

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 677 070**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/113** (2010.01)

**A61K 31/7125** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.10.2011 PCT/US2011/057817**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.05.2012 WO12058268**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.10.2011 E 11836985 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.04.2018 EP 2633052**

54 Título: **Tratamiento de enfermedades relacionadas con el regulador del desarrollo 1 asociado a interferón (IFRD1) mediante inhibición del transcrito antisentido natural al gen IFRD1**

30 Prioridad:

**27.10.2010 US 407045 P**

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

**27.07.2018**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 677 070 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Tratamiento de enfermedades relacionadas con el regulador del desarrollo 1 asociado a interferón (IFRD1) mediante inhibición del transcrito antisentido natural al gen IFRD1

5

### CAMPO DE LA INVENCION

La presente solicitud reivindica la prioridad de la solicitud de patente provisional de EE. UU. n.º 61/407045, depositada el miércoles, 27 de octubre de 2010.

10

Aspectos de la divulgación comprenden oligonucleótidos que modulan la expresión y/o la función del gen IFRD1 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

20

transcripción, la traducción y la replicación de ARN. El ADN antisentido tiene la característica añadida de que los híbridos de ADN-ARN sirven de sustrato para la digestión por ribonucleasa H, una actividad que está presente en la mayoría de los tipos de células. Las moléculas antisentido pueden suministrarse al interior de células, como es el caso para oligodesoxinucleótidos (ODN), o pueden expresarse a partir de genes endógenos como moléculas de ARN. La FDA recientemente aprobó un fármaco antisentido, VITRAVENE™ (para el tratamiento de retinitis por citomegalovirus), que refleja que el antisentido tiene utilidad terapéutica.

25

YuanYuan Gu y col., (Nature, Volume 458, No. 7241, pages 1039-1042, 2009) enseña la identificación del IFRD1 como un gen modificador para la enfermedad de fibrosis quística pulmonar.

### 30 RESUMEN

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

35

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

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 ARNsi, 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 un gen IFRD1 en sistemas biológicos, incluyendo entre otros, células o tejidos del paciente *in vivo* o *in vitro* que comprenden poner en contacto dicho sistema biológico o dichas células o tejidos con un oligonucleótido antisentido de aproximadamente 5 a 30 nucleótidos de longitud, donde dicho oligonucleótido tiene al menos un 50 % de identidad de secuencia con un complemento inverso de un polinucleótido que comprende de 5 a 30 nucleótidos consecutivos dentro de los nucleótidos 1 a 740 de la SEQ ID NO: 2 o 1 a 418 de la SEQ ID NO: 3 o 1 a 540 de la SEQ ID NO: 4 o 1 a 546 de la SEQ ID NO: 5 o 1 a 429 de la SEQ ID NO: 6 o 1 a 429 de la SEQ ID NO: 7 modulando de este modo la función y/o la expresión del polinucleótido del gen IFRD1 en dicho sistema biológico que incluye dichas células o tejidos del paciente *in vivo* o *in vitro*.

50

55

En otro aspecto, un oligonucleótido se dirige a una secuencia antisentido natural de polinucleótidos del gen IFRD1 presentes en un sistema biológico, por ejemplo, los nucleótidos expuestos en las SEQ ID NO: 2 a 7, y cualquier variante, alelo, homólogo, mutante, derivado, fragmento y secuencia complementaria a los mismos. Ejemplos de oligonucleótidos antisentido se exponen como las SEQ ID NO: 8 al 16.

60

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

IFRD1 en células o tejidos del paciente *in vivo* o *in vitro*, que comprende poner en contacto dichas células o tejidos con un oligonucleótido antisentido de 5 a 30 nucleótidos de longitud, donde dicho oligonucleótido tiene al menos un 50 % de identidad de secuencia con un complemento inverso del antisentido del polinucleótido del gen IFRD1; modulando de este modo la función y/o la expresión del polinucleótido del gen IFRD1 en células o tejidos del paciente *in vivo* o *in vitro*.

Otro aspecto proporciona un procedimiento de modulación de la función y/o la expresión de un polinucleótido de un gen IFRD1 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 con respecto a un polinucleótido del gen IFRD1; modulando de este modo la función y/o la expresión del polinucleótido del gen IFRD1 en células o tejidos del paciente *in vivo* o *in vitro*.

En otro aspecto, la divulgación comprende un procedimiento para la modulación de la función o expresión de un polinucleótido del gen IFRD1 en un sistema biológico que comprende poner en contacto dicho sistema biológico con al menos un oligonucleótido antisentido dirigido a una transcrito antisentido natural del polinucleótido del gen IFRD1 modulando así la función y/o expresión del polinucleótido del gen IFRD1 en dicho sistema biológico.

En otro aspecto, la divulgación comprende un procedimiento para la modulación de la función o expresión de un polinucleótido del gen IFRD1 en un sistema biológico que comprende poner en contacto dicho sistema biológico con al menos un oligonucleótido antisentido dirigido a una región de un transcrito antisentido natural del polinucleótido del gen IFRD1 modulando de este modo la función y/o expresión del polinucleótido del gen IFRD1 en dicho sistema biológico.

En otro aspecto, la divulgación comprende un procedimiento para aumentar la función y/o expresión de un polinucleótido del gen IFRD1 que tiene la SEQ ID NO:1 en un sistema biológico que comprende ponerse en contacto dicho sistema biológico con al menos un oligonucleótido antisentido dirigido a una transcrito antisentido natural de dicho polinucleótido del gen IFRD1 modulando así la función y/o expresión de dicho polinucleótido del gen IFRD1 o expresión producto del mismo.

En otro aspecto, la divulgación comprende un procedimiento para aumentar la función y/o expresión de un polinucleótido del gen IFRD1 que tiene la SEQ ID NO: 1 en un sistema biológico que comprende poner en contacto dicho sistema biológico con al menos un oligonucleótido antisentido dirigido a un transcrito antisentido natural de dicho polinucleótido del gen IFRD1 aumentando así la función y/o expresión de dicho polinucleótido del gen IFRD1 o la expresión producto del mismo, donde los transcritos antisentido naturales se seleccionan a partir de las SEQ ID NO: 2 al 7.

En otro aspecto, la divulgación comprende un procedimiento para aumentar la función y/o expresión de un polinucleótido del gen IFRD1 que tiene la SEQ ID NO. 1 en un sistema biológico que comprende poner en contacto dicho sistema biológico con al menos un oligonucleótido antisentido dirigido a una transcrito antisentido natural de dicho polinucleótido del gen IFRD1 aumentando así la función y/o expresión de dicho polinucleótido del gen IFRD1 o la expresión producto del mismo, donde los transcritos antisentido naturales se seleccionan a partir de las SEQ ID NO: 2 a 7 y donde los oligonucleótidos antisentido se seleccionan a partir de al menos una de las SEQ ID NO: 8 a 16.

En un aspecto, una composición comprende uno o más oligonucleótidos antisentido que se unen a polinucleótidos del gen IFRD1 sentido y/o antisentido.

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

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

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

En un aspecto, los oligonucleótidos se administran a un paciente por cualquier vía de administración incluyendo, pero sin limitación, vía oral, transdérmica, a través de medios de inhalación, por vía subcutánea, intramuscular, intravenosa o intraperitoneal.

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

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

10 Otros aspectos se describen *infra*.

#### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

La figura 1 es un gráfico de resultados de PCR en tiempo real que muestra el cambio en veces + la desviación estándar en ARNm de IFRD1 después del tratamiento de células 518A2 con oligonucleótidos de fosforotioato introducidos usando Lipofectamine 2000, en comparación con el control. Las barras indicadas como CUR-0498, CUR-0496, CUR-0500, CUR-0484, CUR-0488, CUR-0486, CUR-0492, CUR-0490 y CUR-0494 se corresponden con muestras tratadas con las SEQ ID NO: 15,14,16, 8, 10,9, 12, 11 y 13 respectivamente.

Descripción del listado de secuencias: SEQ ID NO: 1: 'Regulador del desarrollo 1 asociado a interferón' (IFPD1) de Homo sapiens, variante de transcripción 3, ARNm (NCBI n.º de acceso: NM\_001007245); SEQ ID NO: 2: Secuencia antisentido natural de IFRD1 (Hs.657074); SEQ ID NO: 3: Secuencia antisentido natural de IFRD1 (Hs.642044); SEQ ID NO: 4: Secuencia antisentido natural de IFRD1 (Hs.709100); SEQ ID NO: 5: Secuencia antisentido natural de IFRD1 (Inversa de CD673697); SEQ ID NO: 6: Secuencia antisentido natural de IFRD1 (Inversa de AA625894); SEQ ID NO: 7: Secuencia antisentido natural de IFRD1 (Inversa de DB508733); SEQ ID NO: 8 a 16: Oligonucleótidos antisentido y SEQ ID NO: 17 a 25; los oligonucleótidos sentido correspondientes al complemento inverso del oligonucleótido antisentido; SEQ ID NO: 8 al 16. "r" indica ARN

#### **DESCRIPCIÓN DETALLADA**

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

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

#### **50 Definiciones**

La terminología usada en el presente documento es con el fin de describir aspectos particulares solamente y no pretende ser limitante de la divulgación. Tal como se utilizan en este 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", "incluyen", "que tiene", "tiene", "con", o variantes de los mismos se usan en la descripción detallada y/o las reivindicaciones, dichas expresiones pretenden ser inclusivas de una manera similar a la expresión "que comprende".

El término «alrededor de» o «aproximadamente» significa dentro de un intervalo de error aceptable para el valor particular como se ha determinado por un experto habitual en la materia, que dependerá en parte de cómo se mide o

- determina el valor, es decir, las limitaciones del sistema de medición. Por ejemplo, "alrededor de" puede significar 1 o más de 1 de desviación estándar, conforme a la práctica de la técnica. Como alternativa, «aproximadamente» puede significar un intervalo de hasta el 20%, preferentemente hasta el 10%, más preferentemente hasta el 5%, y más preferentemente todavía hasta el 1% de un valor dado. De manera alternativa, en particular con respecto a los sistemas o procesos biológicos, el término puede significar un orden de magnitud de un valor preferentemente comprendido en 5 veces y más preferentemente, comprendido en 2 veces. En los casos en los que se describen valores particulares en la solicitud y las reivindicaciones, a menos que se exprese lo contrario, el término «alrededor de» significa que se debe asumir que el valor se encuentra comprendido en un intervalo de error aceptable para el valor particular.
- 10 Tal como se usa en el presente documento, el término "ARNm" significa el/los transcrito(s) de ARNm actualmente conocidos de un gen elegido como diana, y cualquier transcrito adicional que pueda ser dilucidado.
- 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 ADN diana. Un oligonucleótido antisentido puede regular positivamente o regular negativamente la expresión y/o función de un polinucleótido particular. La definición pretende comprender cualquier molécula de ARN o ADN extraña que es útil desde un punto de vista terapéutico, de diagnóstico u otro. Dichas moléculas incluyen, por ejemplo, moléculas de ARN o ADN antisentido, ARN de interferencia (ARNi), micro ARN, moléculas de ARN señuelo, siRNA, ARN enzimático, ARN de edición terapéutica y ARN agonista y antagonista, compuestos oligoméricos antisentido, oligonucleótidos antisentido, oligonucleótidos de secuencia guía externa (EGS), agentes de *splicing* alternativos, cebadores, sondas y otros compuestos oligoméricos que hibridan con al menos una parte del ácido nucleico diana. Por lo tanto, estos compuestos pueden introducirse en forma de compuestos oligoméricos monocatenarios, bicatenarios, parcialmente monocatenarios, o circulares.
- 25 En el contexto de esta divulgación, el término "oligonucleótido" se refiere a un oligómero o polímero de ácido ribonucleico (ARN) o ácido desoxirribonucleico (ADN) o miméticos de los mismos. El término "oligonucleótido" también incluye oligómeros lineales o circulares de monómeros o enlaces naturales y/o modificados, que incluyen desoxirribonucleósidos, ribonucleósidos, formas sustituidas y alfa-anómeras de los mismos, ácidos nucleicos peptídicos (PNA), ácidos nucleicos bloqueados (LNA), fosforotioato, metilfosfonato y similares. Los oligonucleótidos 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 Hoösteen o Hoösteen inversa, o similares.
- 35 El oligonucleótido puede ser "quimérico", es decir, estar compuesto de diferentes regiones. En el contexto de esta divulgación los compuestos "quiméricos" son oligonucleótidos, que contienen dos o más regiones químicas, por ejemplo, una o más regiones de ADN, una o más regiones de ARN, una o más regiones de PNA, etc. Cada región química está compuesta por al menos una unidad monomérica, es decir, un nucleótido en el caso de un compuesto de oligonucleótidos. Estos oligonucleótidos normalmente comprenden al menos una región donde el oligonucleótido se modifica con el fin de presentar una o más propiedades deseadas. Las propiedades deseadas del oligonucleótido incluyen, 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.
- 55 Tal y como se usan en el presente documento, "IFRD1" y "regulador del desarrollo 1 asociado a interferón" 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, los términos "proteína PC4 inducible por factor de crecimiento nervioso", "PC4", "TIS7", "IFRdl", "regulador del desarrollo 1 asociado a interferón" e "IFRD1" son considerados lo

mismo en la bibliografía y se usan indistintamente en la presente solicitud.

- Tal como se usa en el presente documento, la expresión "oligonucleótido específico para" u "oligonucleótido que se dirige a" se refiere a un oligonucleótido que tiene una secuencia (i) capaz de formar un complejo estable con una parte del gen elegido como diana, o (ii) capaz de formar un dúplex estable con una parte de un transcrito de ARNm del gen elegido como diana. La estabilidad de los complejos y los dúplex puede determinarse mediante cálculos teóricos y/o ensayos in vitro. Ensayos a modo de ejemplo para determinar la estabilidad de complejos y dúplex de hibridación se describen en los ejemplos más adelante.
- 10 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "ácido nucleico diana" engloba ADN, ARN (que comprende pre-ARNm y ARNm) transcrito a partir de dicho ADN, y también ADNc derivado de dicho ARN, secuencias codificantes, no codificantes, polinucleótidos sentido o antisentido. La hibridación específica de un compuesto oligomérico con su ácido nucleico diana interfiere en la función normal del ácido nucleico. Esta modulación de la función de un ácido nucleico diana por compuestos, que se hibridan específicamente con él, se denomina
- 15 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, 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. El efecto global de dicha interferencia con las funciones del ácido nucleico diana es la modulación de la expresión de
- 20 un producto codificado u oligonucleótidos.

- El ARN de interferencia "ARNi" está mediada por moléculas de ARN bicatenario (ARNdc) que tienen homología específica de secuencia con sus secuencias de ácido nucleico «diana». En ciertos aspectos de la presente divulgación, los mediadores son dúplex de ARN "de interferencia pequeña" (siRNA) de 5-25 nucleótidos. Los siRNA
- 25 se derivan a partir del procesamiento del dsARN mediante una enzima RNasa conocida como Dicer. Los productos dúplex son reclutados en un siRNA multiproteína denominado RISC (complejo de silenciamiento inducido por ARN). Sin desear ceñirse a ninguna teoría particular, se cree entonces que un RISC es guiado a un ácido nucleico diana (adecuadamente ARNm), en el que el dúplex de siRNA interactúa de una forma específica de secuencia para mediar en la escisión en un modo catalítico. Los ARN de interferencia pequeños que pueden usarse de acuerdo con la
- 30 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 de aproximadamente 5 a aproximadamente 40 nt, de aproximadamente 5 a aproximadamente 30 nt, de
- 35 aproximadamente 10 a aproximadamente 30 nt, de 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
- 40 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
- 45 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
- 50 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
- 55 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
- 60 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 VIH puede actuar como un "señuelo" y se une de forma eficiente a la proteína tat de VIH, impidiendo de este modo que se una a secuencias TAR codificadas por el ARN de VIH. 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-alquinil(C3-C6)-citosina, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, seudoisocitosina, 2-hidroxi-5-metil-4-triazolopiridina, isocitosina, isoguanina, inosina y los nucleótidos "no de origen natural" descritos en Benner y col., patente de EE.UU. n.º 5.432.272. El término "nucleótido" pretende cubrir todos y cada uno de estos ejemplos, además de análogos y tautómeros de los mismos. 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, p. ej., 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, New York, 1980; Freier & Altmann, (1997) Nucl. Acid. Res., 25(22), 4429- 4443; Toulmé, J.J., (2001) Nature Biotechnology 19:17-18; Manoharan M., (1999) Biochemica et Biophysica Acta 1489:117-139; Freier S. M., (1997) Nucleic Acid Research, 25:4429-4443; Uhlman, E., (2000) Drug Discovery & Development, 3: 203-213; Herdewin P., (2000) Antisense & Nucleic Acid Drug Dev., 10:297-310); 2'-O, 3'-C-enlazados[3.2.0]bicycloarabinonucleósidos. Dichos análogos incluyen nucleótidos sintéticos diseñados para mejorar propiedades de unión, p. ej., la estabilidad, especificidad del dúplex o el tríplex, o similares.

