



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 290 951**

(51) Int. Cl.:

**C12N 15/11** (2006.01)

**A61K 31/70** (2006.01)

**A61K 48/00** (2006.01)

**C12N 15/67** (2006.01)

(12)

### TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **94916064 .2**

(86) Fecha de presentación : **10.05.1994**

(87) Número de publicación de la solicitud: **0698092**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **28.02.1996**

(54) Título: **Oligonucleótidos antisentido que combaten el corte y empalme aberrante y métodos de uso de los mismos.**

(30) Prioridad: **11.05.1993 US 62471**

(73) Titular/es:

**The University of North Carolina at Chapel Hill  
200 Bynum Hall Campus Box 4100  
Chapel Hill, North Carolina 27599-4100, US**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.02.2008**

(72) Inventor/es: **Kole, Ryszard y  
Dominski, Zbigniew**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.02.2008**

(74) Agente: **Torner Lasalle, Elisabet**

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

Oligonucleótidos antisentido que combaten el corte y empalme aberrante y métodos de uso de los mismos.

**5 Campo de la invención**

La presente invención se refiere a medicamentos para combatir el corte y empalme aberrante de moléculas de pre-ARNm y la regulación por incremento de la expresión génica y a los oligonucleótidos antisentido útiles para llevar a cabo los mismos.

**10 Antecedentes de la invención**

El potencial de los oligonucleótidos como moduladores de la expresión génica se está sometiendo actualmente a investigación intensa. La mayor parte de los esfuerzos se centran en la inhibición de la expresión de genes seleccionados como diana tales como oncogenes o genes virales. Los oligonucleótidos están dirigidos o bien contra ARN (oligonucleótidos antisentido) (M. Ghosh y J. Cohen, Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 42, 79 (1992); L. Neckers *et al.*, Crit. Rev. Oncog. 3, 175 (1992)) o bien contra ADN con el que forman estructuras triples que inhiben la transcripción mediante la ARN polimerasa II (J. Hanvey *et al.*, Science 258, 1481 (1992); W. McShan *et al.*, J. Biol. Chem. 267, 5712 (1992); M. Grigoriev *et al.*, J. Biol. Chem. 267, 3389 (1992); G. Duval-Valentin *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 504 (1992)). Para lograr un efecto deseado, los oligonucleótidos deben potenciar una disminución de la proteína preexistente no deseada evitando eficazmente su formación *de novo*. Tales técnicas no son útiles cuando el objeto es regular por incremento la producción de la proteína natural. Sin embargo, en los casos en los que la expresión de un gen está regulada por disminución debido a mutaciones en el mismo, un medio para regular por incremento la expresión génica a través de la tecnología antisentido sería extremadamente útil.

**25 Sumario de la invención**

La presente invención proporciona medios para utilizar oligonucleótidos antisentido para regular por incremento la expresión de un ADN que contiene una mutación que de otro modo conduciría a la regulación por disminución de ese gen mediante corte y empalme aberrante del pre-ARNm para el que codifica.

En consecuencia, en un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un medicamento para combatir el corte y empalme aberrante en una molécula de pre-ARNm que contiene una mutación. Cuando está presente en el pre-ARNm, la mutación hace que el pre-ARNm experimente corte y empalme incorrectamente y produzca un fragmento de ARNm o un ARNm aberrante diferente del ARNm que resulta normalmente a partir del pre-ARNm. Más particularmente, la molécula de pre-ARNm contiene: (i) un primer conjunto de elementos de corte y empalme que definen un intrón natural que se elimina mediante corte y empalme cuando la mutación está ausente para producir una primera molécula de ARNm que codifica para una proteína natural, y (ii) un segundo conjunto de elementos de corte y empalme inducidos por la mutación que definen un intrón aberrante diferente del intrón natural, intrón aberrante que se elimina mediante corte y empalme cuando la mutación está presente para producir una segunda molécula de ARN aberrante diferente de la primera molécula de ARNm. El medicamento comprende un oligonucleótido antisentido que puede hibridar con la molécula de pre-ARNm para crear una molécula doble en condiciones que permiten el corte y empalme. El oligonucleótido antisentido es uno que no activa a la ARNasa H, y se selecciona para bloquear un miembro del segundo conjunto aberrante de elementos de corte y empalme de modo que se elimina el intrón natural mediante corte y empalme y se produce la primera molécula de ARNm que codifica para una proteína natural.

