

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 653 247**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.06.2012 PCT/US2012/041484**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.12.2012 WO12170771**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.06.2012 E 12797228 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.08.2017 EP 2718439**

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

30 Prioridad:

09.06.2011 US 201161494928 P

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

06.02.2018

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 2 653 247 T3

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

DESCRIPCIÓN

Tratamiento de enfermedades relacionadas con la frataxina (FXN) mediante inhibición del transcrito antisentido natural al gen FXN

5

CAMPO DE LA DIVULGACIÓN

La presente solicitud reivindica la prioridad de la solicitud de patente provisional de Estados Unidos n.º 61/494,928, depositada el 9 de junio de 2011.

10

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

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

15

La hibridación ADN-ARN y ARN-ARN ES importante para muchos aspectos de la función del ácido nucleico, incluyendo la 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.

20

25

El documento WO2004/048511 describe un grupo bioinformáticamente detectable de genes virales regulatorios y usos de los mismos.

El documento US2010/035983 describe polimorfismos genéticos asociados a enfermedades cardiovasculares, métodos de detección y usos de los mismos.

30

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

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

35

RESUMEN DE LA DIVULGACIÓN

Este resumen se proporciona para presentar un resumen de la divulgación que indique 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.

40

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 puede conseguirse mediante siRNA, ribozimas y moléculas pequeñas, que se considera que están dentro del alcance de la presente divulgación.

45

Un aspecto proporciona un procedimiento de modulación de la función y/o la expresión de un polinucleótido de FXN en células o tejidos del paciente *in vivo* o *in vitro* que comprende poner en contacto dichas células o tejidos con un oligonucleótido antisentido de 5 a 30 nucleótidos de longitud, donde dicho oligonucleótido tiene al menos un 50% de identidad de secuencia con un complemento inverso de un polinucleótido que comprende de 5 a 30 nucleótidos consecutivos dentro de los nucleótidos 1 a 454 de la SEQ ID NO: 2 modulando de este modo la función y/o la expresión del polinucleótido de FXN en células o tejidos del paciente *in vivo* o *in vitro*.

50

En un aspecto, un oligonucleótido se dirige a una secuencia antisentido natural de polinucleótidos de FXN, por ejemplo, nucleótidos expuestos en la SEQ ID NO: 2, y cualquier variante, alelo, homólogo, mutante, derivado, fragmento y secuencia complementaria a los mismos. Ejemplos de oligonucleótidos antisentido se exponen como las SEQ ID NOS: 3 al 6.

55

Otro aspecto proporciona un procedimiento de modulación de la función y/o la expresión de un polinucleótido de

60

FXN 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 de FXN, modulando de este modo la función y/o la expresión del polinucleótido de FXN en células o tejidos del paciente in vivo o in vitro.

5

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

10

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

15 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 nucleico bloqueado (LNA). Preferentemente, los nucleótidos modificados son moléculas de ácido nucleico bloqueado, que incluyen α -L-LNA.

20

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

25

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.

30

En un aspecto, los oligonucleótidos están encapsulados en un liposoma o unidos a una molécula portadora (por ejemplo, colesterol, péptido TAT). En cada uno de los aspectos, los métodos y las composiciones incluyen la administración de oligonucleótidos a un sistema biológico.

35

Otros aspectos se describen más adelante.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

40 Figura 1: Regulación positiva de ARNm del gen FXN mediante dosificación de células HepG2 con oligonucleótidos antisentido dirigidos al transcrito antisentido natural específico de la FXN. La línea celular del hepatoma HepG2 se dosificó con oligonucleótidos antisentido diferentes dirigidos al transcrito antisentido natural específico de la FXN (CUR-0732, CUR-0733, CUR-0734 y CUR-0735) en una concentración de 20 nM. Tras 48 h de dosificación, se cuantificó el ARNm del gen FXN mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR)-transcripción inversa (RT). El cambio de expresión relativo del ARNm del gen FXN debido al tratamiento con oligonucleótidos se calculó en base a valores normalizados diferentes contra 18S entre células dosificadas (oligonucleótido CUR añadido a las células) y simuladas (oligonucleótido no específico añadido a las células). Las barras indicadas como CUR-0732, CUR-0733, CUR-0734 y CUR-0735 corresponden a muestras tratadas con las SEQ ID NO: 3 a 6 respectivamente.

45

50 Figura 2: Regulación positiva de ARNm del gen FXN mediante dosificación de células CHP-212 con oligonucleótidos antisentido dirigidos al transcrito antisentido natural específico de la FXN. La línea celular del neuroblastoma CHP-212 se dosificó con oligonucleótidos antisentido diferentes dirigidos al transcrito antisentido natural específico de la FXN (CUR-0732, CUR-0733, CUR-0734 y CUR-0735) en una concentración de 20 nM. Tras 48 h de dosificación, se cuantificó el ARNm del gen FXN mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR)-transcripción inversa (RT). El cambio de expresión relativo del ARNm del gen FXN debido al tratamiento con oligonucleótidos se calculó en base a valores normalizados diferentes contra 18S entre células dosificadas (oligonucleótido CUR añadido a las células) y simuladas (oligonucleótido no específico añadido a las células). Las barras indicadas como CUR-0732, CUR-0733, CUR-0734 y CUR-0735 corresponden a muestras tratadas con las SEQ ID NO: 3 a 6 respectivamente.

55

60 Figura 3: Regulación positiva de ARNm del gen FXN mediante dosificación de la línea celular del fibroblasto del

- paciente GM03816 con oligonucleótidos antisentido dirigidos al transcrito antisentido natural específico de la FXN. La línea celular del fibroblasto del paciente GM03816 se dosificó con oligonucleótidos antisentido diferentes dirigidos al transcrito antisentido natural específico de la FXN (CUR-0732, CUR-0733, CUR-0734 y CUR-0735) en una concentración de 20 nM. Tras 48 h de dosificación, se cuantificó el ARNm del gen FXN mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR)-transcripción inversa (RT). El cambio de expresión relativo del ARNm de FXN debido al tratamiento con nucleótidos se calculó en base a valores diferentes normalizados contra beta-actina entre células dosificadas (oligonucleótido CUR añadido a las células) y simuladas (oligonucleótido no específico añadido a las células). Las barras indicadas como CUR-0732, CUR-0733, CUR-0734 y CUR-0735 corresponden a muestras tratadas con las SEQ ID NO: 3 a 6 respectivamente.
- 10 Figura 4: Regulación positiva de ARNm del gen FXN mediante dosificación de la línea celular del linfoblasto del paciente GM15850 con oligonucleótidos antisentido dirigidos al transcrito antisentido natural específico de la FXN. La línea celular del linfoblasto del paciente GM15850 se dosificó con oligonucleótidos antisentido diferentes dirigidos al transcrito antisentido natural específico de la FXN (CUR-0732, CUR-0733, CUR-0734 y CUR-0735) en una concentración de 20 nM. Tras 48 h de dosificación, se cuantificó el ARNm del gen FXN mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR)-transcripción inversa (RT). El cambio de expresión relativo del ARNm del gen FXN debido al tratamiento con oligonucleótidos se calculó en base a valores normalizados diferentes contra 18S entre células dosificadas (oligonucleótido CUR añadido a las células) y simuladas (oligonucleótido no específico añadido a las células). Las barras indicadas como CUR-0732, CUR-0733, CUR-0734 y CUR-0735 corresponden a muestras tratadas con las SEQ ID NO: 3 a 6 respectivamente.
- 20 Figura 5: Regulación positiva de ARNm del gen FXN mediante dosificación de la línea celular del linfoblasto del paciente GM15850 con oligonucleótidos antisentido dirigidos al transcrito antisentido natural específico de la FXN. La línea celular del linfoblasto del paciente GM15850 se dosificó con oligonucleótidos antisentido diferentes dirigidos al transcrito antisentido natural específico de la FXN (CUR-0732, CUR-0734) en una concentración de 20 nM. Tras 48 h de dosificación, se cuantificó el ARNm del gen FXN mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR)-transcripción inversa (RT). El cambio de expresión relativo del ARNm de FXN debido al tratamiento con nucleótidos se calculó en base a valores diferentes normalizados contra beta-actina entre células dosificadas (oligonucleótido CUR añadido a las células) y simuladas (oligonucleótido no específico añadido a las células). Las barras indicadas como CUR-0732 y CUR-0734 corresponden a muestras tratadas con las SEQ ID NO: 3 y 5 respectivamente. 18S y beta-actina son controles estándar para la PCR en tiempo real.
- 30 Descripción del listado de secuencias: SEQ ID NO: 1: Frataxina humana (FXN), gen nuclear que codifica proteína mitocondrial, variante de transcrito 2, ARNm (n.º de acceso NCBI: NM_181425); SEQ ID NO: 2: Secuencia antisentido natural de FXN (AI951739); SEQ ID NO: 3 al 6: Oligonucleótidos antisentido

35 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.
- 45 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
- 55 ácidos nucleicos son humanos.

Definiciones

- La terminología usada en el presente documento es con el fin de describir aspectos particulares solamente y no pretende ser limitante de la divulgación. Tal como se usan en la presente, se pretende que las formas en singular

“un”, “una”, “el” y “la” incluyan también las formas plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Además, siempre que las expresiones "que incluye", "incluyen", "que tiene", "tiene", "con", o variantes de los mismos se usan en la descripción detallada y/o las reivindicaciones, dichas expresiones pretenden ser inclusivas de una manera similar a la expresión "que comprende."

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 pueden significar un orden de magnitud de un valor preferentemente comprendido en 5 veces y más preferentemente, comprendido en 2 veces. En los casos en los que se describen valores particulares en la solicitud y las reivindicaciones, a menos que se exprese lo contrario, el término «alrededor de» significa que se debe asumir que el valor se encuentra comprendido en un intervalo de error aceptable para el valor particular.

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 ADN que se une a otro ARN o ADN (ARN, ADN diana). Por ejemplo, si es un oligonucleótido de ARN, se une a otra diana de ARN por medio de interacciones ARN-ARN y altera la actividad del ARN diana. Un oligonucleótido antisentido puede regular 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, siRNA, ARN enzimático, ARN de edición terapéutica y ARN agonista y antagonista, compuestos oligoméricos antisentido, oligonucleótidos antisentido, oligonucleótidos de secuencia guía externa (EGS), agentes de splicing alternativos, cebadores, sondas y otros compuestos oligoméricos que hibridan con al menos una parte del ácido nucleico diana. Por lo tanto, estos compuestos pueden introducirse en forma de compuestos oligoméricos monocatenarios, bicatenarios, parcialmente monocatenarios, o circulares.

En el contexto de esta divulgación, el término "oligonucleótido" se refiere a un oligómero o polímero de ácido ribonucleico (ARN) o 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.

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, "FXN" y "frataxina" son incluyentes de todos los miembros de la familia, mutantes, alelos, fragmentos, especies, secuencias codificadoras y no codificadoras, cadenas de polinucleótido sentido y antisentido, etc.

- 5 Tal y como se usan en el presente documento, las palabras 'frataxina', FXN, FA, CyaY, FARR, FRDA, MGC57199 y X25, se consideran 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 de la" 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. El término "no específico" se usa en el contexto de controles simulados que no son específicos para el transcrito antisentido natural diana o el ácido nucleico diana. Los controles de oligonucleótidos también se pueden denominar "no relevantes". Los oligonucleótidos "no relevantes" tendrán una secuencia codificada y serán similares en longitud al oligonucleótido comparativo. Los experimentos también se pueden realizar sin un oligonucleótido de control como control negativo para un efecto no funcional de la FXN. Este último experimento se denomina sin transfección o transfección simulada en los experimentos con células.

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

La interferencia de ARN "iARN" está mediada por moléculas de ARN bicatenario (dsARN) que tienen homología específica de secuencia con sus secuencias de ácido nucleico "diana". En ciertos aspectos de la presente divulgación, los mediadores son dúplex de ARN "de interferencia pequeño" (siRNA) de 5-25 nucleótidos. Los ARNip se derivan a partir del procesamiento del ARNdc mediante una enzima conocida como Dicer. Los productos dúplex de siRNA 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.

60

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
 5 ácido nucleico enzimático reconoce primero y luego se une a un ARN diana mediante apareamiento de bases, y una vez unido al sitio correcto, actúa enzimáticamente para cortar el ARN diana.

Por "ARN señuelo" se indica una molécula de ARN que imita el dominio de unión natural para un ligando. El ARN señuelo compite, por lo tanto, con la diana de unión natural para la unión de un ligando específico. Por ejemplo, se
 10 ha demostrado 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 así 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.

15 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,
 20 fosforoselenoato, fosforamidato y similares, tal como se describe más completamente más adelante.

El término "nucleótido" cubre nucleótidos de origen natural, así como nucleótidos de origen no 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
 25 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, pseudoisocitosina, 2-hidroxi-5-metil-4-triazolopiridina, isocitosina, isoguanina, inosina y
 30 los nucleótidos "de origen no natural" descritos en Benner y col., patente de Estados Unidos 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,
 35 tal y como se describe en Kornberg and Baker, DNA Replication, 2nd Ed. (Freeman, San Francisco, 1992), además de sus análogos.

"Análogos", en referencia a nucleótidos, incluye nucleótidos sintéticos que tienen restos de bases modificados y/o restos de azúcar modificados (véase, por ejemplo, descrito generalmente por Scheit, Nucleotide Analogs, John
 40 Wiley, New York, 1980; Freier & Altmann, (1997) Nucl. Acid. Res., 25(22), 4429- 4443; Toulmé, J.J., (2001) Nature Biotechnology 19:17-18; Manoharan M., (1999) Biochemica et Biophysica Acta 1489:117-139; Freier S. M., (1997) Nucleic Acid Research, 25:4429-4443, Uhlman, E., (2000) Drug Discovery & Development, 3: 203-213, Herdewin P., (2000) Antisense & Nucleic Acid Drug Dev., 10:297-310); 2'-O, 3'-C-linked [3.2.0] bicycloarabinonucleosides. Dichos análogos incluyen nucleótidos sintéticos diseñados para potenciar propiedades de unión, por ejemplo, la estabilidad
 45 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
 50 de nucleósidos o de nucleótidos (nucleótidos) complementarias de las cadenas de compuestos oligoméricos. Por ejemplo, la adenina y la timina son nucleótidos complementarios que se aparean mediante la formación de puentes de hidrógeno. La hibridación puede producirse en circunstancias variables.

