

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 661 813**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

C12N 15/57 (2006.01)

C12N 9/48 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.12.2010 PCT/US2010/060452**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.07.2011 WO11084455**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.12.2010 E 10842521 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.11.2017 EP 2513310**

54 Título: **Tratamiento de enfermedades relacionadas con la peptidasa del factor de transcripción de membrana, sitio 1 (mbtps1) mediante inhibición del transcrito antisentido natural al gen mbtps1**

30 Prioridad:
16.12.2009 US 286924 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 y
KHORKOVA SHERMAN, OLGA**

74 Agente/Representante:
PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 661 813 T3

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

DESCRIPCIÓN

Tratamiento de enfermedades relacionadas con la peptidasa del factor de transcripción de membrana, sitio 1 (mbtps1) mediante inhibición del transcrito antisentido natural al gen mbtps1.

5

CAMPO DE LA DIVULGACIÓN

La presente solicitud reivindica la prioridad de la solicitud de patente provisional de Estados Unidos Nº 61/286924, presentada el 16 de diciembre de 2009.

10

Las realizaciones de la invención comprenden oligonucleótidos que modulan la expresión y/o la función de MBTPS1 y moléculas asociadas.

ANTECEDENTES

15

La hibridación ADN-ARN y ARN-ARN son importantes para muchos aspectos de la función del ácido nucleico incluyendo replicación, transcripción y traducción del ADN. La hibridación también es fundamental para una variedad de tecnologías que tanto detectan un ácido nucleico particular como alteran su expresión. Los nucleótidos antisentido, por ejemplo, alteran la expresión génica hibridándose con ARN diana, interfiriendo así con el splicing, la transcripción, la traducción y la replicación de ARN. El ADN antisentido tiene la característica añadida de que los híbridos de ADN-ARN sirven de sustrato para la digestión por ribonucleasa H, una actividad que está presente en la mayoría de los tipos de células. Las moléculas antisentido pueden suministrarse al interior de células, como es el caso para oligodesoxinucleótidos (ODN), o pueden expresarse a partir de genes endógenos como moléculas de ARN. La FDA aprobó recientemente un fármaco antisentido, VITRAVENE™ (para el tratamiento de la retinitis por citomegalovirus), donde se refleja que el antisentido tiene una utilidad terapéutica. WO 00/26348 describe la subtilisina de mamífero/isoenzima kexina SKI-1, una convertasa de proteína con una especificidad de escisión única. WO 00/09677 describe la proteasa de sitio 1 regulada por esterol y ensayos de moduladores del mismo. Xu y col. Según (Nat. Cel. Biol. 6(11):1129-1134), el óxido nítrico induce el acoplamiento de la señalización mitocondrial con la respuesta a estrés del retículo endoplásmico.

20

25

30

SUMARIO

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

35

El Sumario se ofrece a modo de resumen de la divulgación con fin de indicar brevemente la naturaleza y fundamentos de la misma. Se presenta con la comprensión de que no se usará para interpretar o limitar el alcance o el significado de las reivindicaciones.

40

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

45

Un aspecto proporciona un procedimiento de modulación de la función y/o la expresión de un polinucleótido de MBTPS1 en células o tejidos del paciente *in vivo* o *in vitro* que comprende poner en contacto dichas células o tejidos con un oligonucleótido antisentido de 5 a 30 nucleótidos de longitud donde dicho oligonucleótido tiene al menos un 50 % de identidad de secuencia con un complemento inverso de un polinucleótido que comprende de 5 a 30 nucleótidos consecutivos dentro de los nucleótidos 1 a 1240 de la SEQ ID NO: 2 modulando de este modo la función y/o la expresión del polinucleótido de MBTPS1 en células o tejidos del paciente *in vivo* o *in vitro*.

50

En otro aspecto, un oligonucleótido se dirige a una secuencia antisentido natural de polinucleótidos de MBTPS1, por ejemplo, nucleótidos expuestos en la SEQ ID NO: 2, y cualquier variante, alelo, homólogo, mutante, derivado, fragmento y secuencia complementaria a los mismos. Ejemplos de oligonucleótidos antisentido se exponen como las SEQ ID NOS: 3 a 6.

55

Otro aspecto proporciona un procedimiento de modulación de la función y/o la expresión de un polinucleótido de MBTPS I en células o tejidos del paciente *in vivo* o *in vitro* que comprende poner en contacto dichas células o tejidos con un oligonucleótido antisentido de 5 a 30 nucleótidos de longitud donde dicho oligonucleótido tiene al menos un

60

50 % de identidad de secuencia con un complemento inverso del un antisentido del polinucleótido de MBTPS1; modulando de este modo la función y/o la expresión del polinucleótido de MBTPS1 en células o tejidos del paciente in vivo o in vitro.

5 Otro aspecto: proporciona un procedimiento de modulación de la función y/o la expresión de un polinucleótido de MBTPS1 en células o tejidos del paciente in vivo o in vitro que comprende poner en contacto dichas células o tejidos con un oligonucleótido antisentido de 5 a 30 nucleótidos de longitud donde dicho oligonucleótido tiene al menos un 50 % de identidad de secuencia con un oligonucleótido antisentido para un polinucleótido antisentido de MBTPS1; modulando de este modo la función y/o la expresión del polinucleótido del MBTPS1 en células o tejidos del paciente
10 in vivo o in vitro.

En un aspecto, una composición comprende uno o más oligonucleótidos antisentido que se unen a polinucleótidos de MBTPS1 sentido y/o antisentido.

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

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

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

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

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

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

35 Otros aspectos se describen más adelante.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 es un gráfico de resultados de PCR en tiempo real que muestra el cambio en veces en ARNm de
40 MBTPS1 + desviación estándar después del tratamiento de células HcpG2 con oligonucleótidos de fosforotioato introducidos usando Lipofectamine 2000, en comparación con el control. Los resultados de PCR en tiempo real muestran que los niveles de ARNm de MBTPS1 en células HcpG2 se aumentan significativamente 48 h después del tratamiento con uno de los oligonucleótidos diseñados para MBTPS1 antisentido Hs.568369. Las barras indicadas como CUR-1317, CUR-1315, CUR-1316 y CUR-1318 corresponden a muestras tratadas con las SEQ ID NOS: 3 a 6
45 respectivamente.

Descripción del listado de secuencias: SEQ ID NO: 1: peptidasa del factor de transcripción de membrana de Homo Sapiens, sitio 1 (MBTPS1), ARNm. (Nº de acceso del NCBI: NM_003791); SEQ ID NO: 2: secuencia antisentido natural de MBTPS1 (Hs.568369); SEQ ID NO: 3 a 6. Oligonucleótidos antisentido. * indica enlace fosfotioato.

50

DESCRIPCIÓN DETALLADA

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

Todos los genes, nombres de genes y productos génicos divulgados en el presente documento pretenden corresponderse a homólogos de cualquier especie para la cual las composiciones y procedimientos divulgados en el presente documento son aplicables. De este modo, los términos incluyen, entre otros, genes y productos génicos de seres humanos y ratones. Se entiende que cuando se divulga un gen o producto génico de una especie particular, esta divulgación pretende ser meramente ejemplar, y no se interpreta como una limitación a menos que el contexto en el que aparece lo indique claramente. De este modo, por ejemplo, para los genes divulgados en el presente documento que en algunos aspectos se refieren a secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos de mamífero pretenden englobar genes homólogos y/u ortólogos y productos génicos de otros animales que incluyen, entre otros, a otros mamíferos, peces, anfibios, reptiles y aves. En aspectos, los genes o secuencias de ácidos nucleicos son humanos.

Definiciones

15 La terminología usada en el presente documento tiene como fin el de describir solamente aspectos particulares y no pretende ser limitante de la divulgación. Tal como se usan en el presente documento, se pretende que las formas en singular "un", "una", "el" y "la" incluyan también las formas plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Además, siempre que las expresiones "que incluye", "incluye", "que tiene", "tiene", "con" o variantes de las mismas se usan en la descripción detallada y/o las reivindicaciones, dichas expresiones pretenden ser inclusivas de una manera similar a la expresión "que comprende."

25 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, de las limitaciones del sistema de medición. Por ejemplo, "aproximadamente" puede significar 1 o más de 1 de desviación estándar, conforme a la práctica de la técnica. Alternativamente, "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. Alternativamente, en particular con respecto a los sistemas o procesos biológicos, el término pueden significar un orden de magnitud de un valor, preferentemente comprendido en 5 veces, y más preferentemente comprendido en 2 veces. En los casos en los que se describen valores particulares en la solicitud y las reivindicaciones, a menos que se exprese lo contrario el término "aproximadamente" 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 el presente documento, el término "ARNm" significa el/los transcrito(s) de ARNm actualmente conocido(s) de un gen elegido como diana, y cualquier transcrito adicional que pueda ser dilucidado.

40 Por "oligonucleótidos antisentido" o "compuesto antisentido" se indica una molécula de ARN o de ADN que se une a otro ARN o ADN (ARN, ADN diana). Por ejemplo, si éste es un oligonucleótido de ARN, se une a otra diana de ARN por medio de interacciones ARN-ARN y altera la actividad del ARN diana (Eguchi y col., (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 incluir cualquier molécula de ARN o ADN extraña que sea útil desde un punto de vista terapéutico, de diagnóstico u otra índole. Dichas moléculas incluyen, por ejemplo, moléculas de ARN o ADN antisentido, ARN de interferencia (ARNi), micro ARN, moléculas de ARN señuelo, siRNA, ARN enzimático, ARN de edición terapéutica y ARN agonista y antagonista, compuestos oligoméricos antisentido, oligonucleótidos antisentido, oligonucleótidos de secuencia guía externa (EGS), agentes de splicing alternativos, cebadores, sondas y otros compuestos oligoméricos que hibridan con al menos una parte del ácido nucleico diana. Por lo tanto, estos compuestos pueden introducirse en forma de compuestos oligoméricos monocatenarios, bicatenarios, parcialmente monocatenarios, o circulares.

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

60 El oligonucleótido puede ser "quimérico", es decir, estar compuesto de diferentes regiones. En el contexto de esta divulgación los compuestos "quiméricos" son oligonucleótidos, que contienen dos o más regiones químicas, por

ejemplo, una o más regiones de ADN, una o más regiones de ARN, una o más regiones de PNA, etc. Cada región química está formada 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, entre otras, por ejemplo, resistencia incrementada a la degradación por nucleasas, captación celular incrementada, y/o afinidad de unión incrementada para el ácido nucleico diana. 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 por 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 usan en el presente documento, "MBTPS1" y "peptidasa del factor de transmisión de membrana, sitio I" incluyen todos los miembros de la familia, mutantes, alelos, fragmentos, especies, secuencias codificantes y no codificantes, hebras de polinucleótidos sentido y antisentido, etc.

Tal como se usan en el presente documento, las palabras peptidasa del factor de transmisión de membrana, sitio 1; MBTPS1, KIAA0091, proteasa de sitio 1 del factor de transmisión de membrana, MGC138711, MGC138712, PCSK8, SIP, endopeptidasa SIP. proteasa de sitio 1, SK11, SKI-1, subtilisina/isoenzima kexina 1, son intercambiables en la presente solicitud.

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

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

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

aproximadamente 40 nt, aproximadamente 5 a aproximadamente 30 nt, aproximadamente 10 a aproximadamente 30 nt, aproximadamente 15 a aproximadamente 25 nt, o aproximadamente 20-25 nucleótidos.

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

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

Por "ARN señuelo" se indica una molécula de ARN que imita el dominio de unión natural para un ligando. El ARN señuelo compete, por lo tanto, con la diana de unión natural para la unión de un ligando específico. Por ejemplo, se ha mostrado que la sobreexpresión de ARN de respuesta de activación en trans (TAR) de HIV puede actuar como un "señuelo" y se une de forma eficiente a la proteína tat de HIV, impidiendo de este modo que se una a secuencias TAR codificadas por el ARN de HIV (Sullenger y col. (1990) *Cell*, 63, 601- 608). Esto se indica que es un ejemplo específico. Los expertos en la materia reconocerán que esto es solo un ejemplo, y fácilmente pueden generarse otros aspectos usando técnicas generalmente conocidas en la técnica.

Tal como se usa en el presente documento, el término "monómeros" normalmente indica monómeros enlazados por enlaces fosfodiéster o análogos de los mismos para formar oligonucleótidos que varían en tamaño entre unas pocas unidades monoméricas, por ejemplo, entre aproximadamente 3-4, y aproximadamente varios cientos de unidades monoméricas. Los análogos de enlaces fosfodiéster incluyen: fosforotioato, fosforoditioato, metilfosfonatos, fosforoselenoato, fosforamidoato y similares, tal como se describe más completamente más adelante.

El término "nucleótido" cubre nucleótidos de origen natural, así como nucleótidos no de origen natural. Debe ser evidente para el experto en la materia que diversos nucleótidos que se consideraron anteriormente "no de origen natural" se han descubierto posteriormente en la naturaleza. De este modo, "nucleótidos" incluye no solamente las moléculas que contienen heterociclos de purina y pirimidina conocidas, sino también análogos heterocíclicos y tautómeros de las mismas. Ejemplos ilustrativos de otros tipos de nucleótidos son moléculas que contienen adenina, guanina, timina, citosina, uracilo, purina, xantina, diaminopurina, 8-oxo- N6-metiladenina, 7-deazaxantina, 7-deazaguanina, N4,N4-etanocitosina, N6,N6-etano-2,6- diaminopurina, 5-metilcitosina, 5-alquilil(C3-C6)-citosina, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, pseudoisocitosina, 2-hidroxi-5-metil-4-triazolopiridina, isocitosina, isoguanina, inosina y los nucleótidos "no de origen natural" descritos en Benner y col., patente de EE.UU. Nº 5,432,272. El término "nucleótido" pretende cubrir todos y cada uno de estos ejemplos, además de análogos y tautómeros de los mismos. Nucleótidos especialmente interesantes son aquellos que contienen adenina, guanina, timina, citosina y uracilo, que se consideran como los nucleótidos de origen natural en relación con la aplicación terapéutica y diagnóstica en seres humanos. Los nucleótidos incluyen los azúcares naturales 2'-desoxi y 2'-hidroxilo, por ejemplo, como se describe en Kornberg and Baker, *DNA Replication*, 2nd Ed. (Freeman, San Francisco, 1992) , además de sus análogos.