En un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona un medicamento para regular por incremento la expresión de una proteína natural en una célula que contiene un ADN que codifica para la proteína natural. ADN que contiene además una mutación que produce la regulación por disminución de la proteína natural mediante el corte y empalme aberrante de la misma. Más particularmente, el ADN codifica para un pre-ARNm, teniendo el pre-ARNm las características expuestas anteriormente. El medicamento comprende un oligonucleótido antisentido que tiene las características descritas anteriormente, de modo que se elimina el intrón natural mediante corte y empalme y se produce la proteína natural por la célula.

Un tercer aspecto de la presente invención es un oligonucleótido antisentido útil para combatir el corte y empalme aberrante en una molécula de pre-ARNm que contiene una mutación. La molécula de pre-ARNm contiene un primer conjunto y segundo conjunto de elementos de corte y empalme que tienen las características expuestas anteriormente. El oligonucleótido antisentido comprende un oligonucleótido que (*i*) hibrida con el pre-ARNm para formar una molécula doble; (*ii*) no activa a la ARNasa H; y (*iii*) bloquea un miembro del segundo conjunto aberrante de elementos de corte y empalme.

Los anteriores y otros objetos y aspectos de la presente invención se tratan en detalle en los dibujos en el presente documento y en la memoria descriptiva expuesta a continuación.

**65 Breve descripción de los dibujos**

La figura 1 muestra la estructura de los pre-ARNm. Los recuadros indican los exones, las líneas gruesas, los intrones. Las posiciones de las mutaciones (110 y 705) con respecto al nucleótido 1 de IVS 1 e IVS 2, respectivamente,

# ES 2 290 951 T3

se muestran por encima del clon HBΔ6. Los números por debajo indican la longitud, en nucleótidos, de los exones y los intrones. Los oligonucleótidos antisentido se indican mediante las barras cortas numeradas por debajo de los constructos  $\beta^{110}$  e IVS2<sup>705</sup>, y las rutas de corte y empalme mediante las líneas discontinuas.

- 5 La figura 2 muestra la inversión del corte y empalme aberrante mediante el oligonucleótido 1 dirigido contra el punto de ramificación normal en el intrón 1 del pre-ARNm de la  $\beta$ -globina. La estructura de los productos y los productos intermedios se representa a la derecha; su tamaño en nucleótidos se muestra a la izquierda. Un asterisco indica la movilidad aberrante de los productos intermedios que contienen lazo. Se utilizan las mismas denominaciones en las figuras siguientes. El carril 1 muestra el corte y empalme del pre-ARNm de HBΔ6 control; el carril 2 muestra el corte y empalme del pre-ARNm de  $\beta^{110}$ ; los carriles 3-8 muestran el corte y empalme del pre-ARNm de  $\beta^{110}$  en presencia de cantidades crecientes (indicada en la parte superior de la figura) del oligonucleótido 1; el carril 9 muestra el corte y empalme del pre-ARNm de  $\beta^{110}$  en presencia de oligonucleótido 3, dirigido a una secuencia en el intrón 2 del pre-ARNm de la  $\beta$ -globina.
- 10 15 La figura 3 muestra los efectos del oligonucleótido 2, dirigido contra el sitio de corte y empalme en 3' aberrante en el intrón 1 del pre-ARNm de  $\beta^{110}$ . El carril 1 muestra el corte y empalme del pre-ARNm de  $\beta^{110}$ ; los carriles 2-7 muestran el corte y empalme del pre-ARNm de  $\beta^{110}$  en presencia de cantidades crecientes (indicadas en la parte superior de la figura) del oligonucleótido 2.
- 20 25 La figura 4 muestra la inversión del corte y empalme aberrante del pre-ARNm de IVS2<sup>705</sup> mediante el oligonucleótido 3 dirigido contra el sitio de corte y empalme en 3' críptico y el oligonucleótido 4 dirigido contra el sitio de corte y empalme en 5' aberrante en el intrón 2 del pre-ARNm de IVS2<sup>705</sup>. El carril 1 muestra el ARN de entrada; los carriles 2 y 3 muestran el corte y empalme de los transcritos control (indicados en la parte superior de la figura); los carriles 4-8 y 9-13 muestran el corte y empalme del pre-ARNm de IVS2<sup>705</sup> en presencia de oligonucleótido 3 y el oligonucleótido 4, respectivamente. Las cantidades de los oligonucleótidos en la reacción se indican en la parte superior. "?" a la izquierda indica el producto de degradación aparente.

