

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 661 787**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/113** (2010.01)

**A61K 31/7088** (2006.01)

**A61K 31/713** (2006.01)

**A61P 7/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.04.2010 PCT/US2010/033078**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.11.2010 WO10127195**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.04.2010 E 10770391 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.11.2017 EP 2424987**

54 Título: **Tratamiento de enfermedades relacionadas con hemoglobina (hbf/hbg) por inhibición de transcrito antisentido natural para hbf/hbg**

30 Prioridad:

**01.05.2009 US 174719 P**

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

**04.04.2018**

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 2 661 787 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 hemoglobina (hbf/hbg) por inhibición de transcrito antisentido natural para hbf/hbg

5

### CAMPO DE LA INVENCION

Aspectos de la divulgación que comprenden la expresión de modulación de los oligonucleótidos y/o la función de moléculas de globina.

10

### ANTECEDENTES

La hibridación ADN-ARN y ARN-ARN son importantes para muchos aspectos de la función del ácido nucleico incluyendo replicación, transcripción y traducción del ADN. La hibridación también es fundamental para una variedad de tecnologías que tanto detectan un ácido nucleico particular como alteran su expresión. Los nucleótidos antisentido, por ejemplo, alteran la expresión génica hibridándose con ARN diana, interfiriendo así con el splicing, la transcripción, la traducción y la replicación de ARN. El ADN antisentido tiene la característica añadida de que los híbridos de ADN-ARN sirven de sustrato para la digestión por ribonucleasa H, una actividad que está presente en la mayoría de los tipos de células. Las moléculas antisentido pueden suministrarse al interior de células, como es el caso para oligodesoxinucleótidos (ODN), o pueden expresarse a partir de genes endógenos como moléculas de ARN. La FDA recientemente aprobó un fármaco antisentido, VITRAVENE™ (para el tratamiento de retinitis por citomegalovirus), que refleja que el antisentido tiene utilidad terapéutica. Lynn Quek et al., (British Journal of Haematology, Vol. 136, No. 3, 1 February 2007, pages 353-365) instruye sobre tratamientos moleculares en la beta talasemia.

20

25

### RESUMEN

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

30

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.

35

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

En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos comprenden una o más nucleobases modificadas o sustituidas.

40

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

En otro aspecto más, las nucleobases modificadas comprenden bases modificadas que comprenden fosforotioato, metilfosfonato, ácidos nucleicos peptídicos, o moléculas de ácido nucleico bloqueado (LNA). Preferentemente, las nucleobases modificadas son moléculas de ácido nucleico bloqueado, que incluyen  $\alpha$ -L-LNA.

45

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

50

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.

55

En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos son encapsulados en un liposoma.

Otros aspectos se describen más adelante.

### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

60

La Figura 1 es una gráfica de los resultados de PCR en tiempo real mostrando que los niveles de ARNm de la HBF

en células HepG2 se incrementaron significativamente 48 h después del tratamiento con dos de los siRNA diseñados para Hs.702397 antisentido.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA

5

Varios aspectos de la divulgación se describen a continuación con referencia a aplicaciones de ejemplos para ilustración. Debe entenderse que los numerosos detalles, relaciones y procedimientos específicos se exponen para proporcionar un entendimiento completo de la divulgación. Un experto en la materia relevante, sin embargo, reconocerá fácilmente que la divulgación puede ponerse en práctica sin uno o más de los detalles específicos o con otros procedimientos. La presente divulgación no está limitada por el orden de actos o acontecimientos ilustrados, 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.

### 15 *Definiciones*

La terminología usada en el presente documento es con el fin de describir aspectos particulares solamente y no pretende ser limitante de la divulgación. Tal como se usan en la presente, se pretende que las formas en singular "un", "una", "el" y "la" incluyan también las formas plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

20 Además, siempre que las expresiones "que incluye", "incluyen", "que tiene", "tiene", "con", o variantes de las mismos se usan en la descripción detallada y/o las reivindicaciones, dichas expresiones pretenden ser inclusivas de una manera similar a la expresión "que comprende."

El término «aproximadamente» significa dentro de un intervalo de error aceptable para el valor particular como se ha determinado por un experto habitual en la materia, que dependerá en parte de cómo se mide o determina el valor, es decir, las limitaciones del sistema de medición. Por ejemplo, «alrededor de» puede significar 1 o más de 1 de desviación estándar, conforme a la práctica de la técnica. De manera alternativa, "aproximadamente" puede significar un intervalo de hasta el 20%, preferentemente hasta el 10%, más preferentemente hasta el 5%, y más preferentemente todavía hasta el 1% de un valor dado. De manera alternativa, en particular con respecto a los sistemas o procesos biológicos, el término puede significar un orden de magnitud de un valor preferentemente comprendido en 5 veces y más preferentemente, comprendido en 2 veces. En los casos en los que se describen valores particulares en la solicitud y las reivindicaciones, a menos que se exprese lo contrario, el término «alrededor de» significa que se debe asumir que el valor se encuentra comprendido en un intervalo de error aceptable para el valor particular.

35

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

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

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

60

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

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

Tal como se usa en la presente invención, «HBF/HBG1» son inclusivos de cadenas de polinucleótidos antisentido y sentido, alelos, variantes y mutantes, etc. de los genes HBF/HBG1.

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.

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. 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 "ARNi" 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., Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 98:9742-9747 (2001)). En ciertos aspectos de la presente divulgación, los mediadores de silenciamiento génico dependientes de ARN son dúplex de ARN "de interferencia pequeño" (siRNA) de 21-25 nucleótidos. Los siRNA se derivan a partir del procesamiento del ARNdc mediante una enzima conocida como Dicer. (Bernstein, E., et al., Nature 409:363-366 (2001)). Los productos dúplex siRNA son reclutados en un siRNA multiproteína denominado RISC (complejo de silenciamiento inducido por ARN). Sin desear ceñirse a ninguna teoría particular, se cree entonces que un RISC es guiado a un ácido nucleico diana (adecuadamente ARNm), en el que el dúplex de siRNA interactúa de una forma específica de secuencia para mediar en la escisión en un modo catalítico (Bernstein, E., et al., Nature 409:363-366 (2001); Boutla, A., et al., Curr. Biol. 11: 1776-1780 (2001)). Los ARN de interferencia pequeños que pueden usarse de acuerdo con la presente divulgación pueden sintetizarse y usarse de acuerdo con procedimientos que son bien conocidos en la técnica y que serán familiares para el experto en la materia. Los ARN de interferencia pequeños para su uso en los procedimientos de la presente divulgación comprenden adecuadamente entre aproximadamente 0 y aproximadamente 50 nucleótidos (nt). En los ejemplos de casos 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 ARNi 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  
 5 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 ARNi 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  
 10 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.  
 15 Dicha unión se produce mediante la parte de unión de diana de un ácido nucleico enzimático que se mantiene en estrecha proximidad a una parte enzimática de la molécula que actúa para escindir el ARN diana. De este modo, el ácido nucleico enzimático 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.

20 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  
 25 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  
 30 unidades monoméricas, por ejemplo, entre aproximadamente 3-4, y aproximadamente varios cientos de unidades monoméricas. Los análogos de enlaces fosfodiéster incluyen: fosforotioato, fosforoditioato, metilfosfonatos, fosforoselenoato, fosforamidoato y similares, tal como se describe más completamente más adelante.

En el presente contexto, los términos «nucleobase» y «nucleótidos» o «nucleósidos» se usan de forma  
 35 intercambiable en la presente invención; además, estos términos cubren tanto nucleobases de origen natural, como nucleobases de origen no natural. Debe ser evidente para el experto en la materia que diversas nucleobases que se consideraron anteriormente "no de origen natural" se han descubierto posteriormente en la naturaleza. De este modo, "nucleobase" incluye no solamente los heterociclos de purina y pirimidina conocidas, sino también análogos heterocíclicos y tautómeros de las mismas. Ejemplos ilustrativos de nucleobases son adenina, guanina, timina,  
 40 citosina, uracilo, purina, xantina, diaminopurina, 8-oxo-N<sup>6</sup>-metiladenina, 7-deazaxantina, 7-deazaguanina, N<sup>4</sup>,N<sup>4</sup>-etanocitosina, N<sup>6</sup>,N<sup>6</sup>-etano-2,6- diaminopurina, 5-metilcitosina, 5-(C<sup>3</sup>-C<sup>6</sup>)-alquinilcitosina, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, seudoisocitosina, 2-hidroxi-5-metil-4-triazolopiridina, isocitosina, isoguanina, inosina y las nucleobases "no de origen natural" descritas en Benner et al., patente de Estados Unidos N.º 5.432.272. El término «nucleobase» pretende cubrir todos y cada uno de estos ejemplos, además de análogos y tautómeros de los mismos. Nucleobases  
 45 especialmente interesantes son adenina, guanina, timina, citosina y uracilo, que se consideran como las nucleobases de origen natural en relación con la aplicación terapéutica y diagnóstica en seres humanos. El nucleósido incluye los nucleósidos naturales que incluyen las formas 2'-desoxi y 2'-hidroxilo, por ejemplo, como se describe en Komberg and Baker, DNA Replication, 2nd Ed. (Freeman, San Francisco, 1992).