"Análogos" en referencia a nucleótidos, incluye nucleótidos sintéticos que tienen restos de bases modificados y/o restos de azúcar modificados (véase, por ejemplo, descrito generalmente por Scheit, *Nucleotide Analogs*, John Wiley, Nueva York, 1980; Freier & Altmann, (1997) *Nucl. Acid. Res.*, 25(22), 4429- 4443, Toulmé, J.J., (2001) *Nature Biotechnology* 19:17-18; Manoharan M., (1999) *Biochemica et Biophysica Acta* 1489:117-139; Freier S. M., (1997) *Nucleic Acid Research*, 25:4429-4443, Uhlman, E., (2000) *Drug Discovery & Development*, 3:203-213, Hcrdewin P., (2000) *Antisense & Nucleic Acid Drug Dev.*, 10:297-310); 2'-O, 3'-C-enlazados [3.2.0] biciclorabinonucleósidos (véase, por ejemplo, N. K Christensen., y col., (1998) *J. Am. Chem. Soc.*, 120: 5458-546; Prakash TP, Bhat B.

(2007) Curr Top Med Chem. 7(7):641-9; Cho EJ, y col. (2009) Annual Review of Analytical Chemistry, 2, 241-264). Dichos análogos incluyen nucleótidos sintéticos diseñados para potenciar propiedades de unión, por ejemplo, la estabilidad especificidad del dúplex o el tríplex, o similares.

5 Tal como se usa en el presente documento, "hibridación" significa el apareamiento de cadenas sustancialmente complementarias de compuestos oligoméricos. Un mecanismo de apareamiento implica la formación de puentes de hidrógeno, que pueden ser puentes de hidrógeno de Watson-Crick, Hoögsteen o de Hoögsteen inverso, entre bases de nucleósidos o de nucleótidos (nucleótidos) complementarias de las cadenas de compuestos oligoméricos. Por ejemplo, la adenina y la timina son nucleótidos complementarios que se aparean mediante la formación de puentes
10 de hidrógeno. La hibridación puede producirse en circunstancias variables.

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

Tal como se usa en el presente documento, la frase "condiciones de hibridación astringentes" o "condiciones
20 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
25 condiciones de hibridación astringentes comprenden bajas concentraciones (<0,15 M) de sales con cationes inorgánicos tales como Na⁺⁺ o K⁺⁺ (es decir, baja fuerza iónica), temperatura superior a 20 °C - 25 °C por debajo de la T_m del complejo de compuesto oligomérico: secuencia diana, y la presencia de desnaturalizantes tales como formamida, dimetilformamida, dimetilsulfóxido, o el detergente dodecilsulfato de sodio (SDS). Por ejemplo, la tasa de hibridación disminuye un 1,1% por cada 1% de formamida. Un ejemplo de una condición de hibridación de alta
30 astringencia es 0,1X tampón cloruro sódico-citrato sódico (SSC)/0,1 % (peso/volumen) de SDS a 60 °C durante 30 minutos.

"Complementario", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad de apareamiento preciso entre dos nucleótidos en una o dos cadenas oligoméricas. Por ejemplo, si una nucleobase en cierta posición de un
35 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
40 ocupadas por nucleótidos que pueden formar puentes de hidrógeno entre sí. De este modo, "específicamente hibridable" y "complementario" son términos que se usan para indicar un grado suficiente de apareamiento preciso o complementariedad sobre un número suficiente de nucleótidos de modo que se produzca unión estable y específica entre el compuesto oligomérico y un ácido nucleico diana.

45 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
50 70 %, o al menos aproximadamente el 75 %, o al menos aproximadamente el 80 %, o al menos aproximadamente el 85 %, o al menos aproximadamente el 90 %, o al menos aproximadamente el 95 %, o al menos aproximadamente el 99 %, de complementariedad de secuencia con una región diana dentro de la secuencia de ácidos nucleicos diana a la que se dirigen. Por ejemplo, un compuesto antisentido en el que 18 de los 20 nucleótidos del compuesto antisentido son complementarios a una región diana y, por lo tanto, hibridarían específicamente, representaría el 90
55 por ciento de complementariedad. En este ejemplo, los nucleótidos no complementarios restantes pueden agruparse o intercalarse con nucleótidos complementarios y no necesitan ser contiguos entre sí o a nucleótidos complementarios. Por lo tanto, un compuesto antisentido que tiene 18 nucleótidos de longitud que tiene 4 (cuatro) nucleótidos no complementarios que están flanqueados por dos regiones de complementariedad completa con el ácido nucleico diana tendría el 77,8 % de complementariedad global con el ácido nucleico diana y de este modo
60 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 y col., (1990) J. Mol. Biol., 215, 403-410; Zhang y Madden, (1997) Genome Res., 7, 649-656). El porcentaje de homología, identidad de secuencias o complementariedad pueden determinarse por, por ejemplo, el programa

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

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "punto de fusión térmico (Tm)" se refiere a la temperatura,

10 bajo fuerza iónica, pH y concentración de ácido nucleico definidas, a la que el 50% de los oligonucleótidos complementarios a la secuencia diana hibridan con la secuencia diana en equilibrio. Normalmente, condiciones astringentes serán aquellas en las que la concentración de sales es la concentración de ion Na (u otras sales) de al menos aproximadamente 0,01 a 1,0 M a pH de 7,0 a 8,3 y la temperatura es al menos aproximadamente 30°C para oligonucleótidos cortos (por ejemplo, de 10 a 50 nucleótidos). También pueden lograrse condiciones astringentes

15 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.

20 El término "variante", cuando se usa en el contexto de una secuencia de polinucleótidos, puede englobar una secuencia de polinucleótidos relacionada con un gen de tipo silvestre. Esta definición también puede comprender, por ejemplo, variantes "alélicas", de "splicing", de "especie" o "polimórficas". Una variante de splicing puede tener identidad significativa con una molécula de referencia, pero generalmente tendrá un mayor o menor número de polinucleótidos debido al splicing alterno de exones durante el procesamiento de ARNm. El polipéptido

25 correspondiente puede poseer dominios funcionales adicionales o una ausencia de dominios. Las variantes de especie son secuencias de polinucleótidos que varían de una especie a otra. Son de particular utilidad en la divulgación variantes de productos génicos de tipo silvestre (wild type). Las variantes pueden resultar de al menos una mutación en la secuencia de ácidos nucleicos y pueden producir ARNm alterados o polipéptidos cuya estructura o función puede o puede no alterarse. Cualquier gen natural o recombinante dado puede tener ninguna, una o

30 muchas formas alélicas. Cambios mutacionales comunes que dan lugar a variantes se atribuyen generalmente a deleciones, adiciones o sustituciones naturales de nucleótidos. Cada uno de estos tipos de cambios puede producirse solo, o en combinación con los otros, una o más veces en una secuencia dada.

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

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

40 Los polinucleótidos derivados incluyen ácidos nucleicos sometidos a modificación química, por ejemplo, sustitución de hidrógeno por un grupo alquilo, acilo o amino. Los derivados, por ejemplo, oligonucleótidos derivados, pueden comprender partes no de origen natural, tales como restos de azúcar alterados o enlaces inter-azúcar. A modo de ejemplo, entre éstos están fosforotioato y otras especies que contienen azufre que se conocen en la técnica. Los

45 ácidos nucleicos derivados también pueden contener etiquetas, que incluyen radionucleótidos, enzimas, agentes fluorescentes, agentes quimioluminiscentes, agentes cromógenos, sustratos, cofactores, inhibidores, partículas magnéticas y similares.

Un polipéptido o péptido "derivado" es uno que se modifica, por ejemplo, por glucosilación, pegilación, fosforilación,

50 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, entre otros, un radioisótopo, etiqueta fluorescente y enzimática.

Tal como se usa en el presente documento, el término "animal" o "paciente" pretende comprender, por ejemplo,

55 seres humanos, ovejas, alces, venados, ciervos mulos, visones, mamíferos, monos, caballos, ganado vacuno, cerdos, cabras, perros, gatos, ratas, ratones, aves, pollo, reptiles, peces, insectos y arácnidos.

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

60 de solo humanos.

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

10 **Composiciones y moléculas de polinucleótidos y oligonucleótidos**

Dianas: en un aspecto, la dianas incluyen secuencias de ácido nucleico de la peptidasa del factor de transcripción de membrana, sitio 1 (MBTPS1), incluyendo, entre otros, secuencias sentido y/o antisentido no codificantes y/o codificantes asociadas con MBTPS1.

15

La proteasa de sitio I humana (SIP), también conocida ampliamente como MBTPS1 o subtilisina/isoenzima kexina 1 (SKI-1), es una proteasa serina de membrana relacionada con la subtilisina que pertenece a un grupo de nueve convertasas proproteínicas de mamíferos. De entre estas proteasas, la SIP presenta una especificidad de sustrato única en la medida en que muestra una escisión preferida tras aminoácidos no básicos. La SIP desempeña un papel fundamental en una vía proteolítica que controla el contenido en colesterol de las membranas, células y sangre. La SIP es una proteinasa Golgi que media en la activación proteolítica del precursor para proteínas de unión a elementos de respuesta a esteroides (SREBP), 1 y 2, dos factores de transcripción que regulan la expresión de una variedad de genes involucrados en la metabolización del colesterol y los lípidos.

20

25 Las enfermedades y desórdenes en los que media la peptidasa del factor de transcripción de membrana ejemplar, sitio 1 (MBTPS1), que pueden tratarse con células/tejidos regenerados a partir de células madre obtenidas por medio de compuestos antisentido, comprenden: una enfermedad o desorden asociados a la respuesta a estrés RE, una enfermedad inflamatoria del intestino (por ejemplo, colitis), una enfermedad o desorden del metabolismo, una enfermedad o desorden de la metabolización de los lípidos (por ejemplo, obesidad, diabetes, hipercolesterolemia, dislipidemia), una enfermedad o desorden asociados al mal funcionamiento de las proteínas de unión a elementos de respuesta a esteroides (SREBP), una enfermedad o desorden cardiovasculares, una fiebre hemorrágica (por ejemplo, la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo, etc.), una enfermedad o desorden hepáticos, una enfermedad o desorden asociados al desarrollo óseo endocondral (por ejemplo, condrodisplasia, apoptosis condrocítica, desorganización de la red de colágeno).

35

En un aspecto, los oligonucleótidos son específicos para polinucleótidos de MBTPS1, lo que incluye, entre otros, regiones no codificantes. Las dianas de MBTPS1 comprenden variantes de MBTPS1; mutantes de MBTPS1, incluyendo SNP; secuencias no codificantes de MBTPS1; alelos, fragmentos y similares. Preferentemente, el oligonucleótido es una molécula de ARN antisentido.

40

De acuerdo con aspectos de la divulgación, la molécula de ácido nucleico diana no está limitada a polinucleótidos de MBTPS1 en solitario, sino que se extiende a cualquiera de las isoformas, receptores, homólogos, regiones no codificantes y similares de MBTPS1

45 En un aspecto, un oligonucleótido está dirigido a una secuencia antisentido natural (antisentido natural a las regiones codificantes y no codificantes) de dianas de MBTPS1, incluyendo, sin limitación, variantes, alelos, homólogos, mutantes, derivados, fragmentos y secuencias complementarias a estos. Preferentemente el oligonucleótido es una molécula de ARN o ADN antisentido.

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

55

En un aspecto, la homología, identidad de secuencias o complementariedad, entre el compuesto antisentido y la diana es de aproximadamente el 50 % a aproximadamente el 60 %. En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencias o complementariedad es de aproximadamente el 60% a aproximadamente el 70%. En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencias o complementariedad es de aproximadamente el 70 % a aproximadamente el

60

80 %. En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencias o complementariedad es de aproximadamente el 80 % a aproximadamente el 90 %. En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencias o complementariedad es de aproximadamente el 90%, aproximadamente el 92%, aproximadamente el 94%, aproximadamente el 95%, aproximadamente el 96%, aproximadamente el 97%, aproximadamente el 98%, 5 aproximadamente el 99 % o aproximadamente el 100%.

Un compuesto antisentido es específicamente hibridable cuando la unión del compuesto al ácido nucleico diana interfiere en la función normal del ácido nucleico diana para producir una pérdida de actividad, y hay un grado de complementariedad suficiente para evitar la unión inespecífica del compuesto antisentido a secuencias de ácidos 10 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 15 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 20 de ensayos in vitro, en condiciones en las que se realizan los ensayos.

En un aspecto, la elección como diana de MBTPS1, incluyendo sin limitación, secuencias antisentido que se 25 identifican y se expanden, usando, por ejemplo, PCR, hibridación etc., una o más de las secuencias expuestas como las SEQ ID NOS: 2, y similares, modulan la expresión o función de MBTPS1. En un aspecto, la expresión o función está regulada positivamente en comparación con un control. En un aspecto, la expresión o función está regulada 25 negativamente en comparación con un control.

En un aspecto, los oligonucleótidos comprenden secuencias expuestas como las SEQ ID NOS: 3 a 6 incluyendo 30 secuencias antisentido que se identifican y expanden, usando, por ejemplo PCR, hibridación, etc. Estos oligonucleótidos pueden comprender uno o más nucleótidos modificados, fragmentos más cortos o más largos, enlaces modificados y similares. Los ejemplos de enlaces modificados o enlaces internucleotídicos comprenden fosforotioato, fosforoditioato o similares. En un aspecto, los nucleótidos comprenden un derivado de fósforo. El 35 derivado de fósforo (o grupo fosfato modificado) que puede unirse al resto de azúcar o de análogo de azúcar en los oligonucleótidos modificados de la presente divulgación puede ser un monofosfato, difosfato, trifosfato, alquilfosfato, alcanofosfato, fosforotioato y similares. La preparación de los análogos de fosfato indicados anteriormente, y su 35 incorporación en nucleótidos, nucleótidos modificados y oligonucleótidos, también es en sí conocida y no es necesario describirla aquí.

La especificidad y sensibilidad de antisentido también es empleada por los expertos en la materia para usos 40 terapéuticos. Se han empleado oligonucleótidos antisentido como restos terapéuticos en el tratamiento de patologías en animales y el ser humano. Los oligonucleótidos antisentido se han administrado con seguridad y eficazmente a seres humanos y numerosos ensayos clínicos están actualmente en marcha. De este modo, se establece que los oligonucleótidos pueden ser modalidades terapéuticas útiles que pueden configurarse para ser útiles en regímenes de tratamiento para el tratamiento de células, tejidos y animales, especialmente seres humanos.

45 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, 50 translocalización del ARN al sitio de traducción de proteína, traducción de proteína desde ARN, splicing del ARN para dar una o más especies de ARNm, y actividad catalítica que puede acoplarse en o facilitarse por el ARN. Las funciones pueden regularse positivamente o inhibirse dependiendo de las funciones deseadas.

Los compuestos antisentido incluyen compuestos antisentido oligoméricos, oligonucleótidos antisentido, 55 oligonucleótidos de secuencia de guía externa (EGS), agentes de splicing alterno, cebadores, sondas, y otros compuestos oligoméricos que hibridan con al menos una parte del ácido nucleico diana. Por lo tanto, estos compuestos pueden introducirse en forma de compuestos oligoméricos monocatenarios, bicatenarios, parcialmente monocatenarios, o circulares.

