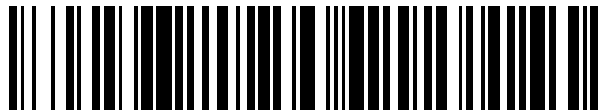


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 658 626**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/113** (2010.01)

**C12N 5/10** (2006.01)

**C12N 15/63** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.02.2010 PCT/US2010/024079**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.08.2010 WO10093906**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.02.2010 E 10741791 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.09.2017 EP 2396408**

54 Título: **Tratamiento de enfermedades relacionadas con el factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) por inhibición de transcrito antisentido natural a GDNF**

30 Prioridad:

**12.02.2009 US 152239 P**

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

**12.03.2018**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 658 626 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Tratamiento de enfermedades relacionadas con el factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) por inhibición de transcrito antisentido natural a GDNF

5

### CAMPO DE LA DIVULGACIÓN

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de EE.UU. nº 61/152.239 presentada el 12 de febrero de 2009.

10

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

### ANTECEDENTES

15

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

20

25

El documento WO 98/46737 describe ADNc para GDNF humano y promotor para el mismo que permite expresión regulada y constitutiva.

30

Qi H et al. 2008, Experimental Eye Research, vol. 87(6): 580-586 describen que la administración de genes del factor neurotrófico derivado de células gliales mejora la supervivencia del epitelio corneal humano en cultivo y la sobreexpresión de GDNF en construcciones de bioingeniería.

35

El documento WO 2010/086389 describe un ensayo de metilación.

40

Yona et al. 2003, Journal of the American Society of Nephrology, vol. 14(3): 620-630 describen que la producción de factores de crecimiento autocrinos mesangiales GDNF e IL10 está regulada por el inmunomodulador AS101.

### RESUMEN DE LA INVENCIÓN

40

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

### RESUMEN DE LA DIVULGACIÓN

45

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

50

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

55

Un aspecto proporciona un procedimiento de modulación de la función y/o la expresión de un polinucleótido de GDNF 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 237 de la SEQ ID NO: 2 o los nucleótidos 1 a 1246 de la SEQ ID NO: 3 o los nucleótidos 1 a 684 de la SEQ ID NO: 4 (figura 3), o los nucleótidos 1 a 400 de la SEQ ID NO: 42 o los nucleótidos 1 a 619 de la SEQ ID NO: 43 o los nucleótidos 1 a 813 de la SEQ ID NO: 44 modulando de este

60

modo la función y/o la expresión del polinucleótido de GDNF en células o tejidos del paciente *in vivo* o *in vitro*.

En otro caso preferido, un oligonucleótido se dirige a una secuencia antisentido natural de polinucleótidos de GDNF, por ejemplo, nucleótidos expuestos en las SEQ ID NO: 2 a 4 y 42 a 44, y cualquier variante, alelo, homólogo, mutante, derivado, fragmento y secuencia complementaria a los mismos. Ejemplos de oligonucleótidos antisentido se exponen como las SEQ ID NO: 5 a 34 (Figura 4).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Otros aspectos se describen más adelante.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

### Figura 1

La figura 1 A es un gráfico de resultados de PCR en tiempo real que muestra el cambio en veces + la desviación estándar en ARNm de GDNF después del tratamiento de células HUVEC con oligonucleótidos de fosforotioato introducidos usando Lipofectamine 2000, en comparación con el control. Las barras indicadas como CUR-0117, CUR-0118, CUR-0119, CUR-0120, CUR-0121 y CUR-0122 se corresponden con muestras tratadas con las SEQ ID NO: 5 a 10 respectivamente.

La figura 1 B es un gráfico de resultados de PCR en tiempo real que muestra el cambio en veces + la desviación estándar en ARNm de GDNF después del tratamiento de células HUVEC con oligonucleótidos de fosforotioato introducidos usando Lipofectamine 2000, en comparación con el control. Los resultados de la PCR en tiempo real muestran que los niveles de GDNF antisentido disminuyeron significativamente después del tratamiento con CUR-0117. Las barras indicadas como CUR-0117 y CUR-0118 se corresponden con muestras tratadas con las SEQ ID NO: 5 y 6 respectivamente.

La figura 1 C: es un gráfico de resultados de PCR en tiempo real que muestra el cambio en veces + la desviación estándar en ARNm de GDNF después del tratamiento de células HepG2 con oligonucleótidos de

fosforotioato introducidos usando Lipofectamine 2000, en comparación con el control. Las barras indicadas como CUR-0741 a CUR-0764 se corresponden con muestras tratadas con las SEQ ID NO: 11 a 34 respectivamente.

5 La figura 1 D: es un gráfico de resultados de PCR en tiempo real que muestra el cambio en veces + la desviación estándar en ARNm de GDNF después del tratamiento de células Vero con oligonucleótidos de fosforotioato introducidos usando Lipofectamine 2000, en comparación con el control. Las barras indicadas como CUR-0741 a CUR-0764 se corresponden con muestras tratadas con las SEQ ID NO: 11 a 34 respectivamente.

10 La figura 1 E: es un gráfico de resultados de PCR en tiempo real que muestra el cambio en veces + la desviación estándar en ARNm de GDNF después del tratamiento de células CHP212 con oligonucleótidos de fosforotioato introducidos usando Lipofectamine 2000, en comparación con el control. Las barras indicadas como CUR-0751, CUR-0752, CUR-0753, CUR-0120, CUR-0121 y CUR-0117 se corresponden con muestras tratadas con las SEQ ID NO: 21, 22, 23, 8, 9 y 5 respectivamente.

15 La Figura 2 muestra la SEQ ID NO: 1: Factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) de Homo sapiens, variante 3 de transcrito, ARNm (número de acceso del NCBI NM\_199234.1) y la SEQ ID NO: 45 muestra la secuencia genómica de GDNF (se muestran exones en letras mayúsculas, intrones en minúsculas).

La Figura 3 muestra

20 SEQ ID NO: 2: Secuencia antisentido natural (AW883557.1 (A))

SEQ ID NO: 3: Secuencia antisentido natural (BM547433 (PR))

SEQ ID NO: 4: Secuencia antisentido natural (BX505687)

La Figura 4 muestra los oligonucleótidos antisentido, las SEQ ID NO: 5 a 34. \* indica enlace fosfotioato.

La Figura 5 muestra las SEQ ID NO: 35 al 41.

La Figura 6 muestra

25 SEQ ID NO: 42: Secuencia antisentido natural (AW883557.1 (A)) splicing alterno a

SEQ ID NO: 43: Secuencia antisentido natural (AW883557.1 (A)) splicing alterno b

SEQ ID NO: 44: Secuencia antisentido natural (AW883557.1 (A)) splicing alterno c

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA DIVULGACIÓN

30 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  
35 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.

40 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  
45 contexto en el que aparece lo indique claramente. De este modo, por ejemplo, para los genes divulgados en el presente documento, que en algunos casos se refieren a secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos de mamífero, pretenden englobar genes homólogos y/u ortólogos y productos génicos de otros animales que incluyen, aunque sin limitarse a, otros mamíferos, peces, anfibios, reptiles y aves. En casos preferidos, los genes o  
50 secuencias de ácidos nucleicos son humanos.

### **Definiciones**

La terminología usada en el presente documento es con el fin de describir aspectos particulares solamente y no pretende ser limitante de la divulgación. Tal como se usan en el presente documento, se pretende que las formas en  
55 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."

60 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, "aproximadamente" puede significar 1 o más de 1 de

desviación estándar, conforme a la práctica de la técnica. Como alternativa, "aproximadamente" puede significar un intervalo de hasta el 20%, preferentemente hasta el 10%, más preferentemente hasta el 5%, y más preferentemente todavía hasta el 1% de un valor dado. De manera alternativa, en particular con respecto a los sistemas o procesos biológicos, el término puede significar un orden de magnitud de un valor preferentemente comprendido en 5 veces y

5 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

10 conocidos de un gen elegido como diana, y cualquier transcrito adicional que pueda ser dilucidado.

Por "oligonucleótidos antisentido" o "compuesto antisentido" se indica una molécula de ARN o de ADN que se une a otro ARN o ADN (ARN, ADN diana). Por ejemplo, si este es un oligonucleótido de ARN, se une a otra diana de ARN por medio de interacciones ARN-ARN y altera la actividad del ARN diana (Eguchi et al., (1991) Ann. Rev. Biochem.

15 60, 631-652). Un oligonucleótido antisentido puede regular positivamente o regular negativamente la expresión y/o función de un polinucleótido particular. La definición pretende comprender cualquier molécula de ARN o ADN extraña que es útil desde un punto de vista terapéutico, de diagnóstico u otro. Dichas moléculas incluyen, por ejemplo, moléculas de ARN o ADN antisentido, ARN de interferencia (iARN), micro ARN, moléculas de ARN señuelo, siRNA, ARN enzimático, ARN de edición terapéutica y ARN agonista y antagonista, compuestos

20 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.

25 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

30 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 Hoögsteeen o Hoögsteeen inversa, o similares.

El oligonucleótido puede ser "quimérico", es decir, estar compuesto de diferentes regiones. En el contexto de esta

35 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

40 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,

45 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

50 funcionalidades, por ejemplo, tener carga positiva o negativa, portar propiedades de unión a ácido nucleico especiales (intercaladores, ligantes de surcos, toxinas, fluoróforos, etc.), ser lipófilos, inducir estructuras secundarias especiales como, por ejemplo, péptidos que contienen alanina que inducen hélices alfa.

Tal como se usa en el presente documento, "GDNF" y "factor neurotrófico derivado de células gliales" incluyen todos

55 los miembros de la familia, mutantes, alelos, fragmentos, especies, secuencias codificantes y no codificantes, hebras de polinucleótidos sentido y antisentido, etc.

Tal como se usan en el presente documento, las palabras "factor neurotrófico derivado de células gliales", "factor neurotrófico derivado de línea de células gliales", "factor neurotrófico derivado de células gliales", "factor trófico derivado de astrocitos", "ATF", "ATF1", "ATF2", "HFB1-GDNF", "hGDNF" y GDNF se consideran iguales en la

60 bibliografía y se usan indistintamente en la presente solicitud.

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

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

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

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

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

Por "ARN señuelo" se indica una molécula de ARN que imita el dominio de unión natural para un ligando. El ARN señuelo compite, por lo tanto, con la diana de unión natural para la unión de un ligando específico. Por ejemplo, se ha mostrado que la sobreexpresión de ARN de respuesta de activación en trans (TAR) de HIV puede actuar como un "señuelo" y se une de forma eficiente a la proteína tat de HIV, impidiendo de este modo que se una a secuencias TAR codificadas por el ARN de HIV (Sullenger et al. (1990) Cell, 63, 601-608). Esto se indica que es un ejemplo

específico. Los expertos en la materia reconocerán que esto es solo un ejemplo, y fácilmente pueden generarse otros aspectos usando técnicas generalmente conocidas en la técnica.

- Tal como se usa en el presente documento, el término "monómeros" normalmente indica monómeros enlazados por enlaces fosfodiéster o análogos de los mismos para formar oligonucleótidos que varían en tamaño entre unas pocas unidades monoméricas, por ejemplo, entre aproximadamente 3-4, y aproximadamente varios cientos de unidades monoméricas. Los análogos de enlaces fosfodiéster incluyen: fosforotioato, fosforoditioato, metilfosfonatos, fosforoselenoato, fosforamido y similares, tal como se describe más completamente más adelante.
- 5 El término "nucleótido" cubre nucleótidos de origen natural, así como nucleótidos no de origen natural. Debe ser evidente para el experto en la materia que diversos nucleótidos que se consideraron anteriormente "no de origen natural" se han descubierto posteriormente en la naturaleza. De este modo, "nucleótidos" incluye no solamente las moléculas que contienen heterociclos de purina y pirimidina conocidas, sino también análogos heterocíclicos y tautómeros de las mismas. Ejemplos ilustrativos de otros tipos de nucleótidos son moléculas que contienen adenina, guanina, timina, citosina, uracilo, purina, xantina, diaminopurina, 8-oxo- N6-metiladenina, 7-deazaxantina, 7-deazaguanina, N4,N4-etanocitosina, N6,N6-etano-2,6- diaminopurina, 5-metilcitosina, 5-alquil(C3-C6)-citosina, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, pseudoisocitosina, 2-hidroxi-5-metil-4-triazolopiridina, isocitosina, isoguanina, inosina y los nucleótidos "no de origen natural" descritos en Benner y col., patente de EE.UU. 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.
- 10 Nucleótidos especialmente interesantes son aquellos que contienen adenina, guanina, timina, citosina y uracilo, que se consideran como los nucleótidos de origen natural en relación con la aplicación terapéutica y diagnóstica en seres humanos. Los nucleótidos incluyen los azúcares naturales 2'-desoxi y 2'-hidroxilo, por ejemplo, como se describe en Kornberg y Baker, DNA Replication, 2nd Ed. (Freeman, San Francisco, 1992), además de sus análogos.
- 15 "Análogos", en referencia a nucleótidos, incluye nucleótidos sintéticos que tienen restos de bases modificados y/o restos de azúcar modificados (véase, por ejemplo, descrito generalmente por Scheit, Nucleotide Analogs, John Wiley, New York, 1980; Freier & Altmann, (1997) Nucl. Acid. Res., 25(22), 4429- 4443; Toulmé, J.J., (2001) Nature Biotechnology 19:17-18; Manoharan M., (1999) Biochemica et Biophysica Acta 1489:117-139; Freier S. M., (1997) Nucleic Acid Research, 25:4429-4443; Uhlman, E., (2000) Drug Discovery & Development, 3: 203-213; Herdewin P., (2000) Antisense & Nucleic Acid Drug Dev., 10:297-310); 2'-O, 3'-C-enlazados [3.2.0] biciclorabinonucleósidos (véase, por ejemplo, N.K Christensen., et al, (1998) J. Am. Chem. Soc., 120: 5458-5463; Prakash TP, Bhat B. (2007) Curr Top Med Chem. 7(7):641-9; Cho EJ, et al. (2009) Annual Review of Analytical Chemistry, 2, 241-264). Dichos análogos incluyen nucleótidos sintéticos diseñados para potenciar propiedades de unión, por ejemplo, la estabilidad, especificidad del dúplex o el tríplex, o similares.
- 20 Tal como se usa en el presente documento, "hibridación" significa el apareamiento de cadenas sustancialmente complementarias de compuestos oligoméricos. Un mecanismo de apareamiento implica la formación de puentes de hidrógeno, que pueden ser puentes de hidrógeno de Watson-Crick, Hoogsteen o de Hoogsteen inverso, entre bases de nucleósidos o de nucleótidos (nucleótidos) complementarias de las cadenas de compuestos oligoméricos. Por 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.
- 25 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.
- 30 Tal como se usa en el presente documento, la frase "condiciones de hibridación astringentes" o "condiciones astringentes" se refiere a condiciones en las que un compuesto de la divulgación hibridará con su secuencia diana, pero con un número mínimo de otras secuencias. Las condiciones astringentes son dependientes de secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias y en el contexto de esta divulgación, "condiciones astringentes" en las que compuestos oligoméricos hibridan con una secuencia diana se determinan mediante la naturaleza y la composición de los compuestos oligoméricos y los ensayos en los que están siendo investigados. En general, las condiciones de hibridación astringentes comprenden bajas concentraciones (<0,15 M) de sales con cationes inorgánicos tales como Na<sup>++</sup> o K<sup>++</sup> (es decir, baja fuerza iónica), temperatura superior a 20°C - 25 °C por debajo de la T<sub>m</sub> 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.

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

Como se usa en el presente documento, el término "cáncer" se refiere a cualquier tumor maligno, particularmente en el pulmón, riñón o tiroides. 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 de cuello uterino, tumor testicular, carcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón de células pequeñas, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma, y retinoblastoma. Como se ha indicado anteriormente, la divulgación permite específicamente el diagnóstico diferencial de tumores pulmonares, renales y tiroideos.

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

*Dianas:* En un aspecto, las dianas comprenden secuencias de factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF), incluyendo sin limitación secuencias no codificantes y/o codificantes, sentido y/o antisentido asociadas con GDNF.

La familia derivada de la glía GDNF de factores neurotróficos incluye cuatro miembros: factor neurotrófico derivado de línea de células gliales (GDNF), neurturina, artemina y persefina (PSPN). Los ligandos de la familia GDNF señalizan a través de receptores que consisten en una subunidad GFR $\alpha$  enlazada a GPI y el receptor transmembrana tirosina-cinasa RET. Con el fin de activar el receptor transmembrana tirosina-cinasa Ret, cada uno de los factores neurotróficos de la familia GDNF se une preferentemente a uno de los  $\alpha$ -receptores de la familia

GDNF enlazados a glicosil-fosfatidilinositol (GPI) (GFR $\alpha$ 1-4). El GDNF es una proteína que se puede identificar en, u obtener de, células gliales y que muestra actividad neurotrófica. De manera más específica, el GDNF es una proteína neurotrófica dopaminérgica que se caracteriza en parte por su capacidad para incrementar la captación de dopamina en los precursores embrionarios de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra, y además por su capacidad de promover la supervivencia de células nerviosas simpáticas y parasimpáticas.

En aspectos preferidos, los oligonucleótidos antisentido se usan para prevenir o tratar enfermedades o trastornos asociados con el tratamiento de enfermedades asociadas con un aumento o reducción de la actividad de las proteínas de desacoplamiento. Los ejemplos de enfermedades que pueden tratarse con células/tejidos regenerados a partir de células madre obtenidas usando los compuestos antisentido comprenden una enfermedad o un trastorno asociado con neurogénesis defectuosa; una enfermedad o trastorno neurodegenerativo (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, etc.); un trastorno neuropsiquiátrico (depresión, esquizofrenia, trastorno esquizofreniforme, trastorno esquizoafectivo y trastorno delirante; trastornos de ansiedad como trastorno de pánico, fobias (incluyendo agorafobia), un trastorno obsesivo-compulsivo, un trastorno de estrés posttraumático, un trastorno bipolar, anorexia nerviosa, bulimia nerviosa, un trastorno autoinmunitario (por ejemplo, esclerosis múltiple) del sistema nervioso central, pérdida de memoria, un trastorno de la memoria a corto o largo plazo, olvido benigno, trastorno de aprendizaje infantil, traumatismo craneoencefálico cerrado, trastorno por déficit de atención, reacción neuronal a infección vírica, daño cerebral, narcolepsia, un trastorno del sueño (por ejemplo, trastornos del ritmo circadiano, insomnio y narcolepsia); rotura de nervios o daño a los nervios, rotura del tronco nervioso cerebroespinal (SNC) y daño a las células cerebrales o nerviosas, un déficit neurológico asociado con el SIDA, un trastorno motor y tic caracterizado por tics motores y/o vocales (por ejemplo, trastorno de Tourette, trastorno crónico motor o tic vocal, tic transitorio y trastorno de movimiento estereotípico), un trastorno por abuso de sustancias (por ejemplo, dependencia de sustancias, abuso de sustancias y secuelas de abuso/dependencia de sustancias, como trastorno psicológico inducido por sustancias, abstinencia de sustancias y demencia o trastorno amnésico inducido por sustancias), lesión cerebral traumática, tinnitus, neuralgia (por ejemplo, neuralgia del trigémino), dolor (por ejemplo, dolor crónico, dolor inflamatorio crónico, dolor asociado con artritis, fibromialgia, dolor de espalda, dolor asociado al cáncer, dolor asociado con enfermedad digestiva, dolor asociado con la enfermedad de Crohn, dolor asociado con enfermedad autoinmunitaria, dolor asociado con enfermedad endocrina, dolor asociado con neuropatía diabética, dolor de miembro fantasma, dolor espontáneo, dolor posquirúrgico crónico, dolor temporomandibular crónico, causalgia, neuralgia postherpética, dolor relacionado con el SIDA, síndromes de dolor regionales complejos tipo I y II, neuralgia del trigémino, dolor de espalda crónico, dolor asociado con lesión de la médula espinal, dolor asociado con el consumo de drogas y dolor agudo recurrente, dolor neuropático), actividad neuronal inapropiada que da como resultado neurodistesias en una enfermedad tal como diabetes, una EM y una enfermedad de las neuronas motoras, ataxias, rigidez muscular (espasticidad), disfunción de la articulación temporomandibular, síndrome de deficiencia de recompensa (SDR), neurotoxicidad causada por el abuso de alcohol o sustancias (por ejemplo, éxtasis, metanfetaminas, etc.), retraso mental o deterioro cognitivo (por ejemplo, retraso mental no sindrómico ligado a X, síndrome X frágil, síndrome de Down, autismo), afasia, parálisis de Bell, enfermedad de Creutzfeldt-jacob, encefalitis, degeneración macular relacionada con la edad, síndrome de Ondine, síndrome WAGR, pérdida de audición, enfermedad de Werdnig-Hoffmann, atrofia muscular espinal proximal crónica, síndrome de Guillain-Barre, atrofia multisistémica (síndrome de Shy Drager), síndrome de Rett, epilepsia, lesión de la médula espinal, accidente cerebrovascular, hipoxia, isquemia, lesión cerebral, neuropatía diabética, una nefropatía o disfunción renal, neuropatía periférica, complicaciones del trasplante nervioso, enfermedad de las neuronas motoras, lesión del nervio periférico, obesidad, síndrome metabólico, cáncer, eczema, un trastorno de la motilidad intestinal, enfermedad de Hirschsprung, acalasia, espasmo esofágico, esclerodermia (relacionada con atrofia muscular de la porción del músculo liso del esófago, debilidad de la contracción de los dos tercios inferiores del cuerpo esofágico e incompetencia del esfínter esofágico inferior, pero también causada por el tratamiento con agentes inmunosupresores), úlcera duodenal, síndrome de Zollinger-Ellison, hipersecreción de ácido gástrico, trastorno malabsortivo, un trastorno de curación de la herida epidérmica y estromal y/o un trastorno de cicatrización, una distrofia muscular progresiva (por ejemplo, Duchenne, Becker, Emery-Dreifuss, Landouzy-Dejerine, escapulohumeral, cintura y extremidades, Von Graefe-Fuchs, oculofaríngea, miotónica y congénita), una miopatía congénita o adquirida, anemia (incluidas anemia aplásica y macrocítica); trombocitopenia; hipoplasia; coagulación intravascular diseminada (CID); mielodisplasia; púrpura trombocitopénica (PTI) inmunitaria (autoinmunitaria), PTI inducida por el HIV, una enfermedad trombocitótica, una infección vírica, una enfermedad o trastorno neuro-oncológico, una enfermedad o trastorno neuroinmunológico y una enfermedad o trastorno neuro-otológico, daño a las células sensoriales cocleares, percepción auditiva defectuosa, feocromocitoma, neoplasia endocrina múltiple de tipo 2, enfermedad de von Hippel-Lindau (VHL), neurofibromatosis de tipo 1; y una enfermedad o trastorno asociado con el envejecimiento y la senescencia.