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

60

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

15 "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 ejemplo, por el programa Gap (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison Wis.), usando parámetros por defecto, que usa el algoritmo de Smith and Waterman (Adv. . Math., (1981) 2, 482-489).

50 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "punto de fusión térmico (T_m)" se refiere a la temperatura, bajo fuerza iónica, pH y concentración de ácido nucleico definidas, a la que el 50 % de los oligonucleótidos complementarios a la secuencia diana hibridan con la secuencia diana en equilibrio. Normalmente, condiciones astringentes serán aquellas en las que la concentración de sales es la concentración de ion Na (u otras sales) de al menos aproximadamente 0,01 a 1,0 M a pH de 7,0 a 8,3 y la temperatura es al menos aproximadamente 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.

60

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 alternativo de exones durante el procesamiento de ARNm. El polipéptido correspondiente puede poseer dominios funcionales adicionales o una ausencia de dominios. Las variantes de especie son secuencias de polinucleótidos que varían de una especie a otra. Son de particular utilidad en la divulgación de productos génicos de tipo silvestre (wild type). Las variantes pueden resultar de al menos una mutación en la secuencia de ácidos nucleicos y pueden producir ARNm alterados o polipéptidos cuya estructura o función puede o puede no alterarse. Cualquier gen natural o recombinante dado puede tener ninguna, una o muchas formas alélicas. Cambios mutacionales comunes que dan lugar a variantes se atribuyen generalmente a deleciones, adiciones o sustituciones naturales de nucleótidos. Cada uno de estos tipos de cambios puede producirse solo, o en combinación con los otros, una o más veces en una secuencia dada.

15 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.

30 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.

35 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.).

50 Tal como se usa en el presente documento, "cáncer" se refiere a todo tipo de cáncer o neoplasia o tumores malignos descubiertos en mamíferos, incluyendo, aunque sin limitarse a: leucemias, linfomas, melanomas, carcinomas y sarcomas. El propio cáncer se manifiesta como un "tumor" o tejido que comprende células malignas del cáncer. Los ejemplos de tumores incluyen sarcomas y carcinomas como tales, pero no limitado a: fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomioma, rhabdomioma, carcinoma de colon, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer ovárico, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándula sudorípara, carcinoma de glándula sebácea, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de conductos biliares, coriocarcinoma,

seminoma, carcinoma embrional, tumor de Wilms, cáncer cervical, tumor testicular, carcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón de células pequeñas, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma, y retinoblastoma. 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, insulanoma 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, 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 involucran al sistema nervioso central (cerebro, tronco encefálico y cerebelo), al 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 caloso; agnosia; síndrome de Aicardi; enfermedad de Alexander; enfermedad de Alpers; hemiplejia alternante; enfermedad de Alzheimer; demencia vascular; esclerosis lateral amiotrófica; anencefalia; síndrome de Angelman; angiomatosis; anoxemia; afasia; apraxia; quistes aracnoides; aracnoiditis; malformación de Anroni-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 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; mielinólisis 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 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 De Morsier; parálisis de Dejerine-Klumke; 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 inclusión celular gigante; leucodistrofia de células globoides; síndrome de Guillain-Barré; mielopatía asociada al Httv-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; hidrocefalia; hipercortisolismo; hipoxia; encefalomiелitis mediada por inmunidad; miositis del cuerpo de inclusión; incontinencia 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 Kinsbourne; síndrome de Klippel Feil; enfermedad de Krabbe; enfermedad de Kugelberg-Welander; kuru; enfermedad de Lafora; síndrome miasténico de Lambert-Eaton; síndrome de Landau-Kleffner; síndrome medular lateral (Wallenberg); 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 enfermedad de Meniere; meningitis; enfermedad de Menkes; leucodistrofia metacromática; microcefalia; migraña; síndrome de Miller Fisher; mini-trazos; miopatías mitocondriales; síndrome de Mobius; amiotrofia monomélica; enfermedad de las neuronas motoras; enfermedad de Moyamoya; mucopolisacaridosis; demencia de infarto múltiple; neuropatía motora multifocal; esclerosis múltiple y otros trastornos desmielinizantes; atrofia de múltiples sistemas con hipotensión postural; distrofia muscular; miastenia gravis; esclerosis difusa mielinoclastica; encefalopatía mioclónica de lactantes; mioclono;

- miopatía; miotonía congénita; narcolepsia; neurofibromatosis; síndrome neuroléptico maligno; manifestaciones neurológicas del sida; secuelas neurológicas del lupus; neuromiotonía; lipofuscinosis cerioide 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 mioclonos; neuritis óptica;
- 5 hipotensión ortostática; síndrome de sobreuso; 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
- 10 vegetativo persistente; trastornos profundos del desarrollo; reflejo estornudo 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; poliostrosis esclerosante progresiva; parálisis supranuclear progresiva; pseudotumor cerebral;
- 15 síndrome de Ramsay-Hunt (tipos I y II); encefalitis de Rasmussen; síndrome de distrofia simpática refleja; enfermedad de Refsum; trastornos del movimiento repetitivo; lesiones por 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;
- 20 lesión de la médula espinal; tumores de la médula espinal; atrofia muscular en la 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;
- 25 lesión cerebral traumática; temblor; neuralgia trigeminal; 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. La ataxia de Friedreich es la enfermedad preferida para su tratamiento con los oligonucleótidos de la divulgación.
- 30 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 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,
- 35 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 Waldenström (MW). Formas adicionales de linfomas malignos incluyen, pero no se limitan a, linfoma no Hodgkin y 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-
- 40 Sternberg.

Composiciones y moléculas de polinucleótidos y oligonucleótidos

- Dianas:* En un aspecto, las dianas comprenden secuencias de ácido nucleico de frataxina (FXN), incluyendo sin
- 45 limitación secuencias no codificantes y/o codificantes, sentido y/o antisentido asociadas al gen FXN.

La frataxina FXN es un gen nuclear que codifica una proteína mitocondrial que pertenece a la familia FRAXINA. La proteína funciona regulando el transporte del hierro y la respiración mitocondrial. La expansión de la repetición del trinucleótido GAA intrónica produce la ataxia de Friedreich. Se produce splicing alternativo en este locus y se han

50 identificado dos variantes de transcrito que codifican isoformas diferentes.

Los defectos en la frataxina son la causa de la ataxia de Friedreich (FRDA). La FRDA es una enfermedad degenerativa progresiva, autosómica y recesiva caracterizada por neurodegeneración y cardiomiopatía y es la ataxia hereditaria más común. Normalmente, el trastorno se manifiesta antes de la adolescencia y, generalmente, se

55 caracteriza por falta de coordinación del movimiento en las extremidades, disartria, nistagmus, disminución o ausencia de los reflejos del tendón, signo de Babinski, deterioro del sentido de la posición y del sentido vibratorio, escoliosis, pie cavo y dedo en martillo. En la mayoría de pacientes, la FRDA es debida a expansiones de la repetición del triplete GAA en el primer intrón del gen frataxina, pero en algunos casos, la enfermedad se debe a mutaciones en la región codificante.

60

La ataxia de Freidreich (FRDA) es la ataxia recesiva autosómica más común, con una incidencia de 1:50 000. Al igual que las ataxias espinocerebelares autosómicas dominantes, el principal signo clínico de la enfermedad es la pérdida de coordinación y la inestabilidad de la marcha. Sin embargo, la cardiomiopatía hipertrófica y la resistencia a la insulina también son habituales en la FRDA.

5

Normalmente, la FRDA es provocada por la herencia de dos alelos expandidos de la repetición del triplete (GAA)_n en el primer intrón del gen frataxina. Se piensa que las expansiones inhiben parcialmente la etapa de elongación de la transcripción o condensan la estructura de la cromatina y, por tanto, reducen la expresión de la proteína frataxina. Tanto la severidad de la FRDA como la edad de aparición están directamente relacionadas con el tamaño de la expansión de GAA más pequeña.

10

Se piensa que la frataxina apoya la biogénesis de los clústeres hierro-azufre, ya que su deficiencia afecta específicamente a enzimas del clúster hierro-azufre y porque interactúa con la ISCU, que se piensa que es la matriz principal sobre la que se construyen los clústeres hierro-azufre. Estudios in vitro han probado que la frataxina interactúa con el clúster hierro-azufre que contiene las enzimas mitocondriales aconitasa y ferroquelatasa (una proteína ISC de los mamíferos), mientras que en levaduras y *Caenorhabditis elegans* interactúa con la succinato deshidrogenasa. La disminución de la expresión del mensaje de la frataxina provoca una disminución de la maduración de las proteínas del clúster hierro-azufre. El análisis de microarrays de células humanas ha mostrado que la depleción de la frataxina afecta preferentemente a transcritos relacionados con el clúster hierro-azufre.

15

La Tabla 1 muestra un ejemplo de proteínas mitocondriales asociadas a la frataxina humana.

Tabla 1:

Proteína identificada	Abreviatura	Total	MW	N.º de acceso
Mortalina, GRP75, hsp70 9B	HSPA9B/GRP75	12	73,6	24234688
isdll/cromosoma 6 orf 149	C6orf149/ISD11	1	10,8	38570053
ATP sintasa, FO subunidad G	ATP5L	1	11,4	51479156
hsp 60, GroEL, SPG13	HSPD1	5	61,2	77702086
Familia ATPasa, dominio AAA	ATAD3A	3	72,5	42476028
Preproteína isoforma 1 de la frataxina	FRATAXINA	1	23,1	31077081
Succinato deshidrogenasa A	SDHA	1	70,9	4759808
Gen de la familia ATPasa AFG3-similar a 2	AFG3L1	1	88,5	5802970

En uno de los aspectos, se usan oligonucleótidos antisentido para prevenir o tratar enfermedades o trastornos asociados a la expresión y/o función anómalas de la frataxina. Esto incluye todas las formas de las moléculas de frataxina, incluyendo mutantes y expresión o función aberrantes de moléculas de frataxina normales o anómalas.

Una amplia gama de enfermedades o trastornos se puede atribuir a la expresión o función anómalas de la frataxina en forma de asociados de frataxina con múltiples proteínas mitocondriales y otras moléculas fisiológicamente importantes, tales como, por ejemplo, biogénesis y reparación de clústeres hierro-azufre, transporte y metabolismo del hierro y acción antioxidativa. La frataxina también interactúa con la chaperona mitocondrial GRP75/mortalina; la chaperona mitocondrial HSP60. HSP60 es un conocido interactivo del GRP75 y junto con el HSPIO forma un complejo de chaperonina mitocondrial.

30

La frataxina también interactúa con la succinato deshidrogenasa, que es un complejo enzimático integrado en la membrana interna de la matriz mitocondrial, interactuando con la matriz pero no con el espacio intermembrana.

La frataxina interactúa con un ortólogo de la ISD11 que se ha demostrado que es un componente del complejo de la biogénesis de hierro-azufre Nfs IIISeD eucariótico. Por tanto, cualquier deficiencia (por ejemplo, expresión, función) de frataxina afectaría a multitud de procesos intracelulares.

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.

35

En un aspecto, se utilizan oligonucleótidos antisentido para prevenir o tratar enfermedades o trastornos asociados con los miembros de la familia FXN. Las enfermedades y los trastornos mediados por frataxina (FXN) ejemplares que se pueden tratar con células/tejidos regenerados a partir de células madre obtenidas usando los compuestos antisentido comprenden: una enfermedad o un trastorno asociados a la función y/o expresión anómalas de la FXN, ataxia de Freidreich, síndrome de Leigh, cáncer, una enfermedad o un trastorno proliferativos, proliferación celular anómala, una enfermedad o un trastorno neurológicos, una enfermedad o un trastorno asociados a una función mitocondrial deficiente, una enfermedad o un trastorno neurodegenerativos causados por disfunción mitocondrial adquirida, una enfermedad o un trastorno asociados al estrés oxidativo, inflamación y una enfermedad o un trastorno autoinmunes.

En un aspecto, la modulación de FXN 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 la FXN en comparación con un control normal.

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

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

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 FXN, 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. La molécula de ácido nucleico diana se encuentra en "sistemas biológicos" en sí y la presente divulgación incluye el tratamiento de tales sistemas biológicos con el oligonucleótido de la divulgación. El término "sistema o sistemas biológicos", en general, incluye pacientes y/o otros organismos vivos así como células y/o modelos celulares usados para monitorizar la expresión de la proteína diana. Los oligonucleótidos de la divulgación son útiles in vivo e in vitro.

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.

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

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

Un compuesto antisentido, ya sea ADN, ARN, quimérico, sustituido, etc., es específicamente hibridable cuando la unión del compuesto a la molécula de ADN o de ARN diana interfiere en la función normal del ADN o ARN diana para producir una pérdida de utilidad, y hay un grado de complementariedad suficiente para evitar la unión

inespecífica del compuesto antisentido a secuencias no diana en condiciones en las que se desea la unión específica, es decir, en condiciones fisiológicas en el caso de ensayos in vivo o tratamiento terapéutico, y en el caso de ensayos in vitro, en condiciones en las que se realizan los ensayos.

5 En un aspecto, la elección como diana del gen FXN, incluyendo sin limitación, secuencias antisentido que se identifican y se expanden, usando, por ejemplo, PCR, hibridación etc., una o más de las secuencias expuestas como las SEQ ID NO: 2, y similares, modulan la expresión o función de FXN. 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.

10

En un aspecto, los oligonucleótidos comprenden secuencias expuestas como las SEQ ID NO: 3 a 6 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

15 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, fosforotioato y similares. La preparación de los análogos de fosfato indicados anteriormente, y su incorporación en nucleótidos, nucleótidos modificados y oligonucleótidos, también es en sí conocida y no es necesario describirla aquí.

La especificidad y sensibilidad de antisentido también es empleada por los expertos en la materia para usos terapéuticos. Se han empleado oligonucleótidos antisentido como restos terapéuticos en el tratamiento de patologías en animales y el ser humano. Los oligonucleótidos antisentido se han administrado con seguridad y eficazmente a

25 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,

30 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

35 funciones pueden regularse positivamente o inhibirse dependiendo de las funciones deseadas.

Los compuestos antisentido incluyen compuestos antisentido oligoméricos, oligonucleótidos antisentido, oligonucleótidos de secuencia de guía externa (EGS), agentes de splicing alternativos, cebadores, sondas, y otros compuestos oligoméricos que hibridan con al menos una parte del ácido nucleico diana. Por lo tanto, estos

40 compuestos pueden introducirse en forma de compuestos oligoméricos monocatenarios, bicatenarios, parcialmente monocatenarios, o circulares.