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

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

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

hibridación disminuye un 1,1% por cada 1% de formamida. Un ejemplo de una condición de hibridación de alta astringencia es 0,1X tampón cloruro sódico-citrato sódico (SSC)/0,1 % (peso/volumen) de SDS a 60 °C durante 30 minutos.

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

Se entiende en la técnica que no es necesario que la secuencia de un compuesto oligomérico sea un 100 % complementaria a la de su ácido nucleico diana para ser específicamente hibridable. Además, un oligonucleótido puede hibridarse sobre uno o más segmentos, de modo que segmentos intermedios o adyacentes no estén

20 implicados en el acontecimiento de hibridación (por ejemplo, una estructura en bucle, desapareamiento o estructura de horquilla). Los compuestos oligoméricos de la presente divulgación comprenden al menos aproximadamente el 70%, o al menos aproximadamente el 75%, o al menos aproximadamente el 80%, o al menos aproximadamente el 85%, o al menos aproximadamente el 90%, o al menos aproximadamente el 95%, o al menos aproximadamente el 99%, de complementariedad de secuencia con una región diana dentro de la secuencia de ácidos nucleicos diana a

25 la que se dirigen. Por ejemplo, un compuesto antisentido en el que 18 de los 20 nucleótidos del compuesto antisentido son complementarios a una región diana y, por lo tanto, hibridarían específicamente, representaría el 90 por ciento de complementariedad. En este ejemplo, los nucleótidos no complementarios restantes pueden agruparse o intercalarse con nucleótidos complementarios y no necesitan ser contiguos entre sí o a nucleótidos complementarios. Por lo tanto, un compuesto antisentido que tiene 18 nucleótidos de longitud que tiene 4 (cuatro)

30 nucleótidos no complementarios que están flanqueados por dos regiones de complementariedad completa con el ácido nucleico diana tendría el 77,8 % de complementariedad global con el ácido nucleico diana y de este modo estaría dentro del alcance de la presente divulgación. El porcentaje de complementariedad de un compuesto antisentido con una región de un ácido nucleico diana puede determinarse rutinariamente usando programas BLAST (herramientas de búsqueda de alineamientos locales básicos) y programas PowerBLAST conocidos en la técnica. El

35 porcentaje de homología, identidad de secuencias o complementariedad pueden determinarse por, por ejemplo, el programa Gap (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison Wis.), usando parámetros por defecto, que usa el algoritmo de Smith y Waterman (Adv. Solic. Math., (1981) 2, 482-489).

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

45 oligonucleótidos cortos (p. ej., de 10 a 50 nucleótidos). Las condiciones estrictas pueden lograrse también con la adición de agentes desestabilizadores, 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.

50 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 corte y empalme puede tener identidad significativa con una molécula de referencia, pero generalmente tendrá un mayor o menor número de

55 polinucleótidos debido al corte y empalme alterno de exones durante el procesamiento de ARNm. El polipéptido correspondiente puede poseer dominios funcionales adicionales o una ausencia de dominios. Las variantes de especie son secuencias polinucleotídicas 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

60 o función puede o puede no alterarse. Cualquier gen natural o recombinante dado puede tener ninguna, una o

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

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

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

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

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

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

35 "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.).

40 Tal como se usa en el presente documento "enfermedad o trastorno neurológico" se refiere a cualquier enfermedad o trastorno del sistema nervioso y/o del sistema visual. "Enfermedad o trastorno neurológico" incluye enfermedades o trastornos que implican al sistema nervioso central (cerebro, tronco del encéfalo y cerebelo), el sistema nervioso periférico (incluyendo los nervios craneales), y el sistema nervioso autónomo (partes del cual están ubicadas en el sistema nervioso tanto central como periférico). Una enfermedad o trastorno neurológico incluye, pero sin limitarse a, afasia epileptiforme adquirida; encefalomiелitis aguda diseminada; adrenoleucodistrofia; degeneración macular relacionada con la edad; agenesia del cuerpo calloso; agnosia; síndrome de Aicardi; enfermedad de Alexander; enfermedad de Alpers; hemiplejía alternante; enfermedad de Alzheimer; demencia vascular; esclerosis lateral amiotrófica; anencefalia; síndrome de Angelman; angiomatosis; anoxemia; afasia; apraxia; quistes aracnoides; 50 aracnoiditis; malformación de Anronl-Chiari; malformación arteriovenosa; síndrome de Asperger; ataxia-telangiectasia; trastorno por déficit de atención con hiperactividad; autismo; disfunción autónoma; dolor de espalda; enfermedad de Batten; enfermedad de Behcet; parálisis de Bell; blefaroespasmo esencial benigno; focal benigna; amiotrofia; hipertensión intracraneal benigna; enfermedad de Binswanger; blefaroespasmo; síndrome de Bloch Sulzberger; lesión del plexo braquial; absceso cerebral; daño cerebral; tumores cerebrales (incluyendo glioblastoma multiforme); tumor espinal; síndrome de Brown-Sequard; enfermedad de Canavan; síndrome del túnel carpiano; 55 causalgia; síndrome de dolor central; mielínolisis pontina central; trastorno cefálico; aneurisma cerebral; arteriosclerosis cerebral; atrofia cerebral; gigantismo cerebral; parálisis cerebral; enfermedad de Charcot-Marie-Tooth; neuropatía inducida por quimioterapia y dolor neuropático; malformación de Chiari; corea; polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica; dolor crónico; síndrome de dolor regional crónico; síndrome de Coffin Lowry ; 60 coma, incluyendo estado vegetativo persistente; diplejía facial congénita; degeneración corticobasal; arteritis craneal;

craneosinostosis; enfermedad de Creutzfeldt-Jakob; trastornos traumáticos acumulativos; síndrome de Cushing; enfermedad del cuerpo de inclusión citomegálica; infección por citomegalovirus; síndrome de los ojos y pies danzantes; síndrome de Dandy Walker; enfermedad de Dawson; síndrome de Morsier; parálisis de Dejerine-Klumke; demencia; dermatomiositis; neuropatía diabética; esclerosis difusa; disautonomía; disgrafía dislexia; distonias;

5 encefalopatía epiléptica infantil temprana; síndrome de la silla vacía; encefalitis; encefaloceles; angiomatosis encefalotrigeminal; epilepsia; parálisis de Erb; temblor esencial; enfermedad de Fabry; síndrome de Fahr; desmayo; parálisis espástica familiar; convulsiones febriles; síndrome de Fisher; ataxia de Friedreich; demencia fronto-temporal y otras "tauopatías"; enfermedad de Gaucher; síndrome de Gerstmann; arteritis de células gigantes; enfermedad de inclusión celular gigante; leucodistrofia de células globoides; síndrome de Guillain-Barré; mielopatía asociada al Htlv-

10 1; enfermedad de Hallervorden-Spatz; lesión craneal; dolor de cabeza; espasmo hemifacial; paraplejía espástica hereditaria; heredoopatía atáctica polineurítica; herpes Zoster ótico; infección por herpes; síndrome de Hirayama; demencia y neuropatía asociada al VIH (también manifestaciones neurológicas del sida); holoprosencefalia; enfermedad de Huntington y otras enfermedades de repetición de poliglutamina; hidranencefalia; hidrocefalia; hipercortisolismo; hipoxia; encefalomiелitis mediada por inmunidad; miositis del cuerpo de inclusión; incontinentia

15 pigmenti; enfermedad de almacenamiento de ácido fitánico infantil; enfermedad de Refsum infantil; espasmos infantiles; miopatía inflamatoria; quiste intracraneal; hipertensión intracraneal; síndrome de Joubert; síndrome de Keams-Sayre; enfermedad de Kennedy síndrome de Kinsboume; síndrome de Klippel Feil; enfermedad de Krabbe; enfermedad de Kugelberg-Welander; kuru; enfermedad de Lafora; síndrome miasténico de Lambert-Eaton; síndrome de Landau-Kleffner; síndrome medular lateral (Wallenberg); dificultades de aprendizaje; enfermedad de Leigh;

20 síndrome de Lennox-Gustaut; síndrome de Lesch-Nyhan; leucodistrofia; demencia del cuerpo de Lewy; lisencefalia; síndrome de enclaustramiento; enfermedad de Lou Gehrig (es decir, enfermedad de las neuronas motoras o esclerosis lateral amiotrófica); enfermedad del disco lumbar; enfermedad de Lyme - secuelas neurológicas; enfermedad de Machado-Joseph; macrocefalia; megalencefalia; síndrome de Melkersson-Rosenthal; I enfermedad de Meniere; meningitis; enfermedad de Menkes; leucodistrofia metacromática; microcefalia; migraña; síndrome de

25 Miller Fisher; mini-trazos; miopatías mitocondriales; síndrome de Moebius; amiotrofia monomérica; enfermedad de las neuronas motoras; enfermedad de Moyamoya; mucopolisacaridosis; demencia de infarto múltiple; neuropatía motora multifocal; esclerosis múltiple y otros trastornos desmielinizantes; atrofia de múltiples sistemas con hipotensión postural; distrofia muscular; miastenia gravis; esclerosis difusa mielinoclastica; encefalopatía mioclónica de lactantes; mioclono; miopatía; miotonía congénita; narcolepsia; neurofibromatosis; síndrome neuroléptico maligno;

30 manifestaciones neurológicas del sida; secuelas neurológicas del lupus; neuromiotonía; lipofuscinosis cerioide neuronal; trastornos de migración neuronal; enfermedad de Niemann-Pick; síndrome de O'sullivan-Mcleod; neuralgia occipital; secuencia de disrafismo espinal oculto; síndrome de Ohtahara; atrofia olivopontocerebelosa; opsoclono mioclono; neuritis óptica; hipotensión ortostática; síndrome de sobreuso; parestesias; enfermedad o trastorno neurodegenerativo (enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, enfermedad de Alzheimer, esclerosis

35 lateral amiotrófica (ELA), demencia, esclerosis múltiple y otras enfermedades y trastornos asociados con la muerte celular neuronal); paramiotonía congénita; enfermedades paraneoplásicas; ataques paroxísticos; síndrome de Parry Romberg; enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher; parálisis periódicas; neuropatía periférica; neuropatía dolorosa y dolor neuropático; estado vegetativo persistente; trastornos profundos del desarrollo; reflejo estornudo fótico; enfermedad de almacenamiento de ácido fitánico; enfermedad de Pick; nervio pinzado; tumores pituitarios;

40 polimiositis; porencefalia; síndrome post-polio; neuralgia postherpética; encefalomiелitis postinfecciosa; hipotensión postural; síndrome de Prader-Willi; esclerosis lateral primaria; enfermedades priónicas; atrofia hemifacial progresiva; leucoencefalopatía multifocal progresiva; poliosteoartritis esclerosante progresiva; parálisis supranuclear progresiva; pseudotumor cerebral; síndrome de Ramsay-Hunt (tipos I y II); encefalitis de Rasmussen; síndrome de distrofia simpática refleja; enfermedad de Refsum; trastornos del movimiento repetitivo; lesiones por estrés repetitivo;

45 síndrome de piernas inquietas; mielopatía asociada a retrovirus; síndrome de Rett; síndrome de Reye; baile de San Vito; enfermedad de Sandhoff; enfermedad de Schilder; esquizencefalia; displasia septo-óptica; síndrome del bebé sacudido; herpes; síndrome de Shy-Drager; síndrome de Sjogren; apnea del sueño; síndrome de Soto; espasticidad; espina bífida; lesión de la médula espinal; tumores de la médula espinal; atrofia muscular en la columna; síndrome de Stiff-Person; ictus; síndrome de Sturge-Weber; panencefalitis esclerosante subaguda; encefalopatía

50 arteriosclerótica subcortical; corea de Sydenham; síncope; siringomielia; discinesia tardía; enfermedad de Tay-Sachs; arteritis temporal; síndrome de la médula espinal atada; enfermedad de Thomsen; síndrome de la salida torácica; tic doloroso; parálisis de Todd; síndrome de Tourette; ataque isquémico transitorio; encefalopatías espongiiformes transmisibles; mielitis transversa; lesión cerebral traumática; temblor; neuralgia trigeminal; paraparesia espástica tropical; esclerosis tuberosa; demencia vascular (demencia de múltiples infartos); vasculitis

55 incluyendo arteritis temporal; enfermedad de Von Hippel-Lindau; síndrome de Wallenberg; enfermedad de Werdnig-Hoffman; síndrome de West; latigazo; síndrome de Williams; enfermedad de Wildon; y síndrome de Zellweger.

Una "inflamación" se refiere a las condiciones inflamatorias sistémicas y condiciones asociadas con la migración a nivel local y la atracción de monocitos, leucocitos y/o neutrófilos. Los ejemplos de la inflamación incluyen, pero no se

60 limitan a, inflamación resultante de la infección con microorganismos patógenos (incluyendo bacterias gram-positivas

y gram-negativas, virus, hongos y parásitos como protozoos y helmintos), rechazo al trasplante [incluido el rechazo a órganos sólidos como riñón, hígado, corazón, pulmón o córnea, así como rechazo a los trasplantes de médula ósea incluyendo enfermedad injerto-contra-huésped (EICH)], o por reacciones alérgicas autoinmunitarias localizadas agudas o crónicas. Las enfermedades autoinmunitarias incluyen glomerulonefritis aguda; artritis o artritis reactiva; 5 glomerulonefritis crónica; enfermedad inflamatoria intestinal, como enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa y enterocolitis necrotizante; hepatitis; sepsis; enfermedad hepática alcohólica, esteatosis hepática no alcohólica; transfusiones de granulocitos síndromes asociados; dermatosis inflamatorias como la dermatitis de contacto, dermatitis atópica, psoriasis, lupus eritematoso sistémico (LES), tiroiditis autoinmune, esclerosis múltiple, y algunas formas de diabetes autoinmune, o cualquier otro estado donde el ataque del propio sistema inmunológico del sujeto 10 se traduce en la destrucción del tejido patológico. Las reacciones alérgicas incluyen asma alérgico, bronquitis crónica y aguda de hipersensibilidad retardada. Estados de enfermedad inflamatoria sistémica incluyen inflamación asociada con trauma, quemaduras, reperfusión tras eventos isquémicos (por ejemplo, eventos trombóticos en el corazón, el cerebro, el intestino o los vasos periféricos, incluyendo infarto de miocardio e ictus), sepsis, síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA) o síndrome de disfunción orgánica múltiple. El reclutamiento de células 15 inflamatorias también se produce en placas ateroscleróticas. Inflamación incluye, pero sin limitarse a, linfoma no Hodgkin, enfermedad de Wegener, tiroiditis de Hashimoto, carcinoma hepatocelular, atrofia del timo, pancreatitis crónica, artritis reumatoide, osteoartritis, hiperplasia linfoide reactiva, carcinoma papilar, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, colecistitis aguda, colecistitis crónica, cirrosis, sialoadenitis crónica, peritonitis, pancreatitis aguda, pancreatitis crónica, gastritis crónica, adenomiosis, endometriosis, cervicitis aguda, cervicitis crónica la 20 hiperplasia linfoide, esclerosis múltiple, hipertrofia secundaria a la púrpura trombocitopénica idiopática, nefropatía por IgA primaria, lupus eritematoso sistémico, soriasis, enfisema pulmonar, pielonefritis crónica y cistitis crónica.