El direccionamiento de un compuesto antisentido a una molécula de ácido nucleico particular, en el contexto de esta 60 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 la peptidasa del factor de transcripción de membrana, sitio 1 (MBTPS1).

5

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 hay 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 definen como posiciones dentro de un ácido nucleico diana.

En un aspecto, los oligonucleótidos antisentido se unen a las secuencias antisentido naturales de la peptidasa del factor de transcripción de membrana, sitio 1 (MBTPS1), y modulan la expresión y/o función de MBTPS1 (SEQ ID NO: 1). Los ejemplos de secuencias antisentido incluyen las SEQ ID NOS: 2 al 6.

15

En un aspecto, los oligonucleótidos antisentido se unen a uno o más segmentos de los polinucleótidos de la peptidasa del factor de transcripción de membrana, sitio 1 (MBTPS1), y modulan la expresión y/o función de MBTPS1. Los segmentos comprenden al menos cinco nucleótidos consecutivos de los polinucleótidos sentido o antisentido de MBTPS1.

20

En un aspecto, los oligonucleótidos antisentido son específicos para secuencias antisentido naturales de MBTPS1 donde la unión de los oligonucleótidos a las secuencias antisentido naturales de MBTPS1 modulan la expresión y/o la función de MBTPS1.

25

En un aspecto, los compuestos de oligonucleótido comprenden secuencias expuestas como las SEQ ID NOS: 3 a 6, secuencias antisentido que se identifican y expanden usando, por ejemplo, PCR, hibridación etc. Estos oligonucleótidos pueden comprender uno o más nucleótidos modificados, fragmentos más cortos o más largos, enlaces modificados y similares. Los ejemplos de enlaces modificados o enlaces internucleotídicos comprenden fosforotioato, fosforoditioato o similares. En un aspecto, los nucleótidos comprenden un derivado de fósforo. El derivado de fósforo (o grupo fosfato modificado) que puede unirse al resto de azúcar o de análogo de azúcar en los oligonucleótidos modificados de la presente divulgación puede ser un monofosfato, difosfato, trifosfato, alquilfosfato, alcanofosfato, fosforotioato y similares. La preparación de los análogos de fosfato indicados anteriormente, y su incorporación en nucleótidos, nucleótidos modificados y oligonucleótidos, también es en sí conocida y no es necesario describirla aquí.

30

35

Ya que, tal como se conoce en la técnica, el codón de iniciación de la traducción normalmente es 5'-AUG (en moléculas de ARNm transcrito; 5'-ATG en la molécula de ADN correspondiente), el codón de iniciación de la traducción también se denomina el "codón AUG", el "codón de iniciación" o el "codón de iniciación AUG". Una minoría de genes tiene un codón de iniciación de la traducción que tiene la secuencia de ARN 5'-GUG, 5'-UUG o 5'-CUG; y se ha demostrado que 5'-AUA, 5'-ACG y 5'-CUG funcionan in vivo. De este modo, las expresiones "codón de iniciación de la traducción" y "codón de iniciación" pueden englobar muchas secuencias de codón, aun cuando el aminoácido iniciador en cada caso normalmente sea metionina (en eucariotas) o formilmetionina (en procariontes). Los genes eucariotas y procariontes pueden tener dos o más codones de iniciación alternativos, uno cualquiera de los cuales puede utilizarse preferencialmente para la iniciación de la traducción en un tipo particular de célula o tejido, o en un conjunto particular de condiciones. En el contexto de la divulgación, "codón de iniciación" y "codón de iniciación de la traducción" se refieren al codón o codones que se usan in vivo para iniciar la traducción de un ARNm transcrito de un gen que codifica para la peptidasa del factor de transcripción de membrana, sitio 1 (MBTPS1), independientemente de la(s) secuencia(s) de dichos codones. Un codón de terminación de la traducción (o "codón de terminación") de un gen puede tener una de tres secuencias, es decir, 5'-UAA, 5'-UAG y 5'-UGA (las secuencias de ADN correspondientes son 5'-TAA, 5'-TAG y 5'-TGA, respectivamente).

40

45

50

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

55

60

codón de terminación de la traducción") son todas las regiones que pueden ser eficazmente elegidas como diana con los compuestos antisentido de la presente divulgación.

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

10 Otra región diana incluye la región no traducida 5' (5'UTR), conocida en la técnica para referirse a la parte de un ARNm en la dirección 5' desde el codón de iniciación de la traducción, y que incluye, por lo tanto, nucleótidos entre el sitio caperuza 5' (5' cap) y el codón de iniciación de la traducción de un ARNm (o nucleótidos correspondientes en el gen). Otra región diana más incluye la región no traducida 3' (3'UTR), conocida en la técnica para referirse a la parte de un ARNm en la dirección 3' desde el codón de terminación de la traducción, y que incluye, por lo tanto, nucleótidos entre el codón de terminación de la traducción y el extremo 3' de un ARNm (o nucleótidos correspondientes en el gen). El sitio caperuza 5' de un ARNm comprende un residuo de guanosina N7-metilado unido al residuo más 5' del ARNm mediante un enlace trifosfato 5'-5'. La región caperuza 5' de un ARNm se considera que incluye la propia estructura caperuza 5', además de los primeros 50 nucleótidos adyacentes al sitio caperuza. Otra región diana para esta divulgación es la región caperuza 5'.

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

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

35 En un aspecto, 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.

40 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.

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

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

descritos en el presente documento también son aspectos de ácidos nucleicos diana.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Se ha descubierto que el ARN bicatenario pequeño (dsARN), tal como ARN 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. Sin embargo, en los aspectos descritos en detalle en la sección de ejemplos a continuación, se muestra que los oligonucleótidos aumentan la expresión y/o función de los polinucleótidos de la peptidasa del factor de transcripción de membrana, sitio 1 (MBTPS1) y productos codificados por los mismos. Los dsARN también pueden actuar como ARN activantes pequeños (ARNap). Sin desear ceñirse a ninguna teoría, direccionando secuencias a promotores génicos, los ARNap inducirán la expresión de genes diana en un fenómeno denominado activación transcripcional inducida por dsARN (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 de la peptidasa del factor de transcripción de membrana, sitio 1 (MBTPS1). Los "moduladores" son aquellos compuestos que disminuyen o aumentan la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica el gen MBTPS1 y que comprenden al menos una parte de 5 nucleótidos que es complementaria a un segmento diana preferido. El procedimiento de cribado comprende las etapas de poner en contacto un segmento diana preferido de una molécula de ácido nucleico que codifica polinucleótidos sentido o antisentido naturales de MBTPS1 con uno o más moduladores candidatos, y seleccionar uno o más moduladores candidatos que disminuyen o aumentan la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica polinucleótidos de MBTPS1, por ejemplo, las SEQ ID NOS: 3 a 6. Una vez que se demuestra que el modulador o moduladores candidatos son capaces de modular (por ejemplo, tanto disminuir como aumentar) la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica polinucleótidos de MBTPS1, el modulador puede entonces emplearse en estudios de investigación adicionales de la función de polinucleótidos de MBTPS1, o para su uso como un agente de investigación, diagnóstico o terapéutico de acuerdo con la presente divulgación.

Direccionar la secuencia antisentido natural preferentemente modula la función del gen diana. Por ejemplo, el gen MBTPS1 (por ejemplo, número de acceso NM_003791). En un aspecto, la diana es un polinucleótido antisentido de MBTPS1. En un aspecto, un oligonucleótido antisentido dirigido a secuencias sentido y/o antisentido naturales de polinucleótidos de MBTPS1 (por ejemplo entrada número NM_003791), variantes, alelos, isoformas, homólogas, mutantes, derivados, fragmentos y secuencias complementarias correspondientes. Preferentemente, el oligonucleótido es una molécula antisentido y las dianas incluyen regiones codificantes y no codificantes de polinucleótidos antisentido y/o sentido de MBTPS1.

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

En un aspecto, un oligonucleótido antisentido se dirige a polinucleótidos de la peptidasa del factor de transcripción de membrana, sitio 1 (MBTPS1) (por ejemplo, número de acceso: NM_003791), variantes, alelos, isoformas, homólogos, mutantes, derivados, fragmentos y secuencias complementarias a los mismos. Preferentemente, el oligonucleótido es una molécula antisentido.

De acuerdo con aspectos de la divulgación, la molécula de ácido nucleico diana no se limita a MBTPS1 por sí sola, sino que se extiende a cualquiera de las isoformas, receptores, homólogos y similares de las moléculas de MBTPS1.

5 En un aspecto, un oligonucleótido se dirige a una secuencia antisentido natural de polinucleótidos de MBTPS1, por ejemplo, los nucleótidos expuestos en las SEQ ID NOS: 2, y cualquier variante, alelo, homólogo, mutante, derivado, fragmento y secuencia complementaria a los mismos. Ejemplos de oligonucleótidos antisentido se exponen como las SEQ ID NOS: 3 a 6.

10 En un aspecto, los oligonucleótidos son complementarios a, o se unen a, secuencias de ácido nucleico de MBTPS1 antisentido, incluyendo sin limitación secuencias sentido y/o antisentido no codificantes asociadas con polinucleótidos de MBTPS1 y modulan la expresión y/o función de moléculas de MBTPS1.

En un aspecto, los oligonucleótidos son complementarios a o se unen a secuencias de ácido nucleico del antisentido natural de MBTPS 1, expuesto como SEQ ID NOS: 2 y modulan la expresión y/o la función de moléculas de MBTPS1.

15 En un aspecto, los oligonucleótidos comprenden secuencias de al menos 5 nucleótidos consecutivos de las SEQ ID NOS: 3 a 6 y modulan la expresión y/o la función de molécula de MBTPS1.

20 La dianas polinucleótidas comprende MBTPS1; incluyendo miembros de la familia del mismo, variantes de MBTPS1, mutantes de MBTPS1, incluidos polimorfismos de un solo nucleótido (SNP); secuencias no codificantes de MBTPS1; alelos de MBTPS1, variantes de especie, fragmentos y similares. Preferentemente, el oligonucleótido es una molécula antisentido.

25 En un aspecto, el oligonucleótido que se dirige a polinucleótidos de MBTPS1, comprende: ARN antisentido, ARN de interferencia (ARNi), ARN de interferencia pequeño (siRNA); microARN de interferencia (miARN); un ARN temporal pequeño (ARNtp); o un ARN de horquilla corta (ARNhc); activación génica inducida por ARN pequeño (ARNa); o, ARN activante pequeño (ARNap).

30 En un aspecto, el direccionamiento de los polinucleótidos de la peptidasa del factor de transcripción de membrana, sitio 1 (MBTPS1), por ejemplo, la SEQ ID NO: 2, modula la expresión o función de estas dianas. En un aspecto, la expresión o función está regulada positivamente en comparación con un control. En un aspecto, la expresión o función está regulada negativamente en comparación con un control.

35 En un aspecto, los compuestos antisentido comprenden secuencias expuestas como las SEQ ID NOS: 3 a 6. Estos oligonucleótidos pueden comprender uno o más nucleótidos modificados, fragmentos más cortos o más largos, enlaces modificados y similares.

40 En un aspecto, SEQ ID NOS: 3 a 6 comprenden uno o más nucleótidos de LNA.

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

50 Debido a su especificidad de secuencia, las moléculas de ácidos nucleicos enzimáticos que se escinden en trans muestran promesa como agentes terapéuticos para enfermedad humana (Usman & McSwiggen. (1995) Ann. Rep. Med. Chem. 30, 285-294; Christoffersen 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.

55 En general, los ácidos nucleicos enzimáticos con actividad de escisión de ARN actúan uniéndose primero a un ARN diana. Dicha unión se produce a través de la parte de unión diana de un ácido nucleico enzimático que se mantiene en estrecha proximidad a una parte enzimática de la molécula que actúa para escindir el ARN diana. De este modo, el ácido nucleico enzimático se reconoce primero y a continuación se une a ARN diana mediante apareamiento de bases complementario, y una vez se une al sitio correcto, actúa enzimáticamente para cortar el ARN diana. La

60

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.

- 5 Varias estrategias como la selección in vitro (evolución) (Orgel, (1979) Proc. R. Soc. London, B 205, 435) se han usado para desarrollar nuevos catalizadores de ácido nucleico capaces de catalizar diversas reacciones, tales como escisión y ligamiento de enlaces fosfodiéster y enlaces amida.

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

25 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.

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

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

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

50 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 ARN mono- o bicatenario tales como compuestos de siRNA, ARN_{ap}, ARN_a, 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, de tipo ADN, de tipo ARN, o mezclas de los mismos, o pueden ser miméticos de uno o más de estos. Estos compuestos pueden ser compuestos oligoméricos monocatenarios, bicatenarios, circulares o de horquilla y pueden contener elementos estructurales tales como protuberancias internas o terminales, desapareamientos o bucles. Los compuestos antisentido se preparan de forma rutinaria linealmente, pero pueden unirse o prepararse de otro modo para ser circulares y/o ramificados. Los compuestos antisentido pueden comprender construcciones tales como, por

ejemplo, dos cadenas hibridadas para formar un compuesto completa o parcialmente bicatenario o una única cadena con auto-complementariedad suficiente para permitir la hibridación y formación de un compuesto completa o parcialmente bicatenario. Las dos cadenas pueden enlazarse internamente, dejando los extremos 3' o 5' libres o pueden enlazarse para formar una estructura de horquilla continua o bucle. La estructura de horquilla puede 5 contener un nucleótido protuberante en cualquiera de los extremos 5' o 3' que produce una extensión del carácter monocatenario. Los compuestos bicatenarios opcionalmente pueden comprender nucleótidos protuberantes en los extremos. Modificaciones adicionales pueden comprender grupos conjugados unidos a uno de los extremos, posiciones de nucleótido seleccionadas, posiciones de azúcar o a uno de los enlaces internucleosídicos. Como alternativa, las dos cadenas pueden enlazarse mediante un resto no de ácido nucleico o grupo conector. Cuando se 10 forma a partir de solo una cadena, el dsARN puede tomar la forma de una molécula tipo horquilla auto-complementaria que se dobla sobre sí misma para formar un dúplex. De este modo, el dsARN puede ser completa o parcialmente bicatenario. Puede lograrse modulación específica de la expresión génica por expresión estable de horquillas de dsARN en líneas celulares transgénicas. 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 15 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 20 trabajar mediante mecanismos basados en la ocupación. En general, los ácidos nucleicos (incluyendo oligonucleótidos) pueden describirse como "de tipo ADN" (es decir, que generalmente tienen uno o más 2'-desoxiazúcares y, generalmente, bases T en vez de U) o "de tipo ARN" (es decir, que generalmente tienen uno o más 2'-hidroxilazúcares o azúcares modificados en 2' y, generalmente bases U en vez de T). Las hélices de ácido nucleico pueden adoptar más de un tipo de estructura, más comúnmente las formas A y B. Se cree que, en general, 25 los oligonucleótidos que tienen estructura similar a la forma B son "de tipo ADN" y aquellos que tienen estructura de tipo forma A son "de tipo ARN". En algunos aspectos (quiméricos), un compuesto antisentido puede contener tanto regiones en forma A como B.