El direccionamiento de un compuesto antisentido a una molécula de ácido nucleico particular, en el contexto de esta divulgación, puede ser un proceso multietapa. El proceso normalmente empieza con la identificación de un ácido

45 nucleico diana cuya función va a modularse. Este ácido nucleico diana puede ser, por ejemplo, un gen celular (o ARNm transcrito del gen) cuya expresión está asociada a un trastorno o patología particular, o una molécula de ácido nucleico de un agente infeccioso. En la presente divulgación, el ácido nucleico diana codifica para el gen frataxina (FXN).

50 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

55 "segmentos" se definen como partes más pequeñas o sub-partes de regiones dentro de un ácido nucleico diana. "Sitios", tal como se usa en la presente divulgación, se define como posiciones dentro de un ácido nucleico diana.

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

60 antisentido incluyen las SEQ ID NO: 3 a 6.

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

5

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

- 10 En un aspecto, los compuestos de oligonucleótido comprenden secuencias expuestas como las SEQ ID NO: 3 a 6, 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, 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.

20

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

- 25 en un conjunto particular de condiciones. En el contexto de la divulgación, "codón de iniciación" y "codón de iniciación de la traducción" se refieren al codón o codones que se usan in vivo para iniciar la traducción de un ARNm transcrito de un gen que codifica para frataxina (FXN), independientemente de las una o más secuencias de dichos codones. Un codón de terminación de la traducción (o "codón de terminación") de un gen puede tener una de tres secuencias, es decir, 5'-UAA, 5'-UAG y 5'-UGA (las secuencias de ADN correspondientes son 5'-TAA, 5'-TAG y 5'-TGA, respectivamente).

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

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

- Otra región diana incluye la región no traducida 5' (5'UTR), conocida en la técnica para referirse a la parte de un ARNm en la dirección 5' desde el codón de iniciación de la traducción, y que incluye, por lo tanto, nucleótidos entre el sitio caperuza 5' 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

60

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.

15 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.

20 En un aspecto, 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.

30 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.

35 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.

45 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.

50 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.

55 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.

60 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
- 5 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.
- 10 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.
- 15 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.
- 20 En un aspecto, se prefiere dirigirse a ácidos nucleicos específicos mediante 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
- 25 (ARNnc).
- Los ARN pueden clasificarse en (1) ARN mensajeros (ARNm), que se traducen en proteínas, y (2) ARN no codificantes de proteína (ARNnc). Los ARNnc comprenden microARN, transcritos antisentido y otras unidades transcripcionales (TU) que contienen una alta densidad de codones de terminación y que carecen de cualquier
- 30 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
- 35 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
- 40 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
- 45 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
- 50 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.
- 55 *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.
- 60 *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 5 simultáneamente a transcritos sentido y antisentido solapantes.

De acuerdo con la presente divulgación, los compuestos antisentido incluyen oligonucleótidos antisentido, ribozimas, oligonucleótidos de secuencia de guía externa (EGS), compuestos de siRNA, compuestos de interferencia (iARN) de ARN mono- o bicatenario tales como compuestos de siRNA, y otros compuestos oligoméricos que hibridan con al menos una parte del ácido nucleico diana y modulan su función. Por lo tanto, pueden ser ADN, ARN, similares a ADN, similares a ARN, o mezclas de los mismos, o pueden ser miméticos de uno o más de estos. Estos compuestos pueden ser compuestos oligoméricos monocatenarios, bicatenarios, circulares o de horquilla y pueden contener elementos estructurales tales como protuberancias internas o terminales, desapareamientos o bucles. Los compuestos antisentido se preparan de forma rutinaria linealmente, pero pueden unirse o prepararse de otro modo para ser circulares y/o ramificados. Los compuestos antisentido pueden comprender construcciones tales como, por ejemplo, dos cadenas hibridadas para formar un compuesto completa o parcialmente bicatenario o una única cadena con auto-complementariedad suficiente para permitir la hibridación y formación de un compuesto completa o parcialmente bicatenario. Las dos cadenas pueden enlazarse internamente, dejando los extremos 3' o 5' libres o pueden enlazarse para formar una estructura de horquilla continua o bucle. La estructura de horquilla puede contener un nucleótido protuberante en cualquiera de los extremos 5' o 3' que produce una extensión del carácter monocatenario. Los compuestos bicatenarios opcionalmente pueden comprender nucleótidos protuberantes en los extremos. Modificaciones adicionales pueden comprender grupos conjugados unidos a uno de los extremos, posiciones de nucleótido seleccionadas, posiciones de azúcar o a uno de los enlaces internucleosídicos. Como alternativa, las dos cadenas pueden enlazarse mediante un resto no de ácido nucleico o grupo conector. Cuando se forma a partir de solo una cadena, el 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 (siRNA); 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 dsARN también pueden activar la expresión génica, un mecanismo que se ha llamado "activación génica inducida por ARN pequeño" o aARN. Los promotores génicos que se dirigen a dsARN inducen la potente activación transcripcional de genes asociados. El 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 (dsARN), tal como ARN interferente pequeño (siRNA) y microARN (miARN), es el desencadenante de un mecanismo evolutivamente conservado conocido como interferencia de ARN (iARN). La iARN conduce invariablemente al silenciamiento génico mediante la remodelación de cromatina para suprimir de este modo la transcripción, degradación de ARNm complementario, o bloqueo de la traducción de proteínas. Sin embargo, en los aspectos descritos en detalle en la sección de ejemplos a continuación,

se muestra que los oligonucleótidos aumentan la expresión y/o función de los polinucleótidos de la frataxina (FXN) y productos codificados por los mismos. Los dsARN también pueden actuar como ARN activantes pequeños (ARNap). Sin desear ceñirse a ninguna teoría, direccionando secuencias a promotores génicos, los ARN_{ap} inducirán la expresión de genes diana en un fenómeno denominado activación transcripcional inducida por ARN_{dc} (ARNa).

5

En un aspecto adicional, los "segmentos diana preferidos" identificados en el presente documento pueden emplearse en un cribado para compuestos adicionales que modulan la expresión de polinucleótidos de frataxina (FXN). Los "moduladores" son aquellos compuestos que disminuyen o aumentan la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica el gen FXN 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 FXN 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 FXN, por ejemplo, las SEQ ID NO: 3 al 6. 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 FXN, el modulador puede entonces emplearse en estudios de investigación adicionales de la función de polinucleótidos del gen FXN, o para su uso como un agente de investigación, diagnóstico o terapéutico de acuerdo con la presente divulgación.

10

15

20 El direccionamiento de la secuencia antisentido natural modula preferentemente la función del gen diana. Por ejemplo, el gen FXN (por ejemplo, número de acceso NM_181425). En un aspecto, la diana es un polinucleótido antisentido del gen FXN. En un aspecto, un oligonucleótido antisentido dirigido a secuencias sentido y/o antisentido naturales de polinucleótidos del gen FXN (por ejemplo, número de acceso NM_181425), variantes, alelos, isoformas, homólogas, mutantes, derivados, fragmentos y secuencias complementarias correspondientes. Preferentemente, el oligonucleótido es una molécula antisentido y las dianas incluyen regiones codificantes y no codificantes de polinucleótidos antisentido y/o sentido de FXN.

25

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

30

Se ha demostrado en la técnica 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 someterse a modificaciones químicas. Por ejemplo, se ha demostrado que dichos restos bicatenarios inhiben la diana por la hibridación clásica de la cadena antisentido del dúplex con la diana, produciendo de este modo la degradación enzimática de la diana.

35

En un aspecto, un oligonucleótido antisentido se dirige a polinucleótidos de frataxina (FXN) (por ejemplo, número de acceso: NM_181425), variantes, alelos, isoformas, homólogos, mutantes, derivados, fragmentos y secuencias complementarias a los mismos. Preferentemente, el oligonucleótido es una molécula antisentido.

40

De acuerdo con aspectos de la divulgación, la molécula de ácido nucleico diana no se limita a la FXN por sí sola, sino que se extiende a cualquiera de las isoformas, receptores, homólogos y similares de las moléculas de FXN.

45

En un aspecto, un oligonucleótido se dirige a una secuencia antisentido natural de polinucleótidos de FXN, por ejemplo, polinucleótidos expuestos en la SEQ ID NO: 2, y cualquier variante, alelo, homólogo, mutante, derivado, fragmento y secuencia complementaria a los mismos. Ejemplos de oligonucleótidos antisentido se exponen como las SEQ ID NOS: 3 al 6.

50

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

55

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

En un aspecto, los oligonucleótidos comprenden secuencias de al menos 5 nucleótidos consecutivos de las SEQ ID NO: 3 a 6 y modula la expresión y/o la función de moléculas de FXN.

60

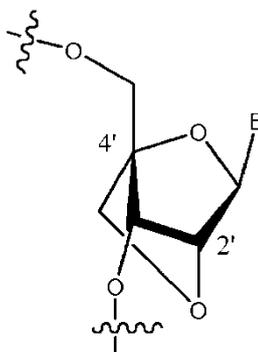
Las dianas de polinucleótido comprenden FXN, que incluyen miembros de la familia del mismo, variantes del FXN; mutantes del FXN, que incluyen SNP; secuencias no codificantes del FXN; alelos del FXN; variantes de especies, fragmentos y similares. Preferentemente, el oligonucleótido es una molécula antisentido.

- 5 En un aspecto, el oligonucleótido que se dirige a polinucleótidos del gen FXN, comprende: ARN antisentido, ARN de interferencia (ARNi), ARN de interferencia pequeño (siRNA); microARN de interferencia (miARN); un ARN temporal pequeño (ARNtp); o un ARN de horquilla corta (ARNhc); activación génica inducida por ARN pequeño (ARNa); o, ARN activante pequeño (ARNap).
- 10 En un aspecto, la elección como diana de transcritos antisentido naturales de frataxina (FXN), por ejemplo, SEQ ID NO: 2 y/o otros transcritos antisentido naturales de FXN puede llevarse a cabo mediante administración de oligonucleótidos que se unen y modulan la expresión o función de estas dianas. En un aspecto, la expresión o función está regulada positivamente en comparación con un control. En otro aspecto, la expresión o función está regulada negativamente en comparación con un control.
- 15 En un aspecto, los compuestos antisentido comprenden secuencias expuestas como las SEQ ID NO: 3 al 6. Estos oligonucleótidos pueden comprender uno o más nucleótidos modificados, fragmentos más cortos o más largos, enlaces modificados y similares.
- 20 En un aspecto, las SEQ ID NO: 3 a 6 comprenden uno o más nucleótidos de LNA. La tabla 2 muestra ejemplos de oligonucleótidos antisentido útiles en los procedimientos de la divulgación.

Tabla 2:

ID de secuencia	Nombre de la secuencia antisentido	Secuencia
SEQ ID NO: 3	CUR-0732	G*C*T*C*C*C*A*A*G*T*T*C*C*T*C*C*T*G*T*T
SEQ ID NO: 4	CUR-0733	C*G*G*A*G*C*A*G*C*A*T*G*T*G*G*A*C*T*C*T
SEQ ID NO: 5	CUR-0734	G*G*A*G*C*A*G*C*A*T*G*T*G*G*A*C*T*C*T
SEQ ID NO: 6	CUR-0735	G*T*C*T*A*A*C*C*T*C*T*A*G*C*T*G*C*T*C*C

- 25 * indica enlace fosfotioato. + indica un LNA que tiene un enlace 2'-O-4'-metileno en la porción de ribosa del ácido ribonucleico designado. Para evitar ambigüedad, este LNA tiene la fórmula:



- 30 wherein B is the particular designated base.

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

35 la capacidad para escindir repetidamente otras moléculas de ácidos nucleicos separadas en un modo específico de secuencia de bases de nucleótidos. Tales moléculas de ácidos nucleicos enzimáticos pueden usarse, por ejemplo, para dirigirse virtualmente a cualquier transcrito de ARN.

- Debido a su especificidad de secuencia, las moléculas de ácidos nucleicos enzimáticos que se escinden en trans
- 40 son una promesa como agentes terapéuticos para enfermedades humanas. Las moléculas de ácidos nucleicos enzimáticos pueden diseñarse para escindir dianas de ARN específicas dentro del fondo del ARN celular. Un acontecimiento de escisión de este tipo convierte el ARNm en no funcional y anula la expresión de proteínas de ese

ARN. De este modo puede inhibirse selectivamente la síntesis de una proteína asociada a una patología.

En general, los ácidos nucleicos enzimáticos con actividad de escisión de ARN actúan uniéndose primero a un ARN diana. Dicha unión se produce 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. Después de unirse un ácido nucleico enzimático y escindir su ARN diana, se libera de ese ARN para buscar otra diana y puede unirse repetidamente y escindir nuevas dianas.

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.

El desarrollo de ribozimas que son óptimas para la actividad catalítica contribuiría significativamente a cualquier estrategia que empleara ribozimas que escinden ARN con el fin de regular la expresión génica. La ribozima de cabeza de martillo, por ejemplo, funciona con una velocidad catalítica (k_{cat}) de aproximadamente 1 min⁻¹ en presencia de concentraciones saturantes (10 mM) de cofactor de Mg²⁺. Se ha demostrado que una ribozima de "ligasa de ARN" artificial cataliza la reacción de auto-modificación correspondiente con una velocidad de aproximadamente 100 min⁻¹. Además, se sabe que ciertas ribozimas de cabeza de martillo modificadas que tienen brazos de unión al sustrato hechos de ADN catalizan la escisión de ARN con múltiples velocidades de recuperación que se aproximan a 100 min⁻¹. Finalmente, la sustitución de un 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.

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.

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

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

En un aspecto, un oligonucleótido o compuesto antisentido comprende un oligómero o polímero de ácido ribonucleico (ARN) y/o ácido desoxirribonucleico (ADN), o un mimético, quimera, análogo u homólogo de los mismos. Este término incluye oligonucleótidos compuestos de nucleótidos de origen natural, azúcares y enlaces internucleosídicos covalentes (esqueleto), además de oligonucleótidos que tienen partes no de origen natural que funcionan similarmente. Dichos oligonucleótidos modificados o sustituidos son frecuentemente deseados con respecto a formas nativas debido a propiedades deseables tales como, por ejemplo, captación celular potenciada, afinidad potenciada por un ácido nucleico diana y elevada estabilidad en presencia de nucleasas.