En un aspecto preferido, los oligonucleótidos son específicos para polinucleótidos de GDNF, lo que incluye, sin limitación regiones no codificantes. Las dianas de GDNF comprenden variantes de GDNF; mutantes de GDNF, incluyendo SNP; secuencias no codificantes de GDNF; 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 GDNF en solitario, sino que se extiende a cualquiera de las isoformas, receptores, homólogos, regiones no codificantes y similares de GDNF.

5

En otro aspecto preferido, un oligonucleótido está dirigido a una secuencia antisentido natural (antisentido natural a las regiones codificantes y no codificantes) de dianas de GDNF, 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.

10

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

15 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

20

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%,

25 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

30

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

35 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

40

de ensayos in vitro, en condiciones en las que se realizan los ensayos.

En otro aspecto preferido, la elección como diana del GDNF, 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

45

las SEQ ID NO: 2, 3 o 4 y similares, modulan la expresión o función de GDNF. En un aspecto, la expresión o función está regulada positivamente en comparación con un control. En otro aspecto preferido, la expresión o función está regulada negativamente en comparación con un control.

En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos comprenden secuencias expuestas como las SEQ ID NO: 5 a 34 incluyendo secuencias antisentido que se identifican y expanden, usando, por ejemplo PCR, hibridación, etc. Estos

50

oligonucleótidos pueden comprender uno o más nucleótidos modificados, fragmentos más cortos o más largos, enlaces modificados y similares. Los ejemplos de enlaces modificados o enlaces internucleotídicos comprenden fosforotioato, fosforoditioato o similares. En otro aspecto preferido, los nucleótidos comprenden un derivado de

fósforo. El derivado de fósforo (o grupo fosfato modificado) que puede unirse al resto de azúcar o de análogo de azúcar en los oligonucleótidos modificados de la presente divulgación puede ser un monofosfato, difosfato, trifosfato,

55

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

60

en animales y el ser humano. Los oligonucleótidos antisentido se han administrado con seguridad y eficazmente a seres humanos y numerosos ensayos clínicos están actualmente en marcha. De este modo, se establece que los

oligonucleótidos pueden ser modalidades terapéuticas útiles que pueden configurarse para ser útiles en regímenes de tratamiento para el tratamiento de células, tejidos y animales, especialmente seres humanos.

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

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

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

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

En un aspecto preferido, los oligonucleótidos antisentido se unen a las secuencias antisentido naturales del factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) y modulan la expresión y/o función del factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) (SEQ ID NO: 1). Los ejemplos de secuencias antisentido incluyen las SEQ ID NO: 2 al 34.

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

Tabla 1

Seq ID	Nombre oligonucleótido	de	Secuencia
SEQ NO:5	ID CUR-0117		C* A* C* C* C* T* G* G* C* T* A* C* T* C* T* T* C* C* C* T
SEQ NO:6	ID CUR-0118		G* G* C* T* A* C* T* C* T* T* C* C* C* T* C* C* C* T* A
SEQ NO:7	ID CUR-0119		T* G* T* G* T* G* T* G* T* G* T* G* T* G* T* G* T* G* T* G* T* G* T
SEQ NO:8	ID CUR-0120		T* T* C* T* A* C* C* C* T* T* A* C* C* C* A* C* C* T* T* C
SEQ NO:9	ID CUR-0121		G* T* C* G* C* C* T* T* G* C* C* T* T* C* C* C* A* T* A* C
SEQ NO:10	ID CUR-0122		G* G* T* G* G* G* T* N* T* G* G* A* A* G* T* G* G* G* A* T
SEQ NO:11	ID CUR-0741		c* g* g* c* a* g* c* c* c* t* c* g* c*
SEQ NO:12	ID CUR-0742		t* g* g* g* g* g* t* g* c* g* g* g* g* g*

ES 2 658 626 T3

Seq ID	Nombre oligonucleótido	de	Secuencia
SEQ NO:13	ID CUR-0743		g* g* a* c* c* t* c* g* g* c* t* t* c* t*
SEQ NO:14	ID CUR-0744		g* c* g* g* c* g* g* c* t* g* c* t* c* g*
SEQ NO:15	ID CUR-0745		c* c* a* c* c* c* a* a* a* g* c* a* g* c*
SEQ NO:16	ID CUR-0746		c* c* c* c* c* c* a* c* c* c* a* a* a* g*
SEQ NO:17	ID CUR-0747		g* c* g* c* a* g* c* c* c* t* g* t* c* a*
SEQ NO:18	ID CUR-0748		c* g* c* g* c* g* c* a* g* c* c* c* t* g*
SEQ NO:19	ID CUR-0749		c* a* g* c* c* a* a* g* a* g* c* g* c* g*
SEQ NO:20	ID CUR-0750		g* g* c* c* c* g* c* g* c* a* g* c* c* c*
SEQ NO:21	ID CUR-0751		g* c* c* c* g* c* a* g* c* g* c* c* c* g*
SEQ NO:22	ID CUR-0752		g* a* g* g* c* g* c* a* g* a* g* c* g* c*
SEQ NO:23	ID CUR-0753		c* a* g* t* g* c* g* c* c* c* a* g* a* g*
SEQ NO:24	ID CUR-0754		g* t* g* c* t* c* c* c* a* g* g* c* a* g*
SEQ NO:25	ID CUR-0755		c* t* g* c* c* t* g* g* g* a* g* c* a* c*
SEQ NO:26	ID CUR-0756		a* a* g* a* c* c* t* c* a* g* c* t* c* c*
SEQ NO:27	ID CUR-0757		t* t* c* g* g* a* t* c* t* c* c* a* g* g* c*
SEQ NO:28	ID CUR-0758		t* g* a* c* g* t* g* g* t* g* t* c* t* c*
SEQ NO:29	ID CUR-0759		c* t* c* c* c* c* g* c* g* c* c* g* g* t*
SEQ NO:30	ID CUR-0760		a* t* g* t* c* t* t* c* a* c* g* g* g* a*
SEQ NO:31	ID CUR-0761		c* t* c* c* t* g* g* c* g* c* c* c* t* c*
SEQ NO:32	ID CUR-0762		a* a* g* a* c* c* a* g* c* c* t* g* c* g*
SEQ NO:33	ID CUR-0763		g* c* t* c* t* a* g* a* a* g* a* c* c* a*
SEQ NO:34	ID CUR-0764		c* c* t* c* c* c* c* a* c* g* c*

En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos antisentido se unen a uno o más segmentos de polinucleótidos del factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) y modulan la expresión y/o función del factor neurotrófico

derivado de células gliales (GDNF). Los segmentos comprenden al menos cinco nucleótidos consecutivos de los polinucleótidos sentido o antisentido del factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF).

En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos antisentido son específicos para secuencias antisentido naturales del factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) donde la unión de los oligonucleótidos a las secuencias antisentido naturales del factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) modulan la expresión y/o la función del factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF).

En otro aspecto preferido, los compuestos de oligonucleótido comprenden secuencias expuestas como las SEQ ID NO: 5 a 34, secuencias antisentido que se identifican y expanden usando, por ejemplo, PCR, hibridación etc. Estos oligonucleótidos pueden comprender uno o más nucleótidos modificados, fragmentos más cortos o más largos, enlaces modificados y similares. Los ejemplos de enlaces modificados o enlaces internucleotídicos comprenden fosforotioato, fosforoditioato o similares. En otro aspecto preferido, los nucleótidos comprenden un derivado de fósforo. El derivado de fósforo (o grupo fosfato modificado) que puede unirse al resto de azúcar o de análogo de azúcar en los oligonucleótidos modificados de la presente divulgación puede ser un monofosfato, difosfato, trifosfato, alquilfosfato, alcanofosfato, fosforotioato y similares. La preparación de los análogos de fosfato indicados anteriormente, y su incorporación en nucleótidos, nucleótidos modificados y oligonucleótidos, también es en sí conocida y no es necesario describirla aquí.

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

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 estructura caperuza 5', además de los primeros 50 nucleótidos adyacentes al sitio caperuza. Otra región diana para esta divulgación es la región caperuza 5'.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Los segmentos diana pueden comprender secuencias de ADN o ARN que comprenden al menos los 5 nucleótidos consecutivos desde el extremo 5' de uno de los segmentos diana preferidos ilustrativos (siendo los restantes nucleótidos un tramo consecutivo del mismo ADN o ARN que empieza inmediatamente cadena arriba del extremo 5' del segmento diana y que continúa hasta que el ADN o ARN contenga de aproximadamente 5 a aproximadamente 100 nucleótidos). Segmentos diana similarmente preferidos se representan por secuencias de ADN o ARN que comprenden al menos los 5 nucleótidos consecutivos desde el extremo 3' de uno de los segmentos diana preferidos ilustrativos (siendo los restantes nucleótidos un tramo consecutivo del mismo ADN o ARN que empieza

inmediatamente cadena abajo del extremo 3' del segmento diana y que continúa hasta que el ADN o ARN contenga de aproximadamente 5 a aproximadamente 100 nucleótidos). Un experto en la materia armado con los segmentos diana ilustrados en el presente documento será capaz, sin excesiva experimentación, de identificar segmentos diana preferidos adicionales.

5

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.

10 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.

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

20 (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

25 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

30 grande, y que muchos de dichos transcritos surgen de las llamadas regiones intergénicas (Cheng, J. et al. (2005) Science 308 (5725), 1149-1154; Kapranov, P. et al. (2005). Genome Res 15 (7), 987-997). El mecanismo por el que los ARNnc pueden regular la expresión génica es por apareamiento de bases con transcritos diana. Los ARN que funcionan por apareamiento de bases pueden agruparse en (1) ARN codificados en cis que están codificados en la misma ubicación genética, pero en la cadena opuesta a los ARN en los que actúan y, por lo tanto, muestran

35 complementariedad perfecta con su diana, y (2) ARN codificados en trans que están codificados en una ubicación cromosómica distinta de los ARN en los que actúan y generalmente no presentan potencial de apareamiento de bases perfecto con sus dianas.

Sin desear ceñirse a ninguna teoría, la perturbación de un polinucleótido antisentido por los oligonucleótidos

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

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

50

*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.

55

*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

60 antisentido correspondiente, o un único oligonucleótido antisentido energéticamente simétrico que se dirige simultáneamente a transcritos sentido y antisentido solapantes.



De acuerdo con la presente divulgación, los compuestos antisentido incluyen oligonucleótidos antisentido, ribozimas, oligonucleótidos de secuencia de guía externa (EGS), compuestos de siRNA, compuestos de interferencia (iARN) de ARN mono- o bicatenario tales como compuestos de siRNA, y otros compuestos oligoméricos que hibridan con al menos una parte del ácido nucleico diana y modulan su función. Por lo tanto, pueden ser ADN, ARN, similares a

5 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

10 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

15 monocatenario. Los compuestos bicatenarios opcionalmente pueden comprender nucleótidos protuberantes en los extremos. Modificaciones adicionales pueden comprender grupos conjugados unidos a uno de los extremos, posiciones de nucleótido seleccionadas, posiciones de azúcar o a uno de los enlaces internucleosídicos. Como alternativa, las dos cadenas pueden enlazarse mediante un resto no de ácido nucleico o grupo conector. Cuando se forma a partir de solo una cadena, el dsARN puede tomar la forma de una molécula tipo horquilla auto-

20 complementaria que se dobla sobre sí misma para formar un dúplex. De este modo, el dsARN puede ser completa o parcialmente bicatenario. Puede lograrse modulación específica de la expresión génica por expresión estable de horquillas de dsARN en líneas celulares transgénicas, sin embargo, en algunos casos, la expresión o función génica está regulada positivamente. Cuando se forma a partir de dos cadenas, o una única cadena que adopta la forma de una molécula de tipo horquilla auto-complementaria que se dobla sobre sí misma para formar un dúplex, las dos

25 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

30 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,

35 los oligonucleótidos que tienen estructura similar a la forma B son "similares a ADN" y aquellos que tienen estructura similar a la forma A son "similares a ARN". En algunos casos (quiméricos), un compuesto antisentido puede contener tanto regiones en forma A como B.

En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos deseados o compuestos antisentido comprenden al menos uno de:

40 ARN antisentido, ADN antisentido, oligonucleótidos antisentido quiméricos, oligonucleótidos antisentido que comprenden enlaces modificados, ARN de interferencia (iARN), ARN interferente pequeño (siRNA); un microARN interferente (miARN); un ARN temporal pequeño (ARNtp); o un ARN de horquilla corta (ARNhc); activación génica inducida por ARN pequeño (aARN); ARN activantes pequeños (ARNap), o combinaciones de los mismos.

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

50 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,

55 se muestra que los oligonucleótidos aumentan la expresión y/o función de los polinucleótidos del factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) y productos codificados por los mismos. Los dsARN también pueden actuar como ARN activantes pequeños (ARNap). Sin desear ceñirse a ninguna teoría, direccionando secuencias a promotores génicos, los ARNap inducirán la expresión de genes diana en un fenómeno denominado activación transcripcional inducida por dsARN (aARN).

60 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 factor neurotrófico derivado de

células gliales (GDNF). Los "moduladores" son aquellos compuestos que disminuyen o aumentan la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica el factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) 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 factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) 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 factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF), por ejemplo, SEQ ID NO: 5 a 34. 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 factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF), el modulador puede entonces emplearse en estudios de investigación adicionales de la función de polinucleótidos del factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF), o para su uso como un agente de investigación, diagnóstico o terapéutico de acuerdo con la presente divulgación.

El direccionamiento de la secuencia antisentido natural modula preferentemente la función del gen diana. Por ejemplo, el gen de GDNF (M\_199234.1, figura 2). En un aspecto preferido, la diana es un polinucleótido antisentido del gen del factor neurotrófico derivado de células gliales. En un aspecto preferido, un oligonucleótido antisentido se dirige a secuencias sentido y/o antisentido naturales de los polinucleótidos del factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) (NM\_199234.1, figura 2), variantes, alelos, isoformas, homólogos, mutantes, derivados, fragmentos y secuencias complementarias a los mismos. Preferentemente, el oligonucleótido es una molécula antisentido y las dianas incluyen regiones codificantes y no codificantes de polinucleótidos antisentido y/o sentido de GDNF.

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

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

En un aspecto preferido, un oligonucleótido antisentido se dirige a polinucleótidos del factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) (por ejemplo número de acceso: NM\_199234.1), variantes, alelos, isoformas, homólogos, mutantes, derivados, fragmentos y secuencias complementarias a los mismos. Preferentemente, el oligonucleótido es una molécula antisentido.

De acuerdo con aspectos de la divulgación, la molécula de ácido nucleico diana no se limita al factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) solo, sino que se extiende a cualquiera de las isoformas, receptores, homólogos y similares de las moléculas del factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF).

En otro aspecto preferido, un oligonucleótido se dirige a una secuencia antisentido natural de polinucleótidos de GDNF, por ejemplo, polinucleótidos expuestos como las SEQ ID NO: 2 a 4 y 42 a 44, y cualquier variante, alelo, homólogo, mutante, derivado, fragmento y secuencia complementaria a los mismos. Ejemplos de oligonucleótidos antisentido se exponen como las SEQ ID NO: 5 a 34.

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

En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos son complementarios a, o se unen a, secuencias de ácido nucleico del antisentido natural de GDNF, expuesto como SEQ ID NO: 2 a 4 y 42 a 44, modulan la expresión y/o función de moléculas de GDNF.

En un aspecto preferido, los oligonucleótidos comprenden secuencias de al menos 5 nucleótidos consecutivos de las SEQ ID NO: 5 a 34 y modulan la expresión y/o la función de moléculas del factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF).

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

5 En otro aspecto preferido, el oligonucleótido que se dirige a polinucleótidos del factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF), comprende: ARN antisentido, ARN de interferencia (iARN), ARN interferente pequeño (siRNA); microARN interferente (miARN); un ARN temporal pequeño (ARNtp); o un ARN de horquilla corta (ARNhc); activación génica inducida por ARN pequeño (aARN); o, ARN activante pequeño (ARNap).

10 En otro aspecto preferido, la selección como diana de los polinucleótidos de factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF), por ejemplo, las SEQ ID NO: 2 a 4 y 42 a 44, modula la expresión o función de estas dianas. En un aspecto, la expresión o función está regulada positivamente en comparación con un control. En otro aspecto preferido, la expresión o función está regulada negativamente en comparación con un control.

15 En otro aspecto preferido, los compuestos antisentido comprenden secuencias expuestas como SEQ ID NO: 5 a 34. Estos oligonucleótidos pueden comprender uno o más nucleótidos modificados, fragmentos más cortos o más largos, enlaces modificados y similares.

20 En otro aspecto preferido, las SEQ ID NO: 5 a 34 comprenden uno o más nucleótidos de LNA.

La modulación de un ácido nucleico diana deseado puede llevarse a cabo de varias formas conocidas en la técnica. Por ejemplo, oligonucleótidos antisentido, siRNA, etc. Las moléculas de ácidos nucleicos enzimáticos (por ejemplo, ribozimas) son moléculas de ácidos nucleicos capaces de catalizar una o más de diversas reacciones, que incluyen  
25 la capacidad para escindir repetidamente otras moléculas de ácidos nucleicos separadas en un modo específico de secuencia de bases de nucleótidos. Estas moléculas de ácido nucleico, enzimáticas, se pueden usar, por ejemplo, para seleccionar como diana virtualmente cualquier transcrito de ARN (Zaug et al., 324, Nature 429 1986; Cech, 260 JAMA 3030, 1988; y Jefferies et al., 17 Nucleic Acids Research 1371, 1989).

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

En general, los ácidos nucleicos enzimáticos con actividad de escisión de ARN actúan uniéndose primero a un ARN diana. Dicha unión se produce mediante la parte de unión de diana de un ácido nucleico enzimático que se mantiene en estrecha proximidad a una parte enzimática de la molécula que actúa para escindir el ARN diana. De este modo,  
40 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.

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

El desarrollo de ribozimas que son óptimas para la actividad catalítica contribuiría significativamente a cualquier estrategia que empleara ribozimas que escinden ARN con el fin de regular la expresión génica. La ribozima de  
55 cabeza de martillo, por ejemplo, funciona con una velocidad catalítica (k<sub>cat</sub>) de aproximadamente 1 min<sup>-1</sup> en presencia de concentraciones saturantes (10 mM) de cofactor de Mg<sup>2+</sup>. Se ha demostrado que una ribozima de "ligasa de ARN" artificial cataliza la reacción de auto-modificación correspondiente con una velocidad de aproximadamente 100 min<sup>-1</sup>. Además, se sabe que ciertas ribozimas de cabeza de martillo modificadas que tienen brazos de unión al sustrato hechos de ADN catalizan la escisión de ARN con múltiples velocidades de recuperación  
60 que se aproximan a 100 min<sup>-1</sup>. Finalmente, la sustitución de un residuo específico dentro del núcleo catalítico de la cabeza de martillo con ciertos análogos de nucleótido da ribozimas modificadas que muestran una mejora de hasta 10 veces en la velocidad catalítica. Estos descubrimientos demuestran que las ribozimas pueden promover

transformaciones químicas con velocidades catalíticas que son significativamente superiores a aquellas mostradas in vitro por la mayoría de las ribozimas que se auto-escinden naturales. Entonces es posible que las estructuras de ciertas ribozimas que se auto-escinden puedan optimizarse para dar la máxima actividad catalítica, o que puedan prepararse motivos de ARN completamente nuevos que muestran velocidades significativamente más rápidas para la escisión de fosfodiéster de ARN.

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

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

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

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

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

Watson-Crick.

Una vez introducidos a un sistema, los compuestos de la divulgación pueden provocar la acción de una o más enzimas o proteínas estructurales para efectuar la escisión u otra modificación del ácido nucleico diana o pueden 5 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, 10 los oligonucleótidos que tienen estructura similar a la forma B son "similares a ADN" y aquellos que tienen estructura similar a la forma A son "similares a ARN". En algunos casos (quiméricos), un compuesto antisentido puede contener tanto regiones en forma A como B.