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

25 *Objetivos:* En un aspecto, las dianas comprenden secuencias de ácido nucleico del regulador del desarrollo 1 asociado a interferón (IFRD1), incluyendo, sin limitación, secuencias no codificantes y/o codificantes, sentido y/o antisentido asociadas al IFRD1.

El IFRD1 humano codifica una proteína prevista de 453 aminoácidos. Las secuencias de humano y rata están 30 altamente conservadas (con una identidad del 90,2 %). El gen humano conduce al cromosoma 7q22-q31. El IFRD1 influye en la gravedad de la enfermedad letal heredada que obstruye y destruye los pulmones. Un estudio genético demostró que pequeñas variaciones del IFRD1 afectaron a la gravedad de los síntomas de fibrosis quística en casi 3000 pacientes humanos. En ratones con la enfermedad, la eliminación del gen redujo la inflamación del pulmón. Los científicos descubrieron que la proteína formada por el IFRD1 regula la función de los leucocitos denominados 35 neutrófilos; estas células, parte del sistema inmunitario, son conocidas por provocar un daño inflamatorio en las vías respiratorias de las personas con fibrosis quística.

En un aspecto, se utilizan oligonucleótidos antisentido para prevenir o tratar enfermedades o trastornos asociados con miembros de la familia IFRD1. A modo de ejemplo, las enfermedades y trastornos mediados por el regulador del 40 desarrollo 1 asociado al interferón (IFRD1) que pueden tratarse con los oligonucleótidos antisentido de la divulgación y/o con células/tejidos regenerados a partir de células madre obtenidas mediante el uso y/o teniendo los compuestos antisentido comprenden: una enfermedad o trastorno asociado con la función anormal y/o la expresión del 'regulador del desarrollo 1 asociado al interferón'; fibrosis quística, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC); una enfermedad o trastorno asociado con la diferenciación y regeneración de tejidos; una enfermedad o trastorno 45 asociado con la regeneración de músculos; una enfermedad o trastorno asociado con la regeneración de músculos esqueléticos; una enfermedad o trastorno asociado con la diferenciación de músculos; una enfermedad o trastorno asociado con la diferenciación miogénicas; estrés oxidativo, una enfermedad o trastorno inflamatorio, inflamación; un afección postoperatoria asociada con el epitelio intestinal; una enfermedad o trastorno del sistema inmunitario; una enfermedad o trastorno asociado con una tasa metabólica anormal, adiposidad y absorción de triglicéridos 50 intestinales; cáncer de pulmón; neuropatía sensoriomotora; una lesión neuronal asociada a isquemia cerebral; una lesión neuronal y una enfermedad o trastorno neurológico.

En un aspecto, la modulación de IFRD1 por uno o varios oligonucleótidos antisentido se administra a un paciente que los necesite, para prevenir o tratar cualquier enfermedad o trastorno relacionado con la expresión, función o 55 actividad anómalas de IFRD1 en comparación con un control normal.

En un aspecto, los oligonucleótidos son específicos para polinucleótidos del gen IFRD1, lo que incluye, sin limitación regiones no codificantes. La diana IFRD1 incluyen variantes de IFRD1; mutantes de IFRD1, incluidos polimorfismos de un solo nucleótido (SNP); secuencias no codificantes de IFRD1; alelos, fragmentos y similares. Preferentemente, 60 el oligonucleótido es una molécula de ARN antisentido.

De acuerdo con aspectos de la divulgación, la molécula de ácido nucleico diana no está limitada a polinucleótidos de IFRD1 en solitario, sino que se extiende a cualquiera de las isoformas, receptores, homólogos, regiones no codificantes y similares de IFRD1

5

En un aspecto, un oligonucleótido está dirigido a una secuencia antisentido natural (antisentido natural a las regiones codificantes y no codificantes) de dianas de IFRD1, incluyendo, sin limitación, variantes, alelos, homólogos, mutantes, derivados, fragmentos y secuencias complementarias a estos. Preferentemente el oligonucleótido es una molécula de ARN o ADN antisentido.

10

En 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.

15

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

20

25

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

30

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

35

En un aspecto, la elección como diana de IFRD1, incluyendo sin limitación, secuencias antisentido que se identifican y se expanden, usando, por ejemplo, PCR, hibridación etc., una o más de las secuencias expuestas como las SEQ ID NOS: 2 a 7, y similares, modulan la expresión o función del IFRD1. 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.

45

En un aspecto, los oligonucleótidos comprenden secuencias de ácidos nucleicos expuestas como las SEQ ID NO: 8 a 16 incluyendo secuencias antisentido que se identifican y expanden, usando, por ejemplo, PCR, hibridación, etc. Estos oligonucleótidos pueden comprender uno o más nucleótidos modificados, fragmentos más cortos o más largos, enlaces modificados y similares. Los ejemplos de enlaces modificados o enlaces internucleotídicos comprenden fosforotioato, fosforoditioato o similares. En un aspecto, los nucleótidos comprenden un derivado de fósforo. El derivado de fósforo (o grupo fosfato modificado) que puede unirse al resto de azúcar o de análogo de azúcar en los oligonucleótidos modificados de la presente divulgación puede ser un monofosfato, difosfato, trifosfato, alquifosfato, 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.

50

55

La especificidad y sensibilidad de antisentido también es empleada por los expertos en la materia para usos terapéuticos. Se han empleado oligonucleótidos antisentido como restos terapéuticos en el tratamiento de patologías

60

en animales y el ser humano. Los oligonucleótidos antisentido se han administrado con seguridad y eficazmente a seres humanos y numerosos ensayos clínicos están actualmente en marcha. De este modo, se establece que los oligonucleótidos pueden ser modalidades terapéuticas útiles que pueden configurarse para ser útiles en regímenes de tratamiento para el tratamiento de células, tejidos y animales, especialmente seres humanos.

5

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

10

Los compuestos antisentido incluyen compuestos antisentido oligoméricos, oligonucleótidos antisentido, 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.

15

El direccionamiento de un compuesto antisentido a una molécula de ácido nucleico particular, en el contexto de esta divulgación, puede ser un proceso multietapa. El proceso normalmente empieza con la identificación de un ácido nucleico diana cuya función va a modularse. Este ácido nucleico diana puede ser, por ejemplo, un gen celular (o ARNm transcrito del gen) cuya expresión está asociada a un trastorno o patología particular, o una molécula de ácido nucleico de un agente infeccioso. En la presente divulgación, el ácido nucleico diana codifica el regulador del desarrollo 1 asociado a interferón (IFRD1).

20

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, p. ej., la modulación de la expresión. Dentro del contexto de la presente divulgación, el término "región" se define como una parte del ácido nucleico diana que tiene al menos una estructura, función o característica identificable. Dentro de las regiones de ácidos nucleicos diana están los segmentos. Los "segmentos" se definen como partes más pequeñas o sub-partes de regiones dentro de un ácido nucleico diana. "Sitios", tal como se usa en la presente divulgación, se define como posiciones dentro de un ácido nucleico diana.

30

En un aspecto, los oligonucleótidos antisentido se unen a las secuencias antisentido naturales del regulador del desarrollo 1 asociado a interferón (IFRD1) y modulan la expresión y/o función de IFRD1 (SEQ ID NO: 1). Los ejemplos de secuencias antisentido incluyen las SEQ ID NO: 2 al 16.

35

En un aspecto, los oligonucleótidos antisentido se unen a uno o más segmentos de polinucleótidos del regulador del desarrollo 1 asociado a interferón (IFRD1) y modulan la expresión y/o función del gen IFRD1. Los segmentos comprenden al menos cinco nucleótidos consecutivos de los polinucleótidos sentido o antisentido del gen IFRD1.

40

En un aspecto, los oligonucleótidos antisentido son específicos para secuencias antisentido naturales del gen IFRD1 donde la unión de los oligonucleótidos a las secuencias antisentido naturales del gen IFRD1 modulan la expresión y/o la función del gen IFRD1.

45

En un aspecto, los compuestos de oligonucleótido comprenden secuencias expuestas como las SEQ ID NO: 8 a 16, 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, alquifosfato, 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.

50

55

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

60

minoría de genes tiene un codón de iniciación de la traducción que tiene la secuencia de ARN 5'-GUG, 5'-UUG o 5'-CUG; y se ha demostrado que 5'-AUA, 5'-ACG y 5'-CUG funcionan *in vivo*. De este modo, las expresiones "codón de iniciación de la traducción" y "codón de iniciación" pueden englobar muchas secuencias de codón, aun cuando el aminoácido iniciador en cada caso normalmente sea metionina (en eucariotas) o formilmetionina (en procariotas).

- 5 Los genes eucariotas y procariotas pueden tener dos o más codones de iniciación alternativos, uno cualquiera de los cuales puede utilizarse preferencialmente para la iniciación de la traducción en un tipo particular de célula o tejido, o en un conjunto particular de condiciones. En el contexto de la divulgación, "codón de iniciación" y "codón de iniciación de la traducción" se refieren al codón o codones que se usan *in vivo* para iniciar la traducción de un ARNm transcrito de un gen que codifica el regulador del desarrollo 1 asociado a interferón (IFRD1), a pesar de la(s)
- 10 secuencia(s) de dichos codones. Un codón de terminación de la traducción (o "codón de terminación") de un gen puede tener una de tres secuencias, es decir, 5'-UAA, 5'-UAG y 5'-UGA (las secuencias de ADN correspondientes son 5'-TAA, 5'-TAG y 5'-TGA, respectivamente).

- Las expresiones "región de codón de iniciación" y "región de codón de iniciación de la traducción" se refieren a una
- 15 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
- 20 dirección (es decir, 5' o 3') desde un codón de terminación de la traducción. Por consiguiente, la "región de codón de iniciación" (o "región de codón de iniciación de la traducción") y la "región de codón de terminación" (o "región de codón de terminación de la traducción") son todas las regiones que pueden ser eficazmente elegidas como diana con los compuestos antisentido de la presente divulgación.

- El marco de lectura abierto (ORF) o "región codificante", que se conoce en la técnica para referirse a la región entre
- 25 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.

- 30 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,
- 35 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'.
- 40

- 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
- 45 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
- 50 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.

- 55 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.

60

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.

5

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".

10 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.

15

20

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.

25

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.

30

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.

35

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.

45

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.

50

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.

55

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

60

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, similares a ADN, similares a ARN, o mezclas de los mismos, o pueden ser miméticos de uno o más de estos. Estos compuestos pueden ser compuestos oligoméricos monocatenarios, bicatenarios, circulares o de horquilla y pueden contener elementos estructurales tales como protuberancias internas o terminales, desapareamientos o bucles. Los compuestos antisentido se preparan de forma rutinaria linealmente, pero pueden unirse o prepararse de otro modo para ser circulares y/o ramificados. Los compuestos antisentido pueden comprender construcciones tales como, por ejemplo, dos cadenas hibridadas para formar un compuesto completan o parcialmente bicatenario o una única cadena con auto-complementariedad suficiente para permitir la hibridación y formación de un compuesto completa o parcialmente bicatenario. Las dos cadenas pueden enlazarse internamente, dejando los extremos 3' o 5' libres o pueden enlazarse para formar una estructura de horquilla continua o bucle. La estructura de horquilla puede contener un nucleótido protuberante en cualquiera de los extremos 5' o 3' que produce una extensión del carácter monocatenario. Los compuestos bicatenarios opcionalmente pueden comprender nucleótidos protuberantes en los extremos. Modificaciones adicionales pueden comprender grupos conjugados unidos a uno de los extremos, posiciones de nucleótido seleccionadas, posiciones de azúcar o a uno de los enlaces internucleosídicos. Como

alternativa, las dos cadenas pueden enlazarse mediante un resto no de ácido nucleico o grupo conector. Cuando se forma a partir de solo una cadena, el dsARN puede tomar la forma de una molécula tipo horquilla auto-complementaria que se dobla sobre sí misma para formar un dúplex. De este modo, el ARNs puede ser completa o parcialmente bicatenario. Puede lograrse modulación específica de la expresión génica por expresión estable de

5 horquillas de ARNs 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.

10

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'-

15

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 "similares a ADN" y aquellos que tienen estructura similar a la forma A son "similares a ARN". En algunos aspectos (quiméricos), un compuesto antisentido puede

20

contener tanto regiones en forma A como B.

En un aspecto, los oligonucleótidos o compuestos antisentido deseados comprenden al menos un ARN antisentido, ADN antisentido, oligonucleótidos antisentido quiméricos, oligonucleótidos antisentido que comprenden enlaces modificados, ARN de interferencia (ARNi), ARN de interferencia pequeño (siRNA); un microARN de interferencia

25

(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.

30

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

35

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 del regulador del desarrollo 1 asociado a interferón (IFRD1) y productos codificados por los mismos. Los dsARN también pueden

40

actuar como ARN activantes pequeños (ARNap). Sin desear quedar ligado por la 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

45

emplearse en un cribado para compuestos adicionales que modulan la expresión de polinucleótidos del regulador del desarrollo 1 asociado a interferón (IFRD1). Los "moduladores" son aquellos compuestos que disminuyen o aumentan la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica el gen IFRD1 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

50

codifica polinucleótidos sentido o antisentido naturales del gen IFRD1 con uno o más moduladores candidatos, y seleccionar uno o más moduladores candidatos que disminuyen o aumentan la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica polinucleótidos del gen IFRD1, por ejemplo, las SEQ ID NO: 8 al 16. Una vez que se demuestra que el modulador o moduladores candidatos son capaces de modular (por ejemplo, tanto disminuir como aumentar) la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica polinucleótidos del gen IFRD1, el modulador

55

puede entonces emplearse en estudios de investigación adicionales de la función de polinucleótidos del gen IFRD1, 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 IFRD1 (p.ej. con número de acceso NM\_001007245). En un aspecto, la diana es un polinucleótido antisentido del

60

gen IFRD1. En un aspecto, un oligonucleótido antisentido dirigido a secuencias sentido y/o antisentido naturales de

polinucleótidos del gen IFRD1 (p. ej. entrada número NM\_001007245), 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 del gen IFRD1.