Los compuestos antisentido de acuerdo con esta divulgación pueden comprender una parte antisentido de 30 aproximadamente 5 a aproximadamente 80 nucleótidos (es decir, de aproximadamente 5 a aproximadamente 80 nucleósidos enlazados) de longitud. Esto se refiere a la longitud de la cadena antisentido o parte del compuesto antisentido. En otras palabras, un compuesto antisentido monocatenario de la divulgación comprende de 5 a aproximadamente 80 nucleótidos, y un compuesto antisentido bicatenario de la divulgación (tal como un dsARN, por ejemplo) comprende una cadena sentido y antisentido o parte de 5 a aproximadamente 80 nucleótidos de longitud. 35 Un experto habitual en la técnica apreciará que éste incluye compuestos antisentido que tienen partes antisentido de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, o 80 nucleótidos de longitud, o cualquier intervalo entremedias.

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

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

50 En un aspecto, los compuestos oligoméricos de la presente divulgación también incluyen variantes en las que una base diferente está presente en una o más de las posiciones de nucleótido en el compuesto. Por ejemplo, si el primer nucleótido es una adenosina, pueden producirse variantes que contienen timidina, guanosina o citidina en esta posición. Esto puede hacerse en cualquiera de las posiciones de los compuestos antisentido o de dsARN. 55 Estos compuestos se ensayan entonces usando los procedimientos descritos en el presente documento para determinar su capacidad para inhibir la expresión de un ácido nucleico diana.

En un aspecto, la homología, identidad de secuencias o complementariedad, entre el compuesto antisentido y la diana es de aproximadamente el 40 % a aproximadamente el 60 %. En algunos aspectos, la homología, identidad de 60 secuencias o complementariedad es de aproximadamente el 60% a aproximadamente el 70%. En algunos aspectos,

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

En un aspecto, los oligonucleótidos antisentido, como, por ejemplo, las moléculas de ácidos nucleicos expuestas en las SEQ ID NOS: 2 a 6 comprenden una o más sustituciones o modificaciones. En un aspecto, los nucleótidos están sustituidos con ácidos nucleicos bloqueados (LNA).

En un aspecto, los oligonucleótidos se dirigen a una o más regiones de las moléculas de ácidos nucleicos sentido y/o antisentido de secuencias codificantes y/o no codificantes asociadas al gen MBTPS1 y las secuencias expuestas como SEQ ID NOS: 1 y 2. Los oligonucleótidos también se dirigen a regiones solapantes de las SEQ ID NOS: 1 y 2.

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

Se pueden formar compuestos antisentido quiméricos de la divulgación como estructuras compuestas de dos o más oligonucleótidos, oligonucleótidos modificados, oligonucleósidos y/o miméticos de oligonucleótidos, tal como se ha descrito anteriormente. Como tales, estos compuestos también se han referido en la técnica como híbridos o gapmeros. Las patentes representativas de los Estados Unidos que enseñan la preparación de estas estructuras híbridas comprenden, entre otras, 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 un aspecto, la región del oligonucleótido que se modifica comprende al menos un nucleótido modificado en la posición 2' del azúcar, de la forma más preferente un nucleótido modificado con 2'-O-alquilo, 2'-O-alquil-O-alquilo o 2'-flúor. En otro aspectos, las modificaciones de ARN incluyen modificaciones de 2'-flúor, 2'-amino y 2'-O-metilo en la ribosa de pirimidinas, residuos abásicos o una base invertida en el extremo 3' del ARN. Dichas modificaciones se incorporan rutinariamente en oligonucleótidos y se ha demostrado que estos oligonucleótidos tienen una mayor T_m (es decir, mayor afinidad de unión a diana) que los 2'-desoxioligonucleótidos contra una diana dada. El efecto de tal afinidad incrementada es potenciar enormemente la inhibición por oligonucleótidos de ARNi de la expresión génica. La RNasa H es una endonucleasa celular que escinde la cadena de ARN de los dúplex de ARN:ADN: por lo tanto, la activación de esta enzima produce la escisión del ARN diana, y de este modo puede potenciar enormemente la eficiencia de inhibición de ARNi. La escisión del ARN diana puede demostrarse rutinariamente por electroforesis en gel. En un aspecto, el oligonucleótido quimérico también se modifica para potenciar la resistencia a nucleasas. Las células contienen diversas exo- y endo-nucleasas que pueden degradar ácidos nucleicos. Se ha demostrado que varias modificaciones de nucleótidos y nucleósidos hacen que el oligonucleótido en el que se incorporan sea más resistente a la digestión por nucleasa que el oligodesoxinucleótido nativo. La resistencia a nucleasas se mide rutinariamente incubando oligonucleótidos con extractos celulares o soluciones de nucleasa aisladas y midiendo el grado de oligonucleótido intacto que queda con el tiempo, normalmente por electroforesis en gel. Los oligonucleótidos que se han modificado para potenciar su resistencia a nucleasas sobreviven intactos durante más tiempo que los oligonucleótidos sin modificar. Se ha demostrado que diversas modificaciones de oligonucleótidos potencian o confieren resistencia a nucleasas. Los oligonucleótidos que contienen al menos una modificación de

fosforotioato son actualmente más preferidos. En algunos casos, las modificaciones de oligonucleótidos que potencian la afinidad de unión a diana son, también, independientemente, capaces de potenciar la resistencia a nucleasas.

5 Ejemplos específicos de algunos oligonucleótidos preferidos concebidos por esta divulgación incluyen aquellos que comprenden esqueletos modificados, por ejemplo, fosforotioatos, fosfotriésteres, metilfosfonatos, enlaces entre azúcares de alquilo o cicloalquilo de cadena corta o enlaces entre azúcares heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta. Los más preferidos son oligonucleótidos con esqueletos de fosforotioato y aquellos con esqueletos de heteroátomo, particularmente esqueletos de CH₂--NH--O--CH₂, CH, --N(CH₃)--O--CH₂ [conocido como un esqueleto de metilen(metilimino) o MMI], CH₂ --O--N (CH₃)--CH₂, CH₂ -N (CH₃)-N (CH₃)--CH₂ y O-N (CH₃)--CH₂ --CH₂, donde el esqueleto de fosfodiéster nativo se representa como O--P--O--CH₂. Los esqueletos de amida divulgados por De Mesmaeker y col. (1995) Acc. Chem. Res. 28:366-374 también se prefieren. También se prefieren oligonucleótidos que tienen esqueletos de morfolino (Summerton and Weller, patente de Estados Unidos Pat. N.º 5,034,506. En otro aspectos, tal como el esqueleto de ácido nucleico peptídico (PNA), el esqueleto de fosfodiéster del oligonucleótido se sustituye por un esqueleto de poliamida, estando los nucleótidos unidos directamente o indirectamente a los átomos de nitrógeno azo del esqueleto de poliamida. Los oligonucleótidos también pueden comprender uno o más restos de azúcar sustituidos. Oligonucleótidos preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': OH, SH, SCH₃, F, OCN, OCH₃ OCH₃, OCH₃ O(CH₂)_n CH₃, O(CH₂)_n NH₂ u O(CH₂)_n CH₃, donde n es de 1 a aproximadamente 10; alquilo inferior de C1 a C10, alcoxicoxi, alquilo, alcarilo o aralquilo inferior sustituido, Cl; Br; CN; CF₃; OCF₃; O--, S--, o N-alquilo; O--, S--, o N-alqueno; SOCH₃; SO₂ CH₃; ONO₂, NO₂; N₃; NH₂; heterocicloalquilo; heterocicloalcarilo; aminoalquilamino; polialquilamino; sililo sustituido; un grupo de escisión de ARN; un grupo indicador; un intercalador, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido; o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un oligonucleótido y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. Una modificación preferida incluye 2'-metoxietoxi [2'-O-CH₂ CH₂ OCH₃, también conocido como 2'-O-(2-metoxietilo)]. Otras modificaciones preferidas incluyen 2'-metoxi (2'-O--CH₃), 2'-propoxi(2'-OCH₂ CH₂CH₃) y 2'-flúor (2'-F). También pueden hacerse modificaciones similares en otras posiciones sobre el oligonucleótido, particularmente la posición 3' del azúcar en el nucleótido del extremo 3' y la posición 5' del nucleótido del extremo 5'. Los oligonucleótidos también pueden tener miméticos de azúcar tales como ciclobutilos en lugar del grupo pentofuranosilo.

30

Los oligonucleótidos también pueden comprender, adicionalmente o como alternativa, modificaciones o sustituciones de nucleobases (frecuentemente denominadas en la técnica simplemente "base"). Tal como se usa en el presente documento, nucleótidos "no modificados" o "naturales" incluyen adenina (A), guanina (G), timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Los nucleótidos modificados incluyen nucleótidos encontrados solo poco frecuentemente o transitoriamente en ácidos nucleicos naturales, por ejemplo, hipoxantina, 6-metiladenina, 5-Mc-pirimidinas, particularmente 5-metilcitosina (también denominada 5-metil-2'-desoxicitosina y frecuentemente denominada en la técnica 5-Me-C), 5-hidroximetilcitosina (HMC), glicosil HMC y gentobiosil HMC, además de nucleótidos sintéticos, por ejemplo, 2-aminoadenina, 2-(metilamino)adenina, 2-(imidazolilalquil)adenina, 2-(aminoalquilamino)adenina u otras alquiladeninas heterosustituidas, 2-tiouracilo, 2-tiotimina, 5-bromouracilo, 5-hidroximetiluracilo, 8-azaguanina, 7-deazaguanina, N6(6-aminohehexil)adenina y 2,6-diaminopurina. Puede incluirse una base "universal" conocida en la técnica, por ejemplo, inosina. Se ha demostrado que las sustituciones 5-Me-C aumentan la estabilidad de los dúplex de ácidos nucleicos en 0,6-1,2 °C, y actualmente son las sustituciones de base preferidas.

Otra modificación de los oligonucleótidos de la divulgación implica enlazar químicamente al oligonucleótido uno o más restos o conjugados que potencian la actividad o captación celular del oligonucleótido. Dichos restos incluyen entre otros restos lipídicos como restos de colesterol, restos de colesterilo, una cadena alifática, por ejemplo, restos de dodecandiol o undecilo, una poliamina o una cadena de polietilenglicol, o ácido adamantano acético. Los oligonucleótidos que comprenden restos lipófilos. y procedimientos para preparar dichos oligonucleótidos, son conocidos en la técnica, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos Pat. N.º 5,138,045, 5,218,105 y 5,459,255.

50

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, entre otros, 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

60

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
 5 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
 10 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
 15 potencia, especificidad y duración de la acción y ampliar las vías de administración de oligonucleótidos comprende químicas actuales tales como MOE, ANA, FANA, PS, etc. Esto puede lograrse sustituyendo algunos de los monómeros en los oligonucleótidos actuales por monómeros LNA. Los oligonucleótidos modificados con LNA pueden tener un tamaño similar al compuesto parental o puede ser más grandes o preferentemente más pequeños. Se prefiere que dichos oligonucleótidos modificados con LNA contengan menos de aproximadamente el 70 %, más
 20 preferiblemente 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 preferiblemente entre aproximadamente 12 y 20 nucleótidos.

Esqueletos de oligonucleótidos modificados preferidos comprenden, entre otros, fosforotioatos, fosforotioatos
 25 quirales, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, metil y otros alquil fosfonatos que comprenden 3'-alquilenfosfonatos y fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidatos que comprenden 3'-amino fosforamidato y aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionoalquilfosfonatos, tionoalquilfosfotriésteres y boranofosfonatos que tienen enlaces 3'-5' normales, análogos enlazados en 2'-5' de estos, y aquellos que tienen polaridad invertida, donde los pares adyacentes de unidades de nucleósidos están enlazados 3'-5' a 5'-3' o 2'-5' a 5'-2'. También se incluyen
 30 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, entre otras, las Patentes de Estados Unidos N.º 3.687.808; 4.469.863; 4.476.301; 5.023.243; 5.177.196; 5.188.897; 5.264.423; 5.276.019; 5.278.302; 5.286.717; 5.321.131; 5.399.676; 5.405.939;
 35 5.453.496; 5.455.233; 5.466.677; 5.476.925; 5.519.126; 5.536.821; 5.541.306; 5.550.111; 5.563.253; 5.571.799; 5.587.361; y 5.625.050.

Esqueletos de oligonucleótido modificados preferidos que no incluyen un átomo de fósforo en ellos tienen esqueletos que se forman por enlaces internucleosídicos de alquilo o cicloalquilo de cadena corta, enlaces internucleosídicos de
 40 heteroátomo y alquilo o cicloalquilo mixtos, o uno o más enlaces internucleosídicos heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta. Estos comprenden aquellos que tienen enlaces morfolino (formados en parte a partir de la parte de azúcar de un nucleósido); esqueletos de siloxano; esqueletos de sulfuro, sulfóxido y sulfona; esqueletos de formacetilo y tioformacetilo; esqueletos de metilenformacetilo y tioformacetilo; esqueletos que contienen alqueno; esqueletos de sulfamato; esqueletos de metilnimino y metilhidrazino; esqueletos de sulfonato y sulfonamida;
 45 esqueletos de amida; y otros que tienen partes de componentes de N, O, S y CH₂ mixtos.

Las patentes representativas de los Estados Unidos que enseñan la preparación de los oligonucleósidos citados anteriormente comprenden, entre otras, las patentes de los EE.UU. N.º 5,034,506; 5,166,315; 5,185,444; 5,214,134; 5,216,141; 5,235,033; 5,264,562; 5,264,564; 5,405,938; 5,434,257; 5,466,677; 5,470,967; 5,489,677; 5,541,307;
 50 5,561,225; 5,596,086; 5,602,240; 5,610,289; 5,602,240; 5,608,046; 5,610,289; 5,618,704; 5,623,070; 5,663,312; 5,633,360; 5,677,437; y 5,677,439.

En otros miméticos de oligonucleótidos preferidos, tanto el azúcar como el enlace internucleosídico, es decir, el esqueleto, de las unidades de nucleótido se sustituyen por grupos novedosos. Las unidades de base se mantienen
 55 para la hibridación con un compuesto de ácido nucleico diana apropiado. Dicho compuesto oligomérico, un oligonucleótido mimético que se ha demostrado que tiene excelente propiedades de hibridación, se denomina ácido nucleico peptídico (PNA). En compuestos de PNA, el esqueleto de azúcar de un oligonucleótido se sustituye por un esqueleto que contiene amida, en particular un esqueleto de aminoetilglicina. Las nucleobases son retenidas y se unen directamente o indirectamente a átomos de nitrógeno azo de la parte de amida del esqueleto. Las patentes
 60 representativas de los Estados Unidos que enseñan la preparación de compuestos PNA comprenden, entre otras,

las patentes de los EE.UU. N.º 5,539,082; 5,714,331; y 5,719,262. Enseñanzas adicionales de compuestos de PNA pueden encontrarse en Nielsen, y col. (1991) Science 254, 1497-1500.