Los compuestos antisentido de acuerdo con esta divulgación pueden comprender una parte antisentido de 15 aproximadamente 5 a aproximadamente 80 nucleótidos (es decir, de aproximadamente 5 a aproximadamente 80 nucleósidos enlazados) de longitud. Esto se refiere a la longitud de la cadena antisentido o parte del compuesto antisentido. En otras palabras, un compuesto antisentido monocatenario de la divulgación comprende de 5 a aproximadamente 80 nucleótidos, y un compuesto antisentido bicatenario de la divulgación (tal como un dsARN, por ejemplo) comprende una cadena sentido y antisentido o parte de 5 a aproximadamente 80 nucleótidos de longitud.

20 Un experto habitual en la materia apreciará que este comprenda partes antisentido de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 u 80 nucleótidos de longitud, o cualquier intervalo entremedias.

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

30 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 estos integran compuestos antisentido que tienen partes antisentido de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos de longitud, o cualquier intervalo entremedias.

35 En otro aspecto preferido, los compuestos oligoméricos de la presente divulgación también incluyen variantes en las que una base diferente está presente en una o más de las posiciones de nucleótido en el compuesto. Por ejemplo, si el primer nucleótido es una adenosina, pueden producirse variantes que contienen timidina, guanosina o citidina en esta posición. Esto puede hacerse en cualquiera de las posiciones de los compuestos antisentido o de dsARN. Estos 40 compuestos se ensayan entonces usando los procedimientos descritos en el presente documento para determinar su capacidad para inhibir la expresión de un ácido nucleico diana.

En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencias o complementariedad, entre el compuesto antisentido y la diana, es de aproximadamente el 40% a aproximadamente el 60%. En algunos aspectos, la homología, identidad 45 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%, 50 aproximadamente el 95%, aproximadamente el 96%, aproximadamente el 97%, aproximadamente el 98%, aproximadamente el 99 % o aproximadamente el 100%.

En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos antisentido, como, por ejemplo, las moléculas de ácidos nucleicos expuestas en las SEQ ID NO: 2 a 34 comprenden una o más sustituciones o modificaciones. En un aspecto, los 55 nucleótidos están sustituidos con ácidos nucleicos bloqueados (LNA).

En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos se dirigen a una o más regiones de las moléculas de ácidos nucleicos sentido y/o antisentido de secuencias codificantes y/o no codificantes asociadas a GDNF y las secuencias expuestas como SEQ ID NO: 1 a 4. Los oligonucleótidos también se dirigen a regiones solapantes de las SEQ ID NO: 1 a 4.

60 Ciertos oligonucleótidos preferidos de esta divulgación son oligonucleótidos quiméricos. "Oligonucleótidos quiméricos" o "quimeras", en el contexto de esta divulgación, son oligonucleótidos que contienen dos o más regiones

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

Se pueden formar compuestos antisentido quiméricos de la divulgación como estructuras compuestas de dos o más oligonucleótidos, oligonucleótidos modificados, oligonucleósidos y/o miméticos de oligonucleótidos, tal como se ha descrito anteriormente. Como tales, estos compuestos también se han referido en la técnica como híbridos o gapmeros. Las patentes representativas de los Estados Unidos que enseñan la preparación de estas estructuras híbridas comprenden, pero no se limitan a, las patentes de los EE.UU con nos. 5.013.830; 5.149.797; 5.220.007; 5.256.775; 5.366.878; 5.403.711; 5.491.133; 5.565.350; 5.623.065; 5.652.355; 5.652.356; y 5.700.922.

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

Ejemplos específicos de algunos oligonucleótidos preferidos concebidos por esta divulgación incluyen aquellos que comprenden esqueletos modificados, por ejemplo, fosforotioatos, fosfotriésteres, metilfosfonatos, enlaces entre azúcares de alquilo o cicloalquilo de cadena corta o enlaces entre azúcares heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta. Los más preferidos son oligonucleótidos con esqueletos de fosforotioato y aquellos con esqueletos de heteroátomo, particularmente esqueletos de  $\text{CH}_2\text{--NH--O--CH}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{--N(CH}_3\text{)--O--CH}_2$  [conocido 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  $\text{O--N(CH}_3\text{)--CH}_2\text{--}$ , donde el esqueleto de fosfodiéster nativo se representa como  $\text{O--P--O--CH}_2$ . Los esqueletos de amida divulgados por De Mesmaeker et al. (1995) *Acc. Chem. Res.* 28:366-374 también se prefieren. También se prefieren oligonucleótidos que tienen esqueletos de morfolino (Summerton y Weller, Patente de EE.UU. Nº. 5.034.506. En otros aspectos preferidos, tal como el esqueleto de ácido nucleico peptídico (PNA), el esqueleto de fosfodiéster del oligonucleótido se sustituye por un esqueleto de poliamida, estando los nucleótidos unidos directamente o indirectamente a los átomos de nitrógeno azo del esqueleto de poliamida (Nielsen et al. (1991) *Science* 254, 1497). Los oligonucleótidos también pueden comprender uno o más restos de azúcar sustituidos. Oligonucleótidos preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': OH, SH, SCH<sub>3</sub>, F, OCN, OCH<sub>3</sub>, OCH<sub>3</sub>

O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> CH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH<sub>2</sub> o O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub> en los que n es de 1 a aproximadamente 10; alquilo C1 a C10 inferior, alcoxialcoxi, alquilo, alcarilo o aralquilo inferior sustituido; Cl; Br; CN; CF<sub>3</sub>; OCF<sub>3</sub>; O-, S-, o N-alquilo; O-, S-, o N-alquenilo; SOCH<sub>3</sub>; SO<sub>2</sub> CH<sub>3</sub>; ONO<sub>2</sub>; NO<sub>2</sub>; N<sub>3</sub>; NH<sub>2</sub>; heterocicloalquilo; heterocicloalcarilo; aminoalquilamino; polialquilamino; sililo sustituido; un grupo de escisión de ARN; un grupo reportero; un intercalador; un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido; o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un oligonucleótido y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. Una modificación preferida incluye 2'-metoxietoxi [2'-O-CH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub> OCH<sub>3</sub>, también conocido como 2'-O-(2-metoxietilo)] Martin et al., (1995) *Helv. Chim. Acta*, 78, 486). Otras modificaciones preferidas incluyen 2'-metoxi (2'-O--CH<sub>3</sub>), 2'-propoxi(2'-OCH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) y 2'-flúor (2'-F). También pueden hacerse modificaciones similares en otras posiciones sobre el oligonucleótido, particularmente la posición 3' del azúcar en el nucleótido del extremo 3' y la posición 5' del nucleótido del extremo 5'. Los oligonucleótidos también pueden tener miméticos de azúcar tales como ciclobutilos en lugar del grupo pentofuranosilo.

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, N<sub>6</sub>(6-aminohexil)adenina y 2,6-diaminopurina (Kornberg, A., *DNA Replication*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, 1980, pp75-77; Gebeyehu, G., (1987) et al. *Nucl. Acids Res.* 15:4513). Puede incluirse una base "universal" conocida en la técnica, por ejemplo, inosina. Se ha mostrado que las sustituciones de 5-Me-C incrementan la estabilidad dúplex del ácido nucleico alrededor de 0,6-1,2 °C. (Sanghvi, Y. S., in Crooke, S. T. y Lebleu, B., eds., *Antisense Research and Applications*, CRC Press, Boca Raton, 1993, págs. 276-278) y actualmente son las sustituciones base preferidas.

Otra modificación de los oligonucleótidos de la divulgación implica enlazar químicamente al oligonucleótido uno o más restos o conjugados que potencian la actividad o captación celular del oligonucleótido. Estos restos incluyen, pero no se limitan a, restos de lípidos como es un resto de colesterol, un resto de colesterilo (Letsinger et al., (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 6553), ácido cólico (Manoharan et al. (1994) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 4, 1053), un tioéter, por ejemplo, hexil-S-tritilol (Manoharan et al. (1992) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 660, 306; Manoharan et al. (1993) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 3, 2765), un tiocolesterol (Oberhauser et al., (1992) *Nucl. Acids Res.* 20, 533), una cadena alifática, por ejemplo, residuos de dodecandiol o undecilo (Saison-Behmoaras et al. *EMBO J.* 1991, 10, 111; Kabanov et al. (1990) *FEBS Lett.* 259, 327; Svinarchuk et al. (1993) *Biochimie* 75, 49), un fosfolípido, por ejemplo, dihexadecil-rac-glicerol o trietilamonio 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero- 3-H-fosfonato (Manoharan et al. (1995) *Tetrahedron Lett.* 36, 3651; Shea et al. (1990) *Nucl. Acids Res.* 18, 3777), una poliamina o una cadena de polietilenglicol (Manoharan et al. (1995) *Nucleosides & Nucleotides*, 14, 969), o un ácido adamantano-acético (Manoharan et al. (1995) *Tetrahedron Lett.* 36, 3651). Los oligonucleótidos que comprenden restos lipófilos, y procedimientos para preparar dichos oligonucleótidos, son conocidos en la técnica, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos Nos. 5.138.045, 5.218.105 y 5.459.255.

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

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

Los oligonucleótidos usados de acuerdo con esta divulgación pueden prepararse cómoda y rutinariamente mediante la técnica muy conocida de síntesis en fase sólida. Equipo para dichas síntesis es comercializado por varios proveedores que incluyen Applied Biosystems. También puede emplearse cualquier otro medio para dicha síntesis; la síntesis real de los oligonucleótidos está perfectamente dentro de las aptitudes de un experto en la materia. También es muy conocido usar técnicas similares para preparar otros oligonucleótidos tales como fosforotioatos y derivados alquilados. También es muy conocido usar técnicas similares y amiditos modificados disponibles en el

mercado y productos de vidrio de poro controlado (CPG) tales como biotina, fluoresceína, acridina o amiditos modificados con psoraleno y/o CPG (disponible de Glen Research, Sterling VA) para sintetizar oligonucleótidos marcados de forma fluorescente, biotinilados u otros oligonucleótidos modificados tales como oligonucleótidos modificados con colesterol.

5

De acuerdo con la divulgación, el uso de modificaciones tales como el uso de monómeros de LNA para potenciar la potencia, especificidad y duración de la acción y ampliar las vías de administración de oligonucleótidos comprende químicas actuales tales como MOE, ANA, FANA, PS, etc. (Uhlman, et al. (2000) Current Opinions in Drug Discovery & Development Vol. 3 No 2). Esto puede lograrse sustituyendo algunos de los monómeros en los presentes oligonucleótidos por monómeros de LNA. El oligonucleótido modificado con LNA puede tener un tamaño similar al compuesto parental o puede ser más grande o preferentemente más pequeño. Se prefiere que dichas oligonucleótidos modificados con LNA contengan menos de aproximadamente el 70%, más preferentemente menos de aproximadamente el 60%, de la manera más preferente menos de aproximadamente el 50% de monómeros de LNA y que sus tamaños estén entre aproximadamente 5 y 25 nucleótidos, más preferentemente entre 15 aproximadamente 12 y 20 nucleótidos.

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

25 Las patentes representativas de los Estados Unidos que enseñan la preparación de los enlaces anteriores que contienen fósforo comprenden, pero no se limitan a, las patentes de los EE.UU. con nos. 3.687.808; 4.469.863; 4.476.301; 5.023.243; 5.177.196; 5.188.897; 5.264.423; 5.276.019; 5.278.302; 5.286.717; 5.321.131; 5.399.676; 5.405.939; 5.453.496; 5.455.233; 5.466.677; 5.476.925; 5.519.126; 5.536.821; 5.541.306; 5.550.111; 5.563.253; 5.571.799; 5.587.361; y 5.625.050.

30

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. Estos comprenden aquellos que tienen enlaces morfolino (formados en parte a partir de la parte de azúcar de un nucleósido); esqueletos de siloxano; esqueletos de sulfuro, sulfóxido y sulfona; esqueletos de formacetilo y tioformacetilo; esqueletos de metilformacetilo y tioformacetilo; esqueletos que contienen alqueno; esqueletos de sulfamato; esqueletos de metilenoimino y metilenoimidazino; esqueletos de sulfonato y sulfonamida; esqueletos de amida; y otros que tienen partes de componentes de N, O, S y CH<sub>2</sub> mixtos.

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

45

En otros miméticos de oligonucleótidos preferidos, tanto el azúcar como el enlace internucleosídico, es decir, el esqueleto, de las unidades de nucleótido se sustituyen por grupos novedosos. Las unidades de base se mantienen para la hibridación con un compuesto de ácido nucleico diana apropiado. Dicho compuesto oligomérico, un oligonucleótido mimético que se ha demostrado que tiene excelentes propiedades de hibridación, se denomina ácido nucleico peptídico (PNA). En compuestos de PNA, el esqueleto de azúcar de un oligonucleótido se sustituye por un esqueleto que contiene amida, en particular un esqueleto de aminoetilglicina. Las nucleobases son retenidas y se unen directamente o indirectamente a átomos de nitrógeno azo de la parte de amida del esqueleto. Las patentes representativas de los Estados Unidos que enseñan la preparación de compuestos PNA comprenden, pero no se limitan a, las patentes de los EE.UU. con nos. 5.539.082; 5.714.331; y 5.719.262. Enseñanzas adicionales de 55 compuestos de PNA pueden encontrarse en Nielsen, et al. (1991) Science 254, 1497-1500.

En otro aspecto preferido de la divulgación, los oligonucleótidos con esqueletos de fosforotioato y oligonucleósidos con esqueletos de heteroátomo, y en particular -CH<sub>2</sub>-NH-O-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)-O-CH<sub>2</sub>-, conocidos como un esqueleto de metileno (metilimino) o MMI, -CH<sub>2</sub>-O-N(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)-N(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>- y -O-N(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- donde el esqueleto de fosfodiéster nativo se representa como -O-P-O-CH<sub>2</sub>- de la patente de EE.UU. nº 5.489.677, citada anteriormente, y los esqueletos de amida de la patente de EE.UU. nº 5.602.240, citada anteriormente. También se prefieren oligonucleótidos que tienen esqueletos de morfolino de la patente de EE.UU. nº

60



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-alquilo; o O-alquil-O-alquilo, donde el alquilo, alqueno y alquilo pueden ser alquilo C a CO sustituido o sin sustituir o alqueno y alquilo C2 a CO. Se prefieren particularmente  $O(CH_2)_n OmCH_3$ ,  $O(CH_2)_n$ ,  $OCH_3$ ,  $O(CH_2)_nNH_2$ ,  $O(CH_2)_nCH_3$ ,  $O(CH_2)_nONH_2$  y  $O(CH_2)_nON(CH_2)_mCH_3$  en las que n y m pueden ser de 1 a aproximadamente 10. Otros oligonucleótidos preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': C a CO, (alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, alcarilo, aralquilo, O-alcarilo o O-aralquilo, SH, SCH<sub>3</sub>, OCN, Cl, Br, CN, CF<sub>3</sub>, OCF<sub>3</sub>, SOCH<sub>3</sub>, SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, ONO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub>, heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, polialquilamino, sililo sustituido, un grupo de escisión de ARN, un grupo indicador, un intercalador, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido, o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un oligonucleótido, y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. Una modificación preferida comprende 2'-metoxietoxi (2'-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, también conocido como 2'-O-(2-metoxietilo) o 2'-MOE) (Martin et al., (1995) *Helv. Chim. Acta*, 78, 486-504) por ejemplo, un grupo alcoxialcoxi. Otra modificación preferida comprende 2'-dimetilaminoetoxi, es decir, un grupo  $O(CH_2)_2ON(CH_3)_2$ , también conocido como 2'-DMAOE, tal como se describe en los ejemplos en el presente documento más adelante, y 2'-dimetilaminoetoxietoxi (también conocido en la técnica como 2'-O-dimetilaminoetoxietilo o 2'-DMAEOE), es decir, 2'-O-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>.
- 20 Otras modificaciones preferidas comprenden 2'-metoxi (2'-OCH<sub>3</sub>), 2'-aminopropoxi (2'-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>) y 2'-flúor (2'-F). También pueden hacerse modificaciones similares en otras posiciones en el oligonucleótido, particularmente la posición 3' del azúcar en el nucleótido del extremo 3' o en oligonucleótidos enlazados 2'-5' y la posición 5' del nucleótido del extremo 5'. Los oligonucleótidos también pueden tener miméticos de azúcar tales como restos ciclobutilo en lugar del azúcar pentofuranosilo. Las patentes representativas de los Estados Unidos que enseñan la preparación de dichas estructuras de azúcar modificadas comprenden, pero no se limitan a, las patentes de los EE.UU. con nos. 4.981.957; 5.118.800; 5.319.080; 5.359.044; 5.393.878; 5.446.137; 5.466.786; 5.514.785; 5.519.134; 5.567.811; 5.576.427; 5.591.722; 5.597.909; 5.610.300; 5.627.053; 5.639.873; 5.646.265; 5.658.873; 5.670.633; y 5.700.920.
- 30 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 nº3.687.808, aquellos divulgados en 'The Concise Encyclopedia of Polymer Science And Engineering', páginas 858-859, Kroschwitz, J.I., ed. John Wiley & Sons, 1990, aquellos divulgados por Englisch et al., 'Angewandte Chemie, International Edition', 1991, 30, página 613, y aquellos divulgados por Sanghvi, Y.S., Capítulo 15, 'Antisense Research and Applications', páginas 289-302, Crooke, S.T. y Lebleu, B. ea., CRC Press, 1993. Algunos de estos nucleótidos son particularmente útiles para incrementar la afinidad de unión de los compuestos oligoméricos de la divulgación. Estos comprenden pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y purinas sustituidas en N-2, N-6 y O-6, que comprenden 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. Se ha mostrado que las sustituciones de 5-metilcitosina incrementan la estabilidad del dúplex de ácido nucleico alrededor de 0,6-1,2 °C. (Sanghvi, Y. S., in Crooke, S. T. y Lebleu, B., eds., *Antisense Research and Applications*, CRC Press, Boca Raton, 1993, págs. 276-278) y actualmente son las sustituciones base preferidas, de manera aún más particular cuando se combinan con modificaciones de azúcar de 2'-Ometoxietilo.
- 55 Las patentes representativas de los Estados Unidos que enseñan la preparación de los nucleótidos modificados citados anteriormente, así como otros nucleótidos modificados, comprenden, pero no se limitan a, las patentes de los EE.UU. con nos. 3.687.808, así como 4.845.205; 5.130.302; 5.134.066; 5.175.273; 5.367.066; 5.432.272; 5.457.187; 5.459.255; 5.484.908; 5.502.177; 5.525.711; 5.552.540; 5.587.469; 5.596.091; 5.614.617; 5.750.692 y 5.681.941.
- 60 Otra modificación de los oligonucleótidos de la divulgación implica enlazar químicamente al oligonucleótido uno o más restos o conjugados, que potencian la actividad, distribución celular o captación celular del oligonucleótido.

Dichos restos comprenden, aunque no se limitan a, restos de lípido tales como un resto colesterol (Letsinger et al., (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 86, 6553-6556), ácido cólico (Manoharan et al., (1994) Bioorg. Med. Chem. Lett., 4, 1053-1060), un tioéter, por ejemplo, hexil-S-tritilitol (Manoharan et al., (1992) Ann. N. Y. Acad. Sci., 660, 306-309; Manoharan et al., (1993) Bioorg. Med. Chem. Lett., 3, 2765-2770), un tiocolesterol (Oberhauser et al., (1992) Nucl. Acids Res., 20, 533-538), una cadena alifática, por ejemplo, residuos de dodecandiol o undecilo (Kabanov et al., (1990) FEBS Lett., 259, 327-330; Svinarchuk et al., (1993) Biochimie 75, 49-54), un fosfolípido, por ejemplo, dihexadecil-rac-glicerol o 1, 2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato de trietilamonio (Manoharan et al., (1995) Tetrahedron Lett., 36, 3651-3654; Shea et al., (1990) Nucl. Acids Res., 18, 3777-3783), una poliamina o una cadena de polientilenglicol (Mancharan et al., (1995) Nucleosides & Nucleotides, 14, 969-973), o ácido adamantano-acético (Manoharan et al., (1995) Tetrahedron Lett., 36, 3651-3654), un resto de palmitilo (Mishra et al., (1995) Biochim. Biophys. Acta, 1264, 229-237), o un resto de octadecilamina o hexilamino-carbonil-t-oxicolesterol (Crooke et al., (1996) J. Pharmacol. Exp. Ther., 277, 923-937).

Las patentes representativas de los Estados Unidos que enseñan la preparación de estos conjugados de oligonucleótidos comprenden, pero no se limitan a, las patentes de los EE.UU con nos. 4.828.979; 4.948.882; 5.218.105; 5.525.465; 5.541.313; 5.545.730; 5.552.538; 5.578.717. 5.580.731; 5.580.731; 5.591.584; 5.109.124; 5.118.802; 5.138.045; 5.414.077; 5.486.603; 5.512.439; 5.578.718; 5.608.046; 4.587.044; 4.605.735; 4.667.025; 4.762.779; 4.789.737; 4.824.941; 4.835.263; 4.876.335; 4.904.582; 4.958.013; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.245.022; 5.254.469; 5.258.506; 5.262.536; 5.272.250; 5.292.873; 5.317.098; 5.371.241; 5.391.723; 5.416.203; 5.451.463; 5.510.475; 5.512.667; 5.514.785; 5.565.552; 5.567.810; 5.574.142; 5.585.481; 5.587.371; 5.595.726; 5.597.696; 5.599.923; 5.599.928 y 5.688.941.