50 «Análogos» en referencia a nucleósidos, incluye nucleósidos sintéticos que tienen restos de bases modificados y/o restos de azúcar modificados, por ejemplo, descritos generalmente por Scheit, Nucleotide Analogs, John Wiley, New York, 1980; Freier & Altmann, Nucl. Acid. Res., 1997, 25(22), 4429-4443; Toulmé, J.J., Nature Biotechnology 19:17-18 (2001); Manoharan M., Biochemica et Biophysica Acta 1489:117-139(1999); Freier S. M., Nucleic Acid Research, 25:4429-4443 (1997); Uhman, E., Drug Discovery & Development, 3: 203-213 (2000); Herdewin P., Antisense &  
 55 Nucleic Acid Drug Dev., 10:297-310 (2000); 2'-O, 3'-C-linked [3.2.0] bicycloarabinonucleosides (véase *por ejemplo* N.K Christensen., et al, J. Am. Chem. Soc., 120: 5458-5463 (1998)). Dichos análogos incluyen nucleósidos sintéticos diseñados para potenciar propiedades de unión, por ejemplo, la especificidad, estabilidad del dúplex o el triplex, o similares.

60 Tal como se usa en el presente documento, "hibridación" significa el apareamiento de cadenas sustancialmente

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

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

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "condiciones de hibridación astringentes" o "condiciones astringentes" se refiere a condiciones en las que un compuesto de la divulgación hibridará con su secuencia diana, pero con un número mínimo de otras secuencias. Las condiciones astringentes son dependientes de secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias y en el contexto de esta divulgación, "condiciones astringentes" en las que compuestos oligoméricos hibridan con una secuencia diana se determinan mediante la naturaleza y la composición de los compuestos oligoméricos y los ensayos en los que están siendo investigados. En general, las condiciones de hibridación astringentes comprenden bajas concentraciones (<0,15 M) de sales con cationes inorgánicas tales como Na<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: complejo de 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 nucleobases 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 nucleobases 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 nucleobases 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 las 20 nucleobases del compuesto antisentido son complementarias a una región diana y, por lo tanto, hibridarían específicamente, representaría el 90 por ciento de complementariedad. En este ejemplo, las nucleobases no complementarias restantes pueden agruparse o intercalarse con nucleobases complementarias y no necesitan ser contiguas entre sí o a nucleobases complementarias. Por lo tanto, un compuesto antisentido que tiene 18 nucleobases de longitud que tiene 4 (cuatro) nucleobases no complementarias que están flanqueadas 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., J. Mol. Biol., 1990,215,403-410; Zhang and Madden, Genome Res., 1997,7, 649-656). El porcentaje de homología, identidad de secuencias o complementariedad pueden determinarse por, por ejemplo, el programa Gap (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research

Park, Madison Wis.), usando parámetros por defecto, que usa el algoritmo de Smith and Waterman (Avd. Appl. Math., 1981, 2, 482-489).

5 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. Como las secuencias diana están generalmente presentes en exceso, en la T<sub>m</sub>, el 50 % de los oligonucleótidos están ocupados 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 con pH de 7,0 a 8,3 y la temperatura es al menos  
10 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.

15

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  
20 polinucleótidos debido al splicing alternativo de exones durante el procesamiento de ARNm. El polipéptido correspondiente puede poseer dominios funcionales adicionales o una ausencia de dominios. Las variantes de especie son secuencias de polinucleótidos que varían de una especie a otra. Son de particular utilidad en la divulgación de 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  
25 o función puede o puede no alterarse. Cualquier gen natural o recombinante dado puede tener ninguna, una o muchas formas alélicas. Cambios mutacionales comunes que dan lugar a variantes se atribuyen generalmente a delecciones, adiciones o sustituciones naturales de nucleótidos. Cada uno de estos tipos de cambios puede producirse solo, o en combinación con los otros, una o más veces en una secuencia dada.

30 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,  
35 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 interazúcar. A modo de  
40 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.

45 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.

50 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, pollos, reptiles, peces, insectos y arácnidos.

"Mamífero" cubre mamíferos de sangre caliente que normalmente están bajo atención médica (por ejemplo, seres  
55 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  
60 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 a la enfermedad (por ejemplo, causa, transmisión, expresión, etc.).

5

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

En aspectos preferidos, los oligonucleótidos antisentido se usan para prevenir o tratar patologías o trastornos asociados con la función o expresión génica anormal de globina. Los genes de la gamma globina (HBG1 y HBG2) se expresan normalmente en el hígado, el bazo y la médula ósea del feto. Dos cadenas gamma junto con dos cadenas alfa constituyen la hemoglobina fetal (HbF) que es normalmente sustituida por hemoglobina de adulto (HbA) en el nacimiento. En algunas beta-talasemias y afecciones relacionadas, la producción de cadenas gamma continúa durante la edad adulta. Los dos tipos de cadenas gamma difieren en la posición 136 de residuo donde se encuentra glicina en el producto G-gamma (HBG2) y alanina en el producto A-gamma (HBG1). El primero es predominante en el nacimiento. El orden de los genes en el clúster beta-globina es: 5'-epsilon -- gamma-G -- gamma-A -- delta -- beta--3'.

Los trastornos o patologías asociadas con una expresión y/o función anormal de globina incluyen, por ejemplo, anemias, como la anemia falciforme, talasemia y similares. La anemia falciforme es un trastorno sistémico causado por una mutación (Glu6Va1) en el gen que codifica la  $\beta$ -globina. La molécula de hemoglobina falciforme (HbS) es un tetrámero de dos cadenas de  $\alpha$ -globina y dos cadenas de  $\beta$ -globina falciforme, con la tendencia a polimerizarse cuando se encuentra deoxigenada. La HbS facilita las interacciones anormales entre los eritrocitos falciformes y los leucocitos y células endoteliales, lo que provoca una patobiología compleja. Esta polifacética patofisiología favorece la oportunidad de interrumpir la enfermedad en varios sitios, lo que incluye la polimerización de la HbS, la densidad de eritrocitos y las interacciones célula a célula. Por ejemplo, es posible inducir mayores concentraciones de hemoglobina fetal, que alteraría la etapa inicial patológica consistente en la polimerización de HbS. En algunos aspectos, el tratamiento de un paciente comprende la administración de uno o más oligonucleótidos antisentido en el propio paciente. El tratamiento puede combinarse con una o más terapias. Por ejemplo, mediante la mejora de la hidratación en los agentes y eritrocitos falciformes para contrarrestar las anomalías oxidativas, inflamatorias y endoteliales de esta enfermedad falciforme.

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

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

45

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

60

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 para HBF/HBG.

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

En un aspecto preferido, los oligonucleótidos antisentido se unen a las secuencias antisentido naturales de HBF/HBG y modulan la expresión del gen de globina. Por ejemplo, hemoglobina fetal. Por ejemplo, una secuencia antisentido natural de HBF comprende un SEQ ID NO: 2 y variantes de la misma.

En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos antisentido se unen a uno o más segmentos de polinucleótidos de HBF/HBG. Los segmentos comprenden al menos cinco nucleobases consecutivas de los polinucleótidos sentido o antisentido de HBF/HBG.

La hemoglobina fetal (HBF) es la principal proteína transportadora de oxígeno en el feto y durante los últimos siete meses de desarrollo en el útero y para el neonato hasta aproximadamente los 6 meses de edad. Funcionalmente, la hemoglobina fetal difiere en su mayor parte de la hemoglobina del adulto en que es capaz de unirse al oxígeno con mayor afinidad que en su forma adulta, lo que favorece que el feto en desarrollo tenga mejor acceso al oxígeno del torrente sanguíneo de la madre. En los neonatos, la hemoglobina fetal es sustituida casi completamente por la hemoglobina de adulto aproximadamente en la decimosegunda semana de vida postnatal. En adultos, la producción de hemoglobina fetal puede reactivarse mediante las composiciones descritas en el presente documento, algo útil en el tratamiento de dichas patologías como la enfermedad falciforme.

Cuando la producción de hemoglobina fetal finaliza tras el nacimiento, los niños normales empiezan a producir hemoglobina de adulto (HbA); sin embargo, los niños con la enfermedad falciforme comienzan a producir, en su lugar, una hemoglobina con forma defectuosa denominada hemoglobina S. Esta variedad de hemoglobina se acumula y forma filamentos, por lo que causa que los glóbulos rojos transformen su forma característica redondeada a forma de hoz, lo que provoca una mayor tendencia a apilarse unos encima de otros y a hacinarse en los vasos sanguíneos. Esto lleva inevitablemente a los denominados episodios vasooclusivos dolorosos, algo distintivo de la enfermedad. Si la hemoglobina fetal permanece como la forma predominante de hemoglobina después del nacimiento, el número de episodios dolorosos, no obstante, disminuye en pacientes con anemia de células falciformes. La hidroxiurea, un fármaco usado también para tratar el cáncer supone un tratamiento viable para la anemia de células falciformes, ya que fomenta la producción de hemoglobina fetal mientras inhibe la formación de eritrocitos falciformes debido a la polimerización de la hemoglobina S.

Así, en algunos aspectos, el tratamiento de la anemia comprende la administración de oligonucleótidos antisentido para elevar los niveles de hemoglobina F y fomentar el desarrollo de células F que contengan HbF.

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 esta forma, 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

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

10 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.

20 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.