En un aspecto de la divulgación, los oligonucleótidos con esqueletos de fosforotioato y oligonucleósidos con esqueletos de heteroátomo, y en particular -CH₂-NH-O-CH₂-, -CH₂-N(CH₃)-O-CH₂-, conocidos como un esqueleto de metileno (metilimino) o MMI, -CH₂-O-N(CH₃)-CH₂-, -CH₂N(CH₃)-N(CH₃)CH₂-and-O-N(CH₃)-CH₂-CH₂- donde el esqueleto de fosfodiéster nativo se representa como -O-P-O-CH₂- de la patente de EE.UU. N.º 5,489,677, citada anteriormente, y los esqueletos de amida de la patente de EE.UU. N.º 5,602,240, citada anteriormente. También se prefieren oligonucleótidos que tienen esqueletos de morfolino de la patente de EE.UU. N.º 5,034,506, citada anteriormente.

Los oligonucleótidos modificados también pueden contener uno o más restos de azúcar sustituidos. Oligonucleótidos preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': OH; F; O-, S- o N-alquilo; O-, S-, o N-alqueno; O-, S- o N-alquino; o O-alquil-O-alquilo, donde el alquilo, alqueno y alquino pueden ser alquilo C a CO sustituido o sin sustituir o alqueno y alquino C2 a CO. Se prefieren particularmente O(CH₂)_nOmCH₃, O(CH₂)_nOCH₃, O(CH₂)_nNH₂, O(CH₂)_nCH₃, O(CH₂)_nONH₂, y O(CH₂)_nON(CH₂)_nCH₃)₂ en las que n y m pueden ser de 1 a aproximadamente 10. Otros oligonucleótidos preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': C a CO, (alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, alcarilo, aralquilo, O-alcarilo o O-aralquilo, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, polialquilamino, sililo sustituido, un grupo de escisión de ARN, un grupo indicador, un intercalador, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido, o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un oligonucleótido, y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. Una modificación preferida comprende 2'-metoxietoxi (2'-O-CH₂CH₂OCH₃, también conocido como 2'-O-(2-metoxietilo) o 2'-MOE) es decir, un grupo alcóxialcoxi. Otra modificación preferida comprende 2'-dimetilaminoetoxi, es decir, un grupo O(CH₂)₂ON(CH₃)₂, también conocido como 2'-DMAOE, tal como se describe en los ejemplos en el presente documento más adelante, y 2'-dimetilaminoetoxietoxi (también conocido en la técnica como 2'-O-dimetilaminoetoxietilo o 2'-DMAEOE), es decir, 2'-O-CH₂-O-CH₂-N(CH₂)₂.

Otras modificaciones preferidas comprenden 2'-metoxi (2'-O CH₃), 2'-aminopropoxi (2'-O CH₂CH₂CH₂NH₂) 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, entre otros, 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, nucleótidos "no modificados" o "naturales" comprenden las bases de purina adenina (A) y guanina (G), y las bases de pirimidina timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Los nucleótidos modificados comprenden otros nucleótidos sintéticos y naturales tales como 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetilcitosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, derivados de 6-metilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, derivados de 2-propilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracilo y citosina, 5-propiniluracilo y citosina, 6-azouracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudo-uracilo), 4-tiouracilo, 8-halógeno, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo. 8-hidroxilo y otras adeninas y guaninas sustituidas en 8, 5-halógeno particularmente 5-bromo, 5-trifluorometilo y otros uracilos y citosinas sustituidos en 5, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-deazaguanina y 7-deazaadenina y 3-deazaguanina y 3-deazaadenina.

Además, los nucleótidos comprenden los divulgados en la patente de Estados Unidos N.º 3,687,808, aquellos divulgados en "The Concise Encyclopedia of Polymer Science And Engineering", páginas 858-859, Kroschwitz, J.I., ed. John Wiley & Sons, 1990, aquellos divulgados por Englisch y col., "Angewandte Chemie, International Edition", 1991,30, página 613, y aquellos divulgados por Sanghvi, Y.S., Chapter 15, 'Antisense Research and Applications', páginas 289-302, Croke, S.T. y Lebleu, B. ea.. CRC Press. 1993. Algunos de estos nucleótidos son particularmente útiles para incrementar la afinidad de unión de los compuestos oligoméricos de la divulgación. Éstos comprenden pirimidinas sustituidas en 5. 6-azapirimidinas y purinas sustituidas en N-2, N-6 y O-6, que comprenden 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. Se ha demostrado que las sustituciones de 5-metilcitosina aumentan la estabilidad de los dúplex de ácido nucleico en 0,6-1,2 °C (Sanghvi, Y.S., Croke, S.T. y Lebleu. B., eds, 'Antisense Research and Applications', CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278) y son sustituciones de bases

actualmente preferidas, incluso más particularmente cuando se combinan con las modificaciones del azúcar 2'-ometoxietilo.

Las patentes representativas de los Estados Unidos que enseñan la preparación de los nucleótidos modificados citados anteriormente así como otros nucleótidos modificados, comprenden, entre otras, las patentes de los EE.UU. N.º. 3,687,808, así como 4,845,205; 5,130,302; 5,134,066; 5,175, 273; 5,367,066; 5,432,272; 5,457,187; 5,459,255; 5,484,908; 5,502,177; 5,525,711; 5,552,540; 5,587,469; 5,596,091; 5,614,617; 5,750,692, y 5,681,941.

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, entre otros, restos de lípido tales como un resto colesterol, ácido cólico, un tioéter, por ejemplo, hexil-S-tritilol, un tiocolesterol, una cadena alifática, por ejemplo, residuos de dodecanodiol o undecilo, un fosfolípido, por ejemplo, di-hexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato de trietilamonio, una poliamina o una cadena de polietilenglicol, o ácido adamantano acético, un resto palmitilo, o un resto octadecilamina o hexilamino-carbonil-oxicolesterol.

Las patentes representativas de los Estados Unidos que enseñan la preparación de estos conjugados de oligonucleótidos comprenden, entre otras, las patentes de los EE.UU. N.º 4,828,979; 4,948,882; 5,218,105; 5,525,465; 5,541,313; 5,545,730; 5,552, 538; 5,578,717,5,580,731; 5,580,731; 5,591,584; 5,109,124; 5,118,802; 5,138,045; 5,414,077; 5,486, 603; 5,512,439; 5,578,718; 5,608,046:4,587,044; 4,605,735; 4,667,025; 4,762, 779; 4,789,737; 4,824,941; 4,835,263; 4,876,335; 4,904,582; 4,958,013; 5,082, 830; 5,112,963; 5,214,136; 5,082,830; 5,112,963; 5,214,136; 5, 245,022; 5,254,469; 5,258,506; 5,262,536; 5,272,250:5,292,873; 5,317,098; 5,371,241,5,391, 723; 5,416,203,5,451,463:5,510,475; 5,512,667; 5,514,785; 5, 565,552; 5,567,810; 5,574,142; 5,585,481; 5,587,371; 5,595,726; 5,597,696; 5,599,923; 5,599,928 y 5,688,941,

Los compuestos de la presente divulgación también pueden aplicarse en las áreas del descubrimiento de fármacos y validación de dianas. La presente divulgación comprende el uso de los compuestos y segmentos diana preferidos e identificados en el presente documento en un esfuerzo por esclarecer las relaciones que existen entre polinucleótidos de la peptidasa del factor de transcripción de membrana, sitio 1 (MBTPS1) y una patología, fenotipo o afección. Estos procedimientos incluyen detectar o modular los polinucleótidos de MBTPS1 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 MBTPS1 y/o un criterio de valoración fenotípico o químico relacionado en algún momento después del tratamiento, y opcionalmente comparar el valor medido con una muestra no tratada o muestra tratada con otro compuesto de la divulgación. Estos procedimientos también pueden realizarse en paralelo o en combinación con otros experimentos para determinar la función de genes desconocidos para el proceso de validación de dianas o para determinar la validez de un producto génico particular como diana para el tratamiento o prevención de una enfermedad, afección o fenotipo particular.

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

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

La expresión de ARN del ácido nucleico exógeno también puede detectarse midiendo una actividad enzimática o una actividad de proteína reportera. Por ejemplo, puede medirse la actividad moduladora antisentido indirectamente como una disminución o aumento en la expresión de ácido nucleico diana como una indicación de que el ácido nucleico exógeno está produciendo el ARN efector. Basándose en conservación de secuencias, pueden diseñarse cebadores y usarse para amplificar regiones codificantes de los genes diana. Inicialmente, la región codificante más altamente expresada de cada gen puede usarse para construir un gen de control modelo, aunque puede usarse cualquier región codificante o no codificante. Cada gen de control se ensambla insertando cada región codificante entre una región codificante reportera y su señal de poli(A). Estos plásmidos producirían un ARNm con un gen indicador en la parte cadena arriba del gen y una posible diana de ARNi en la región no codificante 3'. La eficacia de oligonucleótidos antisentido individuales se ensayaría por modulación del gen indicador. Los genes indicadores

útiles en los procedimientos de la presente divulgación incluyen acetohidroxiácido sintasa (AHAS), fosfatasa alcalina (AP), beta-galactosidasa (LacZ), beta-glucuronidasa (GUS), cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), proteína verde fluorescente (GFP), proteína roja fluorescente (RFP), proteína amarilla fluorescente (YFP), proteína cian fluorescente (CFP), peroxidasa de rábano picante (HRP), luciferasa (Luc), nopalina sintasa (NOS), octopina sintasa (OCS), y derivados de los mismos. Están disponibles múltiples marcadores de selección que confieren resistencia a ampicilina, bleomicina, cloranfenicol, gentamicina, higromicina, kanamicina, lincomicina, metotrexato, fosfotricina, puromicina y tetraciclina. Los procedimientos de determinación de la modulación de un gen reportero son muy conocidos en la técnica, e incluyen, entre otros, procedimientos fluorimétricos (por ejemplo, espectroscopía de fluorescencia, clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), microscopía de fluorescencia), determinación de la resistencia a antibióticos.

La expresión de la proteína y del ARNm de MBTPS1 puede controlarse utilizando procedimientos conocidos por los expertos en la técnica y descritos en este documento. Por ejemplo, pueden usarse inmunoensayos como ELISA para medir los niveles de proteína. Los kits de ensayo ELISA para MBTPS1 están disponibles comercialmente, por ejemplo, en R&D Systems (Minneapolis, MN).

En unos aspectos, la expresión de MBTPS1 (p. ej. ARNm o proteína) en una muestra (por ejemplo, células o tejidos *in vivo* o *in vitro*) tratados con un oligonucleótido antisentido de la divulgación se evalúan por comparación con la expresión de MBTPS1 en una muestra de control. Por ejemplo, la expresión de la proteína o del ácido nucleico puede compararse usando procedimientos conocidos por los expertos en la técnica, con una muestra tratada de forma simulada y sin tratar. De forma alternativa, puede hacerse una comparación con una muestra tratada con un oligonucleótido antisentido control (por ejemplo, uno que tenga una secuencia modificada o diferente) dependiendo de la información deseada. En otro aspecto, una diferencia en la expresión de la proteína MBTPS1 o su ácido nucleico en una muestra tratada frente a una muestra sin tratar puede compararse con la diferencia en la expresión de un ácido nucleico diferente (incluyendo cualquier estándar que el investigador considere apropiado, por ejemplo, un gen de mantenimiento) en una muestra tratada frente a una muestra sin tratar.

Las diferencias observadas pueden expresarse como se desee, por ejemplo, en forma de proporción o fracción, para su uso en comparación con un control. En unos aspectos, el nivel de ARNm o proteína de MBTPS1, en una muestra tratada con un oligonucleótido antisentido de la presente divulgación, aumenta o disminuye entre aproximadamente 1,25 veces a unas 10 veces o más en relación con una muestra sin tratar o una muestra tratada con un ácido nucleico de control. En unos aspectos, el nivel de ARNm o proteína de MBTPS1 aumenta o disminuye en al menos aproximadamente 1,25 veces, al menos aproximadamente 1,3 veces, al menos aproximadamente 1,4 veces, al menos aproximadamente 1,5 veces, al menos aproximadamente 1,6 veces, al menos aproximadamente 1,7 veces, al menos aproximadamente 1,8 veces, al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 2,5 veces, al menos aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 3,5 veces, al menos aproximadamente 4 veces, al menos aproximadamente 4,5 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 5,5 veces, al menos aproximadamente 6 veces, al menos aproximadamente 6,5 veces, al menos aproximadamente 7 veces, al menos aproximadamente 7,5 veces, al menos aproximadamente 8 veces, al menos aproximadamente 8,5 veces, al menos aproximadamente 9 veces, al menos aproximadamente 9,5 veces, o al menos aproximadamente 10 veces o más.

Kits. reactivos de investigación, de diagnóstico y terapéuticos

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

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

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "sistema biológico" o "sistema" se define como cualquier organismo, célula, cultivo celular o tejido que expresa, o se ha hecho competente para expresar productos de genes de la peptidasa del factor de transcripción de membrana, sitio 1 (MBTPS1). Éstos incluyen, entre otros, seres humanos, animales transgénicos, células, cultivos celulares, tejidos, xenoinjertos, trasplantes y combinaciones de los mismos.

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

Ejemplos de procedimientos de análisis de expresión génica conocidos en la técnica incluyen matrices de ADN o micromatrices, SAGE (análisis en serie de expresión génica), READS (amplificación de ADNc digerido con enzimas de restricción), TOGA (análisis de expresión génica total), matrices de proteínas y proteómica, etiqueta de secuencia expresada (EST), secuenciación, huella genética de ARN sustractivos (SuRF), clonación sustractiva, presentación diferencial (DD), hibridación genómica comparativa, FISH (hibridación fluorescente in situ), técnicas y procedimientos de espectrometría de masas.

Los compuestos de la divulgación son útiles para investigación y diagnóstico, debido a que estos compuestos hibridan con ácidos nucleicos que codifican la peptidasa del factor de transcripción de membrana, sitio 1 (MBTPS1). Por ejemplo, los oligonucleótidos que hibridan con dicha eficiencia y en dichas condiciones que se han descrito en el presente documento como moduladores eficaces de MBTPS1 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 MBTPS1 y en la amplificación de dichas moléculas de ácidos nucleicos para la detección o para su uso en estudios adicionales de MBTPS1. La hibridación de los oligonucleótidos antisentido, particularmente los cebadores y sondas de la divulgación con un ácido nucleico que codifica el gen MBTPS1, 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 MBTPS1 en una muestra.