De acuerdo con la presente divulgación, los oligonucleótidos o "compuestos antisentido" incluyen oligonucleótidos antisentido (por ejemplo, ARN, ADN, mimético, quimera, análogo u homólogo de los mismos), ribozimas, oligonucleótidos de secuencia de guía externa (EGS), compuestos de siRNA, compuestos de interferencia (iARN) de

ARN mono- o bicatenario tales como compuestos de siRNA, ARN_{ap}, aARN, y otros compuestos oligoméricos que hibridan con al menos una parte del ácido nucleico diana y modulan su función. Por lo tanto, pueden ser ADN, ARN, similares a ADN, similares a ARN, o mezclas de los mismos, o pueden ser miméticos de uno o más de estos. Estos compuestos pueden ser compuestos oligoméricos monocatenarios, bicatenarios, circulares o de horquilla y pueden
 5 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
 10 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,
 15 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 ARN_{dc} 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 ARN_{dc} puede ser completa o parcialmente bicatenario. Puede lograrse modulación específica de la expresión génica por expresión estable de
 20 horquillas de ARN_{dc} en líneas celulares transgénicas. 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.

25 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
 30 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.

35 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
 40 aproximadamente 80 nucleótidos, y un compuesto antisentido bicatenario de la divulgación (tal como un ARN_{dc}, 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,
 45 77, 78, 79 u 80 nucleótidos de longitud, o cualquier intervalo entremedias.

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

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

En 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
 60 primer nucleótido es una adenosina, pueden producirse variantes que contienen timidina, guanosina o citidina en

esta posición. Esto puede hacerse en cualquiera de las posiciones de los compuestos antisentido o de 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.

- 5 En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencias o complementariedad, entre el compuesto antisentido y la diana, es de aproximadamente el 40 % a aproximadamente el 60 %. En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencias o complementariedad es de aproximadamente el 60% a aproximadamente el 70%. En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencias o complementariedad es de aproximadamente el 70% a aproximadamente el 80%. En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencias o complementariedad es de aproximadamente el 80% a aproximadamente el 90%. En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencias o complementariedad es de aproximadamente el 90%, aproximadamente el 92%, aproximadamente el 94%, aproximadamente el 95%, aproximadamente el 96%, aproximadamente el 97%, aproximadamente el 98%, aproximadamente el 99 % o aproximadamente el 100%.
- 10
- 15 En un aspecto, los oligonucleótidos antisentido tales como, por ejemplo, las moléculas de ácidos nucleicos expuestas en las SEQ ID NO: 3 a 6 comprenden una o más sustituciones o modificaciones. En un aspecto, los nucleótidos están sustituidos con ácidos nucleicos bloqueados (LNA).

- 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 FXN y las secuencias expuestas como SEQ ID NO: 1 y 2. Los oligonucleótidos también se dirigen a regiones solapantes de las SEQ ID NO: 1 y 2.
- 20

- Ciertos oligonucleótidos preferidos de esta divulgación son oligonucleótidos quiméricos. "Oligonucleótidos quiméricos" o "quimeras", en el contexto de esta divulgación, son oligonucleótidos que contienen dos o más regiones químicamente distintas, cada una constituida por al menos un nucleótido. Estos oligonucleótidos normalmente contienen al menos una región de nucleótidos modificados que confiere una o más propiedades beneficiosas (tales como, por ejemplo, resistencia a nucleasas incrementada, captación en células incrementada, afinidad de unión por la diana incrementada) y una región que es un sustrato para enzimas capaces de escindir híbridos de ARN:ADN o ARN:ARN. A modo de ejemplo, la ARNasa H es una endonucleasa celular que escinde la cadena de ARN de un dúplex de ARN:ADN. La activación de ARNasa H, por lo tanto, produce la escisión del ARN diana, potenciando así enormemente la eficiencia de la modulación antisentido de la expresión génica. Por consiguiente, frecuentemente pueden obtenerse resultados comparables con oligonucleótidos más cortos cuando se usan oligonucleótidos quiméricos, en comparación con desoxi oligonucleótidos de fosforitoato 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.
- 25
- 30
- 35
- 40 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 Estados Unidos n.º 5.013.830; 5.149.797; 5. 220.007; 5.256.775; 5.366.878; 5.403.711; 5.491.133; 5.565.350; 5.623.065; 5.652.355; 5.652.356 y 5.700.922.
- 45

- 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'-fluoro. 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'-desoxi oligonucleótidos contra una diana dada. El efecto de tal 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
- 50
- 55
- 60

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 CH₂--NH--O--CH₂, CH--N(CH₃)--O--CH₂ [conocido como un esqueleto de metilen(metilimino) o MMI], CH₂--O--N(CH₃)--CH₂, CH₂--N(CH₃)--N(CH₃)--CH₂ y O--N(CH₃)--CH₂--CH₂, donde el esqueleto de fosfodiéster nativo se representa como O--P--O--CH. Los esqueletos de amida divulgados por De Mesmaeker y col. (1995) Acc. Chem. Res. 28:366-374 también se prefieren. También se prefieren oligonucleótidos que tienen esqueletos de morfolino (Summerton and Weller, patente de Estados Unidos Pat. n.º. 5.034.506). En otro aspecto, 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, SCH₃, F, OCN, OCH₃ OCH₃, OCH₃ O(CH₂)_n CH₃, O(CH₂)_nNH₂ o O(CH₂)_nCH₃ en los que n es de 1 a aproximadamente 10; alquilo C1 a C10 inferior, alcoxicoxi, alquilo, alcarilo o aralquilo inferior sustituido; Cl; Br; CN; CF₃; OCF₃; O--, S--, o N-alquilo; O--, S--, o N-alqueno; SOCH₃; SO₂ CH₃; ONO₂; NO₂; N₃; NH₂; heterocicloalquilo; heterocicloalcarilo; aminoalquilamino; polialquilamino; sililo sustituido; un grupo de escisión de ARN; un grupo reportero; un intercalador; un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido; o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un oligonucleótido y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. Una modificación preferida incluye 2'-metoxietoxi [2'-O-CH₂ CH₂ OCH₃, también conocido como 2'-O-(2-metoxietilo)]. Otras modificaciones preferidas incluyen 2'-metoxi (2'-O--CH₃), 2'-propoxi(2'-OCH₂ CH₂CH₃) y 2'-flúor (2'-F). También pueden hacerse modificaciones similares en otras posiciones sobre el oligonucleótido, particularmente la posición 3' del azúcar en el nucleótido del extremo 3' y la posición 5' del nucleótido del extremo 5'. Los oligonucleótidos también pueden tener miméticos de azúcar tales como ciclobutilos en lugar del grupo pentofuranosilo.

Los oligonucleótidos también pueden comprender, adicionalmente o como alternativa, modificaciones o sustituciones de nucleobases (frecuentemente denominadas en la técnica simplemente "base"). Tal como se usa en el presente documento, nucleótidos "no modificados" o "naturales" incluyen adenina (A), guanina (G), timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Los nucleótidos modificados incluyen nucleótidos encontrados solo poco frecuentemente o transitoriamente en ácidos nucleicos naturales, por ejemplo, hipoxantina, 6-metiladenina, 5-Me-pirimidinas, particularmente 5-metilcitosina (también denominada 5-metil-2'-desoxicitosina y frecuentemente denominada en la técnica 5-Me-C), 5-hidroximetilcitosina (HMC), glicosil HMC y gentobiosil HMC, además de nucleótidos sintéticos, por ejemplo, 2-aminoadenina, 2-(metilamino)adenina, 2-(imidazolilalquil)adenina, 2-(aminoalquilamino)adenina u otras alquiladeninas heterosustituidas, 2-tiouracilo, 2-tiotimina, 5-bromouracilo, 5-hidroximetiluracilo, 8-azaguanina, 7-deazaguanina, N6(6-aminohexil)adenina y 2,6-diaminopurina. 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 Pat. 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.

5 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.

10 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
15 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.

20 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 al sustituir alguno de los monómeros en los oligonucleótidos actuales por monómeros de LNA. El oligonucleótido modificado con LNA puede tener un
25 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.

30 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
35 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
40 contienen fósforo comprenden, pero no se limitan a, las patentes de Estados Unidos n.º. 3.687.808; 4.469.863; 4.476.301; 5.023.243; 5.177.196; 5.188.897; 5.264.423; 5.276.019; 5.278.302; 5.286.717; 5.321.131; 5.399.676; 5.405.939; 5.453.496; 5.455.233; 5.466.677; 5.476.925; 5.519.126; 5.536.821; 5.541.306; 5.550.111; 5.563.253; 5.571.799; 5.587.361 y 5.625.050.

45 Los 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,
50 sulfóxido y sulfona; esqueletos de formacetilo y tioformacetilo; esqueletos de metilenformacetilo y tioformacetilo; esqueletos que contienen alqueno; esqueletos de sulfamato; esqueletos de metilenimino y metilenhidrazino; esqueletos de sulfonato y sulfonamida; esqueletos de amida; y otros que tienen partes de componentes de N, O, S y CH₂ mixtos.

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

60

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 Estados Unidos n.º 5.539.082; 5.714.331 y 5.719.262. Enseñanzas adicionales de compuestos de PNA pueden encontrarse en Nielsen, y col. (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 $-\text{CH}_2\text{-NH-O-CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{-N(CH}_3\text{)-O-CH}_2-$, conocidos como un esqueleto de metileno (metilimino) o MMI, $-\text{CH}_2\text{-O-N(CH}_3\text{)-CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{N(CH}_3\text{)-N(CH}_3\text{)CH}_2-$ y $-\text{O-N(CH}_3\text{)-CH}_2\text{-CH}_2-$ donde el esqueleto de fosfodiéster nativo se representa como $-\text{O-P-O-CH}_2-$ de la patente de Estados Unidos n.º 5.489.677, citada anteriormente, y los esqueletos de amida de la patente de Estados Unidos n.º 5.602.240, citada anteriormente. También se prefieren oligonucleótidos que tienen esqueletos de morfolino de la patente de Estados Unidos 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-alqueno; O-, S- o N-alquino; o O-alquil-O-alquilo, donde el alquilo, alqueno y alquino pueden ser alquilo C a CO sustituido o sin sustituir o alqueno y alquino C2 a CO. Se prefieren particularmente $\text{O(CH}_2\text{)}_n\text{OCH}_3$, $\text{O(CH}_2\text{)}_n$, OCH_3 , $\text{O(CH}_2\text{)}_n\text{NH}_2$, $\text{O(CH}_2\text{)}_n\text{CH}_3$, $\text{O(CH}_2\text{)}_n\text{ONH}_2$ y $\text{O(CH}_2\text{)}_n\text{O(N(CH}_2\text{)}_n\text{CH}_3\text{)}_2$ en las que n y m pueden ser de 1 a aproximadamente 10. Otros oligonucleótidos preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': C a CO, (alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, alcarilo, aralquilo, O-alcarilo o O-aralquilo, SH, SCH3, OCN, Cl, Br, CN, CF3, OCF3, SOCH3, SO2CH3, ONO2, NO2, N3, NH2, heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, polialquilamino, sililo sustituido, un grupo de escisión de ARN, un grupo indicador, un intercalador, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido, o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un oligonucleótido, y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. Una modificación preferida comprende 2'-metoxietoxi (2'-O-CH2CH2OCH3, también conocido como 2'-O-(2-metoxietilo) o 2'-MOE), es decir un grupo alcoxialcoxi. Otra modificación preferida comprende 2'-dimetilaminoetoxi, es decir, un grupo $\text{O(CH}_2\text{)}_2\text{ON(CH}_3\text{)}_2$, también conocido como 2'-DMAOE, tal como se describe en los ejemplos en el presente documento más adelante, y 2'-dimetilaminoetoxietoxi (también conocido en la técnica como 2'-O-dimetilaminoetoxietilo o 2'-DMAEOE), es decir, 2'-O-CH2-O-CH2-N(CH2)2.

Otras modificaciones preferidas comprenden 2'-metoxi (2'-OCH3), 2'-aminopropoxi (2'-OCH2CH2CH2NH2) y 2'-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 Estados Unidos n.º 4.981.957; 5.118.800; 5.319.080; 5.359.044; 5.393.878; 5.446.137; 5.466.786; 5.514.785; 5.519.134; 5.567.811; 5.576.427; 5.591.722; 5.597.909; 5.610.300; 5.627.053; 5.639.873; 5.646.265; 5.658.873; 5.670.633 y 5.700.920.

Los oligonucleótidos también pueden comprender modificaciones o sustituciones de nucleobases (frecuentemente denominadas en la técnica simplemente "base"). 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 y col., "Angewandte Chemie, International Edition", 1991, 30, página 613 y aquellos divulgados por Sanghvi, Y.S., Capítulo 15, "Antisense Research and Applications", páginas 289-302, Crooke, S.T. and Lebleu, B. ea., CRC Press, 1993. Algunos de estos nucleótidos son particularmente útiles para incrementar la afinidad de unión de los compuestos oligoméricos de la divulgación. Estos
 5 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
 10 azúcar de 2'-Ometoxietilo

Las patentes representativas de los Estados Unidos que enseñan la preparación de los nucleótidos modificados citados anteriormente, así como otros nucleótidos modificados, comprenden, pero no se limitan a, las patentes de Estados Unidos n.º 3.687.808, así como 4.845.205; 5.130.302; 5.134.066; 5.175.273; 5. 367.066; 5.432.272;
 15 5.457.187; 5.459.255; 5.484.908; 5.502.177; 5.525.711; 5.552.540; 5.587.469; 5.596.091; 5.614.617; 5.750.692 y 5.681.941.

Otra modificación de los oligonucleótidos de la divulgación implica enlazar químicamente al oligonucleótido uno o más restos o conjugados, que potencian la actividad, distribución celular o captación celular del oligonucleótido.
 20

Dichos restos comprenden, aunque no se limitan a, restos de lípido tales como un resto colesterol, ácido cólico, un tioéter, por ejemplo, hexil-S-tritilitiol, 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
 25 resto octadecilamina o hexilamino-carbonil-oxicoolesterol.

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 Estados Unidos n.º 4.828.979; 4.948.882; 5.218.105; 5.525.465; 5.541.313; 5.545.730; 5.552.538; 5.578.717, 5.580.731; 5.580.731; 5.591.584; 5.109.124;
 30 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.