25 Otra región diana incluye la región no traducida 5' (5'UTR), conocida en la técnica para referirse a la parte de un ARNm en la dirección 5' desde el codón de iniciación de la traducción, y que incluye, por lo tanto, nucleótidos entre el sitio caperuza 5' (5' cap) y el codón de iniciación de la traducción de un ARNm (o nucleótidos correspondientes en el gen). Otra región diana más incluye la región no traducida 3' (3'UTR), conocida en la técnica para referirse a la parte de un ARNm en la dirección 3' desde el codón de terminación de la traducción, y que incluye, por lo tanto, 30 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'.

35 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 40 empalmes exón-intrón, es particularmente útil en situaciones en las que el splicing aberrante participa en la enfermedad, o en las que una producción en exceso de un producto de splicing particular participa en la enfermedad. Un empalme de fusión aberrante debido a la transposición o delección es otro aspecto de un sitio diana. Los ARNm transcritos producidos mediante el proceso de splicing de dos (o más) ARNm de diferentes fuentes de genes se conocen como "transcritos de fusión". Los intrones pueden ser eficazmente elegidos como diana usando 45 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.

50 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.

55 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.

60

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".

5 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.

10 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 15 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 nucleobases de una región diana a la que se dirige un compuesto antisentido activo.

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

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

30 Los segmentos diana pueden comprender secuencias de ADN o ARN que comprenden al menos las 5 nucleobases consecutivas desde el extremo 5' de uno de los segmentos diana preferidos ilustrativos (siendo las restantes nucleobases 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 nucleobases). Segmentos diana similarmente preferidos se representan por secuencias de ADN o ARN que 35 comprenden al menos las 5 nucleobases consecutivas desde el extremo 3' de uno de los segmentos diana preferidos ilustrativos (siendo las restantes nucleobases 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 nucleobases). Un experto en la materia armado con los segmentos diana ilustrados en el presente documento será capaz, sin excesiva experimentación, de identificar segmentos diana 40 preferidos adicionales.

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

45 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 con el fin de cubrir toda la longitud del polinucleótido diana. Las dianas también incluyen regiones codificantes, además de no 50 codificantes.

En un aspecto, se prefiere dirigirse a ácidos nucleicos específicos por oligonucleótidos antisentido. El direccionamiento de un compuesto antisentido a un ácido nucleico particular es un proceso multietapa. El proceso normalmente empieza con la identificación de una secuencia de ácidos nucleicos cuya función va a modularse. Ésta 55 puede ser, por ejemplo, un gen celular (o ARNm transcrito a partir del gen) cuya expresión está asociada a un trastorno o patología particular, o un polinucleótido no codificante tal como, por ejemplo, ARN no codificante (ARNnc).

Los ARN pueden clasificarse en (1) ARN mensajeros (ARNm), que se traducen en proteínas, y (2) ARN no 60 codificantes de proteína (ARNnc). Los ARNnc comprenden microARN, transcritos antisentido y otras unidades

transcripcionales (TU) que contienen una alta densidad de codones de terminación y que carecen de cualquier amplio "marco de lectura abierto". Muchos ARNnc parecen empezar a partir de sitios de iniciación en regiones no traducidas 3' (3'UTRs) de loci codificantes de proteínas. Los ARNnc son frecuentemente raros y al menos la mitad de los ARNnc que se han secuenciado por el consorcio FANTOM no parecen estar poliadenilados. La mayoría de los investigadores se han basado, por motivos obvios, en ARNm poliadenilados que se procesan y se exportan al citoplasma. Recientemente, se demostró que el conjunto de ARN nucleares no poliadenilados puede ser muy grande, y que muchos de dichos transcritos surgen de las llamadas regiones intergénicas (Cheng, J. et al. (2005) Transcriptional maps of 10 human chromosomes at 5-nucleotide resolution. *Science* 308 (5725), 1149-1154; Kapranov, P. et al. (2005). Examples of the complex architecture of the human transcriptome revealed by RACE and high-density tiling arrays. *Genome Res* 15 (7), 987-997). El mecanismo más común por el que los ARNnc regulan la expresión génica es por apareamiento de bases con transcritos diana. Los ARN que funcionan por apareamiento de bases pueden agruparse en (1) ARN codificados en cis que están codificados en la misma ubicación genética, pero en la cadena opuesta a los ARN en los que actúan y, por lo tanto, muestran complementariedad perfecta con su diana, y (2) ARN codificados en trans que están codificados en una ubicación cromosómica distinta de los ARN en los que actúan y generalmente no presentan potencial de apareamiento de bases perfecto con sus dianas.

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

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

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

De acuerdo con la presente divulgación, los compuestos antisentido incluyen oligonucleótidos antisentido, ribozimas, oligonucleótidos de secuencia de guía externa (EGS), compuestos de siRNA, compuestos de interferencia (ARNi) de ARN mono- o bicatenario tales como compuestos de siRNA, y otros compuestos oligoméricos que hibridan con al menos una parte del ácido nucleico diana y modulan su función. Por lo tanto, pueden ser ADN, ARN, similares a ADN, similares a ARN, o mezclas de los mismos, o pueden ser miméticos de uno o más de estos. Estos compuestos pueden ser compuestos oligoméricos monocatenarios, bicatenarios, circulares o de horquilla y pueden contener elementos estructurales tales como protuberancias internas o terminales, desapareamientos o bucles. Los compuestos antisentido se preparan de forma rutinaria linealmente, pero pueden unirse o prepararse de otro modo para ser circulares y/o ramificados. Los compuestos antisentido pueden comprender construcciones tales como, por ejemplo, dos cadenas hibridadas para formar un compuesto completo o parcialmente bicatenario o una única cadena con auto-complementariedad suficiente para permitir la hibridación y formación de un compuesto completo 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 nucleobase seleccionadas, posiciones de azúcar o a uno de los enlaces internucleosídicos. Como alternativa, las dos cadenas pueden enlazarse mediante un resto no de ácido nucleico o grupo conector. Cuando se forma a partir de solo una cadena, el ARNdc puede tomar la forma de una molécula tipo horquilla auto-complementaria que se dobla sobre sí misma para formar un dúplex. De este modo, el ARNdc puede ser completa o

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

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

En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos o compuestos antisentido, comprenden al menos uno de: oligonucleótidos de ARN antisentido, oligonucleótidos de ADN antisentido, oligonucleótidos antisentido quiméricos, oligonucleótidos antisentido que comprenden enlaces modificados, ARN de interferencia (ARNi), 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 (ARNa); ARN activantes pequeños (ARNap), o combinaciones de los mismos.

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

Se ha descubierto que el ARN bicatenario pequeño (ARNdc), tal como ARN de interferencia pequeño (siRNA) y microARN (miARN), es el desencadenante de un mecanismo evolutivamente conservado conocido como ARN de interferencia (ARNi). El ARNi conduce invariablemente al silenciamiento génico mediante la remodelación de cromatina para suprimir de este modo la transcripción, degradación de ARNm complementario, o bloqueo de la traducción de proteínas. Los ARNp pueden actuar también como ARN activantes pequeños (ARNap). Sin desear ceñirse a ninguna teoría, direccionando secuencias a promotores génicos, los ARNap inducirán la expresión de genes diana en un fenómeno denominado activación transcripcional inducida por ARNdc (ARNa).

En un aspecto adicional, los "segmentos diana preferidos" identificados en el presente documento pueden emplearse en un cribado para compuestos adicionales que modulan la expresión de polinucleótidos HBF/HBG. Los "moduladores" son aquellos compuestos que disminuyen o aumentan la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica el gen HBF/HBG y que comprenden al menos una parte de 5 nucleobases 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 del gen HBF/HBG con uno o más moduladores candidatos, y seleccionar uno o más moduladores candidatos que disminuyen o aumentan la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica polinucleótidos del gen HBF/HBG. Una vez que se demuestra que el modulador o moduladores candidatos son capaces de modular (por ejemplo, tanto disminuir como aumentar) la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica polinucleótidos del gen HBF/HBG, el modulador puede entonces emplearse en estudios de investigación adicionales de la función de polinucleótidos del gen HBF/HBG, o para su uso como un agente de investigación, diagnóstico o terapéutico de acuerdo con la presente divulgación.

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., Nature, 1998, 391, 806-811; Timmons and Fire, Nature 1998, 395, 854; Timmons et al., Gene, 2001, 263, 103-112; Tabara et al., Science, 1998, 282,430-

431; Montgomery et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, 95, 15502-15507; Tuschl et al., Genes Dev., 1999, 13, 3191-3197; Elbashir et al., Nature, 2001, 411, 494-498; Elbashir et al., Genes Dev. 2001, 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., Science, 5 2002, 295, 694-697).

En un aspecto preferido, un oligonucleótido antisentido se dirige a polinucleótidos de HBF/HBG (por ejemplo, número de acceso: NM\_000559), variantes, alelos, isoformas, homólogos, mutantes, derivados, fragmentos y secuencias complementarias a los mismos. Preferentemente, el oligonucleótido es una molécula antisentido.

10

De acuerdo con aspectos de la divulgación, la molécula de ácido nucleico diana no se limita a los polinucleótidos de HBF/HBG solos, sino que se extiende a cualquiera de las isoformas, homólogos y similares de los miembros de la familia de la globina.

15 En otro aspecto preferido, un oligonucleótido de ARN se dirige a una secuencia antisentido natural de polinucleótidos de HBF/HBG, por ejemplo, polinucleótidos expuestos como SEQ ID NO: 2, y cualquier variante, alelo, homólogo, mutante, derivado, fragmento y secuencia complementaria a los mismos. Ejemplos de oligonucleótidos antisentido se exponen como las SEQ ID NO: 3 a 5.