- 5 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.
- 10 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.
- 15 En un aspecto, un oligonucleótido antisentido se dirige a polinucleótidos del regulador del desarrollo 1 asociado a interferón (IFRD1) (por ejemplo, con número de acceso NM\_001007245), variantes, alelos, homólogos, mutantes, derivados, fragmentos y secuencias complementarias correspondientes. Preferentemente, el oligonucleótido es una molécula antisentido.
- 20 De acuerdo con los aspectos de la divulgación, la molécula de ácido nucleico diana no está limitada solo al gen IFRD1, sino que se extiende a cualquier polinucleótido variante del mismo y a cualquier polinucleótido que produzca, afecte, influya o resulte en o se refiera a un producto de expresión del gen IFRD1 y/o cualquier isoforma del mismo.
- 25 En un aspecto, un oligonucleótido se dirige a una secuencia antisentido natural de polinucleótidos del gen IFRD1, por ejemplo, los polinucleótidos expuestos en las SEQ ID NO: 2 a 7, y cualquier variante, alelo, homólogo, mutante, derivado, fragmento y secuencia complementaria a los mismos. Ejemplos de oligonucleótidos antisentido se exponen como las SEQ ID NO: 8 al 16.
- 30 En un aspecto, los oligonucleótidos son complementarios a, o se unen a, secuencias de ácido nucleico de IFRD1 antisentido, incluyendo sin limitación secuencias sentido y/o antisentido no codificantes asociadas con polinucleótidos de IFRD1 y modulan la expresión y/o funciones de moléculas de IFRD1.
- 35 En un aspecto, los oligonucleótidos son complementarios a, o se unen a, secuencias de ácido nucleico del antisentido natural del gen IFRD1, expuesto como las SEQ ID NO: 2 a 7 y modula la expresión y/o la función de moléculas del gen IFRD1.
- 40 En un aspecto, los oligonucleótidos comprenden secuencias de al menos 5 nucleótidos consecutivos de las SEQ ID NO: 8 a 16 y modula la expresión y/o la función de moléculas del gen IFRD1.
- 45 La diana polinucleotídica comprende IFRD1; incluyendo miembros de la familia del mismo, variantes de IFRD1, mutantes de IFRD1, incluidos polimorfismos de un solo nucleótido (SNP); secuencias no codificantes de IFRD1; alelos de IFRD1, variantes de especie, fragmentos y similares. Preferentemente, el oligonucleótido es una molécula antisentido.
- 50 En un aspecto, el oligonucleótido que se dirige a polinucleótidos del gen IFRD1, comprende: ARN antisentido, ARN de interferencia (ARNi), ARN de interferencia pequeño (ARNip); microARN de interferencia (miARN); un ARN temporal pequeño (ARNtp); o un ARN de horquilla corta (ARNhc); activación génica inducida por ARN pequeño (ARNa); o, ARN activante pequeño (ARNap).
- 55 En un aspecto, el direccionamiento de los polinucleótidos del regulador del desarrollo 1 asociado a interferón (IFRD1), p. ej., las SEQ ID NO: 2 a 16, 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.
- 60 En un aspecto, las SEQ ID NO: 8 a 16 comprenden uno o más nucleótidos de LNA. La tabla 1 muestra ejemplos de

oligonucleótidos antisentido útiles en los procedimientos de la divulgación.

**Tabla 1:**

ID de secuencia	Nombre de secuencia	Tipo de secuencia	Secuencia
SEQ ID NO: 8	CUR-0484	Antisentido	rGrCrGrArCrCrUrUrArGrArArUrGrGrArGrArGrUrGrGrArArGrArG
SEQ ID NO:17	CUR-0484	Sentido	rCrUrUrCrCrArCrUrCrUrCrCrArUrUrCrUrArArGrGrUrCGC
SEQ ID NO:9	CUR-0486	Antisentido	rUrUrUrGrCrCrArUrUrCrUrCrArUrCrCrArCrCrUrUrArCrArGrUrA
SEQ ID NO:18	CUR-0486	Sentido	rCrUrGrUrArArGrGrUrGrGrArUrGrArGrArArUrGrGrCrAAA
SEQ ID NO:10	CUR-0488	Antisentido	rArArArUrArArUrUrGrArArUrArUrCrUrArArGrUrGrCrCrArCrGrU
SEQ ID NO:19	CUR-0488	Sentido	rGrUrGrGrCrArCrUrUrArGrArUrArUrUrCrArArUrUrArUTT
SEQ ID NO:11	CUR-0490	Antisentido	rUrUrUrGrUrArArUrCrArUrUrUrArGrUrGrArCrUrUrGrArUrGrUrU
SEQ ID NO:20	CUR-0490	Sentido	rCrArUrCrArArGrUrCrArCrUrArArArUrGrArUrUrArCrAAA
SEQ ID NO:12	CUR-0492	Antisentido	rUrCrCrUrGrArUrArUrArUrGrArGrGrCrArGrArCrArUrUrGrCrUrA
SEQ ID NO:21	CUR-0492	Sentido	rGrCrArArUrGrUrCrUrGrCrCrUrCrArUrArUrArUrCrArGGA
SEQ ID NO:13	CUR-0494	Antisentido	rUrGrGrArArGrUrUrUrCrUrArGrGrGrArGrUrGrUrGrGrUrCrUrUrU
SEQ ID NO:22	CUR-0494	Sentido	rArGrArCrCrArCrArCrUrCrCrCrUrArGrArArArCrUrUrCCA
SEQ ID NO:14	CUR-0496	Antisentido	rUrGrArUrCrCrUrCrGrCrUrArArGrCrUrCrCrGrArCrUrCrUrGrGrG
SEQ ID NO:23	CUR-0496	Sentido	rCrArGrArGrUrCrGrGrArGrCrUrUrArGrCrGrArGrGrArUCA

SEQ NO:15	ID	CUR-0498	Antisentido	rCrArCrUrGrCrArCrUrCrCrArArUrGrUrA rGrGrCrArArCrArGrArG
SEQ NO:24	ID	CUR-0498	Sentido	rCrUrGrUrUrGrCrCrUrArCrArUrUrGrGrA rGrUrGrCrArGTG
SEQ NO:16	ID	CUR-0500	Antisentido	rUrUrUrGrGrGrArGrGrCrUrGrArGrGrUrG rGrGrUrGrGrArUrUrArU
SEQ NO:25	ID	CUR-0500	Sentido	rArArUrCrCrArCrCrCrArCrCrUrCrArGrC rCrUrCrCrCrAAA

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

Debido a su especificidad de secuencia, las moléculas de ácidos nucleicos enzimáticos que se escinden en trans muestran promesa como agentes terapéuticos para enfermedad humana. Las moléculas de ácidos nucleicos enzimáticos pueden diseñarse para escindir dianas de ARN específicas dentro del fondo del ARN celular. Un acontecimiento de escisión de este tipo convierte el ARNm en no funcional y anula la expresión de proteínas de ese ARN. De este modo puede inhibirse selectivamente la síntesis de una proteína asociada a una patología.

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 un ARN diana mediante apareamiento de bases complementario, y una vez se une al sitio correcto, actúa enzimáticamente para cortar el ARN diana. La escisión estratégica de dicho ARN diana destruirá su capacidad para dirigir la síntesis de una proteína codificada. Después de unirse un ácido nucleico enzimático y escindir su ARN diana, se libera de ese ARN para buscar otra diana y puede unirse repetidamente y escindir nuevas dianas.

Se han usado varias estrategias como la selección *in vitro* (evolución) (Orgel, (1979) Proc. R. Soc. London, B 205, 435) para desarrollar nuevos catalizadores de ácido nucleico capaces de catalizar 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  $1 \text{ min}^{-1}$  en presencia de concentraciones saturantes (10 mM) de cofactor de  $\text{Mg}^{2+}$ . Se ha demostrado que una ribozima de "ligasa de ARN" artificial cataliza la reacción de auto-modificación correspondiente con una velocidad de aproximadamente  $100 \text{ min}^{-1}$ . Además, se sabe que ciertas ribozimas de cabeza de martillo modificadas que tienen brazos de unión al sustrato hechos de ADN catalizan la escisión de ARN con múltiples velocidades de recuperación que se aproximan a  $100 \text{ min}^{-1}$ . Finalmente, la sustitución de un resto específico dentro del núcleo catalítico de la cabeza de martillo con ciertos análogos de nucleótido da ribozimas modificadas que muestran una mejora de hasta 10 veces en la velocidad catalítica. Estos descubrimientos demuestran que las ribozimas pueden promover transformaciones químicas con velocidades catalíticas que son significativamente superiores a aquellas mostradas *in vitro* por la mayoría de las ribozimas que se auto-escinden naturales. Entonces es posible que las estructuras de ciertas ribozimas que se auto-escinden puedan optimizarse para dar la máxima actividad catalítica, o que puedan prepararse motivos de ARN completamente nuevos que muestran velocidades significativamente más rápidas para la escisión de fosfodiéster de ARN.

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

5

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

10

escindir posiblemente ARN de sustrato específico in vivo.

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 interferente pequeño (siRNA) bien como el propio ARN o bien como ADN, usando un plásmido de expresión o virus y la secuencia codificante para

15

ARN de horquilla pequeño que se procesan 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

20

ribonucleico (ARN) y/o ácido desoxirribonucleico (ADN), o un mimético, quimera, análogo u homólogo de los mismos. Este término incluye oligonucleótidos compuestos de nucleótidos de origen natural, azúcares y enlaces internucleosídicos covalentes (esqueleto), además de oligonucleótidos que tienen partes no de origen natural que funcionan similarmente. Dichos oligonucleótidos modificados o sustituidos son frecuentemente deseados con respecto a formas nativas debido a propiedades deseables tales como, por ejemplo, captación celular potenciada,

25

afinidad potenciada por un ácido nucleico diana y elevada estabilidad en presencia de nucleasas.

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

30

ARN mono- o bicatenario tales como compuestos de ARNip, ARNap, ARNa, y otros compuestos oligoméricos que hibridan con al menos una parte del ácido nucleico diana y modulan su función. Por lo tanto, pueden ser ADN, ARN, similares a ADN, similares a ARN, o mezclas de los mismos, o pueden ser miméticos de uno o más de estos. Estos compuestos pueden ser compuestos oligoméricos monocatenarios, bicatenarios, circulares o de horquilla y pueden contener elementos estructurales tales como protuberancias internas o terminales, desapareamientos o bucles. Los

35

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 completan o parcialmente bicatenario o una única cadena con auto-complementariedad suficiente para permitir la hibridación y formación de un compuesto completa o parcialmente bicatenario. Las dos cadenas pueden enlazarse internamente, dejando los extremos 3' o 5' libres o

40

pueden enlazarse para formar una estructura de horquilla continua o bucle. La estructura de horquilla puede contener un nucleótido protuberante en cualquiera de los extremos 5' o 3' que produce una extensión del carácter monocatenario. Los compuestos bicatenarios opcionalmente pueden comprender nucleótidos protuberantes en los extremos. Modificaciones adicionales pueden comprender grupos conjugados unidos a uno de los extremos, posiciones de nucleótido seleccionadas, posiciones de azúcar o a uno de los enlaces internucleosídicos. Como

45

alternativa, las dos cadenas pueden enlazarse mediante un resto no de ácido nucleico o grupo conector. Cuando se forma a partir de solo una cadena, el 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 ARNs 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

50

que adopta la forma de una molécula de tipo horquilla auto-complementaria que se dobla sobre sí misma para formar un dúplex, las dos cadenas (o regiones formadoras de dúplex de una sola cadena) son cadenas de ARN complementarias que se aparean con bases en el modo de Watson-Crick.

Una vez introducidos a un sistema, los compuestos de la divulgación pueden provocar la acción de una o más

55

enzimas o proteínas estructurales para efectuar la escisión u otra modificación del ácido nucleico diana o pueden trabajar mediante mecanismos basados en la ocupación. En general, los ácidos nucleicos (incluyendo oligonucleótidos) pueden describirse como "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

60

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

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

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

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

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

35 En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencias o complementariedad, entre el compuesto antisentido y la diana, es de aproximadamente el 40% a aproximadamente el 60%. En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencias o complementariedad es de aproximadamente el 60% a aproximadamente el 70%. En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencias o complementariedad es de aproximadamente el 70% a aproximadamente el 80%. En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencias o complementariedad es de aproximadamente el 80% a aproximadamente el 90%. En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencias o complementariedad es de aproximadamente el 90%, aproximadamente el 92%, aproximadamente el 94%, aproximadamente el 95%, aproximadamente el 96%, aproximadamente el 97%, aproximadamente el 98%, aproximadamente el 99% o aproximadamente el 100%.

45 En un aspecto, los oligonucleótidos antisentido, como, por ejemplo, las moléculas de ácidos nucleicos expuestas en las SEQ ID NO: 8 a 16 comprenden una o más sustituciones o modificaciones. En un aspecto, los nucleótidos están sustituidos con ácidos nucleicos bloqueados (LNA).

50 En un aspecto, los oligonucleótidos se dirigen a una o más regiones de las moléculas de ácidos nucleicos sentido y/o antisentido de secuencias codificantes y/o no codificantes asociadas al gen IFRD1 y las secuencias expuestas como las SEQ ID NO: 1 al 7. Los oligonucleótidos también se dirigen a regiones solapantes de las SEQ ID NO: 1 a 7.

55 Ciertos oligonucleótidos preferidos de esta divulgación son oligonucleótidos quiméricos. "Oligonucleótidos quiméricos" o "quimeras", en el contexto de esta divulgación, son oligonucleótidos que contienen dos o más regiones químicamente distintas, cada una constituida por al menos un nucleótido. Estos oligonucleótidos normalmente contienen al menos una región de nucleótidos modificados que confiere una o más propiedades beneficiosas (tales como, por ejemplo, resistencia a nucleasas incrementada, captación en células incrementada, afinidad de unión por la diana incrementada) y una región que es un sustrato para enzimas capaces de escindir híbridos de ARN:ADN o ARN:ARN. A modo de ejemplo, la ARNasa H es una endonucleasa celular que escinde la cadena de ARN de un dúplex de ARN:ADN. La activación de RNasa H, por lo tanto, produce la escisión del ARN diana, potenciando así

60

enormemente la eficiencia de la modulación antisentido de la expresión génica. Por consiguiente, frecuentemente pueden obtenerse resultados comparables con oligonucleótidos más cortos cuando se usan oligonucleótidos quiméricos, en comparación con desoxioligonucleótidos de fosforotioato que hibridan con la misma región diana. La escisión del ARN diana puede detectarse rutinariamente por electroforesis en gel y, si fuera necesario, técnicas de hibridación de ácidos nucleicos asociadas conocidas en la técnica. En un aspecto, un oligonucleótido quimérico comprende al menos una región modificada para aumentar la afinidad de unión de la diana, y, normalmente, una región que actúa de sustrato para ARNasa H. La afinidad de un oligonucleótido por su diana (en este caso, un ácido nucleico que codifica ras) se determina rutinariamente midiendo la  $T_m$  de un par de oligonucleótido/diana, que es la temperatura a la que se disocian el oligonucleótido y la diana; la disociación se detecta espectrofotométricamente.

10 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

15 gapmeros. Las patentes representativas de los Estados Unidos que enseñan la preparación de estas estructuras híbridas comprenden, pero no se limitan a, las patentes de los EE. UU. con n<sup>os</sup>. 5.013.830;5.149.797;5.220.007;5.256.775;5.366.878;5.403.711;5.491.133;5.565.350;5.623.065;5.652.355;5.652.356; y5.700.922.

En un aspecto, la región del oligonucleótido que se modifica comprende al menos un nucleótido modificado en la

20 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 aspecto, 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

25 dicha afinidad incrementada es potenciar enormemente la inhibición por oligonucleótidos de ARNi de la expresión génica. La ARNasa H es una endonucleasa celular que escinde la cadena de ARN de los dúplex de ARN:ADN; por lo tanto, la activación de esta enzima produce la escisión del ARN diana, y de este modo puede potenciar enormemente la eficiencia de inhibición de ARNi. La escisión del ARN diana puede demostrarse rutinariamente por electroforesis en gel. En un aspecto, el oligonucleótido quimérico también se modifica para potenciar la resistencia a

30 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

35 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

40 la resistencia a nucleasas.