30 La figura 5 ilustra los efectos de tratar células IVS2-654 con un oligonucleótido antisentido de 2'-O-metil-oligorribonucleótido (17 monómeros) dirigido contra un sitio de corte y empalme en 3' críptico en presencia del reactivo de transfección LIPOFECTIN™. En los carriles 1, 3 y 5, el ARN de la celulosa total se sometió a reacción en cadena de la polimerasa - transcriptasa inversa (RT-PCR) llevada a cabo con el cebador A (específico para detectar el corte y empalme aberrante del pre-ARNm); en los carriles 2, 4 y 6, se llevó a cabo la RT-PCR con el cebador C (específico para detectar el corte y empalme correcto del pre-ARNm). El pre-ARNm no sometido a corte y empalme y los productos de corte y empalme aberrante y correcto y aberrante del mismo se ilustran esquemáticamente por debajo de la ilustración de los carriles del gel. Los carriles 1 y 2 muestran el corte y empalme del pre-ARNm de las células tratadas con el reactivo de transfección LIPOFECTIN™ y pre-ARNm 3  $\mu$ M del 2'-O-metil-oligorribonucleótido; los carriles 3 y 4 muestran el corte y empalme de las células tratadas con el reactivo de transfección LIPOFECTIN™ solo; los carriles 5 y 6 muestran el corte y empalme del pre-ARNm de las células no tratadas.

40 45 La figura 6 es similar a la figura 5 anterior y muestra los efectos de tratar células IVS2-654\* con el oligonucleótido antisentido 5 y 20  $\mu$ M dirigido al sitio de corte y empalme en 3' críptico en presencia de partículas de adenovirus deficiente para la replicación. Se llevó a cabo la reacción de RT-PCR utilizando cebadores que hibridan con los exones segundo y tercero del gen de la  $\beta$ -globina humana, respectivamente. El carril 1 muestra el corte y empalme del pre-ARNm de las células no tratadas. Los carriles 2 y 3 muestran el corte y empalme del pre-ARNm de células tratadas con oligonucleótido 5 y 20  $\mu$ M, respectivamente, en presencia del adenovirus.

50 La figura 7 es similar a la figura 5 anterior, y muestra los efectos de la electroporación de células IVS2-654\* tratadas con 5 ó 50  $\mu$ M de un oligonucleótido antisentido de 2'-O-metil-oligorribonucleótido, dirigido a un sitio de corte y empalme en 5' aberrante. El carril 1 muestra el corte y empalme del pre-ARNm de las células no tratadas. Los carriles 2 y 3 muestran el corte y empalme de pre-ARNm de las células tratadas con 5 y 50  $\mu$ M del oligonucleótido, respectivamente.

## Descripción detallada de la invención

55 Los intrones son partes del ADN eucariota que se interponen entre las partes codificantes, o "exones", de ese ADN. Los intrones y exones se transcriben en ARN denominado "transcrito primario, precursor de ARNm" (o "pre-ARNm"). Los intrones deben eliminarse del pre-ARNm de modo que pueda producirse la proteína natural codificada por los exones (la expresión "proteína natural", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la proteína que se produce en la naturaleza, de tipo natural o funcional). La eliminación de los intrones del pre-ARNm y la unión posterior de los exones se lleva a cabo en el proceso de corte y empalme.