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

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

25

En un aspecto preferido, los oligonucleótidos comprenden secuencias de al menos 5 nucleobases consecutivas de las SEQ ID NO: de la 1 a la 5.

30

Las dianas de polinucleótido comprenden genes de globina, que incluye miembros de su familia, variantes de HBF/HBG; mutantes de HBF/HBG, que incluyen SNP; secuencias no codificantes de HBF/HBG; alelos de HBF/HBG; variantes de especies, fragmentos y similares. Preferentemente, el oligonucleótido es una molécula antisentido.

35 En otro aspecto preferido, el oligonucleótido que se une a polinucleótidos de HBF/HBG comprende: ARN antisentido, ARN de interferencia (ARNi), 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 (ARNa); o, ARN activante pequeño (ARNap).

40 En otro aspecto preferido, la selección como diana de los polinucleótidos de globina, por ejemplo, las SEQ ID NO: 1 a 3, NM\_001110, 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.

45 En otro aspecto preferido, los compuestos antisentido comprenden polinucleótidos expuestos como SEQ ID NO: 2 a 5. Estos oligonucleótidos pueden comprender una o más nucleobases modificadas, fragmentos más cortos o más largos, enlaces modificados y similares.

En otro aspecto preferido, las SEQ ID NO: 2 a 5 comprenden una o más nucleobases de LNA.

50

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

55

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.

60

Med. Chem. 30,285-294; Christoffersen and Marr, 1995 J. Med. Chem. 38, 2023-2037). Las moléculas de ácidos nucleicos enzimáticos pueden diseñarse para escindir dianas de ARN específicas dentro del fondo del ARN celular. Un acontecimiento de escisión de este tipo convierte el ARNm en no funcional y anula la expresión de proteínas de ese ARN. De este modo puede inhibirse selectivamente la síntesis de una proteína asociada a una patología.

5

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

- 15 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) TBTBTECH 12, 268; Bartel et al., (1993) Science 261:1411- -1418; Szostak, (1993) TIBS 17, 89-93; Kumar et al., (1995) FASEB J., 20 9, 1183; Breaker, (1996) Curr. Op. Biotech., 7,442).

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

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

ARN catalíticos diseñados en base al motivo "cabeza de martillo" se han usado para escindir secuencias diana específicas al producir cambios de bases apropiados en el ARN catalítico para mantener el apareamiento necesario de bases con las secuencias diana (Haseloff and Gerlach, Nature, 334, 585 (1988); Walbot and Bruening, Nature, 334, 196 (1988); Uhlenbeck, O. C. (1987) Nature, 328: 596-600; Koizumi, M., Iwai, S. and Ohtsuka, E. (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, Nature, 334, 585 (1988); Walbot y Bruening, Nature, 334, 196 (1988); Uhlenbeck, O. C. (1987) Nature, 328: 596-600).

El ARN interferencia (ARNi) se ha convertido en una poderosa herramienta para bloquear 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

60

mismos. Este término incluye oligonucleótidos compuestos de nucleobases 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, 5 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 (ARNi) de 10 ARN mono- o bicatenario tales como compuestos de siRNA, ARN<sub>ap</sub>, ARN<sub>a</sub>, y otros compuestos oligoméricos que hibridan con al menos una parte del ácido nucleico diana y modulan su función. Por lo tanto, pueden ser ADN, ARN, similares a ADN, similares a ARN, o mezclas de los mismos, o pueden ser miméticos de uno o más de estos. Estos compuestos pueden ser compuestos oligoméricos monocatenarios, bicatenarios, circulares o de horquilla y pueden 15 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 20 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, 25 posiciones de nucleobase seleccionadas, posiciones de azúcar o a uno de los enlaces internucleosídicos. Como alternativa, las dos cadenas pueden enlazarse mediante un resto no de ácido nucleico o grupo conector. Cuando se forma a partir de solo una cadena, el ARN<sub>dc</sub> puede tomar la forma de una molécula tipo horquilla auto-complementaria que se dobla sobre sí misma para formar un dúplex. De este modo, el ARN<sub>dc</sub> puede ser completa o 30 parcialmente bicatenario. La modulación específica de la expresión génica se puede lograr por expresión estable de las horquillas de ARN<sub>dc</sub> en líneas de células transgénicas (Hammond et al., Nat. Rev. Genet., 1991, 2, 110-119; Matzke et al., Curr. Opin. Genet. Dev., 2001, 11, 221-227; Sharp, Genes Dev., 2001, 5, 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 35 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 40 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'-hidroxilo o azúcares modificados en 2' y, generalmente bases U en vez de T). Las hélices de ácido nucleico pueden adoptar más de un tipo de estructura, más comúnmente las formas A y B. Se cree que, en general, los oligonucleótidos que tienen estructura similar a la forma B son "de tipo ADN" y aquellos que tienen estructura similar a la forma A son "de tipo ARN". En algunos aspectos (quiméricos), un compuesto antisentido puede contener tanto 45 regiones en forma A como B.

Los compuestos antisentido de acuerdo con esta divulgación comprenden una parte antisentido de aproximadamente 5 a aproximadamente 80 nucleobases (es decir, de aproximadamente 5 a aproximadamente 80 50 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 nucleobases, y un compuesto antisentido bicatenario de la divulgación (tal como un ARN<sub>dc</sub>, por ejemplo) comprende una cadena antisentido o parte de 5 a aproximadamente 80 nucleobases de longitud. Un experto habitual en la materia apreciará que éste comprenda partes antisentido de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 55 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, o 80 nucleobases de longitud, o cualquier intervalo entremedias.

En un aspecto, los compuestos antisentido de la divulgación tienen partes antisentido de 10 a 50 nucleobases de longitud. Un experto habitual en la materia apreciará que éstos integran oligonucleótidos que tienen partes 60 antisentido de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 8, 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 nucleobases de longitud, o cualquier intervalo entremedias. En algunos aspectos, los oligonucleótidos tienen 15 nucleobases de longitud.

En un aspecto, los compuestos antisentido o de oligonucleótido de la divulgación tienen partes antisentido de 12 o 5 13 a 30 nucleobases de longitud. Un experto en la materia apreciará que éstos integran compuestos antisentido que tienen partes antisentido de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleobases de longitud, o cualquier intervalo entremedias.

En un aspecto preferido, la administración de al menos un oligonucleótido que elige como diana uno o más 10 polinucleótidos de HBF/BBG previene o trata patologías asociadas con la función o expresión anormal de los polinucleótidos de HBF/HBG y productos codificados de los mismos, u otras patologías relacionadas. Ejemplos de patologías que pueden tratarse con los oligonucleótidos antisentido comprenden talasemia, enfermedad de células falciformes, anemia perniciosa, otras anemias, leucemias y similares. Los oligonucleótidos también son preventivos para un paciente que esté en riesgo de desarrollo, por ejemplo, para la talasemia se pueden administrar uno o más 15 polinucleótidos antisentido para prevenir dicha enfermedad o trastorno. Además, los oligonucleótidos pueden administrarse con otros agentes como parte del tratamiento.

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 20 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 ARNdc. Estos compuestos se ensayan entonces usando los procedimientos descritos en el presente documento para determinar su capacidad para inhibir la expresión de un ácido nucleico diana.

25 En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencias o complementariedad, entre el compuesto antisentido, por ejemplo en las SEQ ID NO: 2 a 5 y la diana es de aproximadamente el 50% a aproximadamente el 60%. En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencias o complementariedad es de aproximadamente el 60% a aproximadamente el 70%. En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencias o complementariedad es de aproximadamente el 70% a aproximadamente el 80%. En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencias 30 o complementariedad es de aproximadamente el 80% a aproximadamente el 90%. En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencias o complementariedad es de aproximadamente el 90%, aproximadamente el 92%, aproximadamente el 94%, aproximadamente el 95%, aproximadamente el 96%, aproximadamente el 97%, aproximadamente el 98%, aproximadamente el 99 % o aproximadamente el 100%.

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

En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos eligen como diana una o más regiones de los polinucleótidos diana. 40 Son también diana de los oligonucleótidos de ARN, las regiones solapantes de la SEQ ID NO: 1, polinucleótidos del HBF/HBG.