Ejemplos específicos de algunos oligonucleótidos preferidos concebidos por esta divulgación incluyen aquellos que comprenden esqueletos modificados, por ejemplo, fosforotioatos, fosfotriésteres, metilfosfonatos, enlaces entre

45 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 CH<sub>2</sub>-NH-O-CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)-O-CH<sub>2</sub> [conocido como esqueleto de metileno(metilimino) o MMI], CH<sub>2</sub>-O-N(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)-N(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub> y O-N(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>, donde el esqueleto de fosfodiéster nativo se representa como O-P-O-CH<sub>2</sub>. Los esqueletos de amida divulgados por De Mesmaeker y cols., (1995) Acc. Chem. Res. 28:366-374 también se prefieren. También se prefieren oligonucleótidos

50 que tienen esqueletos de morfolino (Summerton y Weller, patente de EE.UU. N.º. 5.034.506. En otro aspecto, tal como el esqueleto de ácido nucleico peptídico (PNA), el esqueleto de fosfodiéster del oligonucleótido se sustituye por un esqueleto de poliamida, estando los nucleótidos unidos directamente o indirectamente a los átomos de nitrógeno azo del esqueleto de poliamida. Los oligonucleótidos también pueden comprender uno o más restos de azúcar sustituidos. Oligonucleótidos preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': OH, SH, SCH<sub>3</sub>,

55 F, OCN, OCH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> CH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> NH<sub>2</sub> o O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> CH<sub>3</sub> en los que n es de 1 a aproximadamente 10; alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>10</sub> inferior, alcoxi, alquilo, alcarilo o aralquilo inferior sustituido; Cl; Br; CN; CF<sub>3</sub>; OCF<sub>3</sub>; O-, S-, o N-alquilo; O-, S-, o N-alqueno; SOCH<sub>3</sub>; SO<sub>2</sub> CH<sub>3</sub>; ONO<sub>2</sub>; NO<sub>2</sub>; N<sub>3</sub>; NH<sub>2</sub>; heterocicloalquilo; heterocicloalcarilo; aminoalquilamino; polialquilamino; sililo sustituido; un grupo de escisión de ARN; un grupo reportero; un intercalador;

60 un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido; o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un oligonucleótido y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. Una

modificación preferida incluye 2'-metoxietoxi [2'-O-CH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub> OCH<sub>3</sub>, también conocido como 2'-O-(2-metoxietilo)]. Otras modificaciones preferidas incluyen 2'-metoxi (2'-O-CH<sub>3</sub>), 2'-propoxi(2'-OCH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) y 2'-flúor (2'-F). También pueden hacerse modificaciones similares en otras posiciones sobre el oligonucleótido, particularmente la posición 3' del azúcar en el nucleótido del extremo 3' y la posición 5' del nucleótido del extremo 5'. Los oligonucleótidos también pueden tener miméticos de azúcar tales como ciclobutilos en lugar del grupo pentofuranosilo.

Los oligonucleótidos también pueden comprender, adicionalmente o como alternativa, modificaciones o sustituciones de nucleobases (frecuentemente denominadas en la técnica simplemente "base"). Tal como se usa en el presente documento, nucleótidos "no modificados" o "naturales" incluyen adenina (A), guanina (G), timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Los nucleótidos modificados incluyen nucleótidos encontrados solo poco frecuentemente o transitoriamente en ácidos nucleicos naturales, p. ej., hipoxantina, 6-metiladenina, 5-Me-pirimidinas, particularmente 5-metilcitosina (también denominada 5-metil-2'-desoxicitosina y frecuentemente denominada en la técnica 5-Me-C), 5-hidroximetilcitosina (HMC), glicosil HMC y gentobiosil HMC, además de nucleótidos sintéticos, p. ej., 2-aminoadenina, 2-(metilamino)adenina, 2-(imidazolilalquil)adenina, 2-(aminoalquilamino)adenina u otras alquiladeninas heterosustituidas, 2-tiouracilo, 2-tiotimina, 5-bromouracilo, 5-hidroximetiluracilo, 8-azaguanina, 7-deazaguanina, N<sup>6</sup>(6-aminoxil)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, pero no se limitan a, restos lipídicos como restos de colesterol, restos de colesterilo, una cadena alifática, p. ej. residuos de dodecandiol o undecilo, una poliamina o una cadena de polietilenglicol, o ácido adamantano acético. Los oligonucleótidos que comprenden restos lipófilos, y procedimientos para preparar dichos oligonucleótidos, son conocidos en la técnica, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.<sup>os</sup> 5.138.045, 5.218.105 y 5.459.255.

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

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

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

De acuerdo con la divulgación, el uso de modificaciones tales como el uso de monómeros de LNA para potenciar la potencia, especificidad y duración de la acción y ampliar las vías de administración de oligonucleótidos comprende químicas actuales tales como MOE, ANA, FANA, PS, etc. Esto puede lograrse sustituyendo algunos de los monómeros en los oligonucleótidos actuales por monómeros LNA. El oligonucleótido modificado con LNA puede tener un tamaño similar al compuesto parental o puede ser más grande o preferentemente más pequeño. Se prefiere que dichos oligonucleótidos modificados con LNA contengan menos de aproximadamente el 70%, más preferentemente menos de aproximadamente el 60%, de la manera más preferente menos de aproximadamente el 50% de monómeros de LNA y que sus tamaños estén entre aproximadamente 5 y 25 nucleótidos, más preferentemente entre aproximadamente 12 y 20 nucleótidos.

60

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

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

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

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

En otros miméticos de oligonucleótidos preferidos, tanto el azúcar como el enlace internucleosídico, es decir, el esqueleto, de las unidades de nucleótido se sustituyen por grupos novedosos. Las unidades de base se mantienen para la hibridación con un compuesto de ácido nucleico diana apropiado. Dicho compuesto oligomérico, un oligonucleótido mimético que se ha demostrado que tiene excelentes propiedades de hibridación, se denomina ácido nucleico peptídico (PNA). En compuestos de PNA, el esqueleto de azúcar de un oligonucleótido se sustituye por un esqueleto que contiene amida, en particular un esqueleto de aminoetilglicina. Las nucleobases son retenidas y se unen directamente o indirectamente a átomos de nitrógeno azo de la parte de amida del esqueleto. Las patentes representativas de los Estados Unidos que enseñan la preparación de compuestos de PNA comprenden, pero no se limitan a, las patentes de los EE.UU. n.ºs 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 -CH<sub>2</sub>-NH-O-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)-O-CH<sub>2</sub>-, conocidos como un esqueleto de metileno (metilimino) o esqueleto de MMI, -CH<sub>2</sub>-O-N(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)-N(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>-y-O-N(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- donde el esqueleto de fosfodiéster nativo se representa como -O-P-O-CH<sub>2</sub>- de la patente de EE.UU. n.º 5.489.677, citada anteriormente, y los esqueletos de amida de la patente de EE.UU. n.º 5.602.240, citada anteriormente. También se prefieren oligonucleótidos que tienen estructuras de 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<sub>1</sub> a C<sub>10</sub>, o alqueno y alquino C<sub>2</sub> a C<sub>10</sub> sustituidos o sin sustituir. Se prefieren particularmente O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OmCH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, OCH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH<sub>2</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ONH<sub>2</sub> y O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ON(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> donde n y m pueden ser de 1 a aproximadamente 10. Otros oligonucleótidos preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': C a CO, (alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, alcarilo, aralquilo, O-alcarilo o O-aralquilo, SH, SCH<sub>3</sub>, OCN, Cl, Br, CN, CF<sub>3</sub>, OCF<sub>3</sub>, SOCH<sub>3</sub>, SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, ONO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub>, heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, polialquilamino, sililo sustituido, un grupo de escisión de ARN, un grupo indicador, un intercalador, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido, o un grupo para mejorar las propiedades

farmacodinámicas de un oligonucleótido, y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. Una modificación preferida comprende 2'-metoxietoxi (2'-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, también conocido como 2'-O-(2-metoxietilo) o 2'-MOE) es decir, un grupo alcoxialcoxi. Otra modificación preferida comprende 2'-dimetilaminoetoxi, es decir, un grupo O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>ON(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, también conocido como 2'-DMAOE, tal como se describe en los ejemplos en el presente documento más adelante, y 2'-dimetilaminoetoxietoxi (también conocido en la técnica como 2'-O-dimetilaminoetoxietilo o 2'-DMAEOE), es decir, 2'-O-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>.

Otras modificaciones preferidas comprenden 2'-metoxi (2'-O CH<sub>3</sub>), 2'-aminopropoxi (2'-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>) y 2-fluoro (2'-F). También pueden hacerse modificaciones similares en otras posiciones en el oligonucleótido, particularmente la posición 3' del azúcar en el nucleótido del extremo 3' o en oligonucleótidos enlazados 2'-5' y la posición 5' del nucleótido del extremo 5'. Los oligonucleótidos también pueden tener miméticos de azúcar tales como restos ciclobutilo en lugar del azúcar pentofuranosilo. Las patentes representativas de los Estados Unidos que enseñan la preparación de dichas estructuras de azúcar modificadas comprenden, pero no se limitan a, las patentes de los EE. UU. n.<sup>os</sup> 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 naturales y sintéticos tales como 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroxiometil citosina, xantina, hipoxantina, 2- aminoadenina, 6-metilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 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-tiol, 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.<sup>o</sup> 3.687.808, aquellos divulgados en "The Concise Encyclopedia of Polymer Science And Engineering", páginas 858-859, Kroschwitz, J.I., ed. John Wiley & Sons, 1990, aquellos divulgados por Englisch y col., "Angewandte Chemie, International Edition", 1991, 30, página 613, y aquellos divulgados por Sanghvi, Y.S., Capítulo 15, "Antisense Research and Applications", páginas 289-302, 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. Estos comprenden pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y purinas sustituidas en N-2, N-6 y O-6, que comprenden 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. Se ha demostrado que las sustituciones de 5-metilcitosina incrementan la estabilidad del dúplex de ácido nucleico alrededor de 0,6-1,2°C. (Sanghvi, Y. S., en Croke, S. T. y Lebleu, B., eds., Antisense Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, páginas 276-278) y actualmente son las sustituciones base preferidas, de manera aún más particular cuando se combinan con modificaciones de azúcar de 2'-Ometoxietilo.

Las patentes representativas de los Estados Unidos que enseñan la preparación de los nucleótidos modificados citados anteriormente, así como otros nucleótidos modificados, comprenden, pero no se limitan a, las patentes de los EE. UU. n.<sup>os</sup> 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 mejoran la actividad, distribución celular o captación celular del oligonucleótido.

Dichos restos comprenden, aunque no se limitan a, restos de lípido tales como un resto colesterol, ácido cólico, un tioéter, p. ej., hexil-S-tritilol, un tiocolesterol, una cadena alifática, p. ej., residuos de dodecanodiol o undecilo, un fosfolípido, por ejemplo, di-hexadecil-rac-glicerol o 1,2-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-t oxicolesterol.

Las patentes representativas de los Estados Unidos que enseñan la preparación de dichos conjugados de oligonucleótidos comprenden, pero no se limitan a, las patentes de los EE.UU n.<sup>os</sup> 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.

5

**Descubrimientos de fármacos:** Los compuestos de la presente divulgación también pueden aplicarse en las áreas del descubrimiento de fármacos y validación de dianas. La presente divulgación comprende el uso de los compuestos y segmentos diana preferidos e identificados en el presente documento en un esfuerzo por descubrir fármacos para esclarecer las relaciones que existen entre los polinucleótidos del regulador del desarrollo 1 asociado a interferón (IFRD1) y una patología, fenotipo o afección. Estos procedimientos incluyen detectar o modular los polinucleótidos de IFRD1 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 IFRD1 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.

10

15

**20 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).

25

30

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

35

40

45

50

La expresión de la proteína y del ARNm de IFRD1 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 IFRD1 están disponibles comercialmente, p. ej., en R&D Systems (Minneapolis, MN).

55

En unos aspectos, la expresión de IFRD1 (p. ej. ARNm o proteína) en una muestra (p. ej., células o tejidos *in vivo* o *in vitro*) tratados con un oligonucleótido antisentido de la divulgación se evalúa por comparación con la expresión de IFRD1 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

60

tratar. De forma alternativa, puede hacerse una comparación con una muestra tratada con un oligonucleótido antisentido control (p. ej., uno que tenga una secuencia modificada o diferente) dependiendo de la información deseada. En otro aspecto, una diferencia en la expresión de la proteína IFRD1 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, p. ej., en forma de proporción o fracción, para su uso en comparación con un control. En unos aspectos, el nivel de ARNm o proteína de IFRD1, 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 IFRD1 aumenta o disminuye entre al menos 1,25 veces, al menos 1,3 veces, al menos 1,4 veces, al menos 1,5; al menos 1,6 veces, al menos 1,7 veces, al menos 1,8 veces, al menos 2 veces, al menos 2,5 veces, al menos 3 veces, al menos 3,5 veces, al menos 4 veces, al menos 4,5 veces, al menos 5 veces, al menos 5,5 veces, al menos 6 veces, al menos 6,5 veces, al menos 7 veces, al menos 7,5 veces, al menos 8 veces, al menos 8,5 veces, al menos 9 veces, al menos 9,5 veces, o al menos 10 veces o más.

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

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

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

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "sistema biológico" o "sistema" se define como cualquier organismo, célula, cultivo celular o tejido que expresa, o se ha hecho competente para expresar productos de genes del regulador del desarrollo 1 asociado a interferón (IFRD1). Estos incluyen, aunque no se limitan a, seres humanos, animales transgénicos, células, cultivos celulares, tejidos, xenoinjertos, trasplantes y combinaciones de los mismos.

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

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

Los compuestos de la divulgación son útiles para investigación y diagnóstico, debido a que estos compuestos hibridan con ácidos nucleicos que codifican el regulador de desarrollo 1 asociado a interferón (IFRD1). Por ejemplo, los oligonucleótidos que hibridan con dicha eficiencia y en dichas condiciones que se han descrito en el presente documento como moduladores eficaces del gen IFRD1 son cebadores o sondas eficaces en condiciones que favorecen la amplificación génica o detección, respectivamente. Estos cebadores y sondas son útiles en procedimientos que requieren la detección específica de moléculas de ácidos nucleicos que codifican el gen IFRD1 y en la amplificación de dichas moléculas de ácidos nucleicos para la detección o para su uso en estudios adicionales del gen IFRD1. La hibridación de los oligonucleótidos antisentido, particularmente los cebadores y sondas de la divulgación con un ácido nucleico que codifica el gen IFRD1, puede detectarse por medios conocidos en la técnica. Dichos medios pueden comprender conjugación de una enzima con el oligonucleótido, radiomarcado del

oligonucleótido, o cualquier otro medio de detección adecuado. También pueden prepararse kits que usan dichos medios de detección para detectar el nivel del gen IFRD1 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 los productos terapéuticos, un animal, preferentemente un ser humano, sospechoso de tener o tiene una enfermedad o trastorno que puede tratarse modulando la expresión de los polinucleótidos del gen IFRD1 se trata administrando compuestos antisentido de acuerdo con esta divulgación. Por ejemplo, en un aspecto no limitante, los procedimientos comprenden la etapa de administrar al animal que necesita tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz del modulador del gen IFRD1. Los moduladores del gen IFRD1 de la presente divulgación modulan de manera efectiva la actividad del gen IFRD1 o modulan la expresión de la proteína del gen IFRD1. En un aspecto, la actividad o expresión del gen IFRD1 en un animal se inhibe aproximadamente el 10 % en comparación con un control. Preferentemente, la actividad o expresión del gen IFRD1 en un animal se inhibe aproximadamente el 30 %. Más preferiblemente, la actividad o expresión del gen IFRD1 en un animal se inhibe el 50 % o más. De este modo, los compuestos oligoméricos modulan la expresión del ARNm del gen regulador del desarrollo 1 asociado a interferón (IFRD1) al menos el 10 %, al menos el 50 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o el 100 % en comparación con un control.

En un aspecto, la actividad o expresión del gen regulador del desarrollo 1 asociado a interferón (IFRD1) y/o en un animal aumenta aproximadamente el 10 % en comparación con un control. Preferentemente, la actividad o expresión del gen IFRD1 en un animal se aumenta aproximadamente el 30 %. Más preferentemente, la actividad o expresión del gen IFRD1 en un animal aumenta el 50 % o más. De este modo, los compuestos oligoméricos modulan la expresión del ARNm del gen IFRD1 al menos el 10 %, al menos el 50 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o el 100 % en comparación con un control.