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

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

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

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

ampicilina, bleomicina, cloranfenicol, gentamicina, higromicina, kanamicina, lincomicina, metotrexato, fosfotricina, puromicina y tetraciclina. Los procedimientos de determinación de la modulación de un gen reportero son muy conocidos en la técnica, e incluyen, aunque no se limitan a, procedimientos fluorimétricos (por ejemplo, espectroscopía de fluorescencia, clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), microscopía de fluorescencia), determinación de la resistencia a antibióticos.

La expresión de la proteína GDNF y del ARNm se pueden valorar usando procedimientos conocidos por los expertos en la materia y descritos en otra parte en el presente documento. Por ejemplo, pueden usarse inmunoensayos tales como ELISA para medir los niveles de proteínas. Kits de ELISA de GDNF están disponibles en el mercado, por ejemplo, de R&D Systems (Minneapolis, MN).

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

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

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

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

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

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

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

Ejemplos de procedimientos de análisis de la expresión génica conocidos en la técnica incluyen matrices o

micromatrices de ADN, (Brazma y Vilo, (2000) FEBS Lett., 480, 17-24; Celis, et al., (2000) FEBS Lett., 480, 2-16), SAGE (análisis en serie de expresión génica) (Madden, et al., (2000) Drug Discov. Today, 5, 415- 425), READS (amplificación por enzimas de restricción de los ADNc digeridos) (Prashar y Weissman, (1999) Methods Enzymol., 303, 258-72), TOGA (análisis de expresión génica total) (Sutcliffe, et al., (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 97, 5 1976-81), matrices de proteínas y proteómicos (Celis, et al., (2000) FEBS Lett., 480, 2-16; Jungblut, et al., Electrophoresis, 1999, 20, 2100-10), secuenciación de marca de secuencia expresada (EST) (Celis, et al., FEBS Lett., 2000, 480, 2-16; Larsson, et al., J. Biotechnol., 2000, 80, 143-57), huella de ADN sustractiva (SuRF) (Fuchs, et al., (2000) Anal. Biochem. 286, 91-98; Larson, et al., (2000) Cytometry 41, 203-208), clonación sustractiva, presentación diferencial (DD) (Jurecic y Belmont, (2000) Curr. Opin. Microbiol. 3, 316-21), hibridación genómica comparativa (Carulli, et al., (1998) J. Cell Biochem. Suppl., 31, 286-96), técnicas de FISH (hibridación in situ fluorescente) (Going y Gusterson, (1999) Eur. J. Cancer, 35, 1895-904) y procedimientos de espectrometría de masas (To, Comb. (2000) Chem. High Throughput Screen, 3, 235-41).

Los compuestos de la divulgación son útiles para investigación y diagnóstico, debido a que estos compuestos 15 hibridan con ácidos nucleicos que codifican el factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF). 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 factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) son cebadores o sondas eficaces en condiciones que favorecen la amplificación génica o detección, respectivamente. Estos 20 cebadores y sondas son útiles en procedimientos que requieren la detección específica de moléculas de ácidos nucleicos que codifican factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) y en la amplificación de dichas moléculas de ácidos nucleicos para la detección o para su uso en estudios adicionales de factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF). La hibridación de los oligonucleótidos antisentido, particularmente los cebadores y sondas, de la divulgación con un ácido nucleico que codifica el factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) puede detectarse por medios conocidos en la técnica. Dichos medios pueden comprender conjugación de 25 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 factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) en una muestra.

La especificidad y sensibilidad del antisentido también son empleadas por los expertos en la materia para usos 30 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, 35 especialmente seres humanos.

Para productos terapéuticos, un animal, preferentemente un ser humano, que se sospecha que tiene una enfermedad o trastorno que puede tratarse modulando la expresión de polinucleótidos del factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) se trata administrando compuestos antisentido de acuerdo con esta divulgación. 40 Por ejemplo, en un aspecto no limitante, los procedimientos comprenden la etapa de administrar al animal que necesita tratamiento, una cantidad terapéuticamente eficaz de modulador del factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF). Los moduladores del factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) de la presente divulgación modulan eficazmente la actividad del factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) o modulan la expresión de la proteína del factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF). En un aspecto, la actividad o 45 expresión del factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) en un animal se inhibe aproximadamente el 10% en comparación con un control. Preferentemente, la actividad o expresión del factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) en un animal se inhibe aproximadamente el 30%. Más preferentemente, la actividad o expresión del factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) en un animal se inhibe el 50% o más. De este modo, los compuestos oligoméricos modulan la expresión del ARNm del factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) 50 al menos el 10%, al menos el 50%, al menos el 25%, al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 98%, al menos el 99%, o el 100% en comparación con un control.

En un aspecto, la actividad o expresión del factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) y/o en un animal 55 aumenta aproximadamente el 10% en comparación con un control. Preferentemente, la actividad o expresión del factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) en un animal aumenta aproximadamente el 30%. Más preferentemente, la actividad o expresión del factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) en un animal aumenta el 50% o más. De este modo, los compuestos oligoméricos modulan la expresión del ARNm del factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) al menos el 10%, al menos el 50%, al menos el 25%, al menos el 60 60 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 98%, al menos el 99%, o el 100% en comparación con un control.

Por ejemplo, se puede medir la reducción de la expresión del factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) en suero, sangre, tejido adiposo, hígado o cualquier otro líquido corporal, tejido u órgano del animal. Preferentemente, las células contenidas dentro de dichos líquidos, tejidos u órganos que se analizan contienen una molécula de ácido nucleico que codifica péptidos del factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) y/o la propia proteína del factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF).

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

### **Conjugados**

Otra modificación de los oligonucleótidos de la divulgación implica enlazar químicamente al oligonucleótido uno o más restos o conjugados, que potencian la actividad, distribución celular o captación celular del oligonucleótido. Estos restos o conjugados pueden comprender grupos conjugados covalentemente unidos a grupos funcionales tales como grupos hidroxilo primarios o secundarios. Grupos conjugados de la divulgación incluyen intercaladores, moléculas reporteras, poliaminas, poliamidas, polietilenglicoles, poliéteres, grupos que potencian las propiedades farmacodinámicas de oligómeros, y grupos que potencian las propiedades farmacocinéticas de oligómeros. Grupos conjugados típicos incluyen colesteroles, lípidos, fosfolípidos, biotina, fenazina, folato, fenantridina, antraquinona, acridina, fluoresceínas, rodaminas, cumarinas y colorantes. Grupos que potencian las propiedades farmacodinámicas, en el contexto de esta divulgación, incluyen grupos que mejoran la captación, potencian la resistencia a la degradación y/o fortalecen la hibridación específica de secuencia con el ácido nucleico diana. Grupos que potencian las propiedades farmacocinéticas, en el contexto de esta divulgación, incluyen grupos que mejoran la captación, distribución, metabolismo o eliminación de los compuestos de la presente divulgación. Grupos conjugados representativos se describen en la solicitud de patente internacional nº. PCT/US92/09196, depositada el 23 de 1992, y la patente de EE.UU. con No. 6.287.860. 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 tiocolesterol, una cadena alifática, por ejemplo, residuos de dodecanodiol o undecilo, un fosfolípido, por ejemplo, di-hexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato de trietilamonio, una poliamina o una cadena de polietilenglicol, o ácido adamantano acético, un resto palmitilo, o un resto octadecilamina o hexilamino-carbonil-oxicolesterol. Los oligonucleótidos de la divulgación también pueden conjugarse con principios activos, por ejemplo, aspirina, warfarina, fenilbutazona, ibuprofeno, suprofen, fenbufeno, ketoprofeno, (S)-(+)-pranoprofeno, carprofeno, dansilsarcosina, ácido 2,3,5-triyodobenzoico, ácido flufenámico, ácido folínico, una benzotiadiazida, clorotiazida, una diazepamina, indometacina, un barbitúrico, una cefalosporina, un fármaco sulfa, un antidiabético, un antibacteriano o un antibiótico.

Las patentes representativas de los Estados Unidos que enseñan la preparación de estos conjugados de oligonucleótidos incluyen, pero no se limitan a, las Patentes de los EE.UU. con Nº 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, por ejemplo, liposomas, moléculas dirigidas a receptor, formulaciones orales, rectales, tópica u otras, para ayudar en la captación, distribución y/o absorción. Las patentes representativas de los Estados Unidos que enseñan la preparación de estas formulaciones de ayuda en la captación, distribución y/o absorción incluyen, pero no se limitan a, las patentes de los EE.UU. con Nº 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  
 5 oligonucleótido solo (por ejemplo, una cualquiera o más de las SEQ ID NO: 5 a 34) o en combinación con una formulación de proteína, polisacárido o lípido adecuada.

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

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

25 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.

30 La expresión "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales fisiológicamente y farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la divulgación: es decir, sales que retienen la actividad biológica deseada del compuesto parental y no confieren efectos toxicológicos no deseados al mismo. Para oligonucleótidos, ejemplos preferidos de sales farmacéuticamente aceptables y sus usos se describen adicionalmente en la patente de Estados Unidos No. 6.287.860.

35 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  
 40 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.

45 Para tratar tejidos en el sistema nervioso central, la administración puede ser mediante inyección o infusión en el líquido cefalorraquídeo. La administración del ARN antisentido en el líquido cefalorraquídeo se describe, por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. App. Pub. No. 2007/0117772, "Methods for slowing familial ALS disease progression".

50 Cuando se pretende que el oligonucleótido antisentido de la presente divulgación se administre a células en el sistema nervioso central, la administración puede ser con uno o más agentes capaces de promover la penetración del oligonucleótido antisentido objeto a través de la barrera hematoencefálica. La inyección puede realizarse, por ejemplo, en la corteza entorrinal o hipocampo. La administración de factores neurotróficos mediante la administración de un vector de adenovirus a neuronas motoras en tejido muscular se describe, por ejemplo, en  
 55 la patente de los EE.UU. nº. 6.632.427, "Adenoviral-vector-mediated gene transfer into medullary motor neurons". La distribución de vectores directamente al cerebro, por ejemplo, el cuerpo estriado, el tálamo, el hipocampo, o la sustancia negra, se conoce en la técnica y se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. nº. 6.756.523, "Adenovirus vectors for the transfer of foreign genes into cells of the central nervous system particularly in brain". La administración puede ser rápida como mediante inyección o realizarse durante un periodo de tiempo como por  
 60 infusión o administración lenta de formulaciones de liberación lenta.

La administración de GDNF a sujetos animales se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. nº 7.226.758,

"Nucleic acids encoding glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)",. La administración de un vector lentiviral a primates se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. nº 6.800.281, "Lentiviral-mediated growth factor gene therapy for neurodegenerative diseases,". La administración de células que expresan NGF a primates y cerebros de primate se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. nº 7.244.423, "Methods for therapy of neurodegenerative disease of the brain".

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, para hacer al compuesto antisentido más eficaz y/o aumenta el transporte del compuesto antisentido a través de la barrera hematoencefálica. La rotura osmótica de la barrera hematoencefálica también puede llevarse a cabo por, por ejemplo, infusión de azúcares que incluyen, aunque no se limitan a, mesoeritritol, xilitol, D(+) galactosa, D(+) lactosa, D(+) xilosa, dulcitol, mioinositol, L(-) fructosa, D(-) manitol, D(+) glucosa, D(+) arabinosa, D(-) arabinosa, celobiosa, D(+) maltosa, D(+) rafinosa, L(+) ramnosa, D(+) melibiosa, D(-)ribosa, adonitol, D(+) arabitól, L(-) arabitól, D(+) fucosa, L(-) fucosa, D(-) lixosa, L(+) lixosa y L(-) lixosa, o aminoácidos que incluyen, aunque no se limitan a, glutamina, lisina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glicina, histidina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, tirosina, valina y taurina. Los procedimientos y materiales para potenciar la penetración de la barrera hematoencefálica se describen, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos nº 4.866.042, "Method for the delivery of genetic material across the blood brain barrier,"6.294.520,"Material for passage through the blood-brain barrier" y6.936.589, "Parenteral delivery systems".

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

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

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

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

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

Las emulsiones normalmente son sistemas heterogéneos de un líquido dispersado en otro en forma de gotitas que normalmente superan 0,1 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 el mismo como una fase independiente. Las microemulsiones están incluidas como un aspecto de la presente divulgación. Las emulsiones y sus usos son muy conocidos en la técnica y se describen adicionalmente en la patente de Estados Unidos No. 6.287.860.

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

- 5
- 10 Los liposomas también incluyen liposomas "estéricamente estabilizados", una expresión que, tal como se usa en el presente documento, se refiere a liposomas que comprenden uno o más lípidos especializados. Cuando se incorporan en liposomas, estos lípidos especializados producen liposomas con vidas en circulación mejoradas con respecto a los liposomas que carecen de dichos lípidos especializados. Ejemplos de liposomas estéricamente estabilizados son aquellos en los que parte de la parte de lípido formado de vesícula del liposoma comprende uno o más glucolípidos o se derivatiza con uno o más polímeros hidrófilos, tales como un resto de polietilenglicol (PEG). Los liposomas y sus usos se describen adicionalmente en la patente de Estados Unidos No. 6.287.860.

Las formulaciones y composiciones farmacéuticas de la presente divulgación también pueden comprender tensioactivos. El uso de tensioactivos en medicamentos, formulaciones y en emulsiones es muy conocido en la técnica. Los agentes tensioactivos y sus usos se describen adicionalmente en la patente de EE.UU. No. 6.287.860.

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

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

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

40 Para administración tópica u otra, los oligonucleótidos de la divulgación pueden encapsularse dentro de liposomas o pueden formar complejos con los mismos, en particular con liposomas catiónicos. Como alternativa, los oligonucleótidos pueden estar complejados con lípidos, en particular con lípidos catiónicos. Ácidos grasos y ésteres preferidos, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, y sus usos se describen adicionalmente en la patente de Estados Unidos No. 6.287.860.

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

60 Las composiciones y formulaciones para administración parenteral, intratecal o intraventricular pueden comprender soluciones acuosas estériles que también pueden contener tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados tales



como, aunque no se limitan a, potenciadores de la penetración, compuestos portadores y otros vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables.

- Ciertos aspectos de la divulgación proporcionan composiciones farmacéuticas que contienen uno o más compuestos oligoméricos y uno o más de otros agentes quimioterapéuticos que funcionan por un mecanismo no antisentido. Ejemplos de dichos agentes quimioterapéuticos incluyen, aunque no se limitan a, fármacos quimioterapéuticos para el cáncer tales como daunorrubicina, daunomicina, dactinomicina, 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, hidroxiourea, desoxicofornicina, 4-hidroxi-peroxi-ciclo-fosforamida, 5-fluorouracilo (5-FU), 5-fluorodesoxiuridina (5-FUdR), metotrexato (MTX), colchicina, taxol, vincristina, vinblastina, etopósido (VP-16), trimetrexato, irinotecán, topotecán, gemcitabina, tenipósido, cisplatino y dietilestilbestrol (DES). Cuando se usan con los compuestos de la divulgación, dichos agentes quimioterapéuticos pueden usarse individualmente (por ejemplo, 5-FU y oligonucleótido), secuencialmente (por ejemplo, 5-FU y oligonucleótido durante un periodo de tiempo seguido de MTX y oligonucleótido), o en combinación con uno o más de otros de dichos agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, 5-FU, MTX y oligonucleótido, o 5-FU, radioterapia y oligonucleótido). Fármacos antiinflamatorios, que incluyen, aunque no se limitan a, fármacos antiinflamatorios no esteroideos y corticosteroides, y fármacos antivirales, que incluyen, aunque no se limitan a, ribavirina, vidarabina, aciclovir y ganciclovir, también pueden combinarse en composiciones de la divulgación. Las combinaciones de compuestos antisentido y otros fármacos no antisentido también están dentro del alcance de la presente divulgación. Pueden usarse dos o más compuestos combinados juntos o secuencialmente.
- En otro aspecto relacionado, las composiciones de la divulgación pueden contener uno o más compuestos antisentido, particularmente oligonucleótidos, dirigidos a un primer ácido nucleico y uno o más compuestos antisentido adicionales dirigidos a un segundo ácido nucleico diana. Por ejemplo, la primera diana puede ser una secuencia antisentido particular del factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF), y la segunda diana puede ser una región de otra secuencia de nucleótidos. Como alternativa, las composiciones de la divulgación pueden contener dos o más compuestos antisentido dirigidos a diferentes regiones del mismo ácido nucleico diana del factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF). 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.

### 35 **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. Se describen ciertas dosis inyectadas de oligonucleótidos antisentido, por ejemplo, en la patente de EE.UU. nº. 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. Los aspectos de composiciones y procedimientos inventivos se ilustran en los siguientes ejemplos.

10

## 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.

15

### ***Ejemplo 1: Diseño de oligonucleótidos antisentido específicos para una molécula de ácido nucleico antisentido para una cadena sentido del polinucleótido del factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF)***

20

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.

25

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.

30

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.

40

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.

50

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.

55

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

60

MeltDoctor de Applied Biosystems Inc.). Estos kits incluyen una solución tampón adecuada que contiene uno de los colorantes de unión a ADN bicatenario (dsADN) (tales como los colorantes ABI HRM, SYBR Green, SYTO, etc.). Las propiedades de los colorantes de dsADN son tales que casi no emiten fluorescencia en forma libre, pero son altamente fluorescentes cuando se unen a dsADN.

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

### **Ejemplo 2: Modulación de polinucleótidos de GDNF**

#### **25 Tratamiento de células HUVEC con oligonucleótidos antisentido**

Las células HUVEC de la ATCC (Promo Cell cat. n.º C-12253) se cultivaron en medio de crecimiento epitelial (Promo Cell cat. n.º C-22010) a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 %. Un día antes del experimento, las células volvieron a sembrarse usando el kit Promo Cell Detach (cat. n.º C-41200) a la densidad de  $1,5 \times 10^5$ /ml en placas de 6 pocillos y se incubaron a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 %. El día del experimento, el medio en las placas de 6 pocillos se cambió a medio de crecimiento epitelial. Todos los oligonucleótidos antisentido se diluyeron a la concentración de 20 µM. Se incubaron dos µl de esta solución con 400 µl de medio Opti-MEM (Gibco, 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 a cada pocillo de las placas de 6 pocillos con células HUVEC. Se usó una mezcla similar que incluye 2 µl de agua en lugar de la solución de oligonucleótido para los controles transfectados con vector simulado. Después de 3-18 horas de incubación a 37°C y con el 5% de CO<sub>2</sub>, el medio se cambió a medio fresco de crecimiento. 48 h después de la adición de oligonucleótidos antisentido, el medio se eliminó y se extrajo ARN de las células usando el sistema de aislamiento de ARN total SV de Promega (n.º de cat Z3105) o el kit de aislamiento de ARN total RNeasy de Qiagen (n.º de cat 74181) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se añadieron 600 ng de ARN a la reacción de transcripción inversa realizada usando el kit de ADNc Verso de Thermo Scientific (n.º de cat AB1453B) 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: Hs01931883\_s1 by Applied Biosystems Inc., Foster City CA). Se usó el siguiente ciclo de PCR: 50 °C durante 2 min, 95 °C durante 10 min, 40 ciclos de (95 °C durante 15 segundos, 60 °C durante 1 min) usando la máquina de PCR en tiempo real StepOne Plus (Applied Biosystems Inc.) o el ciclador térmico Mx4000 (Stratagene).

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

Oligos de detección para GDNF antisentido:

ID de ensayo ABI 76009981

Cebador directo: GCAGGACTACTACTGTGGTTATGAC (SEQ ID No.: 35)

55 Cebador inverso: CCACCCCAGAATTATCCCTCTA (SEQ ID No.: 36)

Sonda (FAM): TCAAGCGCAAAGTTAC (SEQ ID No.: 37)

Oligos de detección para PCR de GDNF antisentido

Cebador directo: GCCGGCTGTCGTGTTTC (SEQ ID No.: 38)

60 Cebador inverso: AGCAAGGAGGCGGAACG (SEQ ID No.: 39)

Sonda (FAM): CTTCTGCCGGTAATC (SEQ ID No.: 40)

Oligos de detección para GDNF

ID de ensayo ABI Hs01931883\_s1

Secuencia de contexto: CATGTTGCAGACCCATCGCCTTTGA (SEQ ID No.: 41)

## 5 Resultados:

Los resultados de PCR en tiempo real muestran que los niveles de ARNm de GDNF en células HUVEC se incrementan significativamente 48 h después del tratamiento con dos de los oligos con esqueleto completamente fosforotioado diseñado para GDNF antisentido A (CUR-0117, P=0,02) y PR (CUR-0121, P=0,05, CUR-0122, P=0,01) (figura 1A). En las mismas muestras los niveles de GDMF antisentido A están disminuidos significativamente después del tratamiento con CUR-0117 (figura 1B).

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

15 Se cultivaron células HepG2 de ATCC (nº de cat HB-8065) en medio de cultivo (MEM/EBSS (Hyclone nº de cat SH30024, o Mediatech nº de cat MT-10-010-CV) +10% FBS (Mediatech nº de cat MT35- 011-CV)+ penicilina/estreptomycin (Mediatech nº de cat MT30-002-CI)) a 37°C y el 5% de CO<sub>2</sub>. Un día antes del experimento, las células volvieron a sembrarse a la densidad de  $1,5 \times 10^5$ /ml en placas de 6 pocillos y se incubaron a 37°C y con el 5% de CO<sub>2</sub>. El día del experimento, el medio en las placas de 6 pocillos se cambió a medio de cultivo fresco.