35 *Descubrimiento de fármacos:* Los compuestos de la presente divulgación también pueden aplicarse en las áreas del descubrimiento de fármacos y validación de dianas. La presente divulgación comprende el uso de los compuestos y segmentos diana preferidos identificados en el presente documento en un esfuerzo por el descubrimiento de fármacos para esclarecer relaciones que existen entre los polinucleótidos de frataxina (FXN) y una patología,
 40 fenotipo o afección. Estos procedimientos incluyen detectar o modular los polinucleótidos del gen FXN 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 FXN 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
 45 procedimientos también pueden realizarse en paralelo o en combinación con otros experimentos para determinar la función de genes desconocidos para el proceso de validación de dianas o para determinar la validez de un producto génico particular como diana para el tratamiento o prevención de una enfermedad, afección o fenotipo particular.

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

50 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
 55 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).

60 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 el ARNm de FXN se pueden valorar usando procedimientos conocidos por los expertos en la materia y descritos en otra parte en el presente documento. Por ejemplo, pueden usarse inmunoensayos como ELISA para medir los niveles de proteína. Los kits de ensayo ELISA para FXN están disponibles comercialmente, por ejemplo, en R&D Systems (Minneapolis, MN).

En aspectos, la expresión de FXN (por ejemplo, ARNm o proteína) en una muestra (por ejemplo, células o tejidos in vivo o in vitro) tratada usando un oligonucleótido antisentido de la divulgación se evalúa comparando con la expresión de FXN 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 FXN 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 según se desee, por ejemplo, en forma de una relación o fracción, para su uso en una comparación con control. En unos aspectos, el nivel de ARNm o proteína de FXN, 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 FXN 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.

Kits, reactivos de investigación, diagnósticos y terapéuticos

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

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

60

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

5

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

Ejemplos de procedimientos de análisis de la expresión génica conocidos en la técnica incluyen micromatrices o matrices de ADN, SAGE (análisis en serie de expresión génica), READS (amplificación por enzimas de restricción de los ADNc digeridos), TOGA (análisis de expresión génica total), matrices de proteínas y proteómicos, secuenciación de marca de secuencia expresada (EST), huella de ARN sustractiva (SuRF), clonación sustractiva, presentación diferencial (DD), hibridación genómica comparativa, técnicas de FISH (hibridación in situ fluorescente) 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 para frataxina (FXN). 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 FXN 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 FXN y en la amplificación de dichas moléculas de ácidos nucleicos para la detección o para su uso en estudios adicionales del gen FXN. La hibridación de los oligonucleótidos antisentido, particularmente los cebadores y sondas de la divulgación con un ácido nucleico que codifica el gen FXN, 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 FXN en una muestra.

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

40

Para terapéuticos, un animal, preferentemente un ser humano, que se sospecha que tiene una enfermedad o trastorno que puede tratarse modulando la expresión de la polinucleótidos de FXN 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 efectiva del modulador del gen FXN. Los moduladores del gen FXN de la presente divulgación modulan de manera efectiva la actividad del gen FXN o modulan la expresión de la proteína del gen FXN. En un aspecto, la actividad o expresión del gen FXN en un animal se inhibe aproximadamente el 10 % en comparación con un control. Preferentemente, la actividad o expresión del gen FXN en un animal se inhibe aproximadamente el 30 %. Más preferentemente, la actividad o expresión del gen FXN en un animal se inhibe el 50 % o más. De este modo, los compuestos oligoméricos modulan la expresión del ARNm del gen frataxina (FXN) al menos el 10 %, al menos el 50 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o el 100 % en comparación con un control.

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

60

menos el 98 %, al menos el 99 %, o el 100 % en comparación con un control.

Por ejemplo, se puede medir la reducción de la expresión de la frataxina (FXN) 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 de FXN y/o la propia proteína FXN.

Los compuestos de la divulgación pueden utilizarse en composiciones farmacéuticas añadiendo una cantidad efectiva de un compuesto a un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado. El uso de los compuestos y procedimientos de la 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. Los 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 colesteroles, lípidos, fosfolípidos, biotina, fenazina, folato, fenantridina, antraquinona, acridina, fluoresceínas, rodaminas, cumarinas y colorantes. Grupos que potencian las propiedades farmacodinámicas, en el contexto de esta divulgación, incluyen grupos que mejoran la captación, potencian la resistencia a la degradación y/o fortalecen la hibridación específica de secuencia con el ácido nucleico diana. Grupos que potencian las propiedades farmacocinéticas, en el contexto de esta divulgación, incluyen grupos que mejoran la captación, distribución, metabolismo o eliminación de los compuestos de la presente divulgación. Los 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 Estados Unidos Pat. n.º 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-tritiltilol, un tiocolésterol, una cadena alifática, por ejemplo, residuos de dodecanodiol o undecilo, un fosfolípido, por ejemplo, di-hexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato de trietilamonio, una poliamina o una cadena de polietilenglicol, o ácido adamantano acético, un resto palmitilo, o un resto octadecilamina o hexilamino-carbonil-oxicolesterol. Los oligonucleótidos de la divulgación también pueden conjugarse con principios activos, por ejemplo, aspirina, warfarina, fenilbutazona, ibuprofeno, suprofen, fenbufeno, ketoprofeno, (S)-(+)-pranoprofeno, carprofeno, dansilsarcosina, ácido 2,3,5-triyodobenzoico, ácido flufenámico, ácido folínico, una benzotiadiazida, clorotiazida, una diazepina, indometacina, un barbitúrico, una cefalosporina, un fármaco sulfa, un antidiabético, un antibacteriano o un antibiótico.

Las patentes representativas de los Estados Unidos que enseñan la preparación de estos conjugados de oligonucleótidos incluyen, pero no se limitan a, las patentes de Estados Unidos Pat. 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.

Formulaciones

Los compuestos de la divulgación también pueden mezclarse, encapsularse, conjugarse o asociarse de otro modo a otras moléculas, estructuras de molécula o mezclas de compuestos, como, por ejemplo, liposomas, moléculas dirigidas a receptor, formulaciones orales, rectales, tópica u otras, para ayudar en la captación, distribución y/o absorción. Las patentes representativas de Estados Unidos que enseñan la preparación de estas formulaciones de ayuda en la captación, distribución y/o absorción incluyen, pero no se limitan a, las patentes de los Estados Unidos Pat. n.º 5.108.921; 5.354.844; 5.416.016; 5.459.127; 5.521.291; 5.543.165; 5.547.932; 5.583.020; 5.591.721; 4.426.330; 4.534.899; 5.013.556; 5.108.921; 5.213.804; 5.227.170; 5.264.221; 5.356.633; 5.395.619; 5.416.016; 5.417.978; 5.462.854; 5.469.854; 5.512.295; 5.527.528; 5.534.259; 5.543.152; 5.556.948; 5.580.575 y 5.595.756.

Aunque los oligonucleótidos antisentido no necesitan administrarse en el contexto de un vector con el fin de modular la expresión y/o función de una diana, aspectos de la divulgación se refieren a construcciones de vector de expresión para la expresión de oligonucleótidos antisentido, que comprende promotores, secuencias de genes

promotores híbridos y poseen una fuerte actividad promotora constitutiva, o una actividad promotora que puede inducirse en el caso deseado.

En un aspecto, la práctica de la divulgación implica administrar al menos uno de los oligonucleótidos antisentido anteriores con un sistema de administración de ácidos nucleicos adecuado. En un aspecto, ese sistema incluye un vector no viral enlazado operativamente al polinucleótido. Ejemplos de dichos vectores no virales incluyen el oligonucleótido solo (por ejemplo, una cualquiera o más de las SEQ ID NO: 3 a 6) o en combinación con una formulación de proteína, polisacárido o lípido adecuada.

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

15

Vectores preferidos adicionales incluyen vectores virales, proteínas de fusión y conjugados químicos. Los vectores retrovirales incluyen virus de la leucemia murina de Moloney y virus basados en el HIV. Un vector viral basado en el HIV preferido comprende al menos dos vectores en los que los genes gag y pol son de un genoma del HIV y el gen env es de otro virus. Se prefieren vectores virales de ADN. Estos vectores incluyen vectores de pox tales como vectores de ortopox o avipox, vectores del virus del herpes tales como un vector del virus del herpes simple I (HSV), vectores de adenovirus y vectores de virus asociados a adenovirus.

20

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.

25

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 los oligonucleótidos, ejemplos preferidos de sales farmacéuticamente aceptables y sus usos se describen adicionalmente en la patente de Estados Unidos Pat. n.º 6.287.860.

30

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.

35

40

Para tratar tejidos en el sistema nervioso central, la administración puede realizarse mediante, por ejemplo, inyección o infusión en el líquido cefalorraquídeo. La administración de ARN antisentido en el líquido cefalorraquídeo se describe, por ejemplo, en la solicitud de patente de Estados Unidos Pat. . de EE.UU. N.º 2007/0117772, "Methods for slowing familial ALS disease progression».

45

Cuando se pretende que el oligonucleótido antisentido de la presente divulgación se administre a células en el sistema nervioso central, la administración puede ser con uno o más agentes capaces de promover la penetración del oligonucleótido antisentido objeto a través de la barrera hematoencefálica. La inyección puede realizarse, por ejemplo, en la corteza entorrinal o en el hipocampo. La aplicación de factores neurotróficos mediante la administración de un vector adenovirus en las neuronas motoras del tejido muscular se describe en, por ejemplo, la patente de Estados Unidos Pat. 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, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos Pat. 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 administración de formulaciones de liberación lenta.

50

55

60 Los oligonucleótidos antisentido objeto también puede enlazarse o conjugarse con agentes que proporcionan

propiedades farmacéuticas o farmacodinámicas deseables. Por ejemplo, el oligonucleótido antisentido puede acoplarse a cualquier sustancia, conocida en la técnica para promover la penetración o transporte a través de la barrera hematoencefálica, tal como un anticuerpo para el receptor de transferrina, y administrarse mediante inyección intravenosa. El compuesto antisentido puede enlazarse con un vector viral, por ejemplo, que hace al compuesto antisentido más eficaz y/o aumenta el transporte del compuesto antisentido a través de la barrera hematoencefálica. La rotura osmótica de la barrera hematoencefálica también puede llevarse a cabo por, por ejemplo, infusión de azúcares que incluyen, aunque no se limitan a, mesoeritritol, xilitol, D(+) galactosa, D(+) lactosa, D(+) xilosa, dulcitol, mioinositol, L(-) fructosa, D(-) manitol, D(+) glucosa, D(+) arabinosa, D(-) arabinosa, celobiosa, D(+) maltosa, D(+) rafinosa, L(+) ramnosa, D(+) melibiosa, D(-) ribosa, adonitol, D(+) arabitól, L(-) arabitól, D(+) fucosa, L(-) fucosa, D(-) lixosa, L(+) lixosa y L(-) lixosa, o aminoácidos que incluyen, aunque no se limitan a, glutamina, lisina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glicina, histidina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, tirosina, valina y taurina. Los procedimientos y materiales para aumentar la penetración en la barrera hematoencefálica se describen, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos 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," y 6.936.589, "Parenteral delivery systems,".

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

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

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

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

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

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

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

cargadas para formar un complejo estable. Se cree que los liposomas que son sensibles al pH o están cargados negativamente atrapan el ADN en vez de complejarse con él. Se han usado tanto liposomas catiónicos como no catiónicos para administrar ADN a células.

- 5 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
- 10 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 Pat. n.º 6.287.860.

Las formulaciones y composiciones farmacéuticas de la presente divulgación también pueden comprender tensioactivos. El uso de tensioactivos en medicamentos, formulaciones y en emulsiones es muy conocido en la

15 técnica. Los agentes tensioactivos y sus usos se describen adicionalmente en la patente de Estados Unidos Pat. n.º 6.287.860.

En un aspecto, la presente divulgación emplea diversos potenciadores de la penetración para efectuar la administración eficiente de ácidos nucleicos, particularmente oligonucleótidos. Además de ayudar en la difusión de

20 fármacos no lipófilos a través de membranas celulares, los potenciadores de la penetración también potencian la permeabilidad de fármacos lipófilos. Los potenciadores de la penetración pueden clasificarse como pertenecientes a una de cinco amplias categorías, es decir, tensioactivos, ácidos grasos, sales biliares, agentes quelantes y no tensioactivos no quelantes. Los mejoradores de penetración y sus usos se describen adicionalmente en la patente de Estados Unidos Pat. n.º 6.287.860.

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

Las 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,

30 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 DOTAP y dioleoil-fosfatidiletanolamina DOTMA).

35 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

40 patente de Estados Unidos Pat. 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,

45 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 Pat. n.º 6.287.860. También se prefieren combinaciones de

50 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

55 sus usos se describen adicionalmente en la patente de Estados Unidos Pat. 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

60 excipientes farmacéuticamente aceptables.

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

En otro aspecto relacionado, las composiciones de la divulgación pueden contener uno o más compuestos antisentido, particularmente oligonucleótidos, dirigidos a un primer ácido nucleico y uno o más compuestos antisentido adicionales dirigidos a un segundo ácido nucleico diana. Por ejemplo, la primera diana puede ser una secuencia antisentido particular de la frataxina (FXN), y la segunda diana puede ser una región de otra secuencia de nucleótidos. Como alternativa, las composiciones de la divulgación pueden contener dos o más compuestos antisentido dirigidos a diferentes regiones del mismo ácido nucleico diana de la frataxina (FXN). Se ilustran numerosos ejemplos de compuestos antisentido en el presente documento y otros pueden seleccionarse de entre compuestos adecuados conocidos en la técnica. Pueden usarse dos o más compuestos combinados juntos o secuencialmente.

Dosificación:

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

En aspectos, un paciente se trata con una dosificación de fármaco que es al menos aproximadamente 1, al menos aproximadamente 2, al menos aproximadamente 3, al menos aproximadamente 4, al menos aproximadamente 5, al menos aproximadamente 6, al menos aproximadamente 7, al menos aproximadamente 8, al menos aproximadamente 9, al menos aproximadamente 10, al menos aproximadamente 15, al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 25, al menos aproximadamente 30, al menos aproximadamente 35, al menos aproximadamente 40, al menos aproximadamente 45, al menos aproximadamente 50, al menos aproximadamente 60, al menos aproximadamente 70, al menos aproximadamente 80, al menos aproximadamente 90, o al menos aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal. Ciertas dosis inyectadas de oligonucleótidos antisentido se describen, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos Pat. 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 a una frataxina (FXN) y/o una cadena sentido de polinucleótido de FXN

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 (por ejemplo, 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 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 secuencias de ácido nucleico no diana en condiciones en las que se desea unión específica, es decir, en condiciones fisiológicas en el caso de ensayos *in vivo* o tratamiento terapéutico, y en condiciones en las que se realizan ensayos en el caso de ensayos *in vitro*.