Por ejemplo, se puede medir el aumento o reducción de la expresión del regulador del desarrollo 1 asociado a interferón (IFRD1) 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 IFRD1 y/o la propia proteína de IFRD1.

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

### **Conjugados**

Otra modificación de los oligonucleótidos de la divulgación implica enlazar químicamente al oligonucleótido uno o más restos o conjugados que mejoran la actividad, distribución celular o captación celular del oligonucleótido. Estos restos o conjugados pueden incluir grupos conjugados unidos de manera covalente a grupos funcionales tal como grupos hidroxilo primarios o secundarios. Grupos conjugados de la divulgación incluyen intercaladores, moléculas de genes indicadores, poliaminas, poliamidas, polietilenglicoles, poliéteres, grupos que potencian las propiedades farmacodinámicas de oligómeros, y grupos que potencian las propiedades farmacocinéticas de oligómeros. Grupos conjugados típicos incluyen colesterolos, lípidos, fosfolípidos, biotina, fenazina, folato, fenantridina, antraquinona, acridina, fluoresceínas, rodaminas, cumarinas y colorantes. Grupos que potencian las propiedades farmacodinámicas, en el contexto de esta divulgación, incluyen grupos que mejoran la captación, potencian la resistencia a la degradación y/o fortalecen la hibridación específica de secuencia con el ácido nucleico diana. Grupos que potencian las propiedades farmacocinéticas, en el contexto de esta divulgación, incluyen grupos que mejoran la captación, distribución, metabolismo o eliminación de los compuestos de la presente divulgación. Grupos conjugados representativos se describen en la solicitud de patente internacional con n.º PCT/US92/09196, depositada el 23 de octubre de 1992, y la patente de EE. UU. n.º 6.287.860.

Restos conjugados incluyen, aunque no se limitan a, restos de lípido tales como un resto colesterol, ácido cólico, un tioéter, p. ej., hexil-5-tritilol, un tiocolesterol, una cadena alifática, p. ej., residuos de dodecanodiol o undecilo, un fosfolípido, p.ej., di-hexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato de trietilamonio, una poliamina o una cadena de polietilenglicol, o ácido adamantano acético, un resto palmitilo, o un resto octadecilamina o hexilamino-carbonil-oxicolesterol. Los oligonucleótidos de la divulgación también pueden conjugarse con principios activos, por ejemplo, aspirina, warfarina, fenilbutazona, ibuprofeno, suprofen, fenbufeno, ketoprofeno, (S)-(+)-pranoprofeno, carprofeno, dansilsarcosina, ácido 2,3,5-triyodobenzoico, ácido flufenámico, ácido folínico, una benzotiadiazida, clorotiazida, una diazepina, indometacina, un barbitúrico, una cefalosporina, un fármaco sulfa, un antidiabético, un antibacteriano o un antibiótico.

10

Las patentes representativas de los Estados Unidos que enseñan la preparación de estos conjugados de oligonucleótidos incluyen, pero no se limitan a, las patentes de los EE. UU. con los n.<sup>os</sup> 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.

## 20 **Formulaciones**

Los compuestos de la divulgación también pueden mezclarse, encapsularse, conjugarse o asociarse de otro modo a otras moléculas, estructuras de molécula o mezclas de compuestos, como, por ejemplo, liposomas, moléculas dirigidas a receptor, formulaciones orales, rectales, tópicas u otras, para ayudar en la captación, distribución y/o absorción. Las patentes representativas de los Estados Unidos que enseñan la preparación de estas formulaciones de ayuda en la captación, distribución y/o absorción incluyen, pero no se limitan a, las patentes de EE. UU. con n.<sup>os</sup> 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.

30

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.

35

En un aspecto, la práctica de la divulgación implica administrar al menos uno de los oligonucleótidos antisentido anteriores con un sistema de administración de ácidos nucleicos adecuado. En un aspecto, ese sistema incluye un vector no viral enlazado operativamente al polinucleótido. Ejemplos de dichos vectores no virales incluyen el oligonucleótido solo (por ejemplo, una cualquiera o más de las SEQ ID NO: 8 a 16) o en combinación con una formulación de proteína, polisacárido o lípido adecuada.

40

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).

45

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 donde los genes gag y pol son de un genoma del VIH 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.

55

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.

60

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 EE. UU. n.º 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, p. ej. por inyección o perfusión en el líquido cefalorraquídeo. La administración del ARN antisentido en el líquido cefalorraquídeo se describe, p. ej., en la publicación de solicitud de patente de los EE. UU., n.º 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, p. ej., la patente de EE. UU. con n.º 6.632.427, "Adenoviral-vector-mediated gene transfer into medullary motor neurons". La aplicación de vectores directamente en el cerebro, p. ej., el cuerpo estriado, el tálamo, el hipocampo, o la sustancia negra, es conocida en la técnica y se describe en, p. ej. La patente de EE. UU. con n.º 6.756.523, "Adenovirus vectors for the transfer of foreign genes into cells of the central nervous system particularly in brain".

La administración puede ser rápida como por inyección o realizarse a lo largo de un período de tiempo ya sea por perfusión lenta o mediante la administración de formulaciones de liberación lenta.

Los oligonucleótidos antisentido sujeto también pueden unirse o conjugarse con agentes que proporcionen unas propiedades farmacéuticas o farmacodinámicas deseables. Por ejemplo, el oligonucleótido antisentido puede acoplarse a cualquier sustancia, conocida en la técnica por favorecer la penetración o el transporte a través de la barrera hematoencefálica, como un anticuerpo contra el receptor de la transferrina, y administrarse por inyección intravenosa. El compuesto antisentido puede unirse a un vector viral, por ejemplo, que hace que el compuesto antisentido resulte más eficaz y/o aumente el transporte del compuesto antisentido a través de la barrera hematoencefálica. La alteración de la barrera hematoencefálica osmótica también puede llevarse a cabo mediante perfusión, p. ej. de azúcares incluyendo, pero sin limitarse a, mesoeritritol, xilitol, D(+)-galactosa, D(+)-lactosa, D(+)-xilosa, dulcitol, mioinositol, L(-)-fructosa, D(-)-manitol, D(+)-glucosa, D(+)-arabinosa, D(-)-arabinosa, celobiosa, D(+)-maltosa, D(+)-rafinosa, L(+)-ramnosa, D(+)-melibiosa, D(-)-ribosa, adonitol, D(+)-arabitol, L(-)-arabitol, D(+)-fucosa, L(-)-fucosa, D(-)-lixosa, L(+)-lixosa y L(-)-lixosa o aminoácidos, incluyendo, pero sin limitarse a, glutamina, lisina, arginina, asparagina, cisteína, ácido aspártico, ácido glutámico, glicina, histidina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, Valina, tirosina y taurina. Los procedimientos y materiales para mejorar la penetración en la barrera hematoencefálica se describen, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. n.ºs 4.866.042, "Method for the delivery of genetic material across the blood brain barrier," 6.294.520. "Material for passage through the blood-brain barrier," y 6.936.589, "Parenteral delivery systems."

Los compuestos antisentido objeto 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, tópicas u otras, para ayudar en la captación, distribución y/o absorción. Por ejemplo, pueden incluirse lípidos catiónicos en la formulación para facilitar la captación de oligonucleótidos. Una de dichas composiciones que se ha demostrado que facilita la absorción es LIPOFECTIN (disponible en GIBCO BRL, Bethesda, MD).

Se cree que los oligonucleótidos con al menos una modificación de 2'-O-metoxietilo son particularmente útiles para administración por vía oral. Composiciones y formulaciones farmacéuticas para administración tópica pueden comprender parches transdérmicos, pomadas, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, espráis, líquidos y

polvos. Pueden ser necesarios o deseables vehículos farmacéuticos convencionales, bases acuosas, en polvo o aceitosas, espesantes y similares. También pueden ser útiles preservativos recubiertos, guantes y similares.

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

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

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

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

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

Los liposomas también incluyen liposomas "estéricamente estabilizados", una expresión que, tal como se usa en el  
40 presente documento, se refiere a liposomas que comprenden uno o más lípidos especializados. Cuando se incorporan en liposomas, estos lípidos especializados producen liposomas con vidas en circulación mejoradas con respecto a los liposomas que carecen de dichos lípidos especializados. Ejemplos de liposomas estéricamente estabilizados son aquellos en los que parte de la parte de lípido formado de vesícula del liposoma comprende uno o más glucolípidos o se derivatiza con uno o más polímeros hidrófilos, tales como un resto de polietilenglicol (PEG).  
45 Los liposomas y sus usos se describen adicionalmente en la patente de EE. UU. con n.º 6.287.860.

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

En un aspecto, la presente divulgación emplea diversos mejoradores 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  
55 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 los EE. UU. con n.º 6.287.860.

60 Un experto en la materia reconocerá que las formulaciones se diseñan rutinariamente de acuerdo con su uso

previsto, es decir, su vía de administración.

- Formulaciones preferidas para administración tópica incluyen aquellas en las que los oligonucleótidos de la divulgación están en mezcla con un agente de administración tópica tal como lípidos, liposomas, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, esteroides, agentes quelantes y tensioactivos. Lípidos y liposomas preferidos incluyen neutros (por ejemplo, dioleoil-fosfatidiletanolamina DOPE, dimiristoilfosfatidilcolina DMPC, diestearoilfosfatidilcolina) negativos (por ejemplo, dimiristoilfosfatidilglicerol DMPG) y catiónicos (por ejemplo, dioleiltetrametilaminopropilo DOTAP y dioleoil-fosfatidiletanolamina DOTMA).
- 10 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 los EE. UU. con n.º 6.287.860.
- 15 Las composiciones y formulaciones para administración por vía oral incluyen polvos o gránulos, micropartículas, nanopartículas, suspensiones o soluciones en agua o medios no acuosos, cápsulas, cápsulas de gel, sobres, comprimidos o 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 juntamente con uno o más mejoradores 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 EE. UU. con n.º 6.287.860. También se prefieren combinaciones de mejoradores 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 polioxietilen-9-laurílico, éter polioxietilen-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 EE. UU. con n.º 6.287.860.
- 20
- 25 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, mejoradores de la penetración, compuestos portadores y otros vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables.
- 30
- 35 Ciertos aspectos de la divulgación proporcionan composiciones farmacéuticas que contienen uno o más compuestos oligoméricos y uno o más de otros agentes quimioterapéuticos que funcionan por un mecanismo no antisentido. Ejemplos de dichos agentes quimioterapéuticos incluyen, aunque no se limitan a, fármacos quimioterapéuticos para el cáncer tales como daunorrubicina, daunomicina, dactinomomicina, doxorubicina, epirubicina, idarubicina, 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, hidroxíurea, desoxicoformicina, 4-hidroxiperoxiciclo-fosforamida, 5-fluorouracilo (5-FU), 5-fluorodesoxiuridina (5-FUdR), metotrexato (MTX), colchicina, taxol, vincristina, vinblastina, etopósido (VP-16), trimetrexato, irinotecán, topotecán, gemcitabina, tenipósido, cisplatino y dietilestilbestrol (DES). Cuando se usan con los compuestos de la divulgación, dichos agentes quimioterapéuticos pueden usarse individualmente (p. ej., 5-FU y oligonucleótido), secuencialmente (p. ej., 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 (p. ej., 5-FU, MTX y oligonucleótido, o 5-FU, radioterapia y oligonucleótido). Fármacos antiinflamatorios, que incluyen, aunque no se limitan a, fármacos antiinflamatorios no esteroideos y corticosteroides, y fármacos antivirales, que incluyen, aunque no se limitan a, ribivirina, vidarabina, aciclovir y ganciclovir, también pueden combinarse en composiciones de la divulgación. Las combinaciones de compuestos antisentido y otros fármacos no antisentido también están dentro del alcance de la presente divulgación. Pueden usarse dos o más compuestos combinados juntos o secuencialmente.
- 40
- 45
- 50
- 55 En otro aspecto relacionado, las composiciones de la divulgación pueden contener uno o más compuestos antisentido, particularmente oligonucleótidos, dirigidos a un primer ácido nucleico y uno o más compuestos antisentido adicionales dirigidos a un segundo ácido nucleico diana. Por ejemplo, la primera diana puede ser una secuencia antisentido particular del regulador del desarrollo 1 asociado a interferón (IFRD1), y la segunda diana puede ser una región de otra secuencia de nucleótidos. Como alternativa, las composiciones de la divulgación
- 60

pueden contener dos o más compuestos antisentido dirigidos a diferentes regiones del mismo ácido nucleico diana del regulador del desarrollo 1 asociado a interferón (IFRD1). Se ilustran numerosos ejemplos de compuestos antisentido en el presente documento y otros pueden seleccionarse de entre compuestos adecuados conocidos en la técnica. Pueden usarse dos o más compuestos combinados juntos o secuencialmente.

5

#### **Dosificación:**

Se cree que la formulación de composiciones terapéuticas y su posterior administración (dosificación) están dentro de la experiencia de los expertos en la materia. La dosificación depende de la gravedad y sensibilidad de la patología que va a tratarse, durando el ciclo de tratamiento de varios días a varios meses, o hasta que se efectúe una cura o se logre una disminución de la patología. Pueden calcularse programas de dosificación óptimos a partir de mediciones de acumulación de fármaco en el cuerpo del paciente. Los expertos pueden determinar fácilmente dosificaciones óptimas, metodologías de dosificación y tasas de repetición. Las dosificaciones óptimas pueden variar dependiendo de la potencia relativa de oligonucleótidos individuales, y generalmente pueden estimarse basándose en las CE50 que se ha descubierto que son eficaces en modelos animales *in vitro* e *in vivo*. En general, la dosificación es de 0,01 µg a 10 mg por kg de peso corporal, y puede administrarse una vez o más diariamente, semanalmente, mensualmente o anualmente, o incluso una vez cada 2 a 20 años. Los expertos en la materia pueden estimar fácilmente tasas de repetición para la dosificación basándose en tiempos de residencia medidos y concentraciones del fármaco en fluidos corporales o tejidos. Tras el tratamiento satisfactorio, puede desearse que el paciente reciba terapia de mantenimiento para prevenir la reaparición de la patología, en el que el oligonucleótido se administra en dosis de mantenimiento, que oscilan de 0,01 µg a 10 mg por kg de peso corporal, una vez o más diariamente, a una vez cada -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 10 mg/kg de peso corporal. Ciertas dosis inyectadas de oligonucleótidos antisentido se describen, p. ej., en la patente de EE: UU. con n.º 7.563.884, "Antisense modulation of PTPIB expression,".