20 Todos los oligonucleótidos antisentido se diluyeron a la concentración de 20 µM. Se incubaron dos µl de esta solución con 400 µl de medio Opti-MEM (Gibco, nº de cat 31985-070) y 4 µl de Lipofectamine 2000 (Invitrogen, nº de cat 11668019) a temperatura ambiente durante 20 min y se aplicaron a cada pocillo de las placas de 6 pocillos con células HepG2. Se usó una mezcla similar que incluye 2 µl de agua en lugar de la solución de oligonucleótido para los controles transfectados con vector simulado. Después de 3-18 horas de incubación a 37°C y con el 5% de CO<sub>2</sub>,

25 el medio se cambió a medio fresco de crecimiento. 48 h después de la adición de oligonucleótidos antisentido, el medio se eliminó y se extrajo ARN de las células usando el sistema de aislamiento de ARN total SV de Promega (nº de cat Z3105) o el kit de aislamiento de ARN total RNeasy de Qiagen (nº de cat 74181) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se añadieron 600 ng de ARN a la reacción de transcripción inversa realizada usando el kit de ADNc Verso de Thermo Scientific (nº de cat AB1453B) o el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (nº de cat 4368813) tal como se describe en el protocolo del fabricante. El ADNc de esta reacción de transcripción inversa se usó para monitorizar la expresión génica por PCR en tiempo real usando la mezcla de expresión génica Taqman de ABI (nº de cat 4369510) y cebadores/sondas diseñados por ABI (ensayo de expresión génica Taqman de Applied Biosystems: Hs01931883\_s1 by Applied Biosystems Inc., Foster City CA). Se usó el siguiente ciclo de PCR: 50°C durante 2 min, 95°C durante 10 min, 40 ciclos de (95°C durante 15 segundos, 60°C durante 1 min) usando la

35 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.

40

### **Resultados**

Los resultados de PCR en tiempo real muestran que los niveles de ARNm de GDNF en células HepG2 se incrementan significativamente 48 h después del tratamiento con esqueleto completamente fosforotioado diseñado para GDNF antisentido BX505687 (Figura 1C).

45

### **Tratamiento de células Vero76 con oligonucleótidos antisentido**

Se cultivaron células Vero76 de ATCC (nº de cat CRL-1587) en medio de cultivo (MEM/EBSS (Hyclone nº de cat SH30024, o Mediatech nº de cat MT-10-010-CV) +10% FBS (Mediatech nº de cat MT35- 011-CV)+ penicilina/estreptomycin (Mediatech nº de cat MT30-002-CI)) a 37°C y el 5% de CO<sub>2</sub>. Un día antes del experimento, las células volvieron a sembrarse a la densidad de  $1,5 \times 10^5$ /ml en placas de 6 pocillos y se incubaron a 37°C y con el 5% de CO<sub>2</sub>. El día del experimento, el medio en las placas de 6 pocillos se cambió a medio de cultivo fresco.

50 Todos los oligonucleótidos antisentido se diluyeron en agua a la concentración de 20 µM. Se incubaron 2 µl de esta solución con 400 µl de medio Opti-MEM (Gibco, nº de cat 31985-070) y 4 µl de Lipofectamine 2000 (Invitrogen, nº de cat 11668019) a temperatura ambiente durante 20 min y se aplicaron a cada pocillo de las placas de 6 pocillos con células Vero76. Se usó una mezcla similar que incluye 2 µl de agua en lugar de la solución de oligonucleótido para los controles transfectados con vector simulado. Después de 3-18 horas de incubación a 37°C y con el 5% de CO<sub>2</sub>,

55 el medio se cambió a medio fresco de crecimiento. 48 h después de la adición de oligonucleótidos antisentido, el medio se eliminó y se extrajo ARN de las células usando el sistema de aislamiento de ARN total SV de Promega (nº de cat Z3105) o el kit de aislamiento de ARN total RNeasy de Qiagen (nº de cat 74181) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se añadieron 600 ng de ARN a la reacción de transcripción inversa realizada usando el kit de ADNc

60

Verso de Thermo Scientific (nº de cat AB1453B) tal como se describe en el protocolo del fabricante. El ADNc de esta reacción de transcripción inversa se usó para monitorizar la expresión génica por PCR en tiempo real usando la mezcla de expresión génica Taqman de ABI (nº de cat 4369510) y cebadores/sondas diseñados por ABI (ensayo de expresión génica Taqman de Applied Biosystems: Hs01931883\_s1 by Applied Biosystems Inc., Foster City CA). Se usó el siguiente ciclo de PCR: 50°C durante 2 min, 95°C durante 10 min, 40 ciclos de (95°C durante 15 segundos, 60°C durante 1 min) usando 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.

10

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.

### 15 **Resultados**

Los resultados de PCR en tiempo real muestran que los niveles de ARNm de GDNF en células Vero se incrementaron significativamente 48 h después del tratamiento con oligonucleótidos antisentido para GDNF antisentido BX505687 (Figura 1D).

20

#### **Tratamiento de células CHP212 con oligonucleótidos antisentido**

Se cultivaron células CHP212 de ATCC (nº de cat CRL-2273) en medio de cultivo (MEM/F12 (ATCC nº de cat 30-2003 y Mediatech nº de cat 10-080-CV) +10% FBS (Mediatech nº de cat MT35- 011-CV)+ penicilina/estreptomina (Mediatech nº de cat MT30-002-CI)) a 37°C y el 5% de CO<sub>2</sub>. Un día antes del experimento, las células volvieron a sembrarse a la densidad de 1,5 x 10<sup>5</sup>/ml en placas de 6 pocillos y se incubaron a 37°C y con el 5% de CO<sub>2</sub>. El día del experimento, el medio en las placas de 6 pocillos se cambió a medio de cultivo fresco. Todos los oligonucleótidos antisentido se diluyeron a la concentración de 20 µM. Se incubaron dos µl de esta solución con 400 µl de medio Opti-MEM (Gibco, nº de cat 31985-070) y 4 µl de Lipofectamine 2000 (Invitrogen, nº de cat 11668019) a temperatura ambiente durante 20 min y se aplicaron a cada pocillo de las placas de 6 pocillos con células CHP212. Se usó una mezcla similar que incluye 2 µl de agua en lugar de la solución de oligonucleótido para los controles transfectados con vector simulado. Después de 3-18 horas de incubación a 37°C y con el 5% de CO<sub>2</sub>, el medio se cambió a medio fresco de crecimiento. 48 h después de la adición de oligonucleótidos antisentido, el medio se eliminó y se extrajo ARN de las células usando el sistema de aislamiento de ARN total SV de Promega (nº de cat Z3105) o el kit de aislamiento de ARN total RNeasy de Qiagen (nº de cat 74181) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se añadieron 600 ng de ARN a la reacción de transcripción inversa realizada usando el kit de ADNc Verso de Thermo Scientific (nº de cat AB1453B) o el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (nº de cat 4368813) tal como se describe en el protocolo del fabricante. El ADNc de esta reacción de transcripción inversa se usó para monitorizar la expresión génica por PCR en tiempo real usando la mezcla de expresión génica Taqman de ABI (nº de cat 4369510) y cebadores/sondas diseñados por ABI (ensayo de expresión génica Taqman de Applied Biosystems: Hs01931883\_s1 by Applied Biosystems Inc., Foster City CA). Se usó el siguiente ciclo de PCR: 50°C durante 2 min, 95°C durante 10 min, 40 ciclos de (95°C durante 15 segundos, 60°C durante 1 min) usando la máquina de PCR en tiempo real StepOne Plus (Applied Biosystems).

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

### **Resultados**

50

Los resultados de PCR en tiempo real muestran que los niveles de ARNm de GDNF en células CHP212 se incrementan significativamente 48 h después del tratamiento con uno de los oligos diseñados para antisentido de GDNF (Figura 1 E).

### 55 **Ejemplo 3: administración de oligonucleótidos específicos para transcritos antisentido de GDNF a primates**

Toda la experimentación se realiza de acuerdo con las directrices de NIH y la aprobación institucional de cuidado animal. Bajo guía de RM, a cada mono se le administran seis inyecciones estereotáxicas de composiciones de oligonucleótidos antisentido de la divulgación bilateralmente en el núcleo caudado, putamen y sustancia negra. Las inyecciones se realizan en la cabeza del núcleo caudado (10 microlitros), cuerpo del núcleo caudado (5 microlitros), putamen anterior (10 microlitros), putamen comisural (10 microlitros), putamen poscomisural (5 microlitros) y sustancia negra ( 5 microlitros). Las inyecciones se realizan a través de una jeringa Hamilton de 10 microlitros

conectada a una bomba a un caudal de 0,5 microlitros/min. Durante la inyección, la aguja se eleva de 1 a 2 mm para dispersar mejor la composición de oligonucleótidos a través de la diana deseada. La aguja se deja en su lugar durante 3 minutos adicionales para permitir que el inyectado se difunda desde la punta de la aguja. El lado izquierdo se inyecta 6 semanas antes que el derecho.

5 Ocho monos rhesus hembras de edad avanzada (aproximadamente 25 años) reciben inyecciones de composiciones de oligonucleótidos antisentido dirigidas al cuerpo estriado y a la sustancia negra y mueren después de 3 meses. Postmortem, todas las inyecciones de GDNF se localizan en el núcleo caudado, putamen y regiones supranigrales, según se revela mediante procedimientos de tinción estándar (la inmunohistoquímica de GDNF se realiza con un anticuerpo disponible en el mercado (R & D Systems, Minneapolis, MN, 1:250), usando procedimiento ABC e intensificación con níquel. La eliminación o sustitución del anticuerpo primario sirven como controles. Se observa inmunorreactividad.

15 Monos de edad avanzada son sometidos a tomografía por emisión de positrones (PET) con fluorodopa (FD) antes de la cirugía y nuevamente justo antes de ser sacrificados. Todos los procedimientos siguen un ayuno nocturno. Después de la sedación con ketamina (10 a 15 mg/kg), el animal se intubó y se colocaron angiocatéteres femorales para la inyección del trazador y el muestreo de sangre. A continuación, la anestesia se mantiene con del 1 al 2% de isoflurano durante el resto del procedimiento. La carbidopa (2 a 3 mg/kg IV) se administra 30 minutos antes del estudio con FD. El animal se coloca en un reposacabezas estereotáxico construido con materiales compatibles con escaneo de PET, y se adquirió un escaneo de transmisión para la corrección de los datos de emisión para la atenuación. Se administra FD (185 MBq) durante 30 s y se inicia un escaneo de emisión dinámica tridimensional de 90 min. El escaneo incluye 22 fotogramas con duraciones que aumentan de 1 min inicialmente a 5 min al final. El lecho se mueve cíclicamente la distancia entre planos entre cada par de escaneos de 5 minutos para obtener un intervalo de muestreo coronal neto de 2.125 mm. Las regiones de interés (ROI) se colocan en el núcleo caudado, el putamen y la corteza occipital en imágenes de RM morfométricas individuales corregistradas con los datos de imagen de FD. Las evoluciones temporales corticales se utilizan como funciones de entrada para generar mapas funcionales de la constante de tasa de absorción  $K_i$  mediante el procedimiento gráfico modificado. Las ROI estriatales se transfieren a los mapas funcionales, y los valores de  $K_i$  se evalúan como la ROI media para cada estructura.

30 Dentro del estriado, se evalúan los marcadores de la función dopaminérgica. Todos los monos son perfundidos con solución salina. Se extirpa el cerebro, se sumerge en solución salina enfriada con hielo durante 10 minutos y se tritura en un rebanador de cerebro de mono. Las losas a través de la cabeza del caudado y el putamen se perforan bilateralmente con un punzón cerebral de 1 mm. Estas punciones se procesan para HPLC. Las losas de tejido están sumergidas en el fijador de Zamboni. Los recuentos estereológicos y los volúmenes de neuronas inmunoreactivas con TH se realizan con el software NeuroZoom utilizando el procedimiento del disector óptico para el recuento celular y el procedimiento del nucleador para medir el volumen neuronal. Las mediciones de densidad óptica se realizan para evaluar la intensidad relativa de la tinción con TH dentro del núcleo caudado y el putamen.

40 En un segundo experimento, 20 adultos jóvenes de rhesus se entrenan inicialmente 3 días por semana hasta que se logra el rendimiento asintótico en una tarea de alcance manual en la que se mide el tiempo para recoger las golosinas de los pocillos ahuecados. Cada día del experimento, los monos reciben 10 intentos por mano. Una vez por semana, los monos también se evalúan en una escala de calificación clínica Parkinsoniana modificada (CRS). A todos los monos se les administra una inyección de 3 mg de MPTP-HCl en la arteria carótida derecha, lo que inicia un estado de Parkinson. Una semana después, los monos son evaluados en la CRS. Solo los monos que muestran hemiparkinsonismo severo con la clásica postura de brazo torcido y pierna que se arrastra en el lado izquierdo continúan en el estudio (n = 10). Sobre la base de las puntuaciones de CRS, los monos se combinan en dos grupos de cinco monos. Estos monos se administran en composiciones de oligonucleótidos antisentido de la divulgación. Usando la guía de imaginología por resonancia magnética (RM), todos los monos reciben inyecciones en el núcleo caudado (n = 2), putamen (n = 3) y sustancia negra (n = 1) en el lado derecho usando los mismos parámetros de inyección que se han descrito anteriormente. Una semana después, los monos comienzan a volver a realizar pruebas en la tarea de alcance manual tres veces por semana durante 3 semanas al mes. Para los análisis estadísticos, los tiempos de una semana individual se combinan en una única puntuación. Durante las semanas de prueba de alcance manual, los monos también se puntúan una vez por semana en la CRS. Individuos con enmascaramiento del tratamiento experimental realizaron todas las evaluaciones de comportamiento. Tres meses después del tratamiento con lentivirus, a los monos se les realiza una exploración por PET con FD y se sacrificaron de 24 a 48 horas después, y los tejidos se procesan histológicamente como anteriormente.

60 Se realizan necropsias para evaluar anomalías en cualquier órgano. Secciones de todos los monos se tiñen para marcadores CD45, CD3 y CD8 para evaluar la respuesta inmunitaria después de la inyección. Estos anticuerpos son marcadores de microglia activada, células T y leucocitos que incluyen linfocitos, monocitos, granulocitos, eosinófilos y timocitos.

Dos monos rhesus adultos jóvenes intactos adicionales reciben inyecciones de oligonucleótidos antisentido en el caudado derecho y putamen y en la sustancia negra izquierda usando el mismo protocolo de inyección. Estos animales se sacrifican 8 meses después y se evalúan por inmunohistoquímica y ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) (las punciones cerebrales se homogeneizan en tampón I 150:1 [solución salina tamponada con tris 0,1 M, pH 8,1, que contiene EDTA 1 mM, aprotinina al 1%), 10 microgramos/ml de leupeptina, 14 microgramos/ml de pepstatina, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 4 mM] durante 30 s en la suspensión de hielo. A continuación se añade una cantidad igual de tampón 11 (solución salina tamponada con tris 0,1 M, pH 8,1, que contiene EDTA 1 mM, aprotinina al 1%, 10 g/ml de leupeptina, 14 microgramos/ml de pepstatina, 4 mM de PMSF y NP-40 al 0,5%).

Los tubos se agitan durante 2 horas. El sobrenadante se recoge para ELISA y mediciones de proteínas. La reacción de ELISA se completó en una placa de 96 pocillos (Dynatech, Chantilly, VA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante de ELISA (GDNF Emax ImmunoAssay Systems Kit G3520, Promega, Madison, WI). Las densidades ópticas se registraron en un lector de placas ELISA (a 450 nm de longitud de onda; Dynatech). Algunos lisados se diluyen para garantizar que todas las densidades ópticas están dentro de la curva patrón. Las concentraciones de GDNF se calculan contra la curva patrón de seis puntos y luego se ajustan a picogramos de GDNF por miligramo de proteína total. La proteína total en cada lisado tisular se mide utilizando el kit de ensayo de proteínas Bio-Rad (Bio-Rad, Richmond, CA) para la expresión génica a largo plazo.

El lentivirus se inyecta tanto en el cuerpo estriado como en la sustancia negra para maximizar la probabilidad de un efecto. En la práctica, el experto en la materia determinará, sin excesiva experimentación, las regiones de administración de GDNF para maximizar la inversión de la degeneración nigroestriatal progresiva, por ejemplo, a partir de las enseñanzas de la técnica y esta divulgación, considerando factores tales como la importancia de acontecimientos biológicos relacionados tales como transporte anterógrado de GDNF desde los sitios de inyección a las regiones diana. Y, el experto en la materia, sin excesiva experimentación, a partir de esta divulgación y el conocimiento en la técnica puede evaluar los posibles acontecimientos adversos que son resultado de la inducción de niveles supranormales de dopamina estriatal; y, vectores con sistemas inducibles incorporados que pueden modular la expresión génica en casos de efectos secundarios que limitan la dosis pueden ser útiles.

**Ejemplo 4: uso de oligonucleótidos antisentido de GDNF para tratar un modelo en mono para parkinsonismo**

El parkinsonismo experimental en monos se genera mediante la administración a los animales de la neurotoxina MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidro-piridina), y los animales se tratan con oligonucleótidos antisentido de la divulgación para inhibir la aparición de los síntomas de la enfermedad.

Los monos son tratados con MPTP para producir parkinsonismo experimental. Se implanta una cánula de acero inoxidable en el ventrículo lateral derecho y se conecta a una minibomba osmótica implantada por vía subcutánea (Alzet 2002). La minibomba contiene oligonucleótidos antisentido de la presente divulgación a diversas concentraciones, o su diluyente como control negativo. La bomba suministra a un caudal de 0,5 microlitros/h durante 14 días. Dos días después del implante de la bomba de cánula, los monos (*Cebus apella*) reciben una inyección de 0,6 mg/kg de MPTP en la arteria carótida derecha. Seis semanas después del implante inicial, los animales se perfunden con solución salina y el cerebro se extirpa rápidamente. El cerebro se disecciona en hielo y se extraen trocitos de tejido del núcleo caudado y del putamen. La sustancia negra se coloca en fijador. El tejido del caudado-putamen se analiza mediante HPLC-EC para determinar la dopamina, la sustancia negra se procesa para la inmunorreactividad a tirosina hidroxilasa (TH).

La degeneración de las células nerviosas dopaminérgicas nigrales y sus proyecciones axónicas hacia el caudado/putamen causa parkinsonismo experimental en este modelo de mono. Existen varias indicaciones experimentales de que el GDNF puede prevenir o reducir la gravedad de esta degeneración neuronal. Por ejemplo, el GDNF puede prevenir la pérdida de cuerpos de células nerviosas positivas para TH en la sustancia negra. Esto indica que el GDNF evita los efectos tóxicos de MPTP sobre células nerviosas dopaminérgicas nigrales. El GDNF también puede prevenir la pérdida de fibras positivas para TH en el caudado/putamen. Esto indica que el GDNF evita los efectos tóxicos de MPTP sobre las proyecciones axónicas de las neuronas dopaminérgicas nigrales. El GDNF también puede prevenir la pérdida de contenido de dopamina en el caudado/putamen. Esto indica que el GDNF evita los efectos tóxicos de MPTP sobre los axones y que su contenido de dopamina extienda desde las neuronas dopaminérgicas nigrales al caudado/putamen.

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.