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 45 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 50 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 55 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 60 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 frente a una diana dada. El efecto de tal afinidad incrementada es potenciar enormemente la modulación por oligonucleótidos de ARNi de la expresión génica. La ARNasa H es una endonucleasa celular que escinde la cadena de ARN de los dúplex de ARN:ADN; por lo tanto, la activación de esta enzima produce la escisión del ARN diana, y de este modo puede potenciar enormemente la eficiencia de inhibición de ARNi. La escisión del ARN diana puede demostrarse rutinariamente por electroforesis en gel. En 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. Acc. Chem. Res. 1995, 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 los oligonucleótidos con esqueletos de fosforotioato y aquellos con esqueletos de heteroátomos, en particular  $\text{CH}_2\text{-NH-O-CH}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{-N(CH}_3\text{)-O-CH}_2$  [conocidos como un esqueleto de metileno(metilimino) o MMI], esqueletos  $\text{CH}_2\text{-O-N(CH}_3\text{)-CH}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{-N(CH}_3\text{)-N(CH}_3\text{)-CH}_2$  y  $\text{O-N(CH}_3\text{)-CH}_2\text{-CH}_2$ , donde el esqueleto de fosfodiéster nativo se representa como  $\text{O-P-O-CH}_2$ . Los esqueletos de amida desvelados por De Mesmaeker et al. Acc. Chem. Res. 1995,28:366-374) también se prefieren. También se prefieren oligonucleótidos que tienen esqueletos de morfolino (Summerton and Weller, nº. de Pat. de EE. UU.: 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. Science 1991, 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,  $\text{SCH}_3$ , F, OCN,  $\text{OCH}_3\text{OCH}_3$ ,  $\text{OCH}_3\text{O(CH}_2\text{)}_n\text{CH}_3$ ,  $\text{O(CH}_2\text{)}_n\text{NH}_2$  o  $\text{O(CH}_2\text{)}_n\text{CH}_3$  donde n es desde 1 a aproximadamente 10;  $\text{C}_1$  to  $\text{C}_{10}$  alquilo inferior, alcoxilcoxi, alquilo inferior sustituido, alcarilo o aralquilo, Cl; Br; CN;  $\text{CF}_3$ ;  $\text{OCF}_3$ ; O-, S-, or N-alquilo; O-, S-, or N-alqueno;  $\text{SOCH}_3$ ;  $\text{SO}_2\text{CH}_3$ ;  $\text{ONO}_2$ ;  $\text{NO}_2$ ;  $\text{N}_3$ ;  $\text{NH}_2$ ; heterocicloalquilo; heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, polialquilamino, sililo sustituido, un grupo de escisión de ARN, un grupo indicador, un intercalador, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido, o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un oligonucleótido, y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. Una modificación preferida incluye 2'-metoxietoxi [ $2'\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$ , también conocido como 2'-O-(2-metoxietilo)] (Martin et al., Helv. Chim. Acta, 1995, 78, 486). Otras modificaciones preferidas incluyen 2'-metoxi ( $2'\text{-O-CH}_3$ ), 2'-propoxi ( $2'\text{-OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ) y 2'-flúor ( $2'\text{-F}$ ). 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, nucleobases "no modificadas" o "naturales" incluyen adenina (A), guanina (G), timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Las nucleobases modificadas incluyen nucleobases encontradas 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 nucleobases sintéticas, 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, pp 75-77; Gebeyehu, G., et al. Nucl. Acids Res. 1987, 15: 4513). Puede incluirse una base "universal" conocida en la técnica, por ejemplo, inosina. Se ha mostrado que las sustituciones de 5-Me-C incrementan la estabilidad dúplex del ácido nucleico alrededor de 0,6-1,2 °C. (Sanghvi, Y. S., in Crooke, S. T. y Lebleu, B., eds., Antisense Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278) y actualmente son las sustituciones base preferidas.

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

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

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

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

De acuerdo con la divulgación, el uso de modificaciones tales como el uso de monómeros de LNA para potenciar la potencia, especificidad y duración de la acción y ampliar las vías de administración de oligonucleótidos comprende químicas actuales tales como MOE, ANA, FANA, PS, etc. (ref: Recent advances in the medical chemistry of antisense oligonucleotide by Uhlman, Current Opinions in Drug Discovery & Development 2000 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 dichos oligonucleótidos modificados con LNA contengan

menos de aproximadamente el 70%, más preferentemente menos de aproximadamente el 60%, de la manera más preferente menos de aproximadamente el 50% de monómeros de LNA y que sus tamaños estén entre aproximadamente 5 y 25 nucleótidos, más preferentemente entre aproximadamente 12 y 20 nucleótidos.

- 5 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  
10 polaridad invertida, donde los pares adyacentes de unidades de nucleósidos están enlazados 3'-5' a 5'-3' o 2'-5' a 5'-2'. También se incluyen diversas sales, sales mixtas y formas de ácido libre.

- Las patentes representativas de los Estados Unidos que enseñan la preparación de los enlaces anteriores que contienen fósforo comprenden, pero no se limitan a, las Patentes de EE.UU. n.º 3.687.808; 4.469.863; 4.476.301;  
15 5.023.243; 5.177.196; 5.188.897; 5.264.423; 5.276.019; 5.278.302; 5.286.717; 5.321.131; 5.399.676; 5.405.939; 5.453.496; 5.455.233; 5.466.677; 5.476.925; 5.519.126; 5.536.821; 5.541.306; 5.550.111; 5.563.253; 5.571.799; 5.587.361; y 5.625.050.

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

- Las patentes representativas de los Estados Unidos que enseñan la preparación de los oligonucleósidos comprenden, pero no se limitan a, las patentes de los EE.UU. N.º 5.034.506; 5.166.315; 5.185.444; 5.214.134;  
30 5.216.141; 5.235.033; 5.264.562; 5.264.564; 5.405.938; 5.434.257; 5.466.677; 5.470.967; 5.489.677; 5.541.307; 5.561.225; 5.596.086; 5.602.240; 5.610.289; 5.602.240; 5.608.046; 5.610.289; 5.618.704; 5.623.070; 5.663.312; 5.633.360; 5.677.437; y 5.677.439.

- En otros miméticos de oligonucleótidos preferidos, tanto el azúcar como el enlace internucleosídico, es decir, el  
35 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  
40 unen directamente o indirectamente a átomos de nitrógeno azo de la parte de amida del esqueleto. Las patentes representativas de los Estados Unidos que enseñan la preparación de compuestos PNA comprenden, pero no se limitan a, las patentes de los EE.UU. N.º 5.539.82; 5.714.331; y 5.719.262.

- Enseñanzas adicionales de compuestos de PNA pueden encontrarse en Nielsen et al., Science, 1991, 254, 1497-  
45 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>-  
50 donde el esqueleto de fosfodiéster nativo se representa como -O-P-O-CH<sub>2</sub>- de la patente de EE. UU. Citada anteriormente con n.º 5.489.677, y los esqueletos de amida de la patente de EE. UU. citada anteriormente con n.º 5.602.240. También se prefieren oligonucleótidos que tienen esqueletos de morfolino de la patente de EE.UU. n.º 5.034.506 citada anteriormente.

- 55 Los oligonucleótidos modificados también pueden contener uno o más restos de azúcar sustituidos. Oligonucleótidos preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': OH; F; O-, S- o N-alquilo; O-, S-, o N-alqueno; O-, S- o N-alquino; o O-alquil-O-alquilo, donde el alquilo, alqueno y alquino pueden ser alquilo C a CO sustituido o sin sustituir o alqueno y alquino C<sub>2</sub> a CO. Particularmente preferidos son O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>O<sub>m</sub>CH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OCH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH<sub>2</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ONH<sub>2</sub>, y O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ON(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> donde n y m pueden ser de 1 a  
60 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., Helv. Chim. Acta, 1995, 78, 486-504) por ejemplo, un grupo alcoxialcoxi. Otra modificación preferida comprende 2'-dimetilaminooxietoxi, es decir, un grupo O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>ON(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, también conocido como 2'-DMAOE, tal como se describe en los ejemplos en el presente documento más adelante, y 2'-dimetilaminoetoxietoxi (también conocido en la técnica como 2'-O-dimetilaminoetoxietilo o 2'-DMAEOE), es decir, 2'-O-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>.

Otras modificaciones preferidas comprenden 2'-metoxi (2'-OCH<sub>3</sub>), 2'-aminopropoxi (2'-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>) y 2'-fluoro (2'-F). También pueden hacerse modificaciones similares en otras posiciones en el oligonucleótido, particularmente la posición 3' del azúcar en el nucleótido del extremo 3' o en oligonucleótidos enlazados 2'-5' y la posición 5' del nucleótido del extremo 5'. Los oligonucleótidos también pueden tener miméticos de azúcar tales como restos ciclobutilo en lugar del azúcar pentofuranosilo. Las patentes representativas de los Estados Unidos que enseñan la preparación de dichas estructuras de azúcar modificadas comprenden, pero no se limitan a, las patentes de los EE.UU. N.º. 4.981.957; 5.118.800; 5.319.080; 5.359.044; 5.393.878; 5.446.137; 5.466.786; 5.514.785; 5.519.134; 5.567.811; 5.576.427; 5.591.722; 5.597.909; 5.610.300; 5.627.053; 5.639.873; 5.646.265; 5.658.873; 5.670.633; y 5.700.920.

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, nucleobases "no modificadas" o "naturales" comprenden las bases de purina adenina (A) y guanina (G), y las bases de pirimidina timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Las nucleobases modificadas comprenden otras nucleobases sintéticas 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, las nucleobases comprenden las desveladas en la patente de Estados Unidos N.º 3.687.808, aquellas desveladas en "The Concise Encyclopedia of Polymer Science And Engineering", páginas 858-859, Kroschwitz, J.I., ed. John Wiley & Sons, 1990, aquellas desveladas por Englisch et al., 'Angewandte Chemie, International Edition', 1991, 30, página 613, y aquellas desveladas por Sanghvi, Y.S., Capítulo 15, 'Antisense Research and Applications', páginas 289-302, Croke, S.T. and Lebleu, B. ea., CRC Press, 1993. Algunas de estas nucleobases son particularmente útiles para incrementar la afinidad de unión de los compuestos oligoméricos de la divulgación. Estas 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 Croke, S. T. y Lebleu, B., eds., Antisense Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278) y actualmente son las sustituciones base preferidas, de manera aún más particular cuando se combinan con modificaciones de azúcar de 2'-O-metoxietilo.