MPS-1 (es decir, mucopolisacaridosis tipo 1) es una rara enfermedad de almacenamiento lisosomal. Esta enfermedad tiene tres grupos de pacientes con síntomas distintos basados en la gravedad de la enfermedad (síndrome de Hurler, síndrome de Hurler-Scheie, síndrome de Scheie). En estudios para determinar y apoyar un procedimiento para determinar y seleccionar el oligonucleótido más preferido para cualquier paciente individual o grupo de pacientes que padecen la enfermedad, se puede realizar el siguiente protocolo general. Este procedimiento puede, por supuesto, usar cualquier célula o tejido que tenga normalmente polinucleótidos de IFRD1 y productos de expresión derivados de los mismos. Una población de pacientes puede seleccionarse usando los siguientes criterios, 1,2; después de la aceptación, se realizan las etapas 3, 4, 5 y 6: (1) Los pacientes que muestran MPS-1 (es decir, mucopolisacaridosis tipo 1) debido a una deficiencia en la actividad de IFRD1. (2) En estos pacientes se definirá a partir de un examen médico que tienen un síndrome de Hurler o un síndrome de Hurler-Scheie o un síndrome de Scheie. (3) Después del consentimiento del paciente/tutor, se tomará una biopsia de piel del paciente; el paciente también será revisado para determinar cualquier otra enfermedad (por ejemplo, enfermedades infecciosas) que requiera precauciones especiales cuando se manejen muestras biológicas del paciente. (4) Después de la documentación completa sobre las condiciones del paciente, la biopsia de la piel se procesará para expandir los fibroblastos de la piel *in vitro*. (5) Los fibroblastos de la piel se dosificarán con diferentes concentraciones de oligos y oligos diferentes; los oligos son un conjunto seleccionado de oligos complementarios con el antisentido natural del IFRD1 humano que se habría caracterizado previamente como reguladores ascendentes del IFRD1 (ARNm, proteína y actividad). (6) El aumento del porcentaje en la actividad del IFRD1 es medido a partir del sobrenadante del cultivo celular de fibroblastos de la piel en el NCBI (The National Center for Biotechnology Information) que caracteriza la actividad del IFRD1 en diferentes subconjuntos de pacientes (o controles) como sigue: un paciente con dos alelos del IFRD1 de tipo silvestre (un gen IFRD1 de cada ascendiente es de tipo silvestre, lo que significa que carece de mutación) la actividad del IFRD1 es del 83-121 %; pacientes con una marcada mutación en el IFRD1 (heterocigotos), la actividad del IFRD1 es del 19 al 60 %; pacientes con dos mutaciones muy marcadas en el IFRD1, la actividad total del IFRD1 es del 0-3 %. Los heterocigotos son solo portadores de la enfermedad y no muestran síntomas de la enfermedad. Los oligos que aumentan la actividad del IFRD1 a más de aproximadamente el 10 % de la actividad total observada en las células normales podrían considerarse candidatos a fármacos activos. Preferiblemente, el porcentaje de aumento estará por encima de aproximadamente el 20 %. El oligonucleótido con el

mayor aumento porcentual en la regulación ascendente del IFRD1 se selecciona como el fármaco candidato para el paciente individual a partir del cual se realizó la medición de fibroblastos. El oligonucleótido también puede ser útil en un subconjunto de pacientes que tienen la misma afección de enfermedad o para tratar la enfermedad en todos los pacientes que tienen dicha enfermedad.

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

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

## 15 EJEMPLOS

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

### ***Ejemplo 1: Diseño de oligonucleótidos antisentido específicos para una molécula de ácido nucleico antisentido a un regulador del desarrollo 1 asociado a interferón (IFRD1) y/o una cadena sentido de polinucleótido de IFRD1***

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

30 La selección de los oligonucleótidos apropiados se ve facilitada por la utilización de programas informáticos (p. ej. IDT AntiSense Design, IDT OligoAnalyzer) que identifican automáticamente en cada secuencia dada, subsecuencias de 19-25 nucleótidos que formarán híbridos con una secuencia de polinucleótidos diana con una temperatura de fusión deseada (normalmente 50-60 °C) y no formará autodímeros u otras estructuras secundarias complejas.

35 La selección de los oligonucleótidos apropiados se facilita aún más usando programas informáticos que alinean automáticamente secuencias de ácido nucleico e indican regiones de identidad u homología. Dichos programas se usan para comparar secuencias de ácidos nucleicos obtenidas, por ejemplo, buscando en bases de datos tales como GenBank o secuenciando productos de PCR. La comparación de secuencias de ácidos nucleicos de un intervalo de genes y regiones intragénicas de un genoma dado permite la selección de secuencias de ácidos nucleicos que muestran un grado de especificidad respecto al gen de interés. Estos procedimientos permiten la selección de oligonucleótidos que muestran un alto grado de complementariedad con secuencias de ácido nucleico diana y un menor grado de complementariedad con otras secuencias de ácido nucleico en un genoma dado. Un experto en la materia se dará cuenta de que hay libertad considerable en la selección de regiones apropiadas de genes para su uso en la presente invención.

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

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

60 La intensidad de unión entre el antisentido natural diana y una posible molécula de fármaco (Molécula) puede estimarse usando cualquiera de los procedimientos establecidos de medición de la intensidad de interacciones

intermoleculares, por ejemplo, un ensayo de la curva de fusión.

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

- Puede realizarse un ensayo de la curva de fusión usando una copia de ADNc de la molécula de ARN antisentido natural real o un nucleótido de ADN o ARN sintético correspondiente al sitio de unión de la molécula. Están disponibles múltiples kits que contienen todos los reactivos necesarios para realizar este ensayo (por ejemplo, kit  
10 MeltDoctor de Applied Biosystems Inc.). Estos kits incluyen una solución tampón adecuada que contiene uno de los colorantes de unión a ADN bicatenario (dsADN) (tales como los colorantes ABI HRM, SYBR Green, SYTO, etc.). Las propiedades de los colorantes de dsADN son tales que casi no emiten fluorescencia en forma libre, pero son altamente fluorescentes cuando se unen a dsADN.
- 15 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 ADNc 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  
20 simultánea sobre la cantidad de fluorescencia que se produce por la reacción. La intensidad de fluorescencia es inversamente proporcional a las cantidades de dsADN presentes en la reacción. Los datos pueden recogerse usando un instrumento de PCR en tiempo real compatible con el kit (p. ej., sistema de PCR en tiempo real StepOne Plus de ABI o el instrumento LightTyper, Roche Diagnostics, Lewes, Reino Unido).
- 25 Los picos de fusión se construyen representando la derivada negativa de la fluorescencia con respecto a la temperatura ( $-d(\text{Fluorescencia})/dT$ ) sobre el eje y) contra la temperatura (eje x) usando software apropiado (por ejemplo, LightTyper (Roche) o SDS Dissociation Curve, ABI). Los datos se analizan para identificar la temperatura de la rápida transición del complejo de dsADN a moléculas monocatenarias. Esta temperatura se llama  $T_m$  y es directamente proporcional a la intensidad de la interacción entre las dos moléculas. Normalmente, la  $T_m$  superará  
30 los 40 °C.

### **Ejemplo 2: Modulación de polinucleótidos de IFRD1**

- Todos los oligonucleótidos antisentido utilizados en el Ejemplo 2 se diseñaron como se describe en el Ejemplo 1. Se  
35 encargó al fabricante (IDT Inc. de Coralville, IA) que fabricara los oligonucleótidos con el enlace fosfotioato diseñados y se proporcionaron los análogos de fosfotioato mostrados en la Tabla 1. La denominación asterisco entre nucleótidos indica la presencia u enlace fosfotioato. Los oligonucleótidos requeridos para el experimento del Ejemplo 2 pueden sintetizarse utilizando cualquier procedimiento apropiado del estado de la técnica, por ejemplo el procedimiento utilizado por IDT: sobre soporte sólido, como microperlas de vidrio de poro controlado (CPG) de 5  
40 micrómetros, usando monómeros de fosforamidita (nucleótidos normales con todos los grupos activos protegidos con grupos de protección, p. ej., grupo tritilo en el azúcar, grupo benzoilo en A y C, y N-2-isobutirilo en G). Los grupos de protección impiden las reacciones no deseadas durante la síntesis de oligonucleótidos. Los grupos de protección se eliminan al final del proceso de síntesis. El nucleótido inicial está unido a un soporte sólido a través del carbono 3' y la síntesis continúa en dirección 3' - 5'. La adición de una nueva base a una cadena de oligonucleótidos  
45 en elongación se realiza en cuatro etapas: 1) el grupo de protección se elimina del oxígeno 5' del nucleótido inmovilizado con ácido tricloroacético; 2) el nucleótido inmovilizado y el siguiente en la secuencia se unen utilizando tetrazol; la reacción continúa a través de un intermediario tetrazoilfosforamidita; 3) se lavan los nucleótidos libres que no hayan reaccionado y otros subproductos de reacción, y los oligonucleótidos inmovilizados que no hayan reaccionado se tapan para evitar su participación en la próxima ronda de síntesis; el tapado se logra acetilando el  
50 hidroxilo 5' libre utilizando anhídrido acético y N-metil-imidazol; 4) para estabilizar el enlace entre los nucleótidos, el fósforo se oxida con yodo y agua, si se va a producir un enlace fosfodiéster, o reactivo Beaucage (3H-1,2-benzoditiol-3-ona-1,1-dióxido), si se desea un enlace fosfotioato. Alternando las dos agentes oxidantes, se puede construir un esqueleto quimérico. Se repite el ciclo de cuatro etapas descrito anteriormente para cada nucleótido de la secuencia. Cuando la secuencia completa esté sintetizada, si el oligonucleótido escinde sobre un soporte sólido y  
55 se desprotege utilizando hidróxido de amonio a alta temperatura. Los grupos de protección se lavan mediante desalinización y el resto de los oligonucleótidos se liofilizan.

### **Tratamiento de células 518A2 con oligonucleótidos antisentido**

- 60 Para realizar el experimento diseñado en el Ejemplo 2, se obtuvieron células 518A2 del Albert Einstein-Montefiore

Cancer Center, NY, cultivadas en medio de crecimiento [MEM/EBSS (Hyclone n.º de cat. SH30024, o Mediatech n.º de cat. MT-10-010-CV) +10 % de FBS (Mediatech n.º de cat. MT35-011-CV)+ penicilina/estreptomicina (Mediatech n.º de cat. MT30-002-CI)] a 37 °C y con el 5 % de CO<sub>2</sub>. Un día antes del experimento, las células volvieron a sembrarse a la densidad de 1,5 x 10<sup>5</sup>/ml en placas de 6 pocillos y se incubaron a 37 °C y el 5 % de CO<sub>2</sub>. El día del experimento, el medio en las placas de 6 pocillos se cambió a medio de cultivo fresco. Todos los oligonucleótidos antisentido se diluyeron a la concentración de 20 µM. Se incubaron dos µl de esta solución con 400 µl de medio Opti-MEM (Gibco, n.º de cat 31985-070) y 4 µl de Lipofectamine 2000 (Invitrogen, n.º de cat 11668019) a temperatura ambiente durante 20 min y se aplicaron a cada pocillo de las placas de 6 pocillos con células 518A2. Se usó una mezcla similar, que incluye 2 µl de agua en lugar de la solución de oligonucleótido, para los controles transfectados con vector simulado. Después de 3-18 horas de incubación a 37 °C y con el 5 % de CO<sub>2</sub>, el medio se cambió a medio fresco de crecimiento. 48 h después de la adición de oligonucleótidos antisentido, el medio se eliminó y se extrajo ARN de las células usando el sistema de aislamiento de ARN SV Total de Promega (n.º de cat Z3105) o el kit de aislamiento de ARN RNeasy Total de Qiagen (n.º de cat 74181) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se añadieron 600 ng de ARN a la reacción de transcripción inversa realizada usando el kit de ADNc Verso de Thermo Scientific (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 (n.º de cat 4369510) y cebadores/sondas diseñados por ABI (ensayo de expresión génica Taqman de Applied Biosystems: Hs00155477\_ml de Applied Biosystems Inc., Foster City CA). Se usó el siguiente ciclo de PCR: 50 °C durante 2 min, 95 °C durante 10 min, 40 ciclos de (95 °C durante 15 segundos, 60 °C durante 1 min) usando la máquina de PCR en tiempo real StepOne Plus (Applied Biosystems). El cambio de veces en la expresión génica después del tratamiento con oligonucleótidos antisentido se calculó basándose en la diferente de valores de dCt normalizados contra 18S entre las muestras tratadas y las transfectadas de forma simulada. *Resultados:* Los resultados de PCR en tiempo real muestran que los niveles de ARNm del IFRD1 en células 518A2 se incrementan significativamente 48 h después del tratamiento con los oligonucleótidos antisentido para IFRD1 (Fig.1).

Además, aunque se ha descrito una característica particular de la divulgación con respecto a solo una de varias implementaciones, dicha característica puede combinarse con una o más de otras características de las otras implementaciones, ya que puede desearse y ser ventajoso para cualquier aplicación dada o particular.

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

35 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> OPKO CURNA LLC

40 <120> TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES RELACIONADAS CON EL 'REGULADOR DEL DESARROLLO 1 ASOCIADO A INTERFERÓN' (IFRD1) POR INHIBICIÓN DEL TRANSCRITO ANTISENTIDO NATURAL A IFRD1

<130> IFRD1

45 <150> US61/407045

<151> 2010-10-27

<160> 25

50 <170> PatentIn versión 35

<210> 1

<211> 2487

<212> ADN

55 <213> Homo sapiens

<400> 1

ES 2 677 070 T3

ctcctgggtc attcaaggtc tacatagtta aagggtgttc cagagggatg tgitgtaattc 60  
ctcccagtat ttgatgttcc ttattactt attttcaact gagccaacag cctgaactgg 120  
tcaggctttg ggctgatgcc agctgcttta tctggtagca ctgttacata aaattaacat 180  
ttattgggta tcaactagtg ccaacattat gcaagaact ttactggac atcccattta 240  
attctcagaa gccgatcaca agctcttcac ggggatttct gctgcccca ccgcccactc 300  
ttacccccgc cgttctcga ctctgtgtt agccgaagac tcgccttca gccgcccgcc 360  
gcacagagcg acgagtaaaa agtgcagctc catcggtga tctctgctaa gctccgactc 420  
tggcggcac cgggcgtccc acgatcccga agaacaagaa gcggaact ccccaccgcg 480  
gtagcagtgc tggcggcggc gggtcaggag cagccgcagc gatggcggcg acagcaggtg 540  
gccagcatcg aaatgttcag ctttttagtg atgaagatgc atcaattgaa acaatgagcc 600  
attgcagtgg ttatagcat ccttcagtt ttgetgaaga tggaccagaa gtccttgatg 660  
aggaaggaac tcaagaagac cttagtaca agttgaaggg attaattgac ctaaccctgg 720  
ataagagtgc gaagacaagg caagcagctc ttgaaggtat taaaaatgca ctggcttcaa 780

ES 2 677 070 T3

aaatgctgta tgaatttatt ctggaaagga gaatgacttt aactgatagc attgaacgct 840  
 gcctgaaaaa aggtaagagt gatgagcaac gtcagctgc agcgttagca tctgttcttt 900  
 gtattcagct gggccctgga attgaaagt aagagatttt gaaaactctt ggaccaatcc 960  
 taaagaaaat catttggat gggtcagcta gtatgcaggc taggcaaac tgtgcaact 1020  
 gctttgggt ttgctgttt attgccacag atgacattac tgaactatac tcaactctgg 1080  
 aatgtttgga aaatatcttc actaaatcct atctcaaaga gaaagacact actgttattt 1140  
 gcagcactcc taatacagtg cttcatatca gctctctct tgcattggaca ctactgctga 1200  
 ccatatgccc aatcaatgaa gtgaagaaaa agctfgagat gcatttccat aagcttccaa 1260  
 gcctcctc tcgtgatgat gtaaacatga gaatagctgc tggtaactt ttggcacttc 1320  
 tcttgaatt gggcagagga atagagagtg actttttta tgaagacatg gagtccttga 1380  
 cgcagatgct tagggccttg gcaacagatg gaaataaaca ccgggcca aa gtggacaaga 1440  
 gaaagcagcg gtcagtttc agagatgccc tgagggcagc ggaggaacgg gattttccaa 1500  
 cagaaacct taaatttgg cctgaacgca tgtatattga ttctgggta aaaaaacaca 1560  
 cctatgacac cttaaggag gttcttggat cagggatgca gtaccactg cagtcaaag 1620  
 aattccttcg aaatgtatt gaacttggac cccagtgat gcttgatgct gcaacgctta 1680  
 aaacgatgaa gatttctctg ttgaaaggc atttatataa ctctgcagcc ttcaaagctc 1740  
 gaaccaaacg tagaagcaaa tgcgagata agagagcaga tgttgagaa ttcttctaga 1800  
 tttcagaac ttgaagacta ttttcaatt tctattttt ttctattc aatgtattta 1860  
 aactctagac acagtttta tctggatta acttagataa cttttgtagc agtgggtata 1920  
 ttgctataa ttaaatgtac aatactattg aaactgggta gttctgatta ttaaatattc 1980  
 tctgaaatc agtaaacatg tataaagtat ttgtaatgt ttgtcataat ttattatga 2040  
 agacagcaaa agactgattt catgatgggg aaaacaatta gccaaagttt aatttctac 2100  
 acttggttg tcaagaatac tgatttacta taatgatata tacatgcaag atatttaact 2160  
 taatatctta gacaagagtt ctgggtacaa ttttgggatc tagttccctt ggaaaagctg 2220