60 El proceso de corte y empalme es en realidad una serie de reacciones, mediadas por factores de corte y empalme, que se llevan a cabo en el ARN tras la transcripción pero antes de la traducción. Por tanto, un "pre-ARNm" es un ARN que contiene tanto exones como intrón/intrones, y un "ARNm" es un ARN en el que el/los intrón/intrones se ha(n) eliminado y los exones están unidos entre sí secuencialmente, de modo que la proteína pueda traducirse a partir de ellos mediante los ribosomas.

## ES 2 290 951 T3

Los intrones están definidos por un conjunto de “elementos de corte y empalme” que son relativamente cortos, segmentos de ARN conservados que se unen a los diversos factores de corte y empalme que llevan a cabo las reacciones de corte y empalme. Por tanto, cada intrón está definido por un sitio de corte y empalme en 5’, un sitio de corte y empalme en 3’ y un punto de ramificación situado entre ellos. Estos elementos de corte y empalme se “bloquean”, tal como se trata en el presente documento, cuando un oligonucleótido antisentido, ya sea total o parcialmente, solapa el elemento, o se une al pre-ARNm en una posición suficientemente próxima al elemento como para alterar la unión y la función de los factores de corte y empalme que normalmente mediarían la reacción de corte y empalme particular que se produce en ese elemento (por ejemplo, se une al pre-ARNm en una posición dentro de los 3, 6, 9, 12, 15 ó 18 nucleótidos del elemento que va a bloquearse).

La mutación en el pre-ARNm y el ADN natural puede ser o bien una mutación por sustitución o bien una mutación por delección que crea un elemento de corte y empalme nuevo, aberrante. Por tanto, el elemento de corte y empalme aberrante es un miembro de un conjunto de elementos de corte y empalme aberrantes que definen un intrón aberrante. Los miembros restantes del conjunto aberrante de elementos de corte y empalme también pueden ser miembros del conjunto de elementos de corte y empalme que definen el intrón natural. Por ejemplo, si la mutación crea un nuevo sitio de corte y empalme en 3’ aberrante que está tanto en el sentido de 5’ del (es decir, en 5’ con respecto al) sitio de corte y empalme en 3’ natural y en el sentido de 3’ del (es decir, en 3’ con respecto al) punto de ramificación natural, entonces el sitio de corte y empalme en 5’ natural y el punto de ramificación natural pueden servir como miembros tanto del conjunto natural de elementos de corte y empalme como del conjunto aberrante elementos de corte y empalme.

En otras situaciones, la mutación puede producir regiones naturales del ARN que normalmente están inactivos, o no desempeña ningún papel como elemento de corte y empalme, para llegar a activarse y servir como elementos de corte y empalme. Tales elementos se denominan elementos “crípticos”. Por ejemplo, si la mutación crea un nuevo sitio de corte y empalme en 3’ mutado aberrante que está situado entre el sitio de corte y empalme en 3’ natural y el punto de ramificación natural, puede activar un punto de ramificación críptico entre el sitio de corte y empalme en 3’ mutado aberrante y el punto de ramificación natural. En otras situaciones, una mutación puede crear un sitio de corte y empalme en 5’ aberrante adicional que está situado entre el punto de ramificación natural y el sitio de corte y empalme en 5’ natural y puede activar además un sitio de corte y empalme en 3’ críptico y un punto de ramificación críptico secuencialmente en el sentido de 5’ desde el sitio de corte y empalme en 5’ mutado aberrante. En esta situación, el intrón natural llega a dividirse en dos intrones aberrantes, con un nuevo exón situado entre ellos. Además, en algunas situaciones en las que un elemento de corte y empalme natural (particularmente un punto de ramificación) es también un miembro del conjunto de elementos de corte y empalme aberrantes, puede ser posible bloquear el elemento natural y activar un elemento críptico (es decir, un punto de ramificación críptico) que incluirá los miembros restantes del conjunto natural de elementos de corte y empalme para forzar el corte y empalme correcto sobre el corte y empalme incorrecto. Obsérvese además que, cuando se activa un elemento de corte y empalme críptico, puede situarse o bien en el intrón o bien en uno de los exones adyacentes. Por tanto, dependiendo del conjunto de elementos de corte y empalme aberrantes creado por la mutación particular, puede sintetizarse el oligonucleótido antisentido para bloquear una variedad de elementos de corte y empalme diferentes para llevar a cabo la presente invención: puede bloquear un elemento mutado, un elemento críptico o un elemento natural; puede bloquear un sitio de corte y empalme en 5’, un sitio de corte y empalme en 3’, o un punto de ramificación. En general, no bloqueará un elemento de corte y empalme que también define el intrón natural, teniendo en cuenta naturalmente la situación en la que el bloqueo de un elemento de corte y empalme natural activa a un elemento críptico que sirve entonces como un miembro sustituto del conjunto natural de elementos de corte y empalme y participa en el corte y empalme correcto, tal como se trató anteriormente.

