* para aumentar la expresión del gen de la Sialidasa 4 (NEU4) en células o tejidos del paciente que comprende: poner en contacto dichas células o tejidos con un oligonucleótido dirigido a un transcrito antisentido natural del gen de la Sialidasa 4 (NEU4); aumentando así la expresión del gen de la Sialidasa 4 (NEU4).  
25
6. El oligonucleótido para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 4, o el uso de acuerdo con la reivindicación 3 o la reivindicación 4, o el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, donde el transcrito antisentido natural tiene la secuencia de ácido nucleico, tal como se expone en una de las SEQ ID NO: 2 al 7.  
30
7. El oligonucleótido para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4 o 6, o para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3, 4 o 6, o el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5 o la reivindicación 6, donde el oligonucleótido es un compuesto de ARNip.  
35
8. El oligonucleótido para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4, 6 o 7, o para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3, 4, 6 o 7, o el procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 5 a 7, donde el oligonucleótido comprende la SEQ ID NO: 9.  
40
9. El oligonucleótido para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4, 6 a 8, o para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3, 4, 6 a 8, o el procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 5 a 8, donde la expresión del gen de la Sialidasa 4 (NEU4) aumenta al menos un 10 %.  
45
10. El oligonucleótido para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4, 6 a 9, o para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3, 4, 6 a 9, o el procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 5 a 9, donde el oligonucleótido además comprende una o más modificaciones que comprenden:  
50
  - 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, acetamidato, un éster carboximetílico, y combinaciones de los mismos;
  - b. al menos un nucleótido modificado seleccionado de entre: un ácido nucleico peptídico (PNA), un ácido nucleico bloqueado (LNA), un ácido arabino-nucleico, un análogo, un derivado, y combinaciones de los mismos; o
  - c. al menos un resto de azúcar modificado seleccionado de entre: un resto de azúcar modificado con 2'-O-metoxietilo, un resto de azúcar modificado con 2'-metoxi, un resto de azúcar modificado con 2'-O-alquilo, un resto de azúcar bicíclico, y combinaciones de los mismos.  
55
11. Un oligonucleótido que se dirige a un transcrito antisentido natural del gen de la Sialidasa 4 (NEU4), donde el oligonucleótido aumenta la expresión de un gen de la Sialidasa 4 (NEU4), y donde el transcrito antisentido  
60

natural tiene la secuencia de ácido nucleico tal como se expone en una de las SEQ ID NO: 2 al 7.

12. El oligonucleótido acuerdo con la reivindicación 11, donde el oligonucleótido es monocatenario o donde el oligonucleótido es un compuesto de ARNip.
- 5
13. El oligonucleótido acuerdo con la reivindicación 11 o la reivindicación 12, donde el oligonucleótido comprende la SEQ ID NO: 9.
14. El oligonucleótido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, donde la expresión del gen de la Sialidasa 4 (NEU4) aumenta al menos en un 10 %.
- 10
15. El oligonucleótido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, donde el oligonucleótido además comprende una o más modificaciones, compuestas por:
- 15 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, acetamidato, un éster carboximetílico, y combinaciones de los mismos;
- b. al menos un nucleótido modificado seleccionado de entre: un ácido nucleico peptídico (PNA), un ácido nucleico bloqueado (LNA), un ácido arabino-nucleico, un análogo, un derivado, y combinaciones de los mismos; o
- 20 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. El oligonucleótido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15, donde el oligonucleótido tiene entre 10 a 30 nucleótidos de longitud.
- 25
17. El oligonucleótido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 16, donde el oligonucleótido tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con un transcrito antisentido natural complementario del gen de la Sialidasa 4 (NEU4).
- 30
18. Una composición farmacéutica que comprende un oligonucleótido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 17, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Figura 1