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

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

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

Puede realizarse un ensayo de la curva de fusión usando una copia de ADNc de la molécula de ARN antisentido natural real o un nucleótido de ADN o ARN sintético correspondiente al sitio de unión de la molécula. Están disponibles múltiples kits que contienen todos los reactivos necesarios para realizar este ensayo (por ejemplo, kit MeltDoctor de Applied Biosystems Inc.). Estos kits incluyen una solución tampón adecuada que contiene uno de los colorantes de unión a ADN bicatenario (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 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 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 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.

25

Ejemplo 2: Modulación de polinucleótidos de FXN

Tratamiento de células HepG2 con oligonucleótidos antisentido

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 y se proporcionó los análogos de fosfotioato mostrados en la Tabla 2. 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 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 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 tetrazoilfosforamidita; 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-benzoditioil-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, se 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.

Para realizar el experimento diseñado en el Ejemplo 2, se cultivaron células HepG2 de ATCC (n.º de cat. HB-8065) en medio de crecimiento (MEM/EBSS (Hyclone n.º de cat. SH30024, o Mediatech n.º de cat. MT-10-010-CV) +10 % de FBS (Mediatech n.º de cat. MT35- 011-CV)+ penicilina/estreptomina (Mediatech n.º de cat. MT30-002-C1)) a 37°C y con el 5 % de CO₂. Un día antes del experimento, las células volvieron a sembrarse a la densidad de 0,5x10⁴/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.

60

Los oligonucleótidos enviados por el fabricante en forma liofilizada se diluyeron a la concentración de 20 μ M en agua desionizada libre de ARNasa/ADNasa. Se incubaron dos μ l de esta solución con 400 μ l de medio OptiMEM (Gibco, N.º de cat 31985-070) y 4 μ l 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
 5 mezcla similar que incluye 2 μ l 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
 10 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:
 15 Hs00175940_ml (FXN) 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.

20

Resultados: Los resultados de la PCR en tiempo real muestran que los niveles de ARNm del gen FXN en células HepG2 se incrementan significativamente 48 h después del tratamiento con dos de los oligos antisentido diseñados para AI951739 antisentido de FXN (Fig 1).

25 **Ejemplo 3: Regulación positiva de ARNm del gen FXN en diferentes líneas celulares mediante tratamiento con oligonucleótidos antisentido dirigidos al transcrito antisentido natural específico de la FXN**

En el Ejemplo 3, se cribaron oligonucleótidos antisentido de diferentes químicas dirigidos al transcrito antisentido natural específico de la FXN en un panel de diversas líneas celulares a una concentración final de 20 nM. Las
 30 células solían provenir de diferentes tipos y órganos. Los datos que se muestran a continuación confirman que la regulación positiva del ARNm del gen FXN mediante modulación de la función del transcrito antisentido natural específico de la FXN no se limita a un único nucleótido, tipo celular o tejido y, por tanto, demuestran que los oligonucleótidos de la divulgación regulan positivamente la expresión del gen FXN en sistemas biológicos.

35 **Materiales y métodos**

Línea celular del fibroblasto GM03816A humano: la línea celular del fibroblasto GM03816A humano se obtuvo de una paciente de 36 años de edad con expansión GAA homocigótica en el gen frataxina (FXN) (alelos de aproximadamente 330 y 380 repeticiones). Estas células se cultivaron en medio esencial modificado de Dulbecco
 40 (Cellgrow, n.º de cat. 10-013-CV) +10 % de FBS (Cellgrow, n.º de cat. 35-011-CV) + 1 % de penicilina/estreptomina (Cellgrow, n.º de cat.30-002-CI) a 37 °C y con el 5 % de CO₂. Las células se trataron con oligonucleótidos antisentido usando uno de los siguientes métodos. Para el Método del día siguiente, un día antes del experimento, las células volvieron a sembrarse con una densidad de aproximadamente 2x10⁵/platillo, en placas de 6 pocillos, en medio de crecimiento y se incubaron a 37 °C y con el 5 % de CO₂ durante la noche. Al día siguiente, el medio de las
 45 placas de 6 pocillos se cambió por medio de crecimiento fresco (1,5 ml/pocillo) y se dosificaron las células con oligonucleótidos antisentido. Todos los nucleótidos antisentido fueron fabricados por IDT Inc. (Coralville, IA). Las secuencias de todos los oligonucleótidos se enumeran en la Tabla 2. Se diluyeron soluciones madre de oligonucleótidos a una concentración de 20 μ M en agua estéril libre de ADNasa/ARNasa. Para dosificar un pocillo, se incubaron 2 μ l de esta solución con 400 μ l de medio Opti-MEM (Gibco, n.º de cat. 31985-070) y 4 μ l de
 50 Lipofectamine 2000 (Invitrogen, n.º de cat. 11668019) a temperatura ambiente durante 20 min y se aplicaron gota a gota a un pocillo de una placa de 6 pocillos con células. Se usó una mezcla similar, que incluye 2 μ l de agua en lugar de la solución de oligonucleótido, para los controles transfectados con vector simulado. Después de aproximadamente 18 horas de incubación a 37 °C y con el 5 % de CO₂, el medio se cambió por medio de crecimiento fresco. Cuarenta y ocho horas después de la adición de los oligonucleótidos antisentido, el medio se
 55 eliminó y se extrajo el ARN de las células usando el sistema de aislamiento de ARN total SV de Promega (n.º de cat. Z3105) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se añadieron seiscientos nanogramos de ARN total purificado a la reacción de transcripción inversa realizada usando el kit de síntesis de ADNc SuperScript VIL0 de Invitrogen (n.º de cat. 11754-250), tal y como se describe en el protocolo del fabricante. El ADNc de esta reacción de transcripción inversa se usó para monitorizar la expresión génica mediante PCR en tiempo real usando la mezcla de expresión
 60 génica Taqman de ABI (n.º de cat. 4369510) y cebadores/sondas diseñados por ABI (ensayos Hs00175940_ml para

- FXN humana). Los resultados obtenidos usando los tres ensayos fueron muy similares. Se usó el siguiente ciclo de PCR: 50 °C durante 2 min, 95 °C durante 10 min, 40 ciclos de (95 °C durante 15 segundos, 60 °C durante 1 min) usando el sistema de PCR en tiempo real StepOne Plus (Applied Biosystems). El ensayo para 18S fue fabricado por ABI (n.º de cat. 4319413E). 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. Para el Método del mismo día alternativo, se llevaron a cabo todos los procedimientos de forma similar, pero las células se dosificaron con oligonucleótidos antisentido el primer día, inmediatamente después de que se distribuyeran en placas de 6 pocillos.
- 10 *Células de linfocito GM15850D humano*: línea celular de linfoblasto GM15850D humano. La línea celular del fibroblasto GM03816A humano se obtuvo de un paciente varón de 13 años de edad con expansión GAA homocigótica en el gen frataxina (FXN) (alelos de aproximadamente 650 y 1030 repeticiones). Estas células se cultivaron en RPMI 1640 con 2 ml de L-glutamina (ATCC, n.º de cat. 30-2001) + 5 % de FBS no desactivado por calentamiento (Cellgrow, n.º de cat. 35-010 CV) + 1 % de penicilina/estreptomicina (Cellgrow, n.º de cat. 30-002-CI) a 37 °C y con el 5 % de CO₂. Las células se trataron con oligonucleótidos antisentido usando el siguiente método. Las células se sembraron en placas con una densidad de aproximadamente 3x10⁵/pocillo, en placas de 6 pocillos, en medio de crecimiento, se incubaron a 37 °C y con el 5 % de CO₂ durante la noche y se dosificaron inmediatamente con oligonucleótidos antisentido; después de la dosificación, cada pocillo contenía solo 1,5 ml. Se diluyeron soluciones madre de oligonucleótidos a una concentración de 20 µM en agua estéril libre de ADNasa/ARNasa. Para dosificar un pocillo, se incubaron 2 µl de esta solución con 400 µl de medio Opti-MEM (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 un pocillo de una placa de 6 pocillos con células. 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. Todos los nucleótidos antisentido fueron fabricados por IDT Inc. (Coralville, IA). Las secuencias de todos los oligonucleótidos se enumeran en la Tabla 2. Al día siguiente, se añadieron 1,5 ml de medio fresco a cada pocillo de las placas de 6 pocillos. Cuarenta y ocho horas después de la dosificación, las células tratadas con el mismo oligonucleótido antisentido se agruparon en un tubo cónico de 15 ml; las células transfectadas con vector simulado se agruparon en un tubo cónico de 15 ml. En ese momento, se centrifugaron las células a 120 g durante 6 minutos y se desechó el medio. Se lisó el sedimento celular con el fin de extraer el ARN celular usando un sistema de aislamiento de ARN total SV de Promega (n.º de cat. Z3105) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se añadieron seiscientos nanogramos de ARN total purificado a la reacción de transcripción inversa realizada usando el kit de síntesis de ADNc SuperScript VINO de Invitrogen (n.º de cat. 11754-250), tal y como se describe en el protocolo del fabricante. El ADNc de esta reacción de transcripción inversa se usó para monitorizar la expresión génica mediante PCR en tiempo real usando la mezcla de expresión génica Taqman de ABI (n.º de cat. 4369510) y cebadores/sondas diseñados por ABI (ensayos Hs00175940_ml para FXN humana). Los resultados obtenidos usando los tres ensayos fueron muy similares. Se usó el siguiente ciclo de PCR: 50 °C durante 2 min, 95 °C durante 10 min, 40 ciclos de (95 °C durante 15 segundos, 60 °C durante 1 min) usando el sistema de PCR en tiempo real StepOne Plus (Applied Biosystems). El ensayo para 18S fue fabricado por ABI (n.º de cat. 4319413E). 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. Para el Método del mismo día alternativo, se llevaron a cabo todos los procedimientos de forma similar, pero las células se dosificaron con oligonucleótidos antisentido el primer día, inmediatamente después de que se distribuyeran en placas de 6 pocillos.
- 45 *Línea celular CHP-212*: Se cultivaron células de neuroblastoma humano CHP-212 de ATCC (n.º de cat. CRL-2273) en medio de crecimiento (1:mezcla de MEM y F12 (ATCC n.º de cat. 30-2003 y Mediatech n.º de cat. 10-080-CV, respectivamente) +10 % de FBS (Mediatech, n.º de cat. MT35-011-CV) + penicilina/estreptomicina (Mediatech, n.º de cat. MT30-002-CI)) a 37 °C y con el 5 % de CO₂. Las células se trataron con oligonucleótidos antisentido usando uno de los siguientes métodos. Para el Método del día siguiente, un día antes del experimento, las células volvieron a sembrarse con una densidad de aproximadamente 2x10⁵/plátano, en placas de 6 pocillos, en medio de crecimiento y se incubaron a 37 °C y con el 5 % de CO₂ durante la noche. Al día siguiente, el medio de las placas de 6 pocillos se cambió por medio de crecimiento fresco (1,5 ml/pocillo) y se dosificaron las células con oligonucleótidos antisentido. Todos los nucleótidos antisentido fueron fabricados por IDT Inc. (Coralville, IA). Las secuencias de todos los oligonucleótidos se enumeran en la Tabla 2. Se diluyeron soluciones madre de oligonucleótidos a una concentración de 20 µM en agua estéril libre de ADNasa/ARNasa. Para dosificar un pocillo, se incubaron 2 µl de esta solución con 400 µl de medio Opti-MEM (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 un pocillo de una placa de 6 pocillos con células. 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 aproximadamente 18 horas de incubación a 37 °C y con el 5 % de CO₂, el medio se cambió por medio de crecimiento fresco. Cuarenta y ocho

horas después de la adición de los oligonucleótidos antisentido, el medio se eliminó y se extrajo el ARN de las células usando el sistema de aislamiento de ARN total SV de Promega (n.º de cat. Z3105) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se añadieron seiscientos nanogramos de ARN total purificado a la reacción de transcripción inversa realizada usando el kit de síntesis de ADNc SuperScript VILO de Invitrogen (n.º de cat. 11754-250), tal y como se describe en el protocolo del fabricante. El ADNc de esta reacción de transcripción inversa se usó para monitorizar la expresión génica mediante PCR en tiempo real usando la mezcla de expresión génica Taqman de ABI (n.º de cat. 4369510) y cebadores/sondas diseñados por ABI (ensayos Hs00175940_ml para FXN humana). Los resultados obtenidos usando los tres ensayos fueron muy similares. Se usó el siguiente ciclo de PCR: 50 °C durante 2 min, 95 °C durante 10 min, 40 ciclos de (95 °C durante 15 segundos, 60 °C durante 1 min) usando el sistema de PCR en tiempo real StepOne Plus (Applied Biosystems). El ensayo para 18S fue fabricado por ABI (n.º de cat. 4319413E). 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. Para el Método del mismo día alternativo, se llevaron a cabo todos los procedimientos de forma similar, pero las células se dosificaron con oligonucleótidos antisentido el primer día, inmediatamente después de que se distribuyeran en placas de 6 pocillos.