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

Para terapéuticos, un animal, preferentemente un ser humano, que se sospecha o tiene una enfermedad o trastorno que puede tratarse modulando la expresión de MBTPS1 se trata administrando compuestos antisentido de acuerdo con esta divulgación. Por ejemplo, en un aspecto no limitante, los procedimientos comprenden la etapa de administrar al animal que necesita tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de los moduladores de MBTPS1. Los moduladores de MBTPS1 de la presente divulgación modulan de manera efectiva la actividad de MBTPS1 o modulan la expresión de la proteína de MBTPS1. En un aspecto, la actividad o expresión de MBTPS1 en un animal se inhibe aproximadamente el 10 % en comparación con un control. Preferiblemente, la actividad o expresión de MBTPS1 en un animal se inhibe aproximadamente el 30 %. Más preferiblemente, la actividad o expresión de MBTPS1 en un animal se inhibe el 50 % o más. De este modo, los compuestos oligoméricos modulan la expresión del ARNm de la peptidasa del factor de transcripción de membrana, sitio 1 (MBTPS1) al menos el 10 %, al menos el 50 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o el 100 % en comparación con un control.

En un aspecto, la actividad o expresión de la peptidasa del factor de transcripción de membrana, sitio 1 (MBTPS1) y/o en un animal aumenta aproximadamente el 10 % en comparación con un control. Preferiblemente, la actividad o expresión de MBTPS1 en un animal se aumenta aproximadamente el 30 %. Más preferiblemente, la actividad o expresión de MBTPS1 en un animal aumenta el 50 % o más. De este modo, los compuestos oligoméricos modulan la expresión del ARNm de MBTPS1 al menos el 10 %, al menos el 50 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o el 100 % en comparación con un control.

Por ejemplo, se puede medir la reducción de la expresión de la peptidasa del factor de transcripción de membrana,

sitio 1 (MBTPS1) en suero, sangre, tejido adiposo, hígado o cualquier otro líquido corporal, tejido u órgano del animal. Preferentemente, las células contenidas dentro de dichos líquidos, tejidos u órganos que se analizan contienen una molécula de ácido nucleico que codifica péptidos de MBTPS1 y/o la propia proteína de MBTPS1.

- 5 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

- 10 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
- 15 intercaladores, moléculas de genes indicadores, poliaminas, poliamidas, polietilenglicoles, poliéteres, grupos que potencian las propiedades farmacodinámicas de oligómeros, y grupos que potencian las propiedades farmacocinéticas de oligómeros. Grupos conjugados típicos incluyen colesteroles, lípidos, fosfolípidos, biotina, fenazina, folato, fenantridina, antraquinona, acridina, fluoresceínas, rodaminas, cumarinas y colorantes. Grupos que potencian las propiedades farmacodinámicas, en el contexto de esta divulgación, incluyen grupos que mejoran la
- 20 captación, potencian la resistencia a la degradación y/o fortalecen la hibridación específica de secuencia con el ácido nucleico diana. Grupos que potencian las propiedades farmacocinéticas, en el contexto de esta divulgación, incluyen grupos que mejoran la captación, distribución, metabolismo o eliminación de los compuestos de la presente divulgación. Grupos conjugados representativos se describen en la solicitud de patente internacional n.º PCT/US92/09196, depositada el 23 de octubre de 1992, y la patente de EE.UU. con Pat. N.º 6,287,860. Restos
- 25 conjugados incluyen, entre otros, restos de lípido tales como un resto colesterol, ácido cólico, un tioéter, por ejemplo, hexil-5-tritilitiol, un tiocolesterol, una cadena alifática, por ejemplo, residuos de dodecanodiol o undecilo, un fosfolípido, por ejemplo, di-hexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato de trietilamonio, una poliamina o una cadena de polietilenglicol, o ácido adamantano acético, un resto palmitilo, o un resto octadecilamina o hexilamino-carbonil-oxicolesterol. Los oligonucleótidos de la divulgación también pueden conjugarse con principios
- 30 activos, por ejemplo, aspirina, warfarina, fenilbutazona, ibuprofeno, suprofen, fenbufeno, ketoprofeno, (S)-(+)-pranoprofeno, carprofeno, dansilsarcosina, ácido 2,3,5-triyodobenzoico, ácido flufenámico, ácido folínico, una benzotiadiazida, clorotiazida, una diazepina, indometacina, un barbitúrico, una cefalosporina, un fármaco sulfa, un anti-diabético, un antibacteriano o un antibiótico.
- 35 Las patentes representativas de los Estados Unidos que enseñan la preparación de estos conjugados de oligonucleótidos incluyen, entre otros, las Patentes de los EE.UU. Pat. N.º 4,828,979; 4,948,882; 5,218,105; 5,525,465; 5,541,313; 5,545,730; 5,552,539; 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;
- 40 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

- 45 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
- 50 de ayuda en la captación, distribución y/o absorción incluyen, entre otras, las patentes de los EE.UU. Pat. N.º 5,108,921; 5,354,844; 5,416,016; 5,459,127; 5,521,291; 5,543,165; 5,547,932; 5,583,020; 5,591,721; 4,426,330; 4,534,899; 5,013,556; 5,108,921; 5,213,804; 5,227,170; 5,264,221; 5,356,633; 5,395,619; 5,416,016; 5,417,978; 5,462,854; 5,469,854; 5,512,295; 5,527,528; 5,534,259; 5,543,152; 5,556,948; 5,580,575; y 5,595,756
- 55 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.

60

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 NOS: 3 a 6) o en combinación con una formulación de proteína, polisacárido o lípido adecuada.

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

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

Los compuestos antisentido de la divulgación engloban cualquier sal, éster o sal de dichos ésteres farmacéuticamente aceptables, o cualquier otro compuesto que, tras la administración a un animal, que incluye un ser humano, es capaz de proporcionar (directa o indirectamente) el metabolito biológicamente activo o residuo del mismo.

La expresión "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales fisiológicamente y farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la divulgación: es decir, sales que retienen la actividad biológica deseada del compuesto parental y no confieren efectos toxicológicos no deseados al mismo. Para oligonucleótidos, ejemplos preferidos de sales farmacéuticamente aceptables y sus usos se describen adicionalmente en la patente de Estados Unidos Pat. N° 6,287,860.

La presente divulgación también incluye composiciones y formulaciones farmacéuticas que incluyen los compuestos antisentido de la divulgación. Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación pueden administrarse en varias formas que dependen de si se desea tratamiento local o sistémico y del área que va a tratarse. La administración puede ser tópica (incluyendo oftálmica y a membranas mucosas que incluyen administración vaginal y rectal), pulmonar, por ejemplo, por inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, que incluye por nebulizador; intratraqueal, intranasal, epidérmica y transdérmica), oral o parenteral. La administración parenteral incluye inyección o infusión intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular; o administración intracraneal, por ejemplo, intratecal o intraventricular.

Para el tratamiento de los tejidos en el sistema nervioso central, la administración puede realizarse, por ejemplo, por inyección o perfusión en el líquido cefalorraquídeo. La administración de ARN antisentido en el líquido cefalorraquídeo se describe, por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. Pat. N° 2007/0117772, "Methods for slowing familial ALS disease progression".

Cuando lo que se pretende es que los oligonucleótidos antisentido de la presente divulgación pueden administrarse a células del sistema nervioso central, la administración puede ser con uno o más agentes capaces de facilitar la penetración de los oligonucleótidos antisentido a través de la barrera hematoencefálica del sujeto. La inyección puede realizarse, por ejemplo, en la corteza entorrinal o en el hipocampo. La aplicación de factores neurotróficos mediante la administración de un vector adenovirus en las neuronas motoras del tejido muscular se describe en, por ejemplo, la patente de Estados Unidos Pat. N° 6,632,427, "Adenoviral-vector-mediated gene transfer into medullary motor neurons," La aplicación de vectores directamente al cerebro, por ejemplo, el cuerpo estriado, el tálamo, el hipocampo, o la sustancia negra es conocida en la técnica y se describe, por ejemplo en la patente de EE.UU. Pat. N° 6,756,523, "Adenovirus vectors for the transfer of foreign genes into cells of the central nervous system particularly in brain," La administración puede ser rápida por medio de inyección o aplicarse a lo largo de un periodo de tiempo por infusión lenta o administración de fórmulas de liberación lenta.

El oligonucleótidos antisentido sujeto también pueden unirse o conjugarse con agentes que proporcionen unas propiedades farmacéuticas o farmacodinámicas deseables. Por ejemplo, el oligonucleótido antisentido puede acoplarse a cualquier sustancia, conocida en la técnica por favorecer la penetración o el transporte a través de la barrera hematoencefálica, como un anticuerpo contra el receptor de la transferrina, y administrarse por inyección

intravenosa. El compuesto antisentido puede enlazarse con un vector viral, por ejemplo, que hace al compuesto antisentido más eficaz y/o aumenta el transporte del compuesto antisentido a través de la barrera hematoencefálica. La alteración de la barrera hematoencefálica osmótica también puede llevarse a cabo mediante por ejemplo, perfusión de azúcares incluyendo, entre otros, mesoeritritol, xilitol, D(+)-galactosa, D(+)-lactosa, D(+)-xilosa, dulcitol, 5 mioinositol, L(-)-fructosa, D(-)-manitol, D(+)-glucosa, D(+)-arabinosa, D(-)-arabinosa, celobiosa, D(+)-maltosa, D(+)-rafinosa, L(+)-ramnosa, D(+)-melibiosa, D(-)-ribosa, adonitol, D(+)-arabitol, L(-)-arabitol, D(+)-fucosa, L(-)-fucosa, D(-)-lixosa, L(+)-lixosa y L(-)-lixosa o aminoácidos, incluyendo, entre otros, glutamina, lisina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glicina, histidina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, tirosina, valina y taurina. Los procedimientos y materiales para aumentar la penetración en la barrera 10 hematoencefálica se describen, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. N° 4,866,042, "Method for the delivery of genetic material across the blood brain barrier," 6,294,520. "Material for passage through the blood-brain barrier," y 6,936,589, "Parenteral delivery systems."

Los compuestos antisentido sujetos también pueden mezclarse, encapsularse, conjugarse o asociarse de otro modo 15 a otras moléculas, estructuras de molécula o mezclas de compuestos, como, por ejemplo, liposomas, moléculas dirigidas a receptor, formulaciones orales, rectales, tópica u otras, para ayudar en la captación, distribución y/o absorción. Por ejemplo, pueden incluirse lípidos catiónicos en la formulación para facilitar la absorción de oligonucleótidos. Una de dichas composiciones que se ha demostrado que facilita la absorción es LIPOFECTIN (disponible en GIBCO-BRL, Bethesda, MD).

20 Se cree que los oligonucleótidos con al menos una modificación de 2'-O-metoxietilo son particularmente útiles para administración por vía oral. Composiciones y formulaciones farmacéuticas para administración tópica pueden comprender parches transdérmicos, pomadas, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, espráis, líquidos y polvos. Pueden ser necesarios o deseables vehículos farmacéuticos convencionales, bases acuosas, en polvo o 25 aceitosas, espesantes y similares. También pueden ser útiles preservativos recubiertos, guantes y similares.

Las formulaciones farmacéuticas de la presente divulgación, que pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria, pueden prepararse de acuerdo con técnicas convencionales muy conocidas en la industria farmacéutica. Dichas técnicas incluyen la etapa de poner en asociación los principios activos con el (los) vehículo(s) 30 farmacéutico(s) o excipiente(s). En general, las formulaciones se preparan poniendo en asociación uniforme e íntimamente los principios activos con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos, o ambos, y luego, si fuera necesario, moldeando el producto.

Las composiciones de la presente divulgación pueden formularse en cualquiera de muchas formas de dosificación 35 posibles tales como, entre otros, comprimidos, cápsulas, cápsulas de gel, jarabes líquidos, geles blandos, supositorios y enemas. Las composiciones de la presente divulgación también pueden formularse como suspensiones en medios acuosos, no acuosos o mixtos. Las suspensiones acuosas pueden contener adicionalmente sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión que incluyen, por ejemplo, carboximetilcelulosa sódica, sorbitol y/o dextrano. La suspensión también puede contener estabilizantes.

40 Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación incluyen, entre otros, soluciones, emulsiones, espumas y formulaciones que contienen liposomas. Las composiciones y formulaciones farmacéuticas de la presente divulgación pueden comprender uno o más potenciadores de la penetración, vehículos, excipientes u otros principios activos o inactivos.

45 Las emulsiones normalmente son sistemas heterogéneos de un líquido dispersado en otro en forma de gotitas que normalmente superan 0,1 μm de diámetro. Las emulsiones pueden contener componentes adicionales, además de las fases dispersas, y el fármaco activo que puede estar presente como una solución en o bien la fase acuosa, fase oleosa o bien él mismo como una fase independiente. Las microemulsiones están incluidas como un aspecto de la 50 presente divulgación. Las emulsiones y sus usos son bien conocidos en la técnica y se describen adicionalmente en la patente de Estados Unidos Pat. N° 6,287,860.

Formulaciones de la presente divulgación incluyen formulaciones liposomales. Tal como se usa en la presente divulgación, el término "liposoma" significa una vesícula compuesta por lípidos anfifílicos dispuestos en una bicapa o 55 bicapas esféricas. Los liposomas son vesículas unilaminares o multilaminares que tienen una membrana formada por un material lipófilo y un interior acuoso que contiene la composición que va a administrarse. Los liposomas catiónicos son liposomas positivamente cargados que se cree que interactúan con moléculas de ADN negativamente cargadas para formar un complejo estable. Se cree que los liposomas que son sensibles al pH o están cargados negativamente atrapan el ADN en vez de complejarse con él. Se han usado tanto liposomas catiónicos como no 60 catiónicos para administrar ADN a células.

Los liposomas también incluyen liposomas "estéricamente estabilizados", una expresión que, tal como se usa en el presente documento, se refiere a liposomas que comprenden uno o más lípidos especializados. Cuando se incorporan en liposomas, estos lípidos especializados producen liposomas con vidas en circulación mejoradas con respecto a los liposomas que carecen de dichos lípidos especializados. Ejemplos de liposomas estéricamente estabilizados son aquellos en los que parte de la parte de lípido formado de vesícula del liposoma comprende uno o más glucolípidos o se derivatiza con uno o más polímeros hidrófilos, tales como un resto de polietilenglicol (PEG). Los liposomas y sus usos se describen adicionalmente en la patente de Estados Unidos Pat. N° 6,287,860.

10 Las formulaciones y composiciones farmacéuticas de la presente divulgación también pueden comprender tensioactivos. El uso de tensioactivos en medicamentos, formulaciones y en emulsiones es muy conocido en la técnica. Los agentes tensioactivos y sus usos se describen adicionalmente en la patente de EE.UU. Pat. N° 6,287,860.