Las patentes representativas de los Estados Unidos que enseñan la preparación de las nucleobases modificadas citadas anteriormente, así como otras nucleobases modificadas, comprenden, pero no se limitan a las patentes de EE. UU. nos. 3.687.808, así como 4.845.205; 5.130.302; 5.134.066; 5.175.273; 5.367.066; 5.432.272; 5.457.187; 5.459.255; 5.484.908; 5.502.177; 5.525.711; 5.552.540; 5.587.469; 5.596.091; 5.614.617; 5.750.692, y 5.681.941.

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

Dichos restos comprenden, aunque no se limitan a, restos de lípido tales como un resto colesterol (Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU., 1989, 86, 6553-6556), ácido cólico (Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Let., 1994, 4, 1053-1060), un tioéter, por ejemplo, hexil-S-tritilitol (Manoharan et al., Ann. N. Y. Acad. Sci., 1992, 660, 306-309; Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Let., 1993, 3, 2765-2770), un tiocolesterol (Oberhauser et al., Nucl. Acids Res., 1992, 20, 533-538), una cadena alifática, por ejemplo, residuos de dodecandiol o undecilo (Kabanov et al., FEBS Lett., 1990, 259, 327-330; Svinarchuk et al., Biochimie, 1993, 75, 49-54), un fosfolípido, por ejemplo, di-hexadecil-rac-

glicerol o 1, 2-di-O- hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato de trietilamonio (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654; Shea et al., Nucl. Acids Res., 1990, 18, 3777-3783), una poliamina o una cadena de polientilenglicol (Mancharan et al., Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14, 969-973), o ácido adamantano-acético (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654), un resto de palmitilo (Mishra et al., Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264, 229-237), o un resto de octadecilamina o hexilamino-carbonil-t-oxicolesterol (Crooke et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277, 923-937).

Las patentes representativas de los Estados Unidos que enseñan la preparación de estos conjugados de oligonucleótido comprenden, pero no se limitan a, las patentes de los EE. UU. nos. 4.828.979; 4.948.882; 5.218.105; 10 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; 15 5.587.371; 5.595.726; 5.597.696; 5.599.923; 5.599.928 y 5.688.941.

*Descubrimientos de fármacos:* Los compuestos de la presente divulgación también pueden aplicarse en las áreas del descubrimiento de fármacos y validación de dianas. La presente divulgación comprende el uso de los compuestos y segmentos diana preferidos identificados en el presente documento en un esfuerzo por el 20 descubrimiento de fármacos para esclarecer relaciones que existen entre los polinucleótidos de globina y una patología, fenotipo o afección. Estos procedimientos incluyen detectar o modular los polinucleótidos de GLOBINA 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 GLOBINA y/o un criterio de valoración fenotípico o químico relacionado en algún momento después del tratamiento, y opcionalmente comparar 25 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.

30 *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 35 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).

40 La expresión de un 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 45 cebadores y usarse para amplificar regiones codificantes de los genes diana. Inicialmente, la región codificante más altamente expresada de cada gen puede usarse para construir un gen de control modelo, aunque puede usarse cualquier región codificante o no codificante. Cada gen de control se ensambla insertando cada región codificante entre una región codificante reportera y su señal de poli(A). Estos plásmidos producirían un ARNm con un gen indicador en la parte cadena arriba del gen y una posible diana de ARNi en la región no codificante 3'. La eficacia de oligonucleótidos antisentido individuales se ensayaría por modulación del gen indicador. Los genes indicadores 50 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 55 ampicilina, bleomicina, cloranfenicol, gentamicina, higromicina, kanamicina, lincomicina, metotrexato, fosfomicina, puromicina y tetraciclina. Los procedimientos de determinación de la modulación de un gen indicador son muy conocidos en la técnica, e incluyen, aunque no se limitan a, procedimientos fluorimétricos (por ejemplo, espectroscopía de fluorescencia, clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), microscopía de fluorescencia), determinación de la resistencia a antibióticos.

60

**Kits, reactivos de investigación, de 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 miembro de la familia de la GLOBINA. Éstos incluyen, aunque no se limitan a, seres humanos, animales transgénicos, células, cultivos celulares, tejidos, xenoinjertos, trasplantes y combinaciones de los mismos.

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

Ejemplos de procedimientos de análisis de la expresión génica conocidos en la técnica incluyen matrices o micromatrices de ADN (Brazma and Vilo, FEBS Lett., 2000 480, 17-24; Celis, et al., FEBS Lett., 2000 480,2-16), SAGE (análisis en serie de la expresión génica)(Madden, et al., Drug Discov. Today, 2000, 5, 415-425), READS (amplificación por enzimas de restricción de los ADNs digeridos) (Prashar and Weissman, Methods Enzymol., 1999, 303, 258-72), TOGA (análisis de expresión génica total) (Sutcliffe, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2000, 97,1976-81), matrices de proteínas y proteómicos (Celis, et al., FEBS Lett., 2000, 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 génica de ARN sustractivos (SuRF) (Fuchs, et al., Anal. Biochem., 2000, 286, 91-98; Larson, et al., Cytometry, 2000, 41, 203-208), clonación sustractiva, presentación diferencial (DD) (Jurecic and Belmont, Curr. Opin. Microbiol., 2000, 3, 316-21), hibridación genómica comparativa (Carulli, et al., J. Cell Biochem. Suppl., 1998, 31, 286-96), técnicas de FISH (hibridación *in situ* fluorescente)(Going and Gusterson, Eur. J. Cancer, 1999, 35, 1895-904) y procedimientos de espectrometría de masas (To, Comb. Chem. High Throughput Screen, 2000, 3, 235-41).

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

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

60

- Para terapéuticos, un animal, preferentemente un ser humano, que se sospecha o tiene una enfermedad o trastorno que puede tratarse modulando la expresión de polinucleótidos de globina se trata administrando compuestos antisentido de acuerdo con esta divulgación. Por ejemplo, en un aspecto no limitante, los procedimientos comprenden la etapa de administrar al animal que necesita tratamiento una cantidad terapéuticamente efectiva del modulador de un inhibidor de globina. La globina, por ejemplo, los inhibidores del gen HBF/HBG1 de la presente divulgación inhiben efectivamente la actividad de la globina, por ejemplo, la proteína de HBF/HBG1, o inhiben la expresión de la globina, por ejemplo, la proteína de HBF/HBG1. En un aspecto, la actividad o expresión del HBF/HBG1 en un animal se inhibe aproximadamente el 10%. Preferentemente, la actividad o expresión del HBF/HBG1 en un animal se inhibe aproximadamente el 30 %. Más preferentemente, la actividad o expresión del HBF/HBG1 en un animal se inhibe el 50 % o más. De este modo, los compuestos oligoméricos modulan la expresión del ARNm del gen HBF/HBG1 al menos el 10 %, al menos el 20 %, 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 %.
- 15 Por ejemplo, la reducción de la expresión del HBF/HBG1 puede medirse en suero, 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 la proteína del gen HBF/HBG1.
- 20 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**

- 25 Otra modificación de los oligonucleótidos de la divulgación implica enlazar químicamente al oligonucleótido uno o más restos o conjugados, que potencian la actividad, distribución celular o captación celular del oligonucleótido. Estos restos o conjugados pueden comprender grupos conjugados covalentemente unidos a grupos funcionales tales como grupos hidroxilo primarios o secundarios. Los grupos conjugados de la divulgación incluyen intercaladores, moléculas de genes indicadores, poliaminas, poliamidas, polietilenglicoles, poliéteres, grupos que potencian las propiedades farmacodinámicas de oligómeros, y grupos que potencian las propiedades farmacocinéticas de oligómeros. Grupos conjugados típicos incluyen colesterolos, 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 desvelan en la solicitud de patente internacional n.º PCT/US92/09196, presentada el 23 de octubre de 1992, y la Pat. de los EE. UU. n.º 6.287.860.
- 30 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, suprofenol, fenbufeno, ketoprofeno, (S)-(+)-pranoprofeno, carprofeno, dansilsarcosina, ácido 2,3,5-triyodobenzoico, ácido flufenámico, ácido folínico, una benzotiadiazida, clorotiazida, una diazepina, indometacina, un barbitúrico, una cefalosporina, un fármaco sulfa, un antidiabético, un antibacteriano o un antibiótico.
- 35 40 45 50 Las patentes representativas de los Estados Unidos que enseñan la preparación de estos conjugados de oligonucleótido incluyen, pero no se limitan a, las Pat. de los EE. UU. 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; 55 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**