La longitud del oligonucleótido antisentido (es decir, el número de nucleótidos en él) no es crítica, siempre que se una selectivamente a la ubicación deseada, y puede determinarse según procedimientos de rutina. En general, el oligonucleótido antisentido tendrá desde 8, 10 ó 12 nucleótidos de longitud hasta 20, 30 ó 50 nucleótidos de longitud.

Los oligonucleótidos antisentido que no activan a la ARNasa H pueden obtenerse según técnicas conocidas. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense número 5.149.797 concedida a Pederson *et al.* (Las descripciones de toda la bibliografía de patentes citadas en el presente documento deben incorporarse al presente documento como referencia). Tales oligonucleótidos antisentido, que pueden ser secuencias de desoxirribonucleótido o ribonucleótido, contienen simplemente cualquier modificación estructural que dificulta o impide estéricamente la unión de la ARNasa H a una molécula doble que contiene el oligonucleótido como un miembro de la misma, modificación estructural que no altera o impide sustancialmente la formación de la molécula doble. Dado que las partes del oligonucleótido implicadas en la formación de la molécula doble son sustancialmente diferentes de las partes implicadas en la unión a la ARNasa H a ello, se dispone de numerosos oligonucleótidos antisentido que no activan a la ARNasa H. Por ejemplo, tales oligonucleótidos antisentido pueden ser oligonucleótidos en los que al menos uno, o todos, los residuos fosfato de unión entre nucleótidos son fosfatos modificados, tales como metilfosfonatos, metilfosfonotioatos, fosforomorfolidatos, fosforopiperazidatos y fosforamidatos. Por ejemplo, uno sí y uno no de los residuos fosfato de unión entre nucleótidos pueden modificarse tal como se describe. En otro ejemplo no limitativo, tales oligonucleótidos antisentido son oligonucleótidos en los que al menos uno, o todos, de los nucleótidos contienen un resto de alquilo inferior en 2’ (por ejemplo, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, lineal o ramificado, saturado o insaturado, tal como metilo, etilo, etenilo, propilo, 1-propenilo, 2-propenilo e isopropilo). Por ejemplo, uno sí y otro no de los nucleótidos puede estar modificado tal como se ha descrito. Véase también, P. Furdon *et al.*, Nucleic Acids Res. 17, 9193-9204 (1989); S. Agrawal *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 1401-1405 (1990); C. Baker *et al.*, Nucleic Acids Res. 18, 3537-3543 (1990); B. Sproat *et al.*, Nucleic Acids Res. 17, 3373-3386 (1989); R. Walder y J. Walder, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 5011-5015 (1988).