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

5



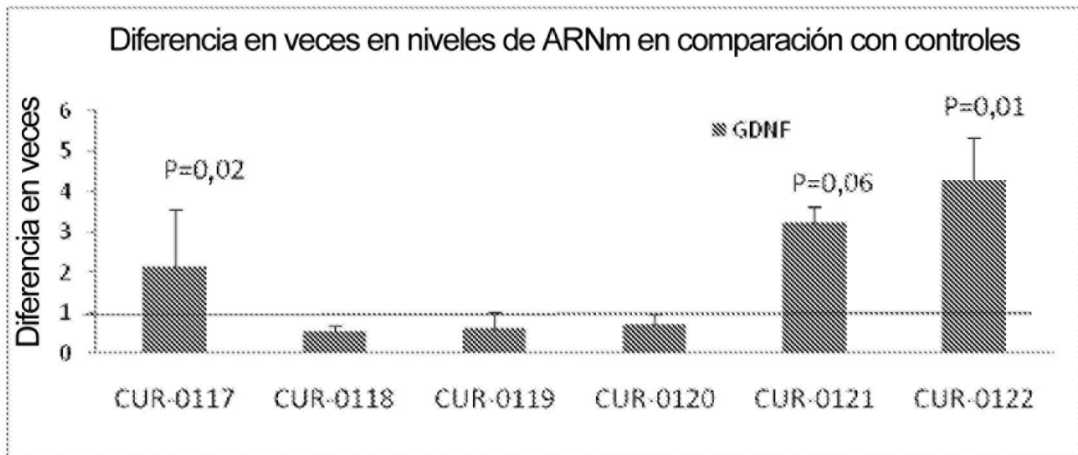
## REIVINDICACIONES

1. Un oligonucleótido antisentido que se dirige a un transcrito antisentido natural del factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) para uso como compuesto terapéutico, donde el transcrito antisentido natural del GDNF tiene la secuencia de ácido nucleico tal y como se expone en una de las SEQ ID NO: 2-3, 42-44, y donde el oligonucleótido antisentido aumenta la expresión del factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF).
2. Un oligonucleótido antisentido que se dirige a un transcrito antisentido natural del factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF), donde el transcrito antisentido natural del GDNF tiene la secuencia de ácido nucleico tal y como se expone en una de las SEQ ID NO: 2-3, 42-44, para uso en la prevención o tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado al factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF), donde el oligonucleótido antisentido aumenta la expresión del factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF), donde la enfermedad o trastorno se selecciona de entre grupo que consiste en daño de células sensoriales cocleares, percepción auditiva defectuosa, pérdida de audición, enfermedad de Alzheimer, esquizofrenia, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, trastorno bipolar, enfermedad de Hirschsprung, enfermedad de las neuronas motoras, esclerosis lateral amiotrófica.
3. Uso de un oligonucleótido antisentido que se dirige a un transcrito antisentido natural del factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF), donde el transcrito antisentido natural del GDNF tiene la secuencia de ácido nucleico tal y como se expone en una de las SEQ ID NO: 2-3, 42-44, para la fabricación de un medicamento para uso en la prevención o tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado al factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF), donde el oligonucleótido antisentido aumenta la expresión del factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF), donde la enfermedad o trastorno se selecciona de entre grupo que consiste en daño de células sensoriales cocleares, percepción auditiva defectuosa, pérdida de audición, enfermedad de Alzheimer, esquizofrenia, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, trastorno bipolar, enfermedad de Hirschsprung, enfermedad de las neuronas motoras, esclerosis lateral amiotrófica.
4. Un procedimiento *in vitro* de modulación de la expresión de factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) en células o tejidos de un paciente que comprende: poner en contacto dichas células o tejidos con un oligonucleótido antisentido que se dirige a un transcrito antisentido natural del factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF), donde el transcrito antisentido natural del GDNF tiene una secuencia de ácido nucleico tal como se expone en una de las SEQ ID NO: 2-3, 42-44; modulando de este modo la expresión del factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF).
5. El oligonucleótido antisentido para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, o el uso de acuerdo con la reivindicación 3, o el procedimiento *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 4, donde el oligonucleótido antisentido es monocatenario o donde el oligonucleótido antisentido es un compuesto de siRNA.
6. El oligonucleótido antisentido para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 5, o el uso de acuerdo con la reivindicación 3 o la reivindicación 5, o el procedimiento *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 4, o la reivindicación 5, donde el oligonucleótido antisentido comprende al menos una de las SEQ ID NO: 5, 9, 10, 15, 16, 18, 19, 21-24, 26, 32-34.
7. El oligonucleótido antisentido para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 5 o 6, o el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3, 5 o 6 o el procedimiento *in vitro* de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, donde la expresión del factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) es aumentada, al menos, un 10%.
8. El oligonucleótido antisentido para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 5 a 7, o el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3, 5 a 7, o el procedimiento *in vitro* de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, donde el oligonucleótido comprende, además, una o más modificaciones que comprenden:
  - a. al menos un enlace internucleosídico modificado seleccionado de entre: un fosforotioato, 2'-fluoro, alquilfosfonato, fosforoditioato, 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
  - c. al menos un resto de azúcar modificado seleccionado de entre: un resto de azúcar modificado con 2'-O-metoxietilo, un resto de azúcar modificado con 2'-metoxi, un resto de azúcar modificado con 2'-O-alquilo, un resto de azúcar bicíclico, y combinaciones de los mismos.

9. Un oligonucleótido antisentido que se dirige a un transcrito antisentido natural del factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF), donde el transcrito antisentido natural del GDNF tiene la secuencia de ácido nucleico tal y como se expone en una de las SEQ ID NO: 2-3, 42-44, donde el oligonucleótido aumenta la expresión del factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF), donde el oligonucleótido antisentido es un compuesto de 5 siRNA.
10. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con la reivindicación 9, donde el oligonucleótido antisentido comprende, además, una o más modificaciones que comprenden:
- 10 a. al menos un enlace internucleosídico modificado seleccionado de entre: un fosforotioato, 2'-fluoro, alquilfosfonato, fosforoditioato, alquilfosfonotioato, fosforamidato, carbamato, carbonato, triéster de fosfato, acetamidata, éster carboximetílico, y combinaciones de los mismos;
  - 15 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
  - 15 c. al menos un resto de azúcar modificado seleccionado de entre: un resto de azúcar modificado con 2'-O-metoxietilo, un resto de azúcar modificado con 2'-metoxi, un resto de azúcar modificado con 2'-O-alquilo, un resto de azúcar bicíclico, y combinaciones de los mismos.
11. Un oligonucleótido antisentido que se dirige a un transcrito antisentido natural del factor neurotrófico 20 derivado de células gliales (GDNF), donde el transcrito antisentido natural del GDNF tiene la secuencia de ácido nucleico tal y como se expone en una de las SEQ ID NO: 2-3, 42-44, donde el oligonucleótido comprende una o más modificaciones que comprenden:
- 25 a. al menos un enlace internucleosídico modificado seleccionado de entre: un fosforotioato, 2'-fluoro, alquilfosfonato, fosforoditioato, alquilfosfonotioato, fosforamidato, carbamato, carbonato, triéster de fosfato, acetamidata, éster carboximetílico, y combinaciones de los mismos;
  - 25 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
  - 30 c. al menos un resto de azúcar modificado seleccionado de entre: un resto de azúcar modificado con 2'-O-metoxietilo, un resto de azúcar modificado con 2'-metoxi, un resto de azúcar modificado con 2'-O-alquilo, un resto de azúcar bicíclico, y combinaciones de los mismos.
12. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con la reivindicación 11, donde el oligonucleótido antisentido es monocatenario o donde el oligonucleótido antisentido es un compuesto de siRNA.
- 35 13. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, donde el oligonucleótido antisentido comprende una de las SEQ ID NO: 5, 9, 10, 15, 16, 18, 19, 21-24, 26, 32-34.
14. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, donde la 40 expresión de un factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) es aumentada, al menos, un 10%.
15. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14, donde el oligonucleótido antisentido tiene una longitud de entre 10 a 30 nucleótidos.
- 45 16. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 15, donde el oligonucleótido antisentido tiene, al menos, una complementariedad de secuencia del 90% con el transcrito antisentido natural del factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF).
- 50 17. Una composición farmacéutica que comprende al menos un oligonucleótido antisentido que tiene las características de un oligonucleótido antisentido definido en cualquiera de las reivindicaciones 9 a 16 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

FIGURA 1

A



B

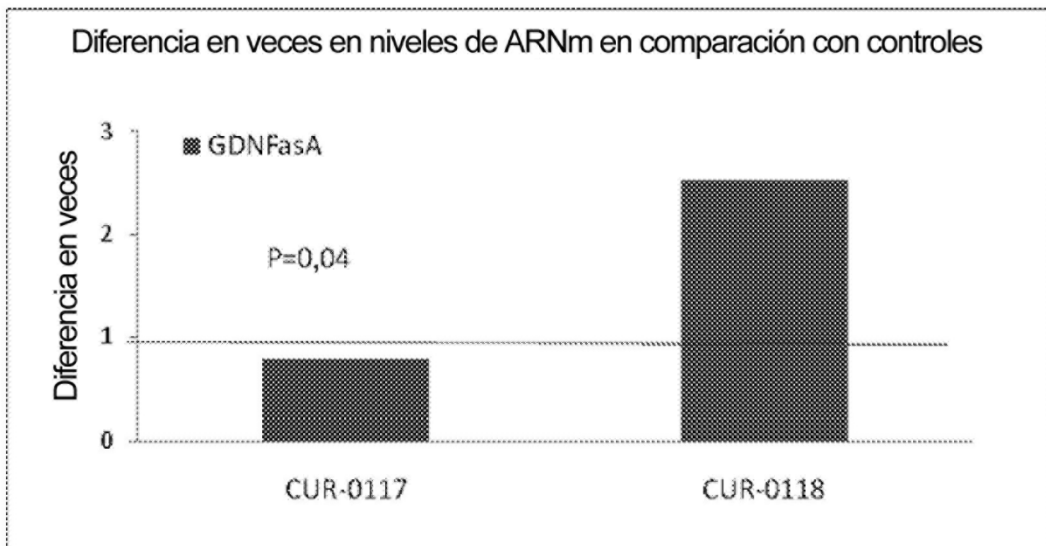


FIGURA 1 (cont.)

C

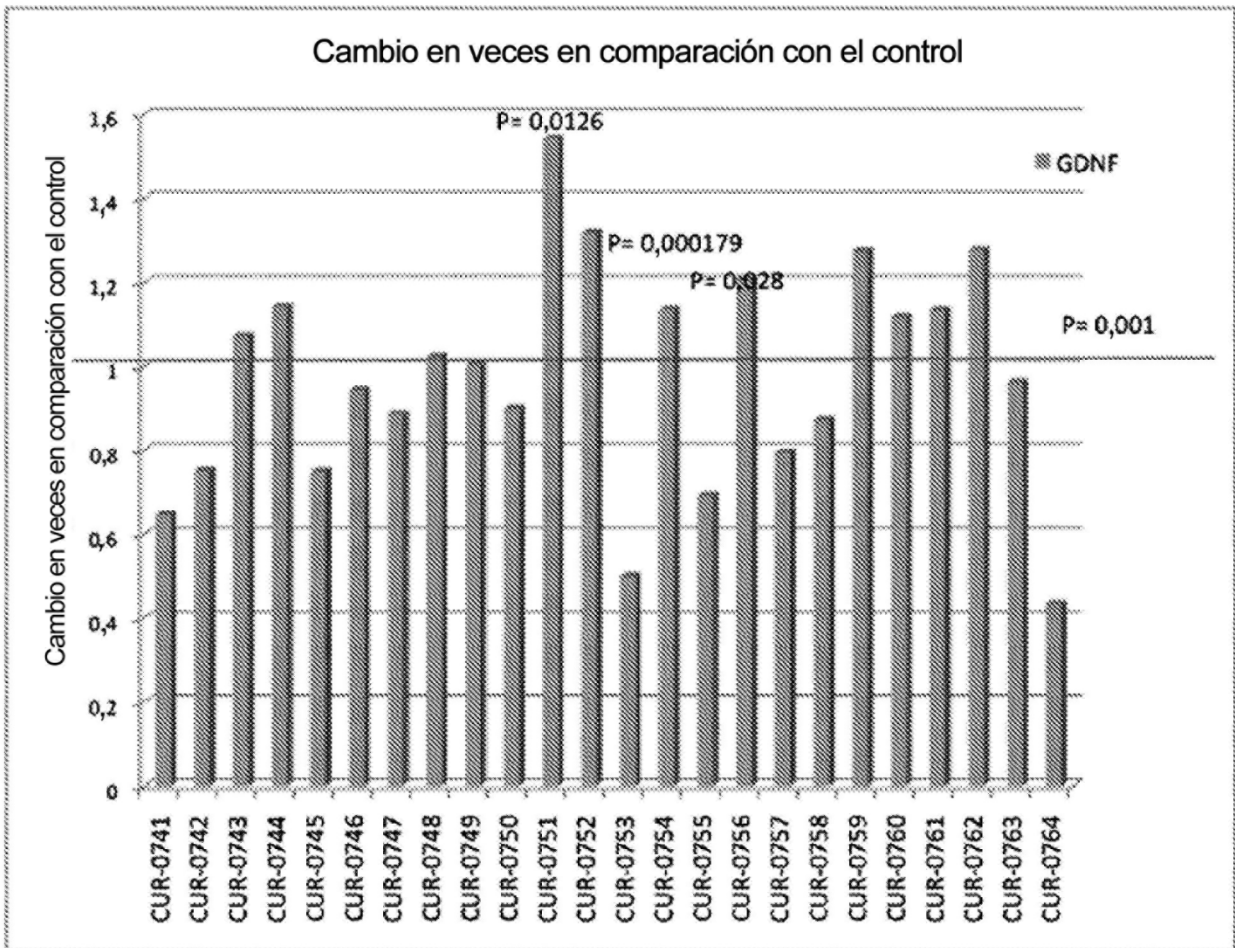


FIGURA 1 (cont.)

D

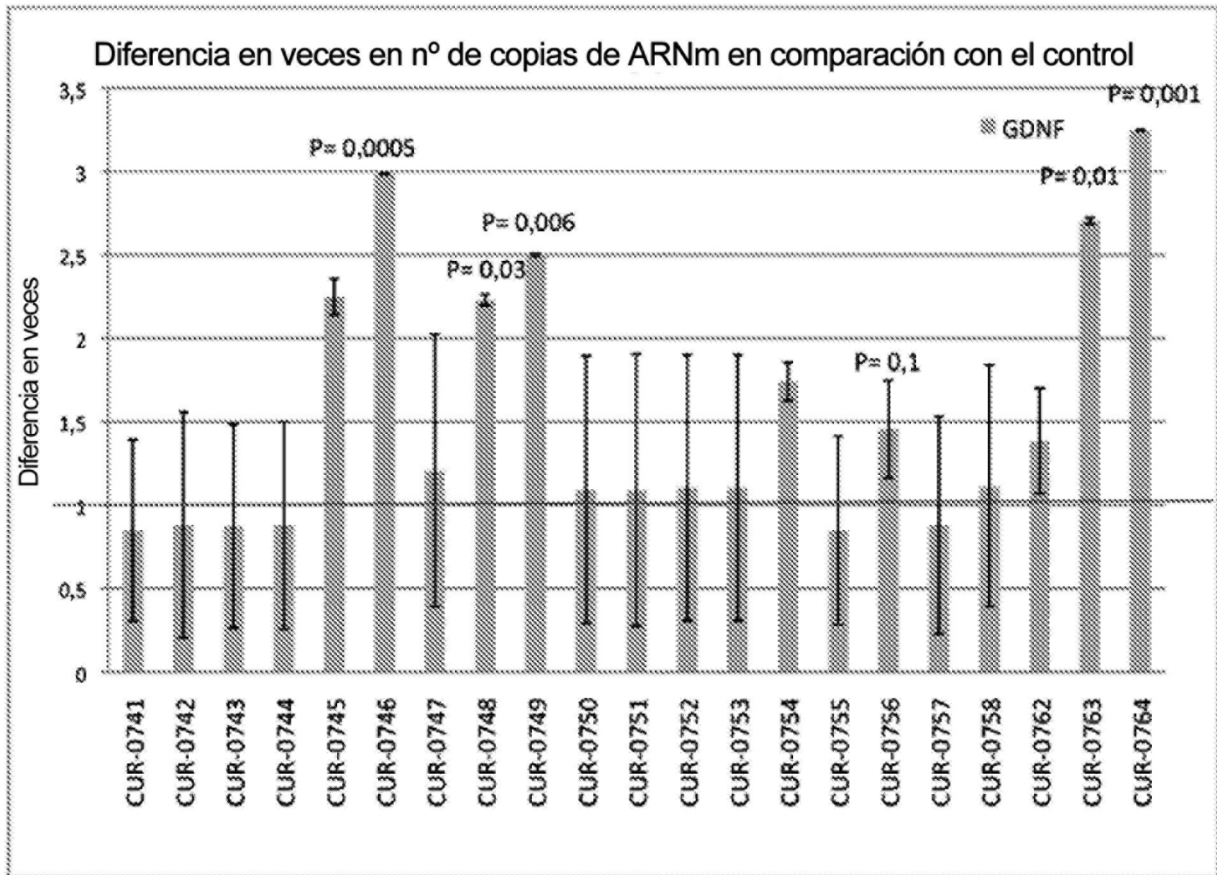


FIGURA 1 (cont.)

E

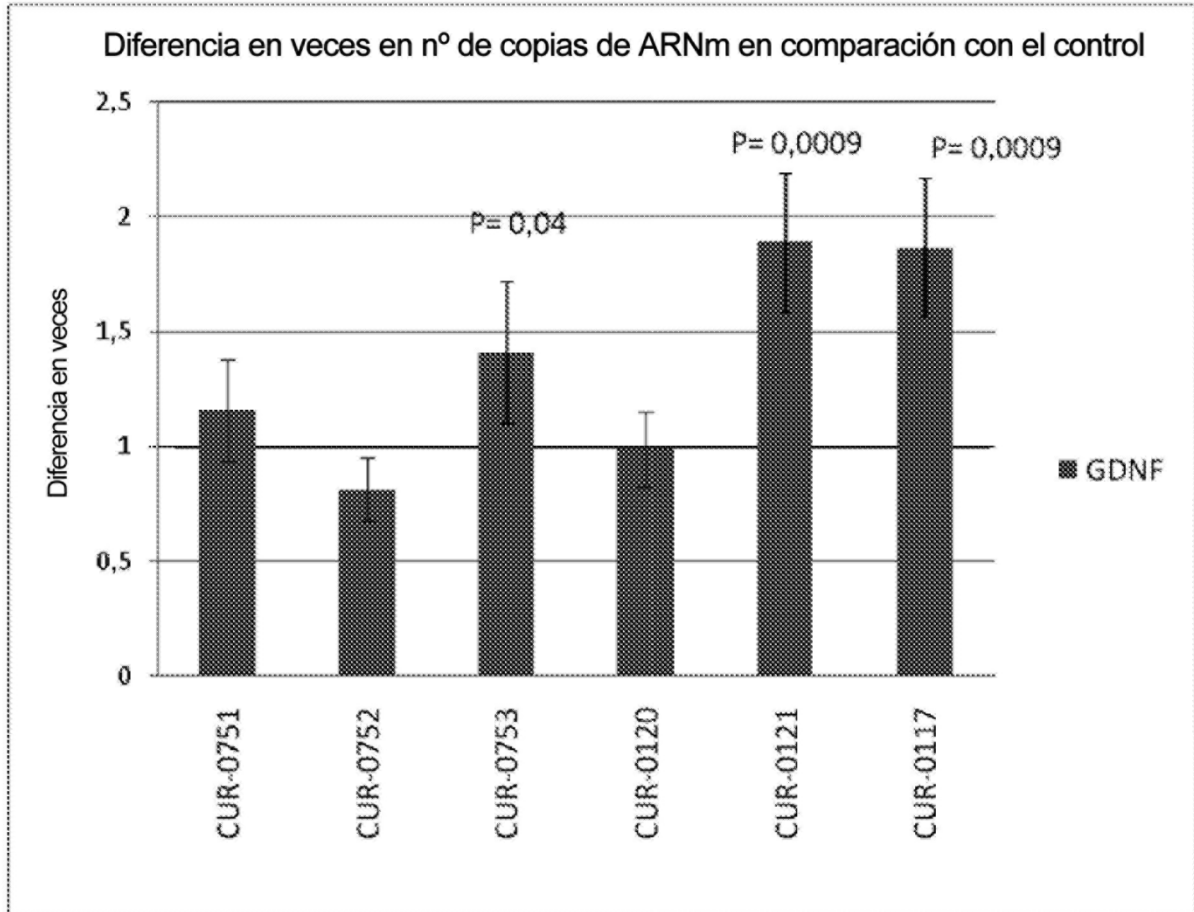


FIGURA 2

(SEQ ID NO: 1)

>gi|40549412|ref|NM\_199234.1| Factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) de Homo sapiens, variante 3 de transcrito, ARNm

ATGAAGTTATGGGATGTCGTGGCTGTCTGCCTGGTGTCTCCACACCGCGTCCGCCTTCCCGCTGCCAACCCAGAG  
AATTCAGAGGAAAAGGTCGGAGAGGCCAGAGGGGCAAAAACCGGGGTGTGTCTTAACTGCAATACATTTAAATGT  
CACTGACTTGGGTCTGGGCTATGAAACCAAGGAGGAAGTATTTTAGGTACTGCAGCGCTCTTGCGATGCAGCTG  
AGACAACGTACGACAAAATATTGAAAACTTATCCAGAAATAGAAGGCTGGTGTGAGTGACAAAAGTAGGGCAGGCATGT  
TGCAGACCCATCGCCTTTGATGATGACCTGTCTGTTTTAGATGATAACCTGGTTTACCATATTCTAAGAAAGCATTC  
CGCTAAAAGGTGTGGATGTATCTGA

(SEQ ID NO: 45)

>hg18\_refGene\_NM\_199234 rango=chr5:37851510-37870655 5'almohadilla=0 3'  
almohadilla=0 cadena=-Enmascaramiento de repeticiones=ninguno