60

- Los compuestos de la divulgación también pueden mezclarse, encapsularse, conjugarse o asociarse de otro modo a otras moléculas, estructuras de molécula o mezclas de compuestos, como, por ejemplo, liposomas, moléculas dirigidas a receptor, formulaciones orales, rectales, tópica u otras, para ayudar en la captación, distribución y/o absorción. Las patentes representativas de los Estados Unidos que enseñan la preparación de estas formulaciones
- 5 de ayuda en la captación, distribución y/o absorción incluyen, pero no se limitan a, las Pat. de los EE. UU. nos. 5.108.921; 5.354.844; 5.416.016; 5.459.127; 5.521.291; 5.543.158; 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.
- 10 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.
- 15 En un aspecto, la práctica de la divulgación implica administrar al menos uno de los oligonucleótidos antisentido anteriores con un sistema de administración de ácidos nucleicos adecuado. En un aspecto, ese sistema incluye un vector no viral enlazado operativamente al polinucleótido. Ejemplos de dichos vectores no virales incluyen el oligonucleótido solo (por ejemplo, una cualquiera o más de las SEQ ID NO: 1 a 5) o en combinación con una
- 20 formulación de proteína, polisacárido o lípido adecuada.
- Sistemas de administración de ácidos nucleicos adecuados adicionales incluyen vector viral, normalmente secuencia de al menos uno de un adenovirus, virus asociado a adenovirus (AAV), adenovirus dependiente de cooperador, retrovirus, o complejo de virus hemaglutinante de Japón-liposoma (HVJ). Preferentemente, el vector viral comprende
- 25 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
- 30 HIV preferido comprende al menos dos vectores donde 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., J. Neurochem, 64: 487 (1995); Lim, F., et al., en DNA Cloning: Mammalian Systems, D. Glover, Ed. (Oxford Univ. Press, Oxford England) (1995); Geller, A.I. et al., Proc Natl. Acad Sci.: U.S.A.:90 7603 (1993); Geller,
- 35 A.I., et al., Proc Natl. Acad Sci USA: 87:1149 (1990)], Adenovirus Vectors [LeGal LaSalle et al., Science, 259:988 (1993); Davidson, et al., Nat. Genet. 3: 219 (1993); Yang, et al., J. Virol. 69: 2004 (1995)] y Adeno-associated Virus Vectors [Kapliitt, M.G., et al., Nat. Genet. 8:148 (1994)].
- Los compuestos antisentido de la divulgación engloban cualquier sal, éster o sal de dichos ésteres
- 40 farmacéuticamente aceptables, o cualquier otro compuesto que, tras la administración a un animal, que incluye un ser humano, es capaz de proporcionar (directa o indirectamente) el metabolito biológicamente activo o residuo del mismo.
- La expresión "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales fisiológicamente y farmacéuticamente
- 45 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 Pat. de los EE.UU. n.º 6.287.860.
- 50 La presente divulgación también incluye composiciones y formulaciones farmacéuticas que incluyen los compuestos antisentido de la divulgación. Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación pueden administrarse en varias formas que dependen de si se desea tratamiento local o sistémico y del área que va a tratarse. La administración puede ser tópica (incluyendo oftálmica y a membranas mucosas que incluyen administración vaginal y rectal), pulmonar, por ejemplo, por inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, que incluye por nebulizador;
- 55 intratraqueal, intranasal, epidérmica y transdérmica), oral o parenteral. La administración parenteral incluye inyección o infusión intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular; o administración intracraneal, por ejemplo, intratecal o intraventricular. Se cree que los oligonucleótidos con al menos una modificación de 2'-O-metoxietilo son particularmente útiles para administración por vía oral. Composiciones y formulaciones farmacéuticas para administración tópica pueden comprender parches transdérmicos, pomadas, lociones, cremas, geles, gotas,
- 60 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.

5 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.

10 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  
15 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  
20 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 [ ] además de Las emul  
25 las fases dispersas, y el fármaco activo que puede estar presente como una solución en o bien la fase acuosa, fase oleosa o bien él mismo como una fase independiente. Las microemulsiones están incluidas como un aspecto de la presente divulgación. Las emulsiones y sus usos son muy conocidos en la técnica y se describen adicionalmente en la Pat. de EE. UU. n.º 6.287.860.

30 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 anfífilos 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  
35 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.

Los liposomas también incluyen liposomas "estéricamente estabilizados", una expresión que, tal como se usa en el  
40 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).  
45 Los liposomas y sus usos se describen adicionalmente en la Pat. de EE. UU. n.º 6.287.860.

Las formulaciones y composiciones farmacéuticas de la presente divulgación también pueden comprender tensioactivos. El uso de tensioactivos en medicamentos, formulaciones y en emulsiones es muy conocido en la  
técnica. Los agentes tensioactivos y sus usos se describen adicionalmente en la Pat. de los EE. UU. n.º 6.287.860.

50 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  
55 una de cinco amplias categorías, es decir, tensioactivos, ácidos grasos, sales biliares, agentes quelantes y no tensioactivos no quelantes. Los mejoradores de penetración y sus usos se describen adicionalmente en la Pat. de los EE. UU. n.º 6.287.860.

Un experto en la materia reconocerá que las formulaciones se diseñan rutinariamente según su uso previsto, es  
60 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 5 neutros (por ejemplo, dioleoil-fosfatidiletanolamina DOPE, dimiristoilfosfatidilcolina DMPC, diestearoilfosfatidilcolina) negativos (por ejemplo, dimiristoilfosfatidilglicerol DMPG) y catiónicos (por ejemplo, dioleiltetrametilaminopropilo DOTAP y dioleoil-fosfatidiletanolamina DOTMA).

Para administración tópica u otra, los oligonucleótidos de la divulgación pueden encapsularse dentro de liposomas o 10 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 Pat. de los EE. UU. n.º 6.287.860.

15 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 minicompriados. 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, 20 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 Pat. de los EE. UU. n.º 6.287.860.

También se prefieren combinaciones de potenciadores de la penetración, por ejemplo, ácidos grasos/sales en 25 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 Pat. de los EE. UU. n.º 6.287.860.

30 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

35 Ciertos aspectos de la divulgación proporcionan composiciones farmacéuticas que contienen uno o más compuestos oligoméricos y uno o más de otros agentes quimioterapéuticos que funcionan por un mecanismo no antisentido. Ejemplos de dichos agentes quimioterapéuticos incluyen, aunque no se limitan a, fármacos quimioterapéuticos para el cáncer tales como daunorrubicina, daunomicina, dactinomomicina, doxorubicina, epirubicina, idarubicina, 40 esorubicina, bleomicina, mafosfamida, ifosfamida, citosina arabinósido, biscloroetil-nitrosurea, busulfano, mitomicina C, actinomicina D, mitramicina, prednisona, hidroxiprogesterona, testosterona, tamoxifeno, dacarbazina, procarbazona, hexametilmelamina, pentametilmelamina, mitoxantrona, amsacrina, clorambucilo, metilciclohexilnitrosurea, mostazas de nitrógeno, melfalan, ciclofosfamida, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-azacitidina, hidroxiaurea, desoxicoformicina, 4-hidroxiperóxido-ciclofosforamida, 5-fluorouracilo (5-FU), 5- 45 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 50 ejemplo, 5-FU, MTX y oligonucleótido, o 5-FU, radioterapia y oligonucleótido). Fármacos antiinflamatorios, que incluyen, aunque no se limitan a, fármacos antiinflamatorios no esteroideos y corticosteroides, y fármacos antivirales, que incluyen, aunque no se limitan a, ribivirina, vidarabina, aciclovir y ganciclovir, también pueden combinarse en composiciones de la divulgación. 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 55 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 un HBF 60 diana, 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 HBF. 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.

5

*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 EC<sub>50s</sub> 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.

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

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

30

## EJEMPLOS

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

35

### **Ejemplos 1: Modulación de polinucleótidos de globina**

#### 40 **Materiales y procedimientos:**

*Tratamiento de células HepG2 con oligonucleótidos antisentido:* Se cultivaron células HepG2 de ATCC (nº de cat HB-8065) en medio de cultivo [MEM/EBSS (Hyclone nº de cat SH30024, o Mediatech nº de cat MT-10-010-CV) +10 % FBS (Mediatech nº de cat MT35-011-CV)+ penicilina/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> células/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.

45

Todos los oligonucleótidos de ARN se diluyeron 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 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.

50

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 de ARN, 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.

55

Se añadieron 600 ng de ARN a la reacción de transcripción inversa realizada usando el kit de ADNc Verso de

60

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. 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 15 min) usando el termociclador Mx4000 (Stratagene). El cambio de veces en la expresión génica después del tratamiento con oligonucleótidos de ARN se calculó basándose en la diferencia de valores de dCt normalizados contra 18S entre las muestras tratadas y las transfectadas de forma simulada.

**Resultados:**

10

Los resultados de PCR en tiempo real muestran que los niveles de ARNm del HBF en células HepG2 se incrementan significativamente 48 h después del tratamiento con dos de los oligonucleótidos diseñados para Hs.702397 antisentido de HBF (Figura 1).