## ES 2 290 951 T3

Los medicamentos, oligonucleótidos y formulaciones de la presente invención tienen una variedad de usos. Son útiles en cualquier proceso de fermentación en el que se desee tener un medio para regular por disminución la expresión de un gene que va a expresarse hasta un cierto tiempo, tras lo cual se desea regular por incremento la expresión génica (por ejemplo, regular por disminución durante la fase de crecimiento de la fermentación y regular por incremento 5 durante la fase de producción de la fermentación). Para tal uso, el gen que va a expresarse puede ser cualquier gen que codifica para una proteína que va a producirse mediante la fermentación, siempre que el gen contenga un intrón natural. El gen puede mutarse entonces mediante cualquier medio adecuado, tal como mutagénesis específica de sitio (véase T. Kunkel, patente estadounidense número 4.873.192) para crear deliberadamente un segundo conjunto aberrante 10 de elementos de corte y empalme que definen un intrón aberrante que regula por disminución sustancialmente la expresión del gen. El gen puede insertarse entonces en un vector de expresión adecuado y el vector de expresión puede insertarse en una célula huésped (por ejemplo, una célula eucariota tal como una célula de levadura, insecto o mamífero (por ejemplo, ser humano, rata)) mediante técnicas recombinantes convencionales. Entonces se hace crecer la célula huésped en cultivo mediante técnicas fermentativas convencionales. Cuando se desea regular por incremento 15 la expresión del gen mutado, se añade entonces al medio de cultivo un oligonucleótido antisentido, en una formulación adecuada, que se une a un miembro del segundo conjunto aberrante de elementos de corte y empalme, de modo que se regula por incremento la expresión del gen.

Los medicamentos, oligonucleótidos y formulaciones de la presente invención también son útiles como herramientas *in vitro* o *in vivo* para examinar el corte y empalme en genes de seres humanos o animales que están regulados en 20 el desarrollo y/o en los tejidos. Tales experimentos pueden llevarse a cabo mediante los procedimientos descritos más adelante en el siguiente documento, o modificaciones de los mismos que serán evidentes para los expertos.

Los medicamentos, oligonucleótidos y formulaciones de la presente invención también son útiles como agentes terapéuticos en el tratamiento de una enfermedad que implica corte y empalme aberrante, tal como  $\beta$ -talasemia (en 25 la que el oligonucleótido se uniría al pre-ARNm de la  $\beta$ -globina, particularmente la humana),  $\alpha$ -talasemia (en la que el oligonucleótido se uniría al pre-ARNM de la  $\beta$ -globina), síndrome de Tay-Sachs (en el que el oligonucleótido se uniría al pre-ARNm de la subunidad  $\alpha$  de la  $\beta$ -hexosaminidasa), fenilcetonuria (en la que el oligonucleótido se uniría al pre-ARNm de la fenilalanina hidroxilasa) y ciertas formas de fibrosis quística (en la que el oligonucleótido se uniría al pre-ARNm del gen de la fibrosis quística), en las que se han identificado las mutaciones que conducen al corte y empalme aberrante del pre-ARNm (véase, por ejemplo, S. Akli *et al.*, J. Biol. Chem. 265, 7324 (1990); B. Dworniczak 30 *et al.*, Genomics 11, 242 (1991); L-C. Tsui, Trends in Genet. 8, 392 (1992)).

Ejemplos de  $\beta$ -talasemia que pueden tratarse mediante la presente invención incluyen, pero sin limitarse a, las de la clase mutante de  $\beta^{110}$ , -IVS1<sup>5</sup>, IVS1<sup>6</sup>, IVS2<sup>654</sup>, IVS2<sup>705</sup> y IVS2<sup>745</sup> (es decir, en las que el pre-ARNm de la  $\beta$ -globina 35 lleva las mutaciones mencionadas anteriormente).

La expresión “oligonucleótido antisentido” incluye las sales fisiológica y farmacéuticamente aceptables del mismo: es decir, sales que conservan la actividad biológica deseada del compuesto original y no confieren efectos toxicológicos 40 no deseados al mismo. Ejemplos de tales sales son (a) sales formadas con cationes tales como sodio, potasio,  $\text{NH}_4^+$ , magnesio, calcio, poliaminas tales como espermina y espermidina, etc.; (b) sales de adición de ácido formadas con ácidos inorgánicos, por ejemplo ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido nítrico y similares; (c) sales formadas con ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, ácido acético, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido glucónico, ácido cítrico, ácido málico, ácido ascórbico, 45 ácido benzoico, ácido tánico, ácido palmítico, ácido algínico, ácido poliglutámico, ácido naftalenosulfónico, ácido metanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido naftalenodisulfónico, ácido poligalacturónico, y similares; y (d) sales formadas de aniones elementales tales como coloro, bromo y yodo.