Línea celular HepG2: se cultivaron células de carcinoma hepatocelular humano 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-10-010-CV) +10 % de FBS (Mediatech, n.º de cat. MT35-011-CV) + 1 % de penicilina/estreptomina (Mediatech, n.º de cat. MT30-002-CI)) a 37°C y con el 5 % de CO₂. Las células se trataron con oligonucleótidos antisentido usando uno de los siguientes métodos. Para el Método del día siguiente, un día antes del experimento, las células volvieron a sembrarse con una densidad de aproximadamente 2x10⁵/plátano, en placas de 6 pocillos, en medio de crecimiento y se incubaron a 37 °C y con el 5 % de CO₂ durante la noche. Al día siguiente, el medio de las placas de 6 pocillos se cambió por medio de crecimiento fresco (1,5 ml/pocillo) y se dosificaron las células con oligonucleótidos antisentido. Todos los nucleótidos antisentido fueron fabricados por IDT Inc. (Coralville, IA). Las secuencias de todos los oligonucleótidos se enumeran en la Tabla 2. Se diluyeron soluciones madre de oligonucleótidos a una concentración de 20 µM en agua estéril libre de ADNasa/ARNasa. Para dosificar un pocillo, se incubaron 2 µl de esta solución con 400 µl de medio Opti-MEM (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 un pocillo de una placa de 6 pocillos con células. 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 aproximadamente 18 horas de incubación a 37 °C y con el 5 % de CO₂, el medio se cambió por medio de crecimiento fresco. Cuarenta y ocho horas después de la adición de los oligonucleótidos antisentido, el medio se eliminó y se extrajo el ARN de las células usando el sistema de aislamiento de ARN total SV de Promega (n.º de cat. Z3105) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se añadieron seiscientos nanogramos de ARN total purificado a la reacción de transcripción inversa realizada usando el kit de síntesis de ADNc SuperScript VILO de Invitrogen (n.º de cat. 11754-250), tal y como se describe en el protocolo del fabricante. El ADNc de esta reacción de transcripción inversa se usó para monitorizar la expresión génica mediante PCR en tiempo real usando la mezcla de expresión génica Taqman de ABI (n.º de cat. 4369510) y cebadores/sondas diseñados por ABI (ensayos Hs00175940_ml para FXN humana). Los resultados obtenidos usando los tres ensayos fueron muy similares. Se usó el siguiente ciclo de PCR: 50 °C durante 2 min, 95 °C durante 10 min, 40 ciclos de (95 °C durante 15 segundos, 60 °C durante 1 min) usando el sistema de PCR en tiempo real StepOne Plus (Applied Biosystems). El ensayo para 18S fue fabricado por ABI (n.º de cat. 4319413E). 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. Para el Método del mismo día alternativo, se llevaron a cabo todos los procedimientos de forma similar, pero las células se dosificaron con oligonucleótidos antisentido el primer día, inmediatamente después de que se distribuyeran en placas de 6 pocillos.

Resultados: en la Tabla 3 se muestran los niveles de ARNm del gen FXN en diferentes líneas celulares después del tratamiento con 20 nM de oligonucleótidos antisentido comparados con el control transfectado con vector simulado. Como se ve en los datos, algunos de los oligonucleótidos, cuando se aplicaron a una concentración de 20 nM, fueron muy activos en la regulación positiva de los niveles de ARNm del gen FXN y mostraron regulación positiva consistentemente en humanos (línea primaria y líneas celulares) en líneas celulares derivadas de diferentes tipos celulares/órganos: línea celular del hepatoma HepG2 (hígado), línea celular del linfoblasto del paciente GM15850D (sangre), línea celular del neuroblastoma CHP-212 (cerebro), línea celular del fibroblasto del paciente GM03816A. Algunos de los oligonucleótidos diseñados contra la secuencia antisentido natural no afectaron, o solo afectaron marginalmente, a los niveles de ARNm del gen FXN en todas, o algunas de, las líneas celulares ensayadas. Estas diferencias están en consonancia con los datos bibliográficos que indican que la unión de oligonucleótidos puede depender de las estructuras secundaria y terciaria de la secuencia diana de los oligonucleótidos.

60

La Tabla 3 muestra la expresión relativa del ARNm del gen FXN en células tratadas con oligonucleótidos antisentido dirigidos a transcrito antisentido natural específico de la FXN. Se hicieron las siguientes abreviaturas en los diferentes tipos celulares y órganos (hígado, sangre, fibroblasto, cerebro). Para obtener más información, vaya a los ejemplos 1 y 2.

5

Tabla 3:

	CUR-0732	CUR-0733	CUR-0734	CUR-0735
Línea celular HepG2 (datos normalizados para 18S)	1,8	1,6	1,4	0,9
Tipo celular: línea celular del carcinoma hepatocelular humano				
Tejido: Hígado				
Línea celular CHP-212 (datos normalizados para 18S)	2,5	1,9	1,9	1,6
Tipo celular: Línea celular del neuroblastoma humano				
Tejido: Cerebro				
Línea celular GM03816 (datos normalizados para beta-actina)	0,9	0,9	1,8	2,4
Tipo celular: Línea celular del linfoblasto humano				
Tejido: Sangre				
Línea celular GM15850 (datos normalizados para 18S)	2,5	2,2	2,5	0,4
Tipo celular: línea celular del fibroblasto humano				
Línea celular GM15850 (datos normalizados para beta-actina)	8	No disponible	2,8	No disponible
Tipo celular: línea celular del fibroblasto humano				

Aunque la divulgación se ha ilustrado y descrito con respecto a una o más implementaciones, se presentarán alteraciones y modificaciones equivalentes a los expertos en la técnica, en relación a la lectura y comprensión de esta especificación y los dibujos anexos. Además, aunque se ha descrito una característica particular de la divulgación con respecto a solo una de varias implementaciones, dicha característica puede combinarse con una o más de las otras características de otras implementaciones, ya que puede desearse y ser ventajoso para cualquier aplicación dada o particular.

15 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.

LISTADO DE SECUENCIAS

20

<110> OPKO CURNA LLC
 <120> TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES RELACIONADAS CON LA FRATAXINA (FXN) MEDIANTE INHIBICIÓN DEL TRANSCRITO ANTISENTIDO NATURAL AL GEN FXN
 <130> FXN

25

<140> US61/4947928
 <141> 09/06/2011
 <160> 6
 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1

30

<211> 7176
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 1

ES 2 653 247 T3

agtcctccctt gggtcagggg tcctgggtgc actccgtgct ttgcacaaag caggtctctcc	60
atctttgtta aatgcacgaa tagtgctaag ctgggaagtt cttcctgagg tctaacctct	120
agctgctccc ccacagaaga gtgcctgctg ccagtggtcca ccaggggtcg ccgcagcacc	180
cagcgttggg gggcggagcg ggcggcagac ccggagcagc atgtggactc tcgggcgccg	240
cgcagtagec ggctctctgg cgtcaccag cccagcccag gcccagacct tcacctgggt	300
cccgcggccg gcagagttgg ccccaactct cggccgccgt ggcctgcgca ccgacatcga	360
tgcgacctgc acgccccgcc gcgcaagttc gaaccaacgt ggcctcaacc agatttgtaa	420
tgtcaaaaag cagagtgtct atttgatgaa ttgaggaaa tctggaactt tgggccacct	480
aggctctcta gatgagacca cctatgaaag actagcagag gaaacgctgg actctttagc	540
agagtttttt gaagaccttg cagacaagcc atacacgttt gaggactatg atgtctcctt	600
tgggagtggg gtcttaactg tcaaactggg tggagatcta ggaacctatg tgatcaacaa	660
gcagacgcca aacaagcaaa tctggctatc ttctccatcc aggtatgtag tggacctaa	720
cgttatgact ggactgggaa aaactgggtg tactcccacg acggcgtgtc cctccatgag	780
ctgctggccg cagagctcac taaagcctta aaaaccaaac tggacttgtc ttccttggcc	840
tattccggaa aagatgcttg atgcccagcc ccgttttaag gacattaaaa gctatcaggc	900
caagacccca gcttcattat gcagctgagg tctgtttttt gttgttgttg ttgtttatft	960
tttttattcc tgcttttgag gacagttggg ctatgtgtca cagctctgta gaaagaatgt	1020
gttgctcctt accttgcccc caagttctga tttttaattt ctatggaaga ttttttggat	1080
tgctggatft cctccctcac atgatacccc ttatctttta taatgtctta tgcctatacc	1140
tgaatataac aacctttaaa aaagcaaat aataagaagg aaaaattcca ggagggaaaa	1200
tgaattgtct tcactcttca ttctttgaag gatttactgc aagaagtaca tgaagagcag	1260

ES 2 653 247 T3

ctggtcaacc tgetcactgt tctatctcca aatgagacac attaaagggt agcctacaaa 1320
 tgttttcagg cttctttcaa agtgaagca cttctgagct ctttagcatt gaagtgtcga 1380
 aagcaactca cacgggaaga tcatttctta ttigtgtctt gtgactgcca aggtgtggcc 1440
 tgcactgggt tgtccaggga gacctagtgc tgtttctccc acatattcac atacgtgtct 1500
 gtgtgtatat atatTTTTTc aatttaaagg ttagtatgga atcagctgct acaagaatgc 1560
 aaaaaatctt ccaaagacaa gaaaagagga aaaaagccg ttttcatgag ctgagtgatg 1620
 tagcgtaca aacaaaatca tggagctgag gaggtgcctt gtaaacaatga aggggcagat 1680
 aaaggaagga gatactcatg ttgataaaga gagccctggt cctagacata gttcagccac 1740
 aaagtagttg tccctttgtg gacaagtttc ccaaattccc tggacctctg cttccccatc 1800
 tgttaaataga gagaatagag tatggttgat tcccagcatt cagtggctct gtcaagcaac 1860
 ctaacaggct agttctaatt ccctattggg tagatgaggg gatgacaaag aacagttttt 1920
 aagctatata ggaaacattg ttattggtgt tgcctatcg tgatttcagt tgaattcatg 1980
 tgaaaataat agccatcctt ggcttgggc ggtggctcac acctgtaac ccagcacttt 2040
 tggaggccaa ggtgggtgga tcacctgagg tcaggagttc aagaccagcc tggccaacat 2100
 gatgaaaccc cgtctctact aaaaatacaa aaaattagcc gggcatgatg gcaggtgect 2160
 gtaatcccag ctacttggga ggctgaagcg gaagaatcgc ttgaaccag aggtggaggt 2220
 tgcagtgagc cgagatcgtg ccattgcact gtaacctggg tgactgagca aaactctgtc 2280
 tcaaaaataat aataacaata taataataat aatagccatc ctttatgtga cccttactgg 2340
 gttaatcgtg ttataaccaca ttacctcatt ttaattttta ctgacctgca ctttatacaa 2400
 agcaacaagc ctccaggaca ttaaaattca tgcaaagtta tgetcatggt atattatttt 2460
 cttacttaaa gaaggattta ttagtggtct ggcatggtgg cgtgcacctg taatcccagg 2520
 tactcaggag gctgagacgg gagaattgct tgaccccagg cggaggaggt tacagtgagt 2580
 cgagatcgtg cctgagcgac agagcgagac tccgtctcaa aaaaaaaaaa aaggagggtt 2640
 tattaatgag aagtttgtat taatatgtag caaaggcttt tccaatgggt gaataaaaac 2700
 acattccatt aagtcaagct gggagcagtg gcatatacct atagtcccag ctgcacagga 2760
 ggtgagaca ggaggattgc ttgaagccag gaattggaga tcagcctggg caacacagca 2820
 agatcctatc tcttaaaaaa agaaaaaaaa acctattaat aataaaacag tataacaaa 2880
 agctaaatag gtaaaatatt ttttctgaaa taaaattatt ttttgagtct gatggaaatg 2940
 ttttaagtga gtaggccagt gccagtgaga aaataaataa catcatacat gtttgtatgt 3000
 gtttgcactt tgetttact gaaagtttca gtgcaccca cttacttaga actcggtgac 3060
 atgatgtact cctttatctg ggacacagca caaagaggt atgcagtggg gctgctctga 3120

ES 2 653 247 T3

catgaaagtg gaagttaagg aatctgggct cttatggggg ccttgtgggc cagcccttca 3180
ggcctatfff actttcattt tacatatagc tctaattggg ttgattatct cgttcccaag 3240
gcagtgggag atccccattt aaggaaagaa aaggggectg gcacagtggc tcatgcctgt 3300
aatcccagca ctttgggagg ctgaggcaag tgtatcacct gaggtcagga gttcaagacc 3360
agcctggcca acatggcaaa atccccgtct tactaaaaat attaaaaaat tggctgggcy 3420
tgggtggttcg tgcctataat ttcagctact caggaggctg aggcaggaga atcgctgtaa 3480
cctggggggg ggaggttgca gtgagacgag atcatgccac ttcactccag cctggccaac 3540
agagccarac tccgtctcaa ataaataaat aaataaataa agggacttca aacacatgaa 3600
cagcagccag ggaagaatc aaaatcatat tctgtcaagc aaactggaaa agtaccactg 3660
tgtgtacca tagcctccc accacagacc ctgggagcat cgcctcattt atggtgtggg 3720
ccagtcatcc atgtgaagga tgagttcca gaaaagggtt attaaatatt cactgtaaca 3780
tactggagga ggtgaggaat tgcataatac aatcttagaa aactttttt tccccttct 3840
atttttgag acaggatctc actttggcac tcaggctgga ggacagtggg acaatcaaag 3900
ctcatggcag cctcgacctc cctgggcttg ggcaatctc ccacaggtgt gcacctccat 3960
agctggctaa tttgtgtatt tttgtagag atggggtttc accatgttgc ccaggtggg 4020
ctctaact taggctcaag tgatccacct gcctcgctct cccaagatgc tgggattaca 4080
ggtgtgtgcc acaggtgtc atcagaaagc ttttctatt atttttacct tcttgagtgg 4140
gtagaacctc agccacatag aaaataaaat gttctggcat gacttattfa gctctctgga 4200
attacaaaga aggaatgagg tgtgtaaaag agaacctggg ttttgaatc acaaatttag 4260
aatttaatcg aaactctgcc tcttacttgt ttgtagacac tgacagtggc ctcatgtttt 4320
ttttttttt aatctataaa atggagatat ctaacatgtt gagcctgggc ccacaggcaa 4380
agcacaatcc tgatgtgaga agtactcagt tcatgacaac tgttgttctc acatgcatag 4440
cataattfca tattcacatt ggaggacttc tcccaaaata tggatgacgt tccctactca 4500
accttgaact taatcaaaat actcagttta ctttaactcg tattagattc tgattccctg 4560
gaaccattta tctgtgtcct taccatgctt atattttact tgatctttg cataccttct 4620
aaaactattt tagccaattt aaaatttgac agtttgcatt aaattatagg tttaaatat 4680
gctttatcca gctataactg ccccaaatc tgacagatgc ttttggcacc tctaaaggaa 4740
gacccatggt catagtgatg gagtttgtgt ggactaacca tgcaaggttg ccaaggaaaa 4800
atcgctttac gcttccaagg tacacactaa gatgaaagta attttagtcc gtgtccagtt 4860
ggattcttgg cacatagtta tcttctgcta gaacaaacta aaacagctac atgccagcaa 4920
gggagaaagg ggaaggagg gcaaagtttt gaattttcat gtaaatttat gctgttcaaa 4980
acgacgagtt catgactttg tgtatagagt aagaaatgcc ttttctttt tgagacagag 5040