ATGAAGTTATGGGATGTCGTGGCTGTCTGCCTGGTGTCTCCACACCGCGTCCGCCTTCCCGTgccccgcggtaa  
gaggcctccccgaggcggcccgccgaagaccgctccctcgggccggccggcgcgcccttcgctgctgagcagtgactgta  
agaaccgttccctccccgccccggggggccgccccggcgagccccctcgacccccaccgcagccagccccgcacgtacc  
ccaagccagcctgatggctgtgtggcctaccgaccgctgggcaaggggtgccccgctgaagccccaggggtgcct  
ggctgcccactgctgcccgcagcctggcctgaaagtgcacgcgctgggttgcccagcacagaggggatggaattt  
ttatgctgctcctttagcattctgatgaacaaatctcctccccaccagcaccaccacctcagaaacacacacacagc  
tgtccccctttctgtttcctcactatacacactcccagttttcttcttgcctccaaagccctttatctgtgtgtctg  
tgctggctgtgcttaattctgagaactattgcactttcactcctaaactgcccctgcaaggcgagaggccggctttt  
cacaaaagcaagccagagcagagaaaacacagaagggcctccatttcagaacaagcgtctgggtaattgtcaaatc  
tgttcagaaaagttcctctgttcagaaaagttccggctctagaaaagacttaaccataaatagtgctggctgggacta  
gggacaaaagactgtagctcactccagctgagacaatgctaactcttgagaaaaaacccaggttattcttattagaa  
aataagctctgtgatttacctctcaaaaattaacatgttttagaagcaagtcaattagggcatatcagctgtgatgtg  
atctogttttccctcactcctcagaagctgtgtgcatgaagtgagagaggctacattacatgtgatagaggctgtt  
gcagagggcataatgtcaacaaagatagcaatagaaaatttcacacaacccccaaaaataaagcaggaatgagctgtgtg  
taactaggataaccacctggctactcttccctccctaacgccacccccagaattatccctctagtaactttgcgctt  
gaaacttactatggctacataaccacagtagtagtccctgcagtagtcagctgtgctgagtcccccaaacccaatggc  
cttggctaggaacaaccagtaaatgcaatgtgcttattttatgcttaattatagcaacaaaagcaccttcttcca  
caagtcccaagaaagatagaaagtgattttttataaggcaaatagacttcaaaaggaagttagggacatgggt  
taatcctttgaaactaaagtacctgttccaagagtgctgtcaattaactgtataaacctactttaaaggcttttat  
ttccatcacaatttaagtataataaacgtttctccaacagaaactttaaaatgccccttagtgccgggtcttccaa  
aactggctattcattcactcaaacggtctagacaagagggacaggaacacagtgccagataatagttctcctaaccca  
gacgttgccaagagaaaaatgactgtgctgattacaaagctgattaattcatggagggttaattgctgtattagtg  
ccctgttcaactagattcatttaattctggctcaggctcctggctctgctttcaactaactctgtgactttcaggca  
agttacttttagagctcaatgaactgtaccataaagagaagcctttctactccacaatcccagtggtatgagatttg  
cccttggcctttatgtttgtcctaaagtcctttgggaagaatctcctaagaagagattggagtcacctggggaact  
ttaagactactgatgctaggctcaccaccagagattctgatttagttgggttgggggtggtggccagggcatctgag  
tttttaggtgttcccagatgagctaatgtgcaaccagacttgaatcaccatggcttgataaacaccaagaaaatc  
tttggctcatataaggtacaagtagtcacaaagcaagcgagttaacacagattgcagggacaagggcatgtttgtagg  
gaagagggattgcttcccttttccaaaattgatgctgtgtcatcagtgacaagattctcactactctatttacatt  
tgaacagcaaaaacacccccattgtgtttgtctgtgggaagaccaatagatcccagaggaaacctgaaaaagaaa  
cgttcccaagagaaactgagctgcatttcaagccaaattgacttctttccagatatgtttgattcggtagcaagct

gtcaagtgcaggaagggcaaaataatgacagtatgcagactttgaacactcaaccagtgtcaacacgcctctgtcac  
 agtgctgacatttataatcctgcactgtacatgggtgcaactgggtaaggcttatgtagaaaaacattaagtcaccaca  
 tttcatttataaaatagaaagtatcataaattctgattcctctagttccatccaaatacttgaacttaattgatgtgag  
 caaaagagctttcatgccacattaacgtcattctgcgcttttcacaggaggaccagaatatacacagtttgcaact  
 cacctttaagattgcatgtgttccgctggttccaatgtaataaaacatccagaattctattactagtagtgcctca  
 gtgtgagataaccaaatggaattcataatggccaacgggctgacctagaggctggctgtaaagtaaatggctcagg  
 actgcctcctgtagcaacttctagcctgtctaaactcaaggacttggatttgactttggggtaaccaagactttt  
 ctcttttgctatctttatgtttatgttcttttgccagtttttgccagtttttgctttttgcccagtttccaa  
 agggcaattagagcaggcatgaggaatctgcaagttgaaactgcaaatgtcatagcattttogagctgaaaggaaa  
 cccctctagctctgaaacctaaagaggcaagcaacttgtctataatgcaccacagttccatgatcacaggaggcag  
 gtctgaagctgggaccagagttcccccaactactgaaatgtaactttatatgggaagggaggatactttatatgg  
 gaggaaggtcttgaactaatgatttagaccatgggtgcacaaggttgtctgaatttatggaaggttagttcatcatag  
 tcatattccttatctcaactctaaatgtatttaataagtaaaagcataaaatgcatgtggttttaaaaatttgcac  
 taaatgcacataacattcaccaaatagttacatgtatgcctgtctgtgccaggcactgtcctaagtgctagggata  
 ccttgatacacctaataaacaagaagctgcctcatggaacatagcttctagtaaatgcacatgtgtggtggtat  
 gaaaaaatcaactgaaagaacctcagtcagtaaggtgggctgaattttttgtgcaactggaaccaactaaaatg  
 acattgagcatcgttaagttgtaattacaagtaattcctaatttagtataataataatgggattatattctaccagtt  
 tggtagcagttcacaaaatttccctatggaaacaatttttttaaatgaagctatcaagtttccaggctagcccacaaa  
 acctagttaaccacgatataactgaaactgtcattcacataatataactaagtgagagctctctgcctggggggcacat  
 cccataatctgcaaaaggaggggcacagaacaagaatcaggagggttccagcaagcaagagctcaaggtaacacatt  
 cagaccagactaggatttggaccccagccttgccacttaactgagatgttgagctgttacttaacatcccttaagct  
 ttgtttttcttccctgtaaaataggcataagagtaaatctgtctcatgggttgatgtgaggggttaacttagatatt  
 gctttgtaaagcctctgctccataaaataggatcatagttgtcatttgccaccctcctgcttgcaatggcccctccc  
 tgggcaccagtgtaattcacttcttccgctacgacatctgccaggatgctgctctaaatagtgggatttcagcagca  
 caacagagtacagcgagtgagagaaaatgcaggccttgtgggcaggctattttgggcccactgttgggtggctagca  
 cgtaggcagctccaggcttgcctgggatctgcccctgggtcagctgcccctggcttcccagggttcacagctccg  
 acccttccccagtttccaagcccataatattccagtggaattttttctcaccacaaactcctatggttatgttaggga  
 gacctcttccgctatgggaaggagggaaccaaggcagggttaggatctttctatggaagtgaacaagagggttgtgagt  
 tggaggctacctgtatggagatggagcgtatctttgtaaatgatccatcccagctggacatttaatttaagaagttt  
 cataaccctagcaaaaaatacttagtaaaactgtgagaccacctctatagagctaaggaagcttctagtgaacaagc  
 tgggtaaatgttaagctttcaaatctaattgttatgaaatacagaatttagaatgaacaaacaccatctatctgtgt  
 gtcttatcgcttagggactgtatgaatgaacaatactttaacaaagtaactacctaagctggaaaggagctctgcca  
 ctggggatgggtctcttggaaatcaagaaactgcacatcagactcttgtaggaggcactgattctttacttgagatct  
 gagaccaatattctcattctggcccagctctggaaaaccatttcaaactgttactgcttagagaaatctatttaagg  
 cttaaattgatttggccagtcaggaccttaggctgaccaggggcgtgagcaatgtactcaacagggttcttctcaac  
 agatataaaaaattaaagctccctgataatttcccctcctaataatctctttgatctttgtttatttaacactcatgga  
 ccatagcaccttcatttgattaaaatacttgttttttagttaattacttaagcttaatacaggaaacaaatattaaat  
 atctttcatgactgggtgccaatgcccctcaaaaaggctaaatttgtaataaaagttgcttgtgatctagctgtaa  
 actatttgctagggtgagtgggcggtggctggatggatgaaatagaatgtcagtcagatagatagctctatttggtagg  
 gtttaggtgagctgtacgcatgtgtggtaaaaatccttagcagtgagctcactgggatttgggtatcatagcaggga  
 cgacttcagggaagaggaggatttgacctggacttgaaagatgggtgtttggaagggaagggaaaaggaaagggg  
 gacatactaggagtagcatgggaaaatttgtgaccatgtagtggggaagggacagtggaacaaagaggaggacaga  
 ccagctccaagttctagaaagagggtctaagaagtggtgggaaattgaagatgtcttgacagggtgataccagattg  
 tgtgatactataaaaattcaggaaaggtgtttgctctgtttttgatagcagtgggggcaccatgggagcaggcaggtga  
 ctacaaggcgggatcttgccttcaaagctgtcttgcaggagaagttacctaaatacccagactgcttttgagtggggc  
 ctatgcccgtaaagcatgtcttttattttgagggtgtgtgcttttatttttaaaaatcttctagacataggcacaattg  
 aacaaactattagcccaagtaagtgaaatctgcaataaaacacttaataatgaagttaatgacctagcaccttt  
 taactatccacatgatgaacacagttcttgtcctgaaatcaagtaagctctgagctctacaatagaagaggagatatt  
 attatccccattttacagggtgaagaaaggagacctagagagttgttccgggtcaciaaacctagtaagtggtgaagcc



agaatttaaacctcagcatgttggtccgaaagccaatatttcttgactttacacagactgtgtgcatattagtga  
 attaagaaaaatagactttggcttgccttaaaaatgactcactaaccctgaaacacagatttccaggaaaattaag  
 caagcaaagagaaaagagaagcagagactatcaaatctcctttggcccttttaaaatctccatttgggctgcgga  
 ggcttaagccagtattactaatgactacttcaaagtcagatcaggatgttttaagaagagaacatgaatttctc  
 taagtattcctataatattgatgcttttgcaatgagagaaggctccctaactcttgcaacaaagcaaggctcctc  
 caagtgttgtaggcagacagcatcgggaggccttggggagactctgggtctcagatctctcccattctgccc  
 gcgaggggatggcatccacataggaacctagtgtgactgcacgagtgccagagcgatggcctcagtgggaataggag  
 tatgctgaagcagacttgggtcaccactgggaaacaactggtagctcagtagaggcaaaaccacttttgcataac  
 ttaataacaaaattgaagtagagaagcatgggttttaaaacaatatggcctccaattttttgctgcaaacctgc  
 aaataagaatgttgaaaaacgattacctactttgaagctttctaaaattttcatcataggtttaaatagttacacc  
 agatgtcatttctagccctttcaggaactgtatataatgctttaaataattcttttgcaaaaactttgcacctgcctat  
 gtagtattattagttcatggaaaatgatcaaaactaatcagcccaaatcaattggctttttggctcagaaaaggctga  
 cttcattttcaattcaaatgtacatgttaataacaccccatgacaactgtcacaattctggatcctaattgtaagg  
 tagagagatggataggtgacagtcagataagcaaaagaaagcactgaggcttcccaaggggctggccaggaggaaa  
 tatggagcaactggctcaggatttctgggttattcacaaagttaattctcccttgcaagtgttggtagcacagtga  
 acaccatacatccttcaactaagattaacctcttttttagcattttgctcgttttttctgaaccatttgagaatt  
 tggtagcaaacatcagaatgttaaataattcagtagtgccttctaagaacaaggacaatgtcttatatagccacaat  
 tcagttatcagtcctcaggaaatttaacatggatataaactgttatccaatagatagtcgtgttcatatgtcccca  
 gttgtagcaattatgtcctttatgttttgggttttttttttttaaaaccaggaccataaaatgcatltgactgtctg  
 gtatctttatacttcttaactaaaatgattcccaagctttttttcccgcatgacattgacatttggtaaaactc  
 tgggctcttttgcctagctgttcccagactaccttcagtttagatctgtctgattatctccatgatttagatgta  
 gggaaacatccttggaaatcatatcatggcactatgtcctcacatcaggaaagcggccaatcagtttgttccaa  
 ggagccattcatgcatgaatgccttggatggcgctgaagggtttatccctgggacaggcccccacaatagaatgg  
 ctagataggtgagaagcacaccgtctctcagtaaggaataagaggggatggaaaaggggacatgggcaaggagaacc  
 acagcaggagatccgcaggcagaccagacattttaggacatggcacaatgggaaatggagaaatggacatggatt  
 cctttcaaccacccataggcactgcagaaaagtctcctgtgccccagagggccaggctcagctgaagacac  
 tgctctaagccatagtgagacacaaaagataaacctcatgggctctggggctgctgacatttgcatgtttagtgtca  
 ggcatlttgaggaacacgggaagagctcacacagcctcccaagacgggctgtggctctgcccacaaccaccatgc  
 caggggctccaggccctgcacagaggtctctcctctgtagaacatgctagactaagtagggaccagtgctcggatcc  
 ccttttgggcaatcttgctttgtctagagactgtagagttggctttactgctgctctctgtgcaaatattgctga  
 aggaggatcccagatgtgataaccatattggcctacataggcaccatttggtaaaacttctgtggaccaggaac  
 tgagctgaaatctttcttatgttatcatattaattttgacctgaaggtaagggtgtgactagccccatttgaaaga  
 tggggaaaatggaggttacagggttagcagcttagccagggtctggacacagggcagcctgagtcagcactcacac  
 ttgtcactactgcacaagatcacttccctgcccagccatgcaactcagatgtcactctctgactgcatcaaaaagtc  
 atcaaggaaaaaaaatcagggaatgggttggcaggtaaaagtgttttagaatgataaccgtatctcattacctgaa  
 gagtctttgagattcccgtaaatcactcactggggtagaaaattccctcctcatatctgaccacaagaatctacca  
 acaaaattcaaatgataaagaagatttctttcatcttctcttagtccctcctctgttcaaatcactgagaccctt  
 acatgcctttacctactgctcagtgggctcccctgggaagagctgagggatgctgagtgcaaatcctgcagggtcc  
 tgcagcctctcaggctgggggagggctctcgctgaaagaagaaggagagactccaccacccccacaaccacctgccc  
 tctgataacaccacagggatgattgcccctagtggctttttgtgacttaatttactgggtaacttctcaccctt  
 cctgttaagtttttataagggcagtagcagacctcctgggtgtgtgctcattagcttgggtgtttattaccgact  
 ctggagtgttttagctcacaccagggtgttcatggattagctaacaaaatgaacaccctgttgggtgtttctcactg  
 taaaagctgaagaatggacacttccaccagggggactgtgctgtattactgtaaaattattagcataactgtaat  
 aaaagcatggaccacatacatagaatcagagcaagggtgatcagaacctgagtaacaaaggaatttactgtctgtct  
 ctccctgagtggggttttctggctgtttgtattgatggagtaattttcagtcatttattacaaatttgccttagttg  
 agttgtaggataacagtttaggatagtagaactagtagtgcaatgtcattcagagtggggtggagatggtaaaata  
 agatggcattttgatgggcaaaagtggcttttctaagtagacccatagcttctttttctatattctaaagtgatttgc  
 attctgggtggctttttctctgcttgagagaatccagaaatgcttttttaaaacaacaaaacagtggtgttttt  
 acaacgcaaaacttttcaataaaatcgatgtcagcttactgtcaacaaaccactggctcctgaagagaatgact

ggtagctctggaatgggtcacaatgacttagtaaatgcctcagctggtaattgttttaggaaaatagatgctgtg  
gacacttctgaaagttaaccaacagcagcctatgatcaggacggctaccaaacactagatgaattctgtgtccaa  
aataggaagcagcgaaggtcattacataatgtaagatgcatcagcattcagtgcctactgatctatggcctttt  
taaaaagtagttcaataagtgtcaaagtcacactttgaaataggagcagataacaaaactttacagaagttttc  
agagaactagaacattctcataaactcacatttagagtccattctcatggactgcacatttttagaggttcctgaagg  
tcaataagaacaagagttgacagcccagagattggcttcaaggacaagctgcttggctctcctgatccattttgta  
ccacttgcaagtggaattcttagccttggagtacataagctgggtatgacctaagcataactgaagcagcaaaaacag  
aaatgaataaaaattgagattcgaagaaaatggtaaatgagtggttgacttttgggtgtaggagactgaaggaattg  
tagcgtgaggctgtagtggtcctctcaggggtcatggggcccactctctatttttacagatggaaactgaagttta  
gaatgccttacagtagaatctggatgctttcatatgcagatacagggcccctttctacacactctttacctctctta  
atagggcacaggaagatgacttgatgatttaagagaagattgatgacggctcatttcaaatgtagccgagacattcag  
ccaagaggtaaactgaagaggtcaagcactgcagagttctaaaatacctcctgtgggggtttatggggcccctgatg  
gtactggctgagctgaatgctgctggggcgtcagccagaggtggtctactccctgcagaggtgactgaaaaaccog  
tgtctggccacactttccagccaagacttagactctccacactttagcattttggagctggaaaaggcccagagag  
cactgagttgacctcagaagggtaagtgactacttccaaggtcacgcagctgatcagggtgaccaagactgga  
atccggggcctctctgtctccaactctgcagcaagagcctgggtcatttgggtgccagcatgagttggaggagcttccg  
gagatggggcctctctgtctgctgctgctgctggctgctggcttttccgggtttaactgggaaatcgccagag  
ctgtcttagcgtgatatgcaagaaccaggacacaggagaaaatgcccctgagtagcatggcttttcccttttgggaga  
caatttactgtatctgtggccatggcagcctaactttaggatctacttagcgtacctgagttcgtactgaatttt  
tcaacagaaagtatgtttctcacctcctgtgctgactttggtaaatgtgtacaggtgaaaccagcatgtctgtctc  
cgtctcagagtaaatccccatctgctgcaagacttgaagagctcagtggttagtagagttttactttaaaacaaaa  
gacaacaagttgagctttgaaactgaaccaccaggtccacatttattagtcctatggacttcaccaaataattgtc  
ttctctgagcctcagcttctctgagctgtaaaatggagatagatattcaatttagccttgaaggagggtgtcaggtt  
aaagttaatgttgtgtgaaagtaggcagatttccacctttacactggtaaatgttttttaagtgttcaaggaagctc  
ttatctaagttatagcctgatgaaattttgtaatgcaagaagttttacaggttaaaactcagccatgtagttctgta  
atgatatccaatattagtgaaagaaaatcatgtttgtaacatatagaaagataaaaaacttattccaaaacaat  
gacattcattgggactcttcttgagaagttgtatcaattttaaagttgatcttttcttttcatataagtagtatatg  
tgtgtctctgtgtgtagacgcataatgtagcagcagctgtgtatgtgtatgtgtttatagatcgagagagatctctat  
atttttcagatacttggcctgtagagcaatttgcattttacctgcaataataggtaggcaagaataaccagataaat  
gtctcccaccattaggggggttttccattttcctcctgtctgaagacagcctttcataggaaccgctacatgtcagga  
tggatggcaccgcacctcggcagccgaggtgcagcatcctgtggcctcatcctcagcatcctgccccatcccaaaa  
ctgagccccaccatctggccactgggtcctgatgtatctctcacttgtgtggccttggctcaggcagcagctcacc  
ctatgggtccattagcctcacccttccaggcacagaagctggacactatagtgaaagtagcaaggctgttctccc  
acagcaagaaaccctgagccttctctctggggcccctgcatcagccaagcccggctcatgcagatctcaagcctgg  
cctggaagacatctcctgaacaggaccactgtgtgtagttaggtcaggccccctctctcctgggtccctctgagcct  
caaagaccttccctccaccttctggataaggagttgtgtcctcaccactttgtccctcatagacaactttgtgccat  
ctccctctcaggccacaggttggggacttaggatgacttagaatgaaagtcagcttagactcctgctggccagg  
ctgaggaggggacaaccagctacaagtagaaaaatgaccctttgattaaaaatagtttaacctgtactgttttaaga  
caaatctggcattttacgaaaagactttgtccactcttggcagcttaaccaatgtaatgttttggattatgtaattt  
tgagttcagctattacagggaggacttggagccctcaccattgttccctattaaaactcagttgactttacaaaatag  
tcaatctcagtcctttgttctctgggatgacattactatttttttccccataatcgagggcagcaagcttttgc  
ggggaactgtttgttcccagagttgtgccccggtacaaggttccatttctttaaagtaaacactatttatacaaaagac  
acatcaaagttaaaatatttttaataagaataacaccaaacaactttgggtgcactctgaaggatagcttaaagcatt  
tgagcactttggattttccaaaaactttatatttttagatggacatgttttccaagataatcctccaagcaggtctgg  
gaaatgagcaagatagacctattatttttttaatgatgctcctcttttgggtttgcaagatatttcaactataaa  
gttaataaatgagggctcatttgcataatctgacattctgccaagccttttaaggatgaagacagagatgcccagta  
agtcttaatttagggaaacgaatccaaaccagaccctcttcttttccctcagctcagtgaaattcctggaaaatgga  
ggcagctgtgggcatctcagctcatcaccaggagtttctgtctgggctgggtgagaggcctctgcagaagaattaa  
ggacaggctcagtgaggctgccagcatcctctgcagaggagtagggcgcctaatagccccagggtgctctgcacatcga