Las formulaciones de la presente invención comprenden el oligonucleótido antisentido en un vehículo fisiológica 50 o farmacéuticamente aceptable, tal como un vehículo acuoso. Por tanto, las formulaciones para su uso en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, aquellas adecuadas para la administración parenteral, incluyendo la administración subcutánea, intradérmica, intramuscular, intravenosa e intraarterial, así como la administración tópica (es decir, la administración de una formulación en aerosol de partículas respirables a los pulmones de un paciente aquejado de fibrosis quística). Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma farmacéutica unitaria y 55 pueden prepararse mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica. La vía de administración más adecuada en cualquier caso dado puede depender del sujeto, la naturaleza y gravedad del estado que se está tratando y el principio activo particular que se está usando.

La presente invención proporciona el uso de oligonucleótidos antisentido que tienen las características expuestas 60 anteriormente para la preparación de un medicamento para regular por incremento la expresión génica en un paciente aquejado con un trastorno de corte y empalme aberrante, tal como se trató anteriormente. En la fabricación de un medicamento según la invención, el oligonucleótido antisentido normalmente se mezcla con, entre otros, un vehículo aceptable. Naturalmente, el vehículo debe ser aceptable en el sentido de ser compatible con cualquier otro componente 65 en la formulación y no debe ser perjudicial para el paciente. El vehículo puede ser un sólido o un líquido. Pueden incorporarse uno o más oligonucleótidos antisentido en las formulaciones de la invención, que pueden prepararse mediante cualquiera de las técnicas bien conocidas de farmacia que consisten esencialmente en mezclar los componentes, incluyendo opcionalmente uno o más componentes terapéuticos auxiliares.

# ES 2 290 951 T3

Las formulaciones de la presente invención pueden comprender disoluciones para inyección estéril acuosas o no acuosas del principio activo, preparaciones que son preferiblemente isotónicas con la sangre del receptor deseado y esencialmente libres de pírogeno. Estas preparaciones pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostatos y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor deseado. Las suspensiones estériles 5 acuosas y no acuosas pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las formulaciones pueden presentarse en recipientes de dosis unitarias o múltiples dosis, por ejemplo viales y ampollas sellados, y pueden almacenarse en un estado seco por congelación (liofilizado) que sólo requiere la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo, solución salina o agua para inyección, inmediatamente antes de su uso.

10 En la formulación, el oligonucleótido antisentido puede estar contenido dentro de una vesícula o partícula lipídica, tal como un liposoma o microcristal, que puede ser adecuado para la administración parenteral. Las partículas pueden ser de cualquier estructura adecuada, tal como unilamelar o plurilamelar, siempre que el oligonucleótido antisentido esté contenido en ella. Los lípidos cargados positivamente, tales como N-[1-(2,3-dioleoiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamoniometilsulfato, o "DOTAP", son particularmente preferidos para tales vesículas y partículas. Se conoce bien la 15 preparación de tales partículas lipídicas. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses números 4.880.635 concedida a Janoff *et al.*; 4.906.477 concedida a Kurono *et al.*; 4.911.928 concedida a Wallach; 4.917.951 concedida a Wallach; 4.920.016 concedida a Allen *et al.*; 4.921.757 concedida a Wheatley *et al.*; etc.

20 La dosificación del oligonucleótido antisentido administrada dependerá del método particular que se esté llevando a cabo, y cuando se está administrando a un sujeto, dependerá de la enfermedad, el estado del sujeto, la formulación particular, la vía de administración, etc. En general, se desean las concentraciones intracelulares de oligonucleótido de desde 0,05 hasta 50  $\mu$ M, o más particularmente de 0,2 a 5  $\mu$ M. Para la administración a un sujeto tal como un ser humano, se emplea una dosificación de desde aproximadamente 0,01, 0,1 ó 1 mg/Kg hasta 50, 100 ó 150 mg/Kg.

25 La presente invención se explica en mayor detalle en los siguientes ejemplos no limitativos. Las secuencias de nucleótido se presentan en el presente documento mediante una sola hebra únicamente, en la dirección de 5' a 3', de izquierda a derecha.