ES 2 653 247 T3

tcttgcctctg tcacccaggc tggagtgagc tggcacgac tgggctcact acaacctccg 5100
 cctcctgggt tcaagcaatt ctctgcctca gcctcccag tagctgggat tacaggtgcc 5160
 tgccaccaca cccggctaata ttttgatatt ttagtagaga cggggtttca ccatcatggc 5220
 caggctggtc ttgaactcct gacctagtaa tccacctgcc tccgcctccc aaagtgcctg 5280
 gattacaggc gtgagccact gcaccagcc agaaatgcct tctaactctt ggtttatctt 5340
 aattagccag gacacttggg gtgcacccc aagtacctga tcagtggccc ctttggaatg 5400
 tgtaaaactc agctcactta tatccctgca tccgctacag agacagaatc caagctcata 5460
 tgttccatct tctctggctg tatagtttaa ggaatggaag gcaccagaac agatttattg 5520
 aaatgtttat tagctgaaga tttatttaga cagttgagga aaacatcagc acccagcagt 5580
 aaaattggct ctcaaagatt tcttctcct gtggaagtc agacctctga ggccccatcc 5640
 aggtagaagt actagtgcga gaaggcctc tgcctccac ttgtgttct gtgatctgtg 5700
 ggaacattgt taacgccaca tcttgacctc aaattgttta gctcctggcc agacacggtg 5760
 gctcacacct gtaatcccag cactttgaga ggctgaggca ggtggatcac ctgaggttag 5820
 gagtccgagg ccagcctggg caacatggta aaaccccgcc tctactaaaa atacaaaaat 5880
 tagctggccg tagtggcgca cgcctgttat cccagctact cgggaggctg aggcaggaga 5940
 attgcttgaa cctgggtggg ggaggttgc gtgagccag attacaccac tgcactccag 6000
 cctgggtgac aagagggaaa ctccattaaa aaaatgtaat tcccgtgtct gccatcttaa 6060
 gtgtaaaggt ggctaaatta tatagaaaaa taagacaata tcatttccca attacattc 6120
 tttcctaccg cactctatga tgctagctga gatttttcca aaagaaaatg gcttaaaaa 6180
 aaccctaaga gaaagaaaaa ctttaaatcc ctccaaagct caaaagtaat agaaacagat 6240
 gagtgtggag tcaggatttc tctgtaagat tgccctaggc gtgtactgca catctccagg 6300
 tgccactgtt gacagagatt ataactacaa tgtgaagtga atgggtgccac tgacagttat 6360
 gcaaaccgtc cagagcatag ccacctgac ctgctgggat tctcttgcc agtccatcag 6420
 cagttccccct tgaagtttc accaaacatc ctttaaatct gccctctctt gccctcccc 6480
 agtggaggtc ctcatcattt ttcacctgca tttttgcagg agctttctta tatccacctt 6540
 cctccttttc tctcagccca tcacttagct acacagctc cagggttaagc tttcagaaaag 6600
 gcaatctctt gtctgtaaaa cctaagcagg accaaggcca agtttcttag cctgaaaaat 6660
 gtgcttttct gactgaactg ttcaggcact gactctacat ataattatgc tttctaccc 6720
 cctcacactc aacactttga ctccagcaat cccaaatccc cagatcccta agtgtgctgt 6780
 gctattttca cgtggctctc agacttggcc agtgcctgtt ccattttggg ctttattccc 6840
 cacatctctg cctggggggg agattctacc ctgaaaaatg ttcttggcac agccttgcaa 6900

ES 2 653 247 T3

actcctcctc cactcagcct ctgcctggat gcccttgatt gttccatgtc ctcagcatac 6960
 catgtttgtc tttcccagca ctgacctacc atgtgtcacc cctgcttggc tgtaccttcc 7020
 atgaggctag gactatgtgt ctcctttggt gactgctggt gccctagcat cttgcacagt 7080
 tccttgcaca caattagagc tctataaatg tcaaataaat gtgttataat tatatgttta 7140
 agatagttgt tcaaataaac tctaaataac cccaac 7176

<210> 2
 <211> 454
 <212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 2
 caactctgcc ggccgcggga cccgggtgag ggtctgggcc tgggctgggc tgggtgacgc 60
 caggaggccg gctactgctc ggcgcccag agtccacatg ctgctccggg tctgccccc 120
 gctccgccct ccagcgtctg gtgctgctgg gaccctggt ggccactggc cgcaggcact 180
 cttctgtggg ggagcagcta gaggttagac ctcaggaaga acttcccagc ttagcactat 240
 tcgtgcattt aacaaaaatg gagagcctgc tttgtgcaaa gcacggagtg caaccaggac 300
 ccccgaccca agggagactg cagcctggtg gcccgccgct tctaaaattc taaacaggag 360
 gaacttggga gctgctgtct tgctgggaag tgggtgcatg cacaaattga ggctgcttgg 420
 ccgcccgtat gggtttacag cagttgggta tgtg 454

<210> 3
 <211> 20

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido antisentido

<400> 3

15 gctccaagt tcctctgtt 20

<210> 4

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Oligonucleótido antisentido

<400> 4

cggagcagca tgggactct 20

<210> 5

25 <211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido antisentido

30 <400> 5

ggagcagcat gttgactct 19

<210> 6

<211> 21

<212> ADN

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido antisentido

<400> 6

gtctaacctc tagctgtcc c 21

40

REIVINDICACIONES

1. Oligonucleótido dirigido a un transcrito antisentido natural de la Frataxina (FXN) para su uso como un compuesto terapéutico, donde el oligonucleótido aumenta la expresión de la Frataxina (FXN).
5
2. Oligonucleótido dirigido a un transcrito antisentido natural de la Frataxina (FXN) para uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad o un trastorno asociados a la Frataxina (FXN), donde el oligonucleótido aumenta la expresión de la Frataxina (FXN), donde la enfermedad o el trastorno es ataxia de Friedreich.
10
3. Procedimiento *in vitro* para aumentar la expresión de la Frataxina (FXN) en células o tejidos del paciente que comprende: poner en contacto dichas células o tejidos con un oligonucleótido dirigido a un transcrito antisentido natural de la Frataxina (FXN); aumentando así la expresión de la Frataxina (FXN).
15
4. Oligonucleótido para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, o procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, donde el transcrito antisentido natural tiene la secuencia de ácido nucleico tal y como se expone en la SEQ ID NO: 2.
20
5. Oligonucleótido para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 4, o método de acuerdo con la reivindicación 3 o la reivindicación 4, donde el oligonucleótido es monocatenario.
25
6. Oligonucleótido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4 o 5, o método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, donde el oligonucleótido es un compuesto de siRNA.
30
7. Oligonucleótido para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4 o 6, o método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, donde el oligonucleótido comprende al menos una de las SEQ ID NO: 3 a 6.
35
8. Oligonucleótido para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4 o 7, o método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7, donde la expresión de la Frataxina (FXN) está aumentada en al menos un 10 %.
40
9. Oligonucleótido para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4 u 8, o método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8, donde el oligonucleótido además comprende una o más modificaciones que comprenden:
45
- a. al menos un enlace internucleosídico modificado seleccionado de entre: un fosforotioato, alquilfosfonato, fosforditioato, alquilfosfonotioato, fosforamidato, carbamato, carbonato, triéster de fosfato, acetamidato, éster carboximetílico y combinaciones de los mismos;
- b. al menos un nucleótido modificado seleccionado de entre: un ácido nucleico peptídico (PNA), un ácido nucleico bloqueado (LNA), un ácido arabino-nucleico, un análogo, un derivado, y combinaciones de los mismos; o
40
- 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-alkilo, un resto de azúcar bicíclico, un resto de azúcar modificado con 2'-fluoro y combinaciones de los mismos.
45
10. Oligonucleótido dirigido a un transcrito antisentido natural de la Frataxina (FXN), donde el oligonucleótido aumenta la expresión de la Frataxina (FXN), donde el oligonucleótido consiste en una de las SEQ ID NO: 3, 4 o 6.
50
11. Oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 10, donde el transcrito antisentido natural de la Frataxina (FXN) tiene la secuencia de ácido nucleico tal y como se expone en la SEQ ID NO: 2.
55
12. Oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 10 o la reivindicación 11, donde el oligonucleótido es un compuesto de siRNA.
13. Oligonucleótido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, donde la expresión de la Frataxina (FXN) está aumentada en al menos un 10 %.
14. Oligonucleótido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, donde el oligonucleótido además comprende una o más modificaciones que comprenden:

- a. al menos un enlace internucleosídico modificado seleccionado de entre: un fosforotioato, alquifosfonato, fosforoditioato, alquifosfonotioato, fosforamidato, carbamato, carbonato, triéster de fosfato, acetamidato, éster carboximetílico y combinaciones de los mismos;
- 5 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, un resto de azúcar modificado con 2'-fluoro y combinaciones de los mismos.
- 10
15. Composición farmacéutica que comprende al menos un oligonucleótido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Figura 1

Diferencia (veces) en el número de copias de ARNm del gen FXN en comparación con el control (usando 18S como control endógeno)

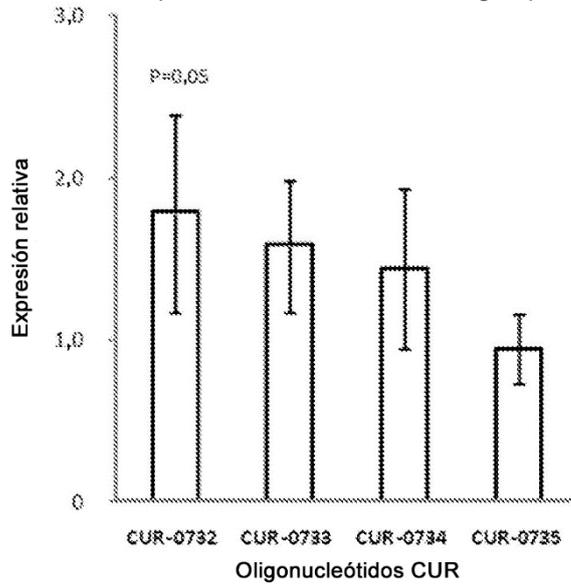


Figura 2

Diferencia (veces) en el número de copias de ARNm del gen FXN en comparación con el control (usando 18S como control endógeno)

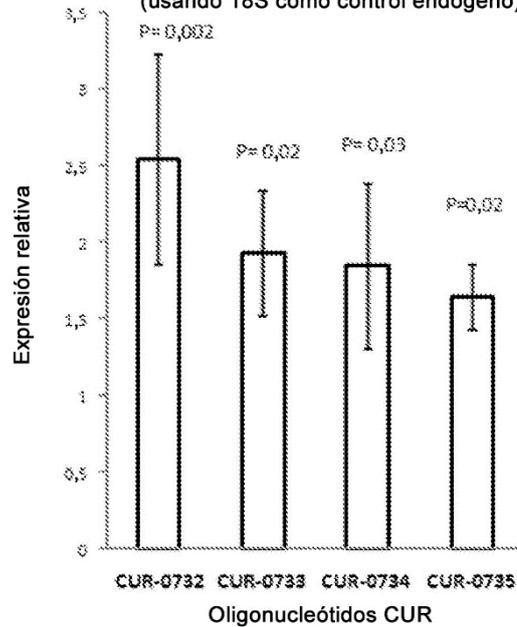


Figura 3

Diferencia (veces) en el número de copias de ARNm del gen FXN en comparación con el control (usando beta-actina como control endógeno)

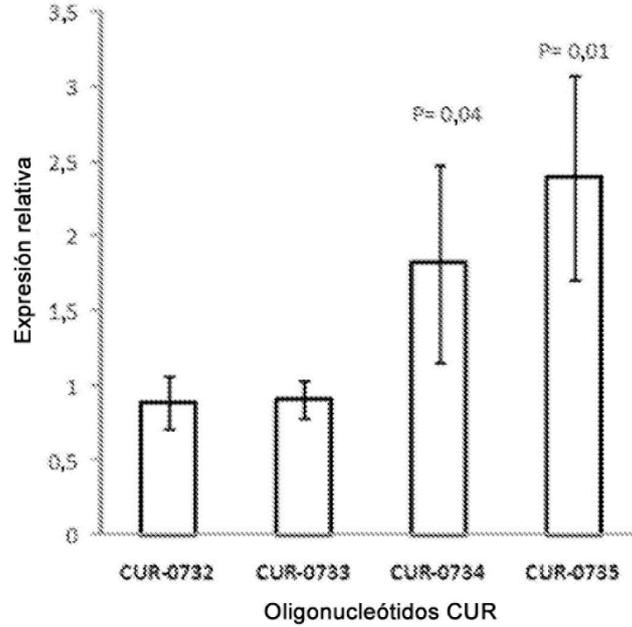


Figura 4

Diferencia (veces) en el número de copias de ARNm del gen FXN en comparación con el control (usando 18S como control endógeno)

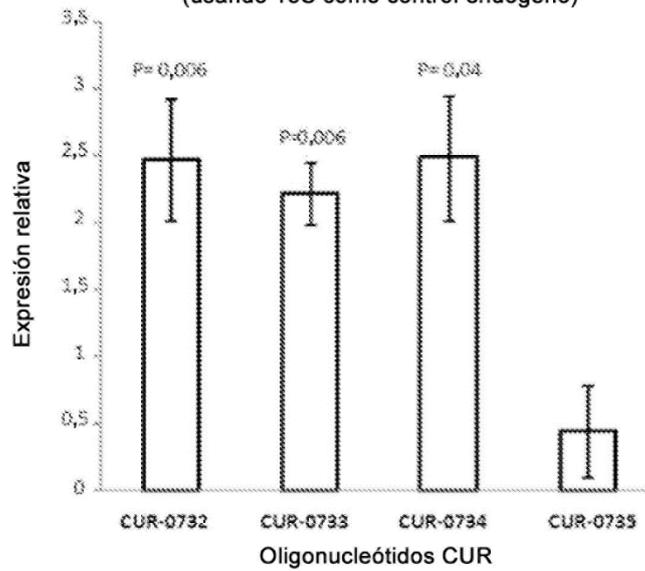


Figura 5

Diferencia (veces) en el número de copias de ARNm del gen FXN en comparación con el control (usando beta-actina como control endógeno)