15 Nombre del gen: HBF/HBG1 (Número de acceso: NM\_000559):

ACACTCGCTTCTGGAACGTCTGAGGTTATCAATAAGCTCCTAGTCCAGAC  
 GCCATGGGTCATTTACAGAGGAGGACAAGGCTACTATCACAAGCCTGTGGGGCAA  
 GGTGAATGTGGAAGATGCTGGAGGAGAAACCCTGGGAAGgtaggctctggtgaccaggacaaggg  
 agggaaggaaggaccctgtgcctggcaaaagtcaggctgcctctcaggattgtggcacctctgactgcaaacgtttctgcaatcicac  
 agGCTCCTGGTTGTCTACCCATGGACCCAGAGGTTCTTTGACAGCTTTGGCAACCTGT  
 CCTCTGCCCTCTGCCATCATGGGCAACCCCAAAGTCAAGGCACATGGCAAGAAGGTG  
 CTGACTTCCTTGGGAGATGCCACAAAGCACCTGGATGATCTCAAGGGCACCTTTGCC  
 CAGCTGAGTGAAGTGCACACTGTGACAAGCTGCATGTGGATCCTGAGAACTTCAAGgtga  
 gtccaggagatgttcagccctgtgaccttagctcaggcaactagacaacggagtattgatctgagcagcaggggtgagctgtttga  
 agatactgggggtgggggtgaagaactgcagaggactaactgggctgagaccagtggaatgttttagggcctaaggagtgccctaaa  
 aatclagatggacaatttgactttgagaaaagagagggtggaatgaggaaaatgacitttcittattagattccagtagaagaactttcatcitt  
 cccctattttgttttaaacatctatctggaggcaggacaagtatgtctgtaaaaagatgcaggcagaaggcatatattgctcagtc  
 agtggggaactttggtggccaacatacattgctaaggctaticctatcagctggacacatataaaatgctgctaattgcttcattacaactta  
 taiccttaattccagatgggggcaaaatgatgtccagggtgaggaacaattgaaacattgggctggagtagattttaaagtcagctctgtg  
 tgtgtgtgtgtgtgcgcgcgcgtgtgtgtgtgtgtcagcgtgtgtttcitttaacgtctcagcctacaacatacagggttcagtggtgc  
 aagaagalagcaagatttaattatgcccagtgactagtgtgtaagggaacaactacctgcatttaagggaaggcaaaatctcaggcttt  
 gaggggaagtaacataggttgattctgggtggaagcttgggtgtgtgtatctggaggccaggtgagcctcagctcactatgggttc  
 cttattgtctcttcacccaacagCTCCTGGGAAATGTGCTGGTGACCGTTTTGGCAATCCAATTC  
 GGCAAAGAAATCACCCCTGAGGTGCAGGCTTCCTGGCAGAAGATGGTACTGCAGT  
 GGCCAGTGCCCTGTCTCCAGATAACCACTGAGCTCACTGCCCATGATTCAGAGCTTT  
 CAAGGATAGGCTTTATTCTGCAAGCAATACAAATAATAAATCTATTCTGCTGAGAGA  
 TCAC (SEQ ID NO: 1).

Secuencia antisentido natural (Hs.702397):

20

GATTTATTAT TTGTATTGCT TGCAGAATAA AGCCTATCCT TGAAAGCTCT 50  
 GA<sub>n</sub>TCATGGG CAGTGAGCTC AGTGG<sub>n</sub>ATCT GG<sub>n</sub>GG<sub>n</sub>CAGG GCACTGGCCA 100  
 CTGCAGTCAC CATCTTCTGC CAGG<sub>gn</sub>GCCT GCACCTCAGG GGTGA<sub>n</sub>TTCT 150  
 TTGCCGA<sub>n</sub>T GG<sub>n</sub>TTGCCAA A<sub>n</sub>CGGTCACC AGCACATTTT CCAGG<sub>gg</sub>CCTT 200  
 GAAGTTTCTCA GG<sub>n</sub>TCCACAT GCAGCTTGTG ACAGTGCAGT TCACTCAGCT 250  
 GGGCAAAGGT GCC<sub>n</sub>TTGAGA TCATCC<sub>g</sub>GG<sub>n</sub> GCTTTGTGG<sub>g</sub> nTCTCCC<sub>n</sub>AG 300  
 G<sub>gn</sub>GTCAG<sub>n</sub>A CCTTCTTGCC ATGTGCCTTG nCTTTGGGG<sub>g</sub> TTGCCC<sub>ctgn</sub> 350  
 tgggcag (SEQ ID NO: 2).

*Oligonucleótidos antisentido:*

5 HBF Hs.702397\_3 (SEQ ID NO: 3):

5'-rGrUrC rArArG rGrCrA rCrArU rGrGrC rArArG rArArG rGrUrG rCrUrG-3'  
 5'-rGrCrA rCrCrU rUrCrU rUrGrC rCrArU rGrUrG rCrCrU rUrGA C-3'

HBF Hs.702397\_2 (SEQ ID NO: 4):

10

5'-rCrCrU rGrGrC rArGrA rArGrA rUrGrG rUrGrA rCrUrG rCrArG rUrGrG-3'  
 5'-rArCrU rGrCrA rGrUrC rArCrC rArUrC rUrUrC rUrGrC rCrAG G-3'

HBF Hs.702397\_1 (SEQ ID NO: 5):

15

5'-rCrUrU rUrCrA rArGrG rArUrA rGrGrC rUrUrU rArUrU rCrUrG rCrArA-3'  
 5'-rGrCrA rGrArA rUrArA rArGrC rCrUrA rUrCrC rUrUrG rArAA G-3'

*Sondas de detección:* Ensayo de expresión génica Taqman de ABI: Hs00361131\_g1.

## REIVINDICACIONES

1. Un oligonucleótido que se dirige a un transcrito antisentido natural de globina para uso como un compuesto terapéutico, donde el oligonucleótido aumenta la expresión de globina y donde el transcrito antisentido natural tiene la secuencia de ácido nucleico tal como se expone en la SEQ ID NO: 2.
2. Un oligonucleótido que se dirige a un transcrito antisentido natural de globina para uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado a la globina, donde dicho oligonucleótido aumenta la expresión de globina y donde el transcrito antisentido natural tiene la secuencia de ácido nucleico tal como se expone en la SEQ ID NO: 2.
3. Uso de un oligonucleótido que se dirige a un transcrito antisentido natural de globina para la fabricación de un medicamento para uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad o afección asociada a la globina, donde dicho oligonucleótido aumenta la expresión de globina y donde el transcrito antisentido natural tiene la secuencia de ácido nucleico tal como se expone en la SEQ ID NO: 2.
4. Uso de acuerdo con la reivindicación 3 o el oligonucleótido para uso de acuerdo con la reivindicación 2, donde la enfermedad o trastorno se selecciona de entre el grupo constituido por talasemia, enfermedad de células falciformes, anemia perniciosa y otros tipos de anemia.
5. Un oligonucleótido que se dirige a un transcrito antisentido natural de globina, donde el oligonucleótido aumenta la expresión de globina, y donde el transcrito antisentido natural tiene la secuencia de ácido nucleico tal como se expone en una de las SEQ ID NO: 2.
6. Uso de acuerdo con la reivindicación 3 o la reivindicación 4, o un oligonucleótido para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 4, o el oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 5, donde el oligonucleótido es de entre 10 a 30 nucleótidos de longitud.
7. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3, 4 ó 6, o el oligonucleótido para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4 o 6, o el oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 5 o la reivindicación 6, donde el oligonucleótido tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con un complemento de un transcrito antisentido natural de globina.
8. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3, 4, 6 o 7, o el oligonucleótido para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4, 6 o 7 o el oligonucleótido de acuerdo con las reivindicaciones 5 a 7, donde el oligonucleótido es monocatenario.
9. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3, 4, 6 o 7, o el oligonucleótido para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4, 6 o 7, o el oligonucleótido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, donde el oligonucleótido es un compuesto de siRNA.
10. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3, 4 o 6 a 9, o un oligonucleótido para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4 o 6 a 9, o el oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, donde el oligonucleótido comprende la SEQ ID NO: 5.
11. Uso de acuerdo con la reivindicación 9, o el oligonucleótido para uso de acuerdo con la reivindicación 9, o el oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 9, donde el compuesto de siRNA comprende al menos un oligonucleótido que comprende la SEQ ID NO: 5 y una secuencia complemento inversa de dicho oligonucleótido que comprende GCAGAAUAAAGCCUAUCCUUGAAAG.
12. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3, 4 o 6 a 11, o un oligonucleótido para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4 o 6 a 11, o el oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 11, donde el oligonucleótido comprende además una o más modificaciones que comprenden:
- un resto de azúcar modificado seleccionado que comprende 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, o un resto de azúcar bicíclico;
  - un enlace internucleosídico modificado seleccionado que comprende un fosforotioato, alquilfosfonato,

fosforoditioato, alquilfosfonotioato, fosforamidato, carbamato, carbonato, triéster de fosfato, acetamidato, éster carboximetílico y/o combinaciones de los mismos; o

c. al menos una nucleobase modificada que comprende ácidos nucleicos peptídicos (PNA), moléculas de ácido nucleico bloqueado (LNA), análogos o derivados de los mismos, y/o combinaciones de ellos.

13. Una composición farmacéutica que comprende al menos un oligonucleótido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 12, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

10

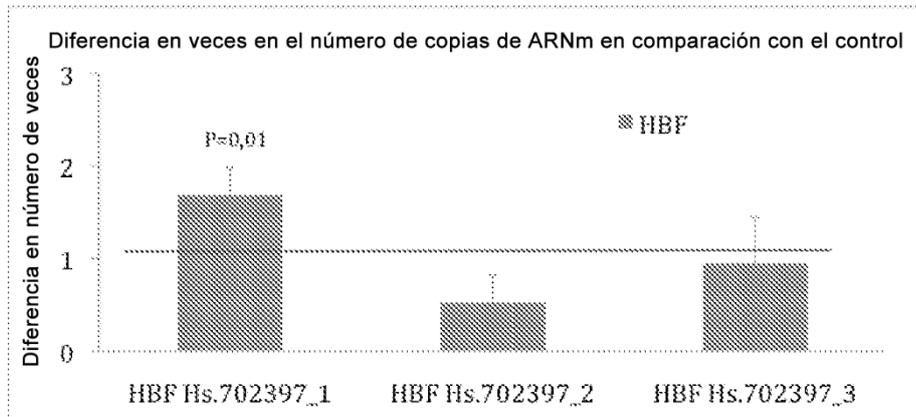


FIGURA 1