15 En un aspecto, la presente divulgación emplea diversos potenciadores de la penetración para efectuar la administración eficiente de ácidos nucleicos, particularmente oligonucleótidos. Además de ayudar en la difusión de fármacos no lipófilos a través de membranas celulares, los potenciadores de la penetración también potencian la permeabilidad de fármacos lipófilos. Los potenciadores de la penetración pueden clasificarse como pertenecientes a una de cinco amplias categorías, es decir, tensioactivos, ácidos grasos, sales biliares, agentes quelantes y no tensioactivos no quelantes. Los mejoradores de penetración y sus usos se describen adicionalmente en la patente de EE.UU. Pat. N° 6,287,860.

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

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

35 Para administración tópica u otra, los oligonucleótidos de la divulgación pueden encapsularse dentro de liposomas o pueden formar complejos con los mismos, en particular con liposomas catiónicos. Como alternativa, los oligonucleótidos pueden estar complejados con lípidos, en particular con lípidos catiónicos. Ácidos grasos y ésteres preferidos, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, y sus usos se describen adicionalmente en la patente de Estados Unidos Pat. N° 6,287,860.

Las composiciones y formulaciones para administración por vía oral incluyen polvos o gránulos, micropartículas, nanopartículas, suspensiones o soluciones en agua o medios no acuosos, cápsulas, cápsulas de gel, sobres, comprimidos o minicomprimidos. Pueden ser deseables espesantes, aromatizantes, diluyentes, emulsionantes, adyuvantes de dispersión o aglutinantes. Formulaciones orales preferidas son aquellas en las que los oligonucleótidos de la divulgación se administran conjuntamente con uno o más potenciadores de la penetración, tensioactivos y quelantes. Tensioactivos preferidos incluyen ácidos grasos y/o ésteres o sales de los mismos, ácidos biliares y/o sales de los mismos. Ácidos biliares/sales y ácidos grasos preferidos y sus usos se describen adicionalmente en la patente de Estados Unidos Pat. N° 6,287,860.

También se prefieren combinaciones de potenciadores de la penetración, por ejemplo, ácidos grasos/sales en combinación con ácidos biliares/sales. Una combinación particularmente preferida es la sal de sodio de ácido láurico, ácido cáprico y UDCA. Potenciadores de la penetración adicionales incluyen éter polioxietileno-9-laurílico, éter polioxietileno-20-cetílico. Los oligonucleótidos de la divulgación pueden administrarse por vía oral, en forma granulada que incluye partículas secadas por pulverización, o complejados para formar micro o nanopartículas. Los agentes complejantes de oligonucleótidos y sus usos se describen adicionalmente en la patente de Estados Unidos Pat. N° 6,287,860.

55 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, entre otros, potenciadores de la penetración, compuestos portadores y otros vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables

60

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

En otro aspecto relacionado, las composiciones de la divulgación pueden contener uno o más compuestos antisentido, particularmente oligonucleótidos, dirigidos a un primer ácido nucleico y uno o más compuestos antisentido adicionales dirigidos a un segundo ácido nucleico diana. Por ejemplo, la primera diana puede ser una secuencia antisentido particular de la peptidasa del factor de transcripción de membrana, sitio 1 (MBTPS1), y la segunda diana puede ser una región de otra secuencia de nucleótidos. Como alternativa, las composiciones de la divulgación pueden contener dos o más compuestos antisentido dirigidos a diferentes regiones del mismo ácido nucleico diana de la peptidasa del factor de transcripción de membrana, sitio 1 (MBTPS1). 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.

30 **Dosificación:**

Se cree que la formulación de composiciones terapéuticas y su posterior administración (dosificación) están dentro de la experiencia de los expertos en la materia. La dosificación depende de la gravedad y sensibilidad de la patología que va a tratarse, durando el ciclo de tratamiento de varios días a varios meses, o hasta que se efectúe una cura o se logre una disminución de la patología. Pueden calcularse programas de dosificación óptimos a partir de mediciones de acumulación de fármaco en el cuerpo del paciente. Los expertos pueden determinar fácilmente dosificaciones óptimas, metodologías de dosificación y tasas de repetición. Las dosificaciones óptimas pueden variar dependiendo de la potencia relativa de oligonucleótidos individuales, y generalmente pueden estimarse basándose en las CE50 que se ha descubierto que son eficaces en modelos animales *in vitro* e *in vivo*. En general, la dosificación es de 0,01 μ g 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 μ g a 100 g por kg de peso corporal, una vez o más diariamente, a una vez cada 20 años.

En aspectos, un paciente se trata con una dosificación de fármaco que es al menos aproximadamente 1, al menos aproximadamente 2, al menos aproximadamente 3, al menos aproximadamente 4, al menos aproximadamente 5, al menos aproximadamente 6, al menos aproximadamente 7, al menos aproximadamente 8, al menos aproximadamente 9, al menos aproximadamente 10, al menos aproximadamente 15, al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 25, al menos aproximadamente 30, al menos aproximadamente 35, al menos aproximadamente 40, al menos aproximadamente 45, al menos aproximadamente 50, al menos aproximadamente 60, al menos aproximadamente 70, al menos aproximadamente 80, al menos aproximadamente 90, o al menos aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal. Ciertas dosis inyectadas de oligonucleótidos antisentido se describen, por ejemplo, en la patente de EE.UU. Pat. N° 7,563,884, "Antisense modulation of PTP1B expression,".

Aunque diversos aspectos de la presente divulgación se han descrito anteriormente, debe entenderse que se han presentado a modo de ejemplo solamente, y no de limitación. Se pueden introducir numerosos cambios en los

aspectos divulgados de acuerdo con el presente documento sin necesidad de alejarse del espíritu o el alcance de la divulgación. Por ello, la amplitud y el alcance de la presente divulgación no debería limitarse a los aspectos citados anteriormente.

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

EJEMPLOS

10

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.

- 15 ***Ejemplo 1: Diseño de oligonucleótidos antisentido específicos para una molécula de ácido nucleico antisentido a la peptidasa del factor de transcripción de membrana, sitio 1 (MRTPS1) y/o una hebra sentido del polinucleótido MBTPS1***

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

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

- Un compuesto antisentido es "específicamente hibridable" cuando la unión del compuesto al ácido nucleico diana interfiere en la función normal del ácido nucleico diana para causar una modulación de la función y/o la actividad, y
40 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.

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

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

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

- Puede realizarse un ensayo de la curva de fusión usando una copia de ADNc de la molécula de ARN antisentido natural real o un nucleótido de ADN o ARN sintético correspondiente al sitio de unión de la molécula. Están
60 disponibles múltiples kits que contienen todos los reactivos necesarios para realizar este ensayo (por ejemplo, kit

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

5

Para realizar el ensayo, el ADNc o un oligonucleótido correspondiente se mezclan con la molécula en concentraciones definidas por los protocolos del fabricante particulares. La mezcla se calienta a 95°C para disociar todos los complejos de dsADN previamente formados, luego se enfría lentamente a temperatura ambiente u otra temperatura menor definida por el fabricante del kit para permitir que se hibriden las moléculas de ADN. Entonces, los complejos recientemente formados se calientan lentamente a 95 °C con recopilación de datos continua simultánea sobre la cantidad de fluorescencia que se produce por la reacción. La intensidad de fluorescencia es inversamente proporcional a las cantidades de ADNdc presentes en la reacción. Los datos pueden recogerse usando un instrumento de PCR en tiempo real compatible con el kit (por ejemplo, sistema de PCR en tiempo real StepOne Plus de ABI o el instrumento LightTyper, Roche Diagnostics, Lewes, Reino Unido).

15

Los picos de fusión se construyen representando la derivada negativa de la fluorescencia con respecto a la temperatura ($-d(\text{Fluorescencia})/dT$) sobre el eje y) contra la temperatura (eje x) usando software apropiado (por ejemplo, LightTyper (Roche) o SDS Dissociation Curve, ABI). Los datos se analizan para identificar la temperatura de la rápida transición del complejo de ADNdc a moléculas monocatenarias. Esta temperatura se llama T_m y es directamente proporcional a la intensidad de la interacción entre las dos moléculas. Normalmente, la T_m superará los 40 °C.

20

Ejemplo 2: Modulación de polinucleótidos de MBTPS1

25 Tratamiento de células HEPG2 con oligonucleótido antisentido

Se cultivaron células HepG2 de ATCC (cat #HB-8065) en medio de cultivo (MEM/EBSS (Hyclone cat #SH30024, o Mediatech cat #MT-10-010-CV) +10 % FBS (Mediatech cat #MT35-011-CV)+ penicilina/estreptomina (Mediatech cat #MT30-002-C1)) a 37 °C y el 5 % de CO₂. El día del experimento, el medio en las placas de 6 pocillos se cambió a medio de cultivo fresco. Todos los oligonucleótidos antisentido se diluyeron a la concentración de 20 µM. Se incubaron dos µl de esta solución con 400 µl de medio Opti-MEM (Gibco, cat #31985-070) y 4 µl de Lipofectamine 2000 (Invitrogen, cat #11668019) a temperatura ambiente durante 20 min y se aplicaron a cada pocillo de las placas de 6 pocillos con células HEPG2. Se usó una mezcla similar que incluye 2 µl de agua en lugar de la solución de oligonucleótido para los controles transfectados con vector simulado. Después de 3-18 horas de incubación a 37 °C y con el 5 % de CO₂, el medio se cambió a medio fresco de crecimiento. 48 h después de la adición de oligonucleótidos antisentido, el medio se eliminó y se extrajo ARN de las células usando el sistema de aislamiento de ARN total SV de Promega (cat #Z3105) o el kit de aislamiento de ARN total RNeasy de Qiagen (cat #74181) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se añadieron 600 ng de ARN a la reacción de transcripción inversa realizada usando el kit de ADNc Verso de Thermo Scientific (cat #AB1453B) o el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (cat #4368813) tal como se describe en el protocolo del fabricante. El ADNc de esta reacción de transcripción inversa se usó para monitorizar la expresión génica por PCR en tiempo real usando la mezcla de expresión génica Taqman de ABI (cat #4369510) y cebadores/sondas diseñados por ABI (ensayo de expresión génica Taqman de Applied Biosystems: Hs00921626_ml by Applied Biosystems Inc., Foster City CA). Se usó el siguiente ciclo de PCR: 50°C durante 2 min, 95°C durante 10 min, 40 ciclos de (95°C durante 15 segundos, 60°C durante 1 min) usando el termociclador Mx4000 (Stratagene). El cambio de veces en la expresión génica después del tratamiento con oligonucleótidos antisentido se calculó basándose en la diferencia de valores de dCt normalizados contra 18S entre las muestras tratadas y las transfectadas de forma simulada.

35

40

45

Resultados: Los resultados de PCR en tiempo real muestran que los niveles de ARNm de MBTPS1 en células HepG2 se aumentan significativamente 48 h después del tratamiento con uno de los oligonucleótidos diseñados para MBTPS1 antisentido Hs.568369.

50

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

55

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> CuRNA, Inc.

60 <120> TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES RELACIONADAS CON LA PEPTIDASA DEL FACTOR DE

ES 2 661 813 T3

TRANSCRIPCIÓN DE MEMBRANA, SITIO 1 (MBTPS1) MEDIANTE INHIBICIÓN DEL TRANSCRITO ANTISENTIDO NATURAL A MBTPS1

<130> P38939EP-PCT

<140> EP10842521.6

5 <141> 15/12/2010

<150> US 61/286,924

<151> 16/12/2009

<160> 6

<170> PatentIn versión 3.5

10 <210> 1

<211> 4354

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<300>

15 <308> NM_003791

<309> 21/09/2010

<313> (1)..(4354)

<400> 1

| | |
|---|-----|
| gacagacagg gcacgctggg tcggcggagc tgaggctccc agctgtgggc ctgctggcc | 60 |
| cggtcgccca gtctcgcgag agttgggagt aaacagcccc gaatggagtg cccaggcgtg | 120 |
| ttcgccgcyg aggcgccgtt atccccggcc cgcggccct gagctcccgg cggcgcagat | 180 |
| tggtcacag tggttgattg atcaaccccc ttggacgttg gttctgtgtg acaaattggag | 240 |
| tacaggactc agtcgtcacg gcctgagtga gagaagcctt atttccaaga tggagaagaa | 300 |
| gcygagaaaag aatgaaaagc ctctcttcag gctgaaccac aaaaggccat gggatttaac | 360 |
| tttatttat gttgggcaag actgtaagat ggctgattag taatgttgca gcttttagct | 420 |
| gaaacaaaaa ttcactttta atcaagaaga aaaaagtgtg atttgaatat atgcaatttt | 480 |
| atgatcatat tcgcttgtga ccatgaagct tgtcaacatc tggctgcttc tgctcgtggt | 540 |
| ttgctctgt ggaagaaac atctgggcyg cagactggaa aagaaatctt ttgaaaaggc | 600 |
| cccatgccct ggctgttccc acctgacttt gaaggtggaa ttctcatcaa cagttgtgga | 660 |
| atatgaatat attgtggctt tcaatggata ctttacagcc aaagctagaa attcatttat | 720 |
| ttcaagtgcc ctgaagagca gtgaagtaga caattggaga attatacctc gaaacaatcc | 780 |
| atccagtgac taccctagtg attttgaggt gattcagata aaagaaaaac agaaagcggg | 840 |
| gctgctaaca cttgaagatc atccaaacat caaacgggtc acgccccaac gaaaagtctt | 900 |
| 20 tcgttcctc aagtatgctg aatctgacct cacagtacct tgcaatgaaa cccggtggag | 960 |