taaattgaggctggctctaagaatgaactcatttagtgcggaacatgcaggcctatattgcccctgtgggttgaaaaata  
caatgttgccctttcctggcttccagaatccatgccatgtaaaattttcagcaaaaatttgtgtgttctctatt  
ttcatgactatgaaggaaaaaaaagccttcagcttaataagagttgcctatggcctgaacttgggggtttaaataat  
atttccacattagcaacaaaatgtgaaggagatttcccatcaaaggaaggaatttcaaaagccacatgccagggaag  
actttaaaaaataataataatagactttatTTTTtagagcagtttttaggttcacagcaaaaatgaaaggaaggc  
agagagttcccatatactccctaccctacacatgcatagcctcctccattgtcaacatccccaccagaatgtctac  
atattatatagttgatgaacctacattgacacatcattatcactcaaagtccacagttgacattgggggtcactcct  
ggtgctatacatcccattgggtttggacaaaatgtctatgacgtgtattcactatttacctgaaattcaaatacaacc  
aggctttctgtattttacctggcaacaaaagcctgtgacaaaagccatgtgggtcaaaaatgtcttaaaaaggggagaaa  
aatgtttttcaagttcttccaagtatcaaggcttaaaaaagaacactataagtgctgatacaaatccttatgatgt  
aactctagtaataaaaaagttatataatcatalagattaatgagttcttaaaaccagcatgatttaaacttctgtgactc  
taatgttttctattagcttatataaaaattttagtaatgttttacctcatttctgattaatcttcagttgatgt  
taattgaacttaactttctatatgccaggttccctaaattaatgacttatttagaattcttgaatagagcctatgat  
gtgagtccttttgtaaacagagttctctgtttttaatTTgaagactcctctgtatTTgattaatcactcctaata  
gatctgtttcataagttccgatttatatacaagcatgttttttttgaaactgggcacatctgtatTTtatttctct  
ttaatagcttattattgaaagaaatcaccaatagctaaagcagctcattttttttaagcaattgttctgtcaac  
caaagtgatttaagtgtgtgtttgtttgtttttgaaagaaaacttccctaaagaaagttcagtgagaaagcagtac  
aaaggaagggacaaaataagagcactcctggccaggcacagtggtcactcctgtaatcccagcattttgggaggt  
gagggcgacggatcacctgagatcaggagttcaagaccagcctggccaacatgggtgaaatcccactctactaaaaa  
tcaaaaaattagccgggtgtgatggcgggacactgtaattgcagctacttgggaggctgagggcaggagaatcacttg  
aacccgggaattggaggttgagtgagccgagaccatgccattgactccagcctggggcagaagagtgaaactccg  
tctcaaaaacaaaaaaagaaaaaaagaaaagagcacttccctgggcccccttaagaaagcattactcagggac  
cagagagctttaggagaccaggggaggtgggactgagagttaatgctgctgcaaaagctgcagaaagctgaggagg  
aaaggtgggttgagagaccagctccttcagctctctggtgggcaatgactgtgccactcagggcagagtggttttctga  
gtaattgtgggtgtttactttggagcatttctttcataacgatgcagttttcagctaaagcccagagtcctctg  
aaaaatagaactctcttccgcctagtaaaatgacccgactcctcagccagcagttaccgtaggcctccacagc  
ctactcaagcacttgagatccatcagtgaaacagcaggacagagttcctgcctcttgagttgacattcttttaga  
gaagacagactataaataacaaccctaagaaatcagttagatgggtgtgttagaatgtagcaagaattatgggtggagg  
gggaggcgcagggcaggggtatctggattaggggctggggagggaatctgttttaaatagggaggtcaggtgggact  
tgtggatagtgacatttgagcaaaagacttgaaggagatgtgggactagccacaggggtgggagacatttaactctgta  
ttctttgctacctatattgcaggtaaaaatgcaaaatgtctctatagccaaggggtccagggcagagaggggacagcca  
gcacaaagggcctgagttcttgactgttttaagctatagttctcaagggatgggtgtgccccctaggggacatttgcaa  
tatccagagataccttgatctgtcatgactaggatgggggatgctatgggcttgtattagctgttttcttactgc  
tatgaagaaatcctgagactgggttaattataaaggaaagaggttccatggactcacagttccacatggctggaga  
ggcctcacaatcatggcagaaggcaaggaggaacaaagtcacatcttacatggcggcagggcaagagggcattagcca  
ggcaggggaactgcactttataaaacaatcaggtctcatgagacttattcattattaccagaatagcacaggaaaaa  
cctgccccctgcgattcaattacctctcactgggccccctcccacaacatgtggggattatggcagctaaaaatcaag  
atgatatttgggtggggacacagccataccatcaggcctctcctggatggaagccagggatgctgccaacatcc  
tacagtgcacaggacagcctcccacaatgaagaatgacccagccgaaaaggtcagtggtgctgacactgagccccgt  
gtttgaggaatggtaaggaagccagggtagctagacgggagggaaacaagaagagaaacaagagaggaggtcagaggt  
aataaaggtcggagggaggggagggcagggcaggtcaggtaggcctttagggccagtggtgatttgggcttttctctaa  
gagtaacagagagctattggaaggttttgagcagagggaggttagttctgcgtttaaagtatccccctgggtgctgg  
gtagaaaaatagatcgaaggtgggttaagggtagaatgaggaagcccagttcaggggcccactgtgggttatccaggaag  
aggtgacagggcctcagccagttggaacagctttgtgatttccgtgcagctgatcctgccaatgctaaattcag  
atagcaactaggcattctacggattccaatcaccagctctttcattattatatatcatatgttttatatattacaca  
cacacacacacacacacactctacacacacgtgggttaagttgcttttgctagattttgttctataggagggatac  
ctgatataatTTaacaatTaaataggttaggtttatgacaaaacaatttgacatgggttagacataatgtaacttt  
ctatgctttaatacaatcctggcaaaaaacatttactcttgctgacaactcctcttgggttatttctctaaagccac  
ttagaatcctaacaactaataatgacctgaaaaatgaggtgagggggcataagaggcctactaccaagaaacagg

ES 2 658 626 T3

tgtttggattgtttttcccccgtttagaaaatttattacattgttccattagttatTTTTctctgctgacttgattg  
gcaaagcaaacactgaaatccggcagaaaagcactaagagactgctgatttatactttcaccaaaggtctcagacat  
cttagtgtccctgcatccttccctccatgtgatctccctaagtagcctcttgtcctgcttgagccagacagtgaggag  
ccatgtgacagcttgagctgaggctggacctcacccttggggcagggctgcttctatgcacgaacagatctcat  
ttcatttattgctgtgatacataaatgccattttactctatcactggacttttttgttaaagtcagctgttcaaag  
gaagcggtaaattagctttttgttagtaaaatataaaactgtttcctgttcctttatgatttttaaggaaatTTA  
aactatagttgcattcctgagctcttcatttgttctgtcagaatggttcctgtcccactcagccacacagaatcaaa  
gcaagtttcaggaagagcactcagtattccagatgaaggtagccatagtggaaggcctcagttttttcaccctcta  
agacgggtgtctctcaaagtttagtgcgtggatctttgggtgtgtggatcttttacattagaattccttgaggcttgtt  
agaaatgcagattccttggctccctccccagaccaaagactcattgtctccaagggtagggccaagaatctgcatgg  
tagtcaatatccagggtattttcctgcatattcacatttgagaaccactactctaggttgtgtgactaggaagaaa  
aatgcccctagaagattggccagctcacagcaagctctgcatggacttgttaaaaatgggtgaatgttattcaaatga  
aaactatgcttctaaggatttgttttcttcgagaaagtatgtcaccaccacattagctcctccttccaactaaatca  
tcttctctctgtgcatttttgcctctgtttttggggattacagtggctctatagcttaatcggtgatagttttgct  
gtgggtccaatTTTTgctgactttagggggcactttgatcttgaagacggcttgaatgatcattttgtctcatgt  
gccattttctcttttcttttgaacagcaaatatgccagaggattatcctgatcagttcgatgatgtcatggatTTT  
attcaagccaccattaaaagactgaaaaggtcaccagataaacaatggcagtgcttctcctagaagagagcggaaatcg  
gcaggtgcagCTGCCAACCAGAGAATCCAGAGGAAAAGGTCCGAGAGGCCAGAGGGGCAAAAACCGGGTTGTG  
TCTTAACTGCAATACATTTAAATGTCACTGACTTGGGTCTGGGCTATGAAACCAAGGAGGAAGTATTTTAGGTAC  
TGCAGCGCTCTTGGATGCAGCTGAGACAACGTACGACAAAATATTGAAAACTTATCCAGAAATAGAAGGCTGGT  
GAGTGACAAAGTAGGGCAGGCATGTTGCAGACCCATCGCCTTTGATGATGACCTGTCTGTTTTTAGATGATAACCTGG  
TTTACCATATTCTAAGAAAGCATTCCGCTAAAAGGTGTGGATGTATCTGA

FIGURA 3

Secuencia antisentido natural (AW883557.1 (A)): SEQ ID NO: 2

TCGATAAGCCACGCCATTGGGTTTGGGGGACTCAGCGCACAGCTGACTACTGCAGGACTACTACTGTGGTTATGACC  
ATAGTAAGTTTCAAGCGCAAAGTTACTAGAGGGATAATTCTGGGGGTGGCGTTAGGGAGGGAAGAGTAGCCAGGGTG  
GTATCCTAGTTACACACAGCTCATTCTGCTTTATTTGGGGTGTGTGAAATTTCTATTGCTATCTTTTGGCCTT  
ATCGAG

Secuencia antisentido natural (BM547433 (PR)) SEQ ID NO: 3

CTCCCGCCGCCGCCGCCCAACAGGGCGAGGGCTGCCGGCAACTCTCCCGCCGGCCCCCGCACCCCCAGAAGCCG  
AGGTCCGAGCAGCCGCCGCTGCTTTGGGTGGGGGCTGACAGGGCTGCGCGCGTCGCGCTCTTGGCTGGGGCTGCGC  
GGGCCCCGGGGCGTGCAGGGCGGCTCAGCGGCAGCTGCCGCGCTGCGCCTCCTGCGGCGACTGCCTGGGAGCAC  
GAGACTGGTTTGTCTGATGCTGCTGCCGGAGCTGAGGTCTTGCCTGGAGATCCGAACGAGACACCACGTCAACCGGC  
GCGGGGAGTCCCCTGAAGACATGAGGGCGCCAGGAGCGCAGGCTGGTCTTCTAGAGCCCCGGGCTGGGGGTCCGGGGT  
CCGGCGTGGGGGAGGGGCGAGCGCGGGGCCCGACACGTATGGGAAGGCAAGGCGACACTCTTTTCCGCTCGATGCAT  
ATCCATCGTACACTCCCACATCTCTCCCCTAAGCCTCCCCCTGCTCCGACCTTCCACCCCTTGTCTGGCACCCCC  
ACCCTTCTATCCTAACCTTGCCAGCTCCCTCCCCTCATCCAGGTAGCCGGCTGTCGTGTTTCGCCACCCTCCC  
CTCCCTTCTGCGGTAATCGGTCCGGACCCCCGGGGGGCACGGGGCGCCCCAAAAAACAACAACCAGAAAAA  
AAGGGGATNTTTCGNTCCCCGTTCCGCTCCTTGTGCTTACTGTCCACTACAATGCCTTGGCCTTCTCCAATCC  
AATCTCTCCATCCATCCCCGCAACCAGTCTTTCTCCCCGCTTCATTTCTGTTTTATCGCATATGTCGTCCTCC  
TCCTACTATCGTCTACCCCCCATTCACCTCATGGTCTCCCCGCCCCGATGACTTAATTGACAATTTGCCCGC  
CACATACCTTTTACCCTCNACACACACCTTACGCGCAGTGACCCACGTTTACTACACTACCCACTTATTCCCCACC  
GGTTTGGACGTTCCCATTCGTTGGGCTTCCTTGCCTTACCACATATCCACCCACGCATATGCTATATCCCAGTA  
ACCTGCCAATTACTCCCGCCTGGTAAATCATAACCCCCCTTATCCCCGTCACACTATCATATCCCACTTCCANACC  
CACCTATAAACCACATCAAGAATATCTCACATATCTAGAAATCTTTCCAATATTTGCCCTGCCTCAAATCGATGT  
ACATCCTTTGACAT

Secuencia antisentido natural (BX505687) SEQ ID NO: 4

ATTTGGGCTTTTCTCTAAGAGTAACAGAGAGCTATTGGAAGGTTTGGAGCAGAGGAGGTTATGTTCTGCGTTTAAA  
GTATCCCTCTGGGTGCTGGGTAGAAAATAGATCGAAGGTGGGTAAAGGTAGAAATGAGGAAGCCAGTTCAGGGGCCA  
CTGTGGTTATCCAGGCAAGAGGTGACAGGGCTTCAGCCAGTGTGAAACAGCTTTGTGATTTCCGTCAGCTGATCC  
TGCCAATGCTAAATTCAGATAGCAACTAGGCATCTACGGATTCCAATCACCAGTCTTTTCATTATATATATCAT  
ATGTTTTATATATTACACACACACACACACACTCTACACACACGTTGGTnGTTGCTTTTGTGCTAGATTT  
TGTTCTATAGGAGGATACTGATATATTTAACAATTAATAGGTTAGGTTTATGACAAAACAATTTGACATGGGT  
TAGACATAATGTAATCTTTCTATGCTTTAATACAATCTTGGCAAAAAACATTTACTCTTGTGACAACTCTTCTTTG  
GTTTATTTCTCTAAGCCACTTAGAATCCTAAACATACTAAATGACCTGAAAAATGAGGTGAGGGGGGCATAAGAGGC  
CTACTACCCAgnAAACAGGTGTTTGGATTGnTTTTnCCCCCGTTnAGAAATTTATTACATTGTTCCA

FIGURA 4

ID de secuencia	Secuencia
SEQ ID NO:5	C*A*C*C*C*T*G*G*C*T*A*C*T*C*T*T*C*C*C*T
SEQ ID NO:6	G*G*C*T*A*C*T*C*T*T*C*C*C*T*C*C*C*T*A
SEQ ID NO:7	T*G*T*G*T*G*T*G*T*G*T*G*T*G*T*G*T*G*T*G*T
SEQ ID NO:8	T*T*C*T*A*C*C*C*T*T*A*C*C*C*A*C*C*T*T*C
SEQ ID NO:9	G*T*C*G*C*C*T*T*G*C*C*T*T*C*C*C*A*T*A*C
SEQ ID NO:10	G*G*T*G*G*G*T*N*T*G*G*A*A*G*T*G*G*G*A*T
SEQ ID NO:11	C*G*G*C*A*G*C*C*C*T*C*G*C*
SEQ ID NO:12	T*G*G*G*G*G*T*G*C*G*G*G*G*G*
SEQ ID NO:13	G*G*A*C*C*T*C*G*G*C*T*T*C*T*
SEQ ID NO:14	G*C*G*G*C*G*G*C*T*G*C*T*C*G*
SEQ ID NO:15	C*C*A*C*C*C*A*A*A*G*C*A*G*C*
SEQ ID NO:16	C*C*C*C*C*A*C*C*C*A*A*A*G*
SEQ ID NO:17	G*C*G*C*A*G*C*C*C*T*G*T*C*A*
SEQ ID NO:18	C*G*C*G*C*G*C*A*G*C*C*C*T*G*
SEQ ID NO:19	C*A*G*C*C*A*A*G*A*G*C*G*C*G*
SEQ ID NO:20	G*G*C*C*C*G*C*G*C*A*G*C*C*C*
SEQ ID NO:21	G*C*C*C*G*C*A*G*C*G*C*C*C*G*
SEQ ID NO:22	G*A*G*G*C*G*C*A*G*A*G*C*G*C*
SEQ ID NO:23	C*A*G*T*G*C*G*C*C*C*A*G*A*G*
SEQ ID NO:24	G*T*G*C*T*C*C*C*A*G*G*C*A*G*
SEQ ID NO:25	C*T*G*C*C*T*G*G*G*A*G*C*A*C*
SEQ ID NO:26	A*A*G*A*C*C*T*C*A*G*C*T*C*C*
SEQ ID NO:27	T*T*C*G*G*A*T*C*T*C*C*A*G*G*C*
SEQ ID NO:28	T*G*A*C*G*T*G*G*T*G*T*C*T*C*
SEQ ID NO:29	C*T*C*C*C*G*C*G*C*C*G*G*T*
SEQ ID NO:30	A*T*G*T*C*T*T*C*A*C*G*G*G*A*
SEQ ID NO:31	C*T*C*C*T*G*G*C*G*C*C*C*T*C*
SEQ ID NO:32	A*A*G*A*C*C*A*G*C*C*T*G*C*G*
SEQ ID NO:33	G*C*T*C*T*A*G*A*A*G*A*C*C*A*
SEQ ID NO:34	C*C*T*C*C*C*C*A*C*G*C*

FIGURA 5

ID de secuencia	Secuencia
SEQ ID NO:35	GCAGGACTACTACTGTGGTTATGAC
SEQ ID NO:36	CCACCCCAGAAATTATCCCTCTA
SEQ ID NO:37	TCAAGCGCAAAGTTAC
SEQ ID NO:38	GCCGGCTGTCGTGTTTC
SEQ ID NO:39	AGCAAGGAGGCGGAACG
SEQ ID NO:40	CTTCCTGCCGGTAATC
SEQ ID NO:41	CATGTTGCAGACCCATCGCCTTTGA

FIGURA 6

Secuencia antisentido natural (AW883557.1 (A)) splicing alternativo a SEQ ID NO 42

GAACAGGTTTTTTTGAAANANAGGATTAACCTTNTTCCNTAACTTCCTTTAGAAAGCTTAATTTGCCTTATAAAAAA  
 ATCCACTTTCTATCTTTCTTGGGACTTGTGGAAGAGGGTGCTTTTGTGCTATAATTAAGCATAAAAATAAGCACATT  
 GCATTTACTGGGTGTTTTCTTCGATAAGCCAAGGcCAttGGGTTTGGGGGACTCAGCGCACAGCTGACTACTGCAG  
 GACTACTACTGTGGTTATGACCATAGTAAGTTTCAAGCGCAAAGTTACTAGAGGGATAATTCTGGGGGTGGCGTTAG  
 GGAGGGAAGAGTAGCCAGGGTGGTATCCTAGTTACACACAGCTCATTCTGCTTTATTTTGGGGTTGTGTGAAATTT  
 TCTATTGCTATCTTT

Secuencia antisentido natural (AW883557.1 (A)) splicing alternativo b SEQ ID NO 43

TTTTTTTGGCAACGTCTGGGTTAGAGAACTATTATCTGCCACTGTGTTCCCTGTCCCTCTGTCTAGACCGTTTGAGT  
 GAATGAATAGCCAGTTTTGGAAGACCCGGCCTAAGGGGCATTTTAAAGTTTCTGTTGGAGAAACGTTTATATACAT  
 TAAATTTGTGATGGAAATAAAAGCCTTTAAAGTAGGTTTATACAGTTAATTGACAGACACTCTTGGAACAGGTTACTT  
 TAGTTTCAAAGGATTAACCATGTCCCTAACTTCCTTTTGAAGTCTTAATTTGCCTTATAAAAAAATCCACTTTCTA  
 TCTTTCTTGGGACTTGTGGAAGAAGGTGCTTTTGTGCTATAATTAAGCATAAAAATAAGCACATTGCATTTACTGGG  
 TTGTTTCTTCGATAAGCCAAGGCCATTGGGTTTGGGGGACTCAGCGCACAGCTGACTACTGCAGGACTACTACTGT  
 GGTATGACCATAGTAAGTTTCAAGCGCAAAGTTACTAGAGGGATAATTCTGGGGGTGGCGTTAGGGAGGGAAGAGT  
 AGCCAGGGTGGTATCCTAGTTACACACAGCTCATTCTGCTTTATTTTGGGGTTGTGTGAAATTTTCTATTGCTATC  
 TTT

Secuencia antisentido natural (AW883557.1 (A)) splicing alternativo c SEQ ID NO 44

TTGTGGAGTAGAAAGGCTTCTCTTTATGGTACAGTTCATTGAGCTCTAAAGTAACTTGCCTGAAAGTCACAGAGTTA  
 GTTGAAAGCAGAGCCAGGAGCCTGAGCCAGAATTAATGAATCTAGTTGAACAGGGCCTAATACAGCAATTAACC  
 TCCATGAATTAATCAGCTTTGTAATCAGGCACAGTCATTTTCTCTTGGCAACGTCTGGGTTAGAGAACTATTATCT  
 GCCACTGTGTTCCCTGTCCCTCTGTCTAGACCGTTTGAGTGAATGAATAGCCAGTTTGGGAAGACCCGGCCTAAGG  
 GGCATTTTAAAGTTTCTGTTGGAGAAACGTTTATATACACTAAATTTGTGATGGAAATAAAAGCCTTTAAAGTAGGT  
 TTATACAGTTAATTGACAGACACTCTTGGAACAGGTTACTTTAGTTTCAAAGGATTAACCATGTTCCCTAACTTCCTT  
 TTGAAGTCTTAATTTGCCTTATAAAAAAATCCACTTTCTATCTTTCTTGGGACTTGTGGAAGAAGGTGCTTTTGTG  
 CTATAATTAAGCATAAAAATAAGCACATTGCATTTACTGGGTTGTTTCTTCGATAAGCCAAGGCCATTGGGTTTGGG  
 GGACTCAGCGCACAGCTGACTACTGCAGGACTACTACTGTGGTTATGACCATAGTAAGTTTCAAGCGCAAAGTTACT  
 AGAGGGATAATTCTGGGGGTGGCGTTAGGGAGGGAAGAGTAGCCAGGGTGGTATCCTAGTTACACACAGCTCATTCC  
 TGCTTTATTTTGGGGTTGTGTGAAATTTTCTATTGCTATCTTT