ES 2 677 070 T3

ctgtatfttt aattttfaat ggaatgtagc ttftaaaatc ctgtcactgg catcaacaaa 2280  
 aggaattata ccatgagacc ttatagctgt acttaaaagc cattcagttc agctattggg 2340  
 agttcatgat gaattagcat atgccagaaa ggttgctaac cttaacatct gagagcagta 2400  
 acactgattt tatctgctgt atgagacttt gtgcatttta ctttgaata aagatttttt 2460  
 tccacactga aaaaaaaaaa aaaaaaa 2487

<210> 2  
 <211> 740  
 5 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 2

catctcctgc cctctttta tccactgcat ttcagccaca ctggctttg ccaacttaaa 60  
 aacacaaagt tcattcccca cttaaagactt gcaacagctc ctccctctgc ctgacatgat 120  
 caacccgagc ttcccacact tgccattcag atctgagctt aatgacacc tacctgaaga 180  
 ggccttcta ctctcccact cttccactct ccattctaag gtcgcatcct caccacact 240  
 accaccagca cctccacctt gcttatattc tcccaaagta catcgacta cttaatatt 300  
 tttggcccaa ttattttttg tctctctac tagaatgta gaattacaag aaagagatcc 360  
 tgtctgtttt attcactatt gtatcttcag tactggaaca gtactgggca cttagatatt 420  
 caattatftt ttactgaatg tttacaccac tcttgagaag aataagcgtc agcgaagaa 480  
 ggtgaagctg gctgtcctga aatactgtaa ggtggatgag aatggcaaaa taagtcgctt 540  
 tcatctagag tgctcttcag atgaatgtgg tactggagcg tttatggcca gccactttga 600  
 cagacattat tgtgacaaat gtctcattgc ttcagcaaac cagaagacaa ttaattgtgt 660  
 atgagttaat aaaagacatg aactaacaaa acacatttac tgaatgaala aatgtattaa 720  
 taattaaaaa aaaaaaaaaa 740

10 <210> 3  
 <211> 418  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

15 <400> 3

ES 2 677 070 T3

tgggacagtg gtcttcagct ccacatacta ttgtgcaata tgtttaaaga aattagaaga 60  
ctccaaacat caagtcacta aatgattaca aataccagaa agaaggggaa gcacgaaagg 120  
gaacaggaaa aaggggcttt ctccagactt ggccttttc ttcaggaaag accacactcc 180  
ctagaaactt ccacctacat gttgaccaga actgtttcac aggatgatcc ctatctgcaa 240  
ggaattttag aacacaagta ttttcggttg ggctcattcg caaacaaat tgagtttctg 300  
ttgtaagaa tgaaggggaa accatggata taaggtagac aaatagcaat gctcgcctca 360  
tatatcagga ggcaaaatc tctcatgctc taataaataa atatcacata tttgttac 418

<210> 4  
<211> 540  
5 <212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 4

gatgccggcg gcggggatac cccttacctg ctgtcggcgc cgtcgtcgc gctgctcctg 60  
accgcccgc gccagcactg ctaccgcggt ggggagtggt ccgcttctg ttcttcggca 120  
tcgtgggacg cccgggtcgc ccagagtcg gagcttagcg aggatcagcc gatggagctg 180  
cactttttac tcgtgcgtct gtgcggcggg cggctgagag gcgagtcttc ggctaacaac 240  
agagtcgaga agcggcgggg ggtctcactc tgttgcttac attggagtgc agtggcacia 300  
tcagggctta ctgcaacctt gactcaagcg atcctccac ctacgcccac tcaaatagct 360  
gggactacag gcctgcacca ccagctgggc taatagaaa ggcttcacca tgttgcccag 420  
gctggctca aactcctgga ctcaaataat ccaccacct cagcctcca aagtgtcaga 480  
attacaggca tgagccactg caccggcctg ataactttc ttttcatag ctatttcgtt 540

10

<210> 5  
<211> 546  
<212> ADN  
15 <213> Homo sapiens

<400> 5

ES 2 677 070 T3

tcctaatgcc atatcaaact ctagcaggc ctctgagctc accactctca agcttccagg 60  
 cctfacctag gtttggcacc tacctctctc tccatattgc atctctgcc cctctttca 120  
 tccactgcat ttcagccaca ctggtctftg ccaacttaaa aacacaaagt tcattcccca 180  
 cttagactt gcaacagctc ctccctctgc ctgatatgat caaccgagc tcccacact 240  
 tgccattcag atctgagctt aatgacacc tacctgaaga ggccttcta ctctccact 300  
 cttccactct ccattctaag gtcgcatctt caccacacct accaccagca cctccacct 360  
 gcttatattc tcccaaagta catcgacta cttaatattt tttggccaa ttatttttg 420  
 tctctctac tagaatgta gaattacaag aaagatcc tctctgtttt attcactatt 480  
 gtatctcag tactggaaca gtacgtggca cttagatatt caattatttt ttactgaatg 540  
 ttaca 546

<210> 6  
 <211> 429  
 5 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 6

ccaattattt tttgtctctt ctactagaat gttagaatta caagaaagag atcctgtctg 60  
 ttttattcac tattgtatct tcagtactgg aacagtactg ggcacttaga tattcaatta 120  
 tttttactg aatgtttaca ccactcctga gaagaataag cgtaagcgaa agaaggtgaa 180  
 gctggctgtc ctgaaatact gtaaggtgga tgagaatggc aaaataagtc gccttcatct 240  
 agagtgtctt tcagatgaat gtggtactgg agcgtttatg gccagccact ttgacagaca 300  
 ttattgtgac aatgtctca ttgcttcagc aaaccagaag acaattaatt gtgtatgagt 360  
 taataaaaga catgaactaa caaacacat ttactgaatg aataaatgla ttaataatta 420  
 aatgtcaaa 429

10  
 <210> 7  
 <211> 429  
 <212> ADN  
 15 <213> Homo sapiens  
 <400> 7

ES 2 677 070 T3

ttgacattt aattattaat acatttattc atfcagtaaa tgtgttttgt tagttcatgt 60  
 cttttattaa ctcatcacaca attaattgtc ttctggtttg ctgaagcaat gagacattg 120  
 tcacaataat gtctgtcaaa gtggctggcc ataaacgctc cagtaccaca ttcatctgaa 180  
 gagcactcta gatgaaggcg acttattttg ccattctcat ccaccttaca gtatttcagg 240  
 acagccagct tcaccttctt tcgcttacgc ttattctfct caggagtggg gtaaaccattc 300  
 agtaaaaaat aattgaatat ctaagtgcc a cgtactgttc cagtactgaa gatacaatag 360  
 tgaataaaac agacaggatc tctttctgtt aattctaaca ttctagtaga agagacaaaa 420  
 aataattgg 429

- <210> 8
- <211> 27
- 5 <212> ARN
- <213> Secuencia artificial
  
- <220>
- <223> Oligonucleótido antisentido
- 10
- <400> 8
- gcgaccuuag aauggagagu ggaagag 27
  
- <210> 9
- 15 <211> 27
- <212> ARN
- <213> Secuencia artificial
  
- <220>
- 20 <223> Oligonucleótido antisentido
  
- <400> 9
- uuugccauuc ucauccaccu uacagua 27
  
- 25 <210> 10
- <211> 27
- <212> ARN
- <213> Secuencia artificial
  
- 30 <220>
- <223> Oligonucleótido antisentido
  
- <400> 10
- aaauaauga auaucuaagu gccacgu 27
- 35
- <210> 11
- <211> 27
- <212> ARN
- <213> Secuencia artificial
- 40
- <220>
- <223> Oligonucleótido antisentido

	<400> 11 uuuguaauca uuugagacu ugauguu	27
5	<210> I2 <211> 27 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 12 uccugauaua ugaggcagac auugcua	27
15	<210> 13 <211> 27 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 13	
25	uggaaguuc uaggagugu ggucuuu	27
	<210> 14 <211> 27 <212> ARN	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	
35	<400> 14 ugauccucgc uaagcuccga cucuggg	27
	<210> 15 <211> 27	
40	<212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	
45	<400> 15 cacugcacuc caauguaggc aacagag	27
	<210> 16 <211> 27	
50	<212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	
55	<400> 16 uuugggaggc ugaggugggu ggauuau	27
60	<210> 17	

# ES 2 677 070 T3

<211> 25  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> Complemento inverso del oligonucleótido antisentido, SEQ ID NO: 8

<400> 17  
cuuccacucu ccauucuaag gucgc 25

10 <210> 18  
<211> 25  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Complemento inverso del oligonucleótido antisentido, SEQ ID NO: 9

<400> 18  
20 cuguaaggug gaugagaau gcaaa 25

<210> 19  
<211> 25  
<212> ADN  
25 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Complemento inverso del oligonucleótido antisentido, SEQ ID NO: 10

30 <400> 19  
guggcacuua gauaucaau uauuu 25

<210> 20  
<211> 25  
35 <212> ARN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Complemento inverso del oligonucleótido antisentido, SEQ ID NO: 11

40 <400> 20  
caucaaguca cuaaugauu acaaa 25

<210> 21  
45 <211> 25  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
50 <223> Complemento inverso del oligonucleótido antisentido, SEQ ID NO: 12

<400> 21  
gcaaugucug ccucauauau cagga 25

55 <210> 22  
<211> 25  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial

60 <220>

# ES 2 677 070 T3

<223> Complemento inverso del oligonucleótido antisentido, SEQ ID NO: 13

<400> 22

agaccacacu cccuagaaac uuca 25

5

<210> 23

<211> 25

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Complemento inverso del oligonucleótido antisentido, SEQ ID NO: 14

<400> 23

15 cagagucgga gcuagcgag gauca 25

<210> 24

<211> 25

<212> ADN

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Complemento inverso del oligonucleótido antisentido, SEQ ID NO: 15

25 <400> 24

cuguugccua cauuggagug cagtg 25

<210> 25

<211> 25

30 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Complemento inverso del oligonucleótido antisentido, SEQ ID NO: 16

35

<400> 25

aauccacca ccucagccuc ccaaa 25

## REIVINDICACIONES

1. Un oligonucleótido que se dirige a un transcrito antisentido natural del regulador del desarrollo 1 asociado a interferón (IFRD1) para uso como un compuesto terapéutico, donde el oligonucleótido aumenta la expresión del regulador del desarrollo 1 asociado a interferón (IFRD1); donde el transcrito antisentido natural tiene la secuencia de ácido nucleico tal como se expone en las SEQ ID NO: 2 al 6.
2. Un oligonucleótido que se dirige a un transcrito antisentido natural del regulador del desarrollo 1 asociado a interferón (IFRD1) para uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado al regulador del desarrollo 1 asociado a interferón (IFRD1), donde dicho oligonucleótido aumenta la expresión del regulador del desarrollo 1 asociado a interferón (IFRD1); donde el transcrito antisentido natural tiene la secuencia de ácido nucleico tal como se expone en una de las SEQ ID NO: 2 al 6.
3. El oligonucleótido para uso de acuerdo con la reivindicación 2, donde la enfermedad o trastorno se selecciona de entre el grupo que consiste en una enfermedad o trastorno asociado con la función anormal y/o la expresión del 'regulador del desarrollo 1 asociado al interferón'; fibrosis quística, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC); una enfermedad o trastorno asociado con la diferenciación y regeneración de tejidos; una enfermedad o trastorno asociado con la regeneración de músculos; una enfermedad o trastorno asociado con la regeneración de músculos esqueléticos; una enfermedad o trastorno asociado con la diferenciación de músculos; una enfermedad o trastorno asociado con la diferenciación miogénicas; estrés oxidativo, una enfermedad o trastorno inflamatorio, inflamación; una afección postoperatoria asociada con el epitelio intestinal; una enfermedad o trastorno del sistema inmunitario; una enfermedad o trastorno asociado con una tasa metabólica anormal, adiposidad y absorción de triglicéridos intestinales; cáncer de pulmón; neuropatía sensoriomotora; una lesión neuronal asociada a isquemia cerebral; una lesión neuronal y una enfermedad o trastorno neurológico.
4. El oligonucleótido para uso de acuerdo con la reivindicación 3, donde la enfermedad o trastorno es fibrosis quística.
5. El oligonucleótido para uso de acuerdo con la reivindicación 3, donde la enfermedad o trastorno es una enfermedad o trastorno asociado con la regeneración muscular.
6. Un procedimiento *in vitro* de aumento de la expresión del regulador del desarrollo 1 asociado a interferón (IFRD1) 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 del regulador del desarrollo 1 asociado a interferón (IFRD1); aumentando de este modo la expresión del regulador del desarrollo 1 asociado a interferón (IFRD1); donde el transcrito antisentido natural tiene la secuencia de ácido nucleico tal como se expone en una de las SEQ ID NO: 2 al 6.
7. Un oligonucleótido que se dirige a un transcrito antisentido natural del gen regulador del desarrollo 1 asociado a interferón (IFRD1), donde dicho oligonucleótido aumenta la expresión del gen regulador del desarrollo 1 asociado a interferón (IFRD1); donde el transcrito antisentido natural tiene la secuencia de ácido nucleico tal como se expone en una de las SEQ ID NO: 2 al 6.
8. El oligonucleótido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, o el oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 7, donde el oligonucleótido tiene entre 10 y 30 nucleótidos de longitud.
9. El oligonucleótido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, u 8, o el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6 o la reivindicación 8, o el oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 7 o la reivindicación 8, donde el oligonucleótido tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con un complemento de un transcrito antisentido natural del regulador del desarrollo 1 asociado a interferón (IFRD1).
10. El oligonucleótido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, 8 o 9, o el procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6, 8 o 9, o el oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, donde el oligonucleótido es monocatenario.
11. El oligonucleótido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, 8 o 9, o el procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6, 8 o 9, o el oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, donde el oligonucleótido es un compuesto de siRNA.

12. El oligonucleótido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 u 8 a 11, o el procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 u 8 a 11, o el oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, donde el oligonucleótido comprende la SEQ ID NO: 9.
- 5 13. El oligonucleótido para uso de acuerdo con la reivindicación 11, o el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11, o el oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 11, donde el compuesto de siRNA comprende un oligonucleótido como se expone en la SEQ ID NO: 9 y una secuencia complemento inversa de dicho oligonucleótido como se expone en la SEQ ID NO: 18.
- 10 14. El oligonucleótido para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 u 8 a 13, o el procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 u 8 a 13, o el oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 13, donde la expresión del regulador del desarrollo 1 asociado a interferón (IFRD1) aumenta al menos un 10 %.
- 15 15. El oligonucleótido para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 u 8 a 14, o el procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 u 8 a 14, o un oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 14, donde el oligonucleótido comprende además una o más modificaciones que comprenden:
- 20 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
- 25 c. al menos un resto de azúcar modificado seleccionado de: un resto de azúcar modificado con 2'-O-metoxietilo, un resto de azúcar modificado con 2'-fluoro, un resto de azúcar modificado con 2'-metoxi, un resto de azúcar modificado con 2'-O-alkilo, un resto de azúcar bicíclico, y combinaciones de los mismos.
16. Una composición farmacéutica que comprende un oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de
- 30 las reivindicaciones 7 a 15 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Figura 1