ES 2 661 813 T3

ccagaagtgg caatcatcac gtcccctgcg aagagccagc ctctccctgg gctctggcctt 1020
 ctggcatgct acgggaaggc attcgagcag acggctgctg agagccatcc cgcgccaggt 1080
 tgcccagaca ctgcaggcag atgtgctctg gcagatggga tatacaggtg ctaatgtaag 1140
 agttgctggt tttgacactg ggctgagcga gaagcatccc cacttcaaaa atgtgaagga 1200
 gagaaccaac tggaccaacg agcgaacgct ggaagatggg ttgggccatg gcacattcgt 1260
 ggcaggtgtg atagccagca tgagggagtg ccaaggattt gctccagatg cagaacttca 1320
 cattttcagg gtctttacca ataatcaggt atcttacaca tcttggtttt tggacgcctt 1380
 caactatgcc attttaaaga agatcgacgt gttaaacctc agcatcggcg gcccggactt 1440
 catggatcat ccgtttgttg acaaggtgtg ggaattaaca gctaacaatg taatcatggt 1500
 ttctgtatt ggcaatgacg gacctcttta tggcactctg aataaccctg ctgatcaaat 1560
 ggatgtgatt ggagtaggcg gcattgactt tgaagataac atcgcccgtt tttcttcaag 1620
 gggaatgact acctgggagc taccaggagg ctacggctgc atgaaacctg acattgtcac 1680
 ctatggtgct ggcgtgcggg gttctggcgt gaaagggggg tgccggggcc tctcagggac 1740
 cagtgttgct tctccagtgg ttgcaggctc tgcaccctg ttagtgagca cagtccagaa 1800
 gcgtgagctg gtgaatcccg ccagtatgaa gcaggccctg atcgcgtcag cccggaggct 1860
 ccccggggtc aacatgtttg agcaaggcca cggcaagctc gatctgctca gagcctatca 1920
 gatcctcaac agctacaagc cacaggcaag tttgagcccc agctacatag atctgactga 1980
 gtgtccctac atgtggccct actgctccca gcccatctac tatggaggaa tgccgacagt 2040
 tgtaaatgct accatcctca acggcatggg agtcacagga agaattgtag ataagcctga 2100
 ctggcagccc tatttgccac agaacggaga caacattgaa gttgccttct cctactcctc 2160
 ggtcttatgg ccttggctcg gctacctggc catctccatt tctgtgacca agaaaagcggc 2220
 ttctgggaa ggcattgctc agggccatgt catgatcact gtggcttccc cagcagagac 2280
 agagtcaaaa aatggtgcag aacagacttc aacagtaaag ctccccatta aggtgaagat 2340
 aattcctact cccccgcaa gcaagagagt tctctgggat cagtaccaca acctccgcta 2400
 tocacctggc tatttcccca gggataatth aaggatgaag aatgaccctt tagactggaa 2460
 tggatgatcac atccacacca atttcaggga tatgtaccag catctgagaa gcatgggcta 2520
 cttttagtag gtectcgggg ccccttcac gtgttttgat gccagtcagt atggcacttt 2580
 gctgatggtg gacagtgagg aggagtactt cctgaagag atcgccaagc tccggagggg 2640
 cgtggacaac ggcctctcgc tcgtcatctt cagtgactgg tacaacactt ctgttatgag 2700
 aaaagtgaag ttttatgatg aaaacacaag gcagtgggtg atgccggata ccggaggagc 2760
 taacatocca gctctgaatg agctgctgct tgtgtggaac atggggttca gcgatggcct 2820
 gtatgaaggg gagttcaccg tggccaacca tgacatgtat tatgcgtcag ggtgcagcat 2880

ES 2 661 813 T3

cgcaagttt ccagaagatg gcgtcgtgat aacacagact ttcaaggacc aaggattgga 2940
 ggttttaaag caggaaacag cagttgttga aaacgtcccc attttgggac tttatcagat 3000
 tccagctgag ggtggaggcc ggattgtact gtatggggac tocaattgct tggatgacag 3060
 tcaccgacag aaggactgct tttggcttct ggatgcctc ctccagtaca catcgtatgg 3120
 ggtgacaccg cctagcctca gtcactctgg gaaccgccag cgccctcca gtggagcagg 3180
 ctcagtcact ccagagagga tggaaggaaa ccatcttcat cggactcca aggttctgga 3240
 ggcccatttg ggagaccaa aacctcggcc tctaccagcc tgtccacgct tgtcttgggc 3300
 caagccacag cctttaacg agacggcgc cagtaacctt tggaacatc agaagctact 3360
 ctccattgac ctggacaagg tgggtttacc caactttcga togaatcgc ctcaagtgag 3420
 gcccttgtcc cctggagaga ggggcgcctg ggacattcct ggagggatca tgcctggccg 3480
 ctacaaccag gaggtgggcc agaccattcc tgtctttgcc ttcctgggag ccatggtggt 3540
 cctggccttc tttgtgttac aaatcaacaa ggccaagagc aggccgaagc ggaggaagcc 3600
 cagggatgaag cgcccgcagc tcatgcagca ggttcaccgc ccaaagacc cttcgtgtg 3660
 accggcagcc tggctgaccg tgagggccag agagagcctt cacggacggc gctggtgggt 3720
 gagccgagct gtggtggcgg ctggtttaaaggaggatccag tttccagctg caggtttggt 3780
 agagtctggt ctacatgggc ctgccctoct gtgatgggca gaggctcctg gtacatogag 3840
 aagattcctg tggatcccgt caggagggac ttagtggctc tgccgccagt gagacttccc 3900
 gccggcagct gtgcgcacca aagactcggg agaactggaa aggctgtctg gggcttctg 3960
 actgcagggg aaggatgtac tttccaaaca aatgatacaa ccctgaccaa gctaaaagac 4020
 gctgtttaa ggctattttc tataatttatt gttgggaaaa gtcactttaa agacttgtgc 4080
 tatttggag caaagctatt tttttgtca gtggaatgca gttttttac tattccatca 4140
 tgaggaacaa catagattcc atgatcttt taatgacagt acagactgag atttgaagga 4200
 aacatgcaca aatctgtaa acatagacct tcgctttatt tttgtaagta tcacctgcca 4260
 ccatgttttg taatttgagg tcttgatttc accattgtcg gtgaagaaaa tttcaataa 4320
 atatgtatta cccgtctgaa gcttaaaaaa aaaa 4354

<210> 2
 <211> 1240
 5 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 2

tgccaggcgg cgagaacgcg ctgggggaac ccttgggtccg ctctgcgcgt cgctctagga 60
 tccccgaaaa ggagcacggg cgcgaaagcg gccaggctgg gccaggatct agaaagactg 120
 cctggcgcag gctccctgcc cccgcgggccc tgctgtcatg gactcgtgga gagctcgctt 180

10

ES 2 661 813 T3

cccgcgcgga cccttcctgc aggggtccac gtccaggcac cggcggctcg gacacccac 240
 ccccggccgg gcacctgcc tgggtgcccc ttaaccggg cggtagctcg ttaagatggc 300
 gaagtgtccg gtccggaaca cgcgaaaccc caaatcccgc ctgcccgacc tcctgacccc 360
 cggccccacg ggacgacaga ctgggcctcc cgacgcgcag cgcgctgccg ggacacggg 420
 tgcgtgcgaa acggcaggac cctttgtaac gccacgtgtc ttgctctttc ttgacaaaac 480
 cagaataaat gcgctcaact ggcctgaaaa aggtctgcc gcctaataaa aaaaaaaaaa 540
 cgggcgcgtc ggctcctagc agcatcccc cccagggggc cccaagcgtt taggcggtaa 600
 ccccggttt ttgctttgtt acaaaaccga ggtccccct tataagggcg agggtcgca 660
 cattcacata cacgcccggc cggctacctt gggttccgcg tcgcccctgt tccaccagag 720
 cgcgccatg tgtgatactt ggggcgagac aacaaacagc tgtgattaca ggactctggg 780
 ggggcgaaca cctcaccctc gcttgagaat aacgggaata cccccctc acgttattcc 840
 ctacgggggg gggggggggc ggcggaaac aattacgtct gtcggtggga caccgcgcac 900
 atgtacacga cctggagagc ggggaagtaa tattgtctaa aataaagccg cgccttttag 960
 cggcgcgcgc acgaacatat gtcatacacc aatgtccctt gtctcacaca cccggaacac 1020
 gacagcaaag gcggggggcg tccaaacagg atcgaggcca cgcgctctgc ttaacgaggc 1080
 actcgtggc gctgcaccct ccttcgagc tgagaatcta tttcgtgcgc gtcacctgt 1140
 gaacaagccg actagggagg atatgttccc gccaacacc cgcggtcatc ctctccgcgc 1200
 gcacagtgcg cgcgcgcgct cctcggagtg ccccgcta 1240

<210> 3

<211> 20

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido antisentido

<400> 3

10 gaccggacac ttcgcatct 20

<210> 4

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Oligonucleótido antisentido

<400> 4

gcagtcttc tagatcctgg c 21

<210> 5

20 <211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido antisentido

25 <400> 5

ctccacgagt ccatgacagc a 21

<210> 6

<211> 21

<212> ADN

ES 2 661 813 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido antisentido

<400> 6

5 gcgccaggca gtcttctag a 21

REIVINDICACIONES

1. Un oligonucleótido que se dirige a un transcrito antisentido natural de la peptidasa del factor de transcripción de membrana, sitio 1 (MBTPS1) para uso como un compuesto terapéutico, donde el oligonucleótido
5 aumenta la expresión de la peptidasa del factor de transcripción de membrana, sitio 1 (MBTPS1), y donde el transcrito antisentido natural tiene la secuencia de ácido nucleico tal como se expone en la SEQ ID NO: 2, o una variante de la misma que retiene la función del transcrito antisentido natural de SEQ ID NO: 2.
2. Un oligonucleótido que se dirige a un transcrito antisentido natural de la peptidasa del factor de
10 transcripción de membrana, sitio 1 (MBTPS1) para uso en la prevención o tratamiento de una enfermedad o desorden asociados a la peptidasa del factor de transcripción de membrana, sitio 1 (MBTPS1), donde el oligonucleótido aumenta la expresión de la peptidasa del factor de transcripción de membrana, sitio 1 (MBTPS1), donde la enfermedad o desorden se han seleccionado del grupo consistente en una enfermedad o desorden
15 asociados a la respuesta a estrés RE, una enfermedad inflamatoria del intestino (por ejemplo, colitis), una enfermedad o desorden asociados al desarrollo óseo endocondral (por ejemplo, condrodisplasia, apoptosis condrocítica, desorganización de la red de colágeno), y donde el transcrito antisentido natural tiene la secuencia de ácido nucleico tal como se expone en la SEQ ID NO: 2, o una variante de la misma que retiene la función del transcrito antisentido natural de SEQ ID NO: 2.
- 20 3. Uso de un oligonucleótido que se dirige a un transcrito antisentido natural de la peptidasa del factor de transcripción de membrana, sitio 1 (MBTPS1) para la fabricación de un medicamento para la prevención o tratamiento de una enfermedad o desorden asociados a la peptidasa del factor de transcripción de membrana, sitio 1 (MBTPS1) donde dicho oligonucleótido aumenta la expresión de la peptidasa del factor de transcripción de membrana, sitio 1 (MBTPS1), donde la enfermedad o desorden se han seleccionado del grupo consistente en una
25 enfermedad o desorden asociados a la respuesta a estrés RE, una enfermedad inflamatoria del intestino (por ejemplo, colitis), una enfermedad o desorden asociados al desarrollo óseo endocondral (por ejemplo, condrodisplasia, apoptosis condrocítica, desorganización de la red de colágeno), y donde el transcrito antisentido natural tiene la secuencia de ácido nucleico tal como se expone en la SEQ ID NO: 2, o una variante de la misma que retiene la función del transcrito antisentido natural de SEQ ID NO: 2.
- 30 4. Un procedimiento *in vitro* de aumento de la expresión la peptidasa del factor de transcripción de membrana, sitio 1 (MBTPS1) en *células* o tejidos de un paciente que comprende: poner en contacto dichas *células* o tejidos con un oligonucleótido que se dirige a un transcrito antisentido natural de la peptidasa del factor de transcripción de membrana, sitio 1 (MBTPS1); aumentando de este modo la expresión de la peptidasa del factor de
35 transcripción de membrana, sitio 1 (MBTPS1); y donde el transcrito antisentido natural tiene la secuencia de ácido nucleico tal como se expone en la SEQ ID NO: 2, o una variante de la misma que retiene la función del transcrito antisentido natural de SEQ ID NO: 2.
5. Uso de acuerdo con la reivindicación 3, o un oligonucleótido para uso de acuerdo con las
40 reivindicaciones 1 o 2, o un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, donde el oligonucleótido es monocatenario.
6. Uso de acuerdo con la reivindicación 3, o un oligonucleótido para uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2 o un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, donde el oligonucleótido es un
45 compuesto de siRNA.
7. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3, 5 o 6, o un oligonucleótido para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 5 o 6, o un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, donde el oligonucleótido comprende al menos una de las SEQ ID NOs: 3, 4 o 6.
- 50 8. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 o 5 a 7, o un oligonucleótido para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 5 a 7, o un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, donde la expresión de la peptidasa del factor de transcripción de membrana, sitio 1 (MBTPS1) aumenta al menos un 10 %.
- 55 9. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 o 5 a 8, o un oligonucleótido para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 5 a 8 o un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, donde el oligonucleótido comprende además una o más modificaciones que comprenden:
- 60 a. al menos un enlace internucleosídico modificado seleccionado de entre: un fosforotioato, alquilfosfonato,

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

5 b. al menos un nucleótido modificado seleccionado de entre: un ácido nucleico peptídico (PNA), un ácido nucleico bloqueado (LNA), un ácido arabino-nucleico, un análogo, un derivado, y combinaciones de los mismos; o

c. al menos un resto de azúcar modificado seleccionado de entre: un resto de azúcar modificado con 2'-O-metoxietilo, un resto de azúcar modificado con 2'-metoxi, un resto de azúcar modificado con 2'-O-alquilo, un resto de azúcar bicíclico, un resto de 2'-fluoro, y combinaciones de los mismos.

10

10. Un oligonucleótido que es específicamente hibridable a un transcrito antisentido natural que tiene la secuencia de ácido nucleico tal como se expone en la SEQ ID NO: 2, o una variante de la misma que retiene la función del transcrito antisentido natural de SEQ ID NO: 2.

15 11. Un oligonucleótido que comprende al menos una de las SEQ ID NOs: 3, 4 o 6.

12 Un oligonucleótido de acuerdo con las reivindicaciones 10 u 11, donde el oligonucleótido es monocatenario o un compuesto de siRNA.

20 13. Un oligonucleótido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, que además comprende una o más modificaciones que comprenden:

25 a. al menos un enlace internucleosídico modificado seleccionado de entre: un fosforotioato, alquilfosfonato, fosforoditioato, alquilfosfonotioato, fosforamidato, carbamato, carbonato, triéster de fosfato, acetamidato, éster carboximetílico y combinaciones de los mismos;

b. al menos un nucleótido modificado seleccionado de entre: un ácido nucleico peptídico (PNA), un ácido nucleico bloqueado (LNA), un ácido arabino-nucleico, un análogo, un derivado, y combinaciones de los mismos; o

30 c. al menos un resto de azúcar modificado seleccionado de entre: un resto de azúcar modificado con 2'-O-metoxietilo, un resto de azúcar modificado con 2'-metoxi, un resto de azúcar modificado con 2'-O-alquilo, un resto de azúcar bicíclico, un resto de 2'-fluoro, y combinaciones de los mismos.

35 14. Un oligonucleótido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, donde el oligonucleótido tiene entre 10 a 30 nucleótidos de longitud.

15. Una composición farmacéutica que comprende al menos un oligonucleótido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

FIGURA 1

Nº de veces la diferencia en # de copias de ARNm en comparación con el control