## Ejemplo 1

### *Estructura y construcción de pre-mRNA*

30 En la figura 1 se ilustra la construcción y estructura de diversas moléculas de pre-ARNm de  $\beta$ -globina humana. Los recuadros indican los exones; las líneas gruesas, los intrones. Las posiciones de las mutaciones (110 y 705) con respecto al nucleótido 1 de IVS 1 e IVS 2, respectivamente, se muestran por encima del clon HB $\Delta$ 6. Los números por debajo indican la longitud, en nucleótidos, de los exones y los intrones. Los oligonucleótidos antisentido (tratados en detalle más adelante) se indican mediante las barras cortas numeradas por debajo de los constructos  $\beta^{110}$  e IVS2 $^{705}$ , y las rutas de corte y empalme mediante las líneas discontinuas. Se transcribieron todos los pre-ARNm mediante la ARN polimerasa de SP6 (M. Konarska *et al.*, Cell 38, 731 (1984)) a partir de los fragmentos apropiados del gen 35 de la  $\beta$ -globina humana subclonado en el vector SP64. HB $\Delta$ 6 (A. Krainer *et al.*, Cell 36, 993 (1984)) contiene el gen completo de la  $\beta$ -globina humana. El constructo  $\beta^{110}$  contiene los exones 1 y 2 y se subclonó a partir del clon talasémico original (R. Spritz *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 2455 (1981)). Antes de la transcripción, se linealizaron los plásmidos en el sitio BamHI. Para construir el plásmido IVS2 $^{705}$  se subclonó en primer lugar en SP64 un fragmento de HB $\Delta$ 6 que contiene prácticamente el segundo exón entero, el segundo intrón entero y la mayor parte del tercer exón, 40 y posteriormente se sometió a mutagénesis específica del sitio según técnicas conocidas (T. Kunkel *et al.*, Methods Enzymol. 154, 367 (1987)) para introducir una mutación de T a G en el nucleótido 705 del intrón. Entonces se llevó a 45 cabo la transcripción en un plásmido linealizado en el sitio PvuII.

## Ejemplo 2

### *Síntesis de 2'-O-metil-oligorribonucleótidos antisentido*

50 Se sintetizaron los 2'-O-metil-oligorribonucleótidos para su uso en los ejemplos descritos en el presente documento según técnicas conocidas usando reactivos de Glen Research (Sterling, VA) y se purificaron según técnicas conocidas 55 con el kit de purificación SUREPURE™ disponible de US Biochemicals.

Los 2'-O-metil-oligorribonucleótidos producidos se denominan del oligonucleótido 1 al oligonucleótido 5.

60 El oligonucleótido 1 (GUCAGUGCCUAUCA) (SEQ ID NO: 1), complementario a los nucleótidos 82-95 del intrón 1, está dirigido contra el punto de ramificación normal, y el oligonucleótido 2 (AUAGACUAUAGGC) (SEQ ID NO: 2), complementario a los nucleótidos 103-116 del intrón 1, contra el sitio de corte y empalme en 3' aberrante creado por la mutación  $\beta^{110}$  en el intrón 1 del gen de la  $\beta$ -globina. El oligonucleótido 3 (CAUUAUUGCCCCUGAAAG) (SEQ ID NO: 3), complementario a los nucleótidos 573-589 del intrón 2, está dirigido contra el sitio de corte y empalme en 3' críptico en el nucleótido 579 del segundo intrón y el oligonucleótido 4 (CCUCUUACCUCAGUUAC) (SEQ ID NO: 4), complementario a los nucleótidos 697-713, está dirigido contra el sitio de corte y empalme en 5' aberrante 65 creado por la mutación en el nucleótido 705 en el segundo intrón del pre-ARNm de IVS2 $^{705}$ . El oligonucleótido 5 (GCUAUUACCUAACCCAG) (SEQ ID NO: 5) está dirigido contra el sitio de corte y empalme en 5' aberrante creado por la mutación IVS2 $^{654}$  (nucleótidos 643-660 del intrón 2). El oligonucleótido 6 (GCCUGACCACCAAC)

# ES 2 290 951 T3

(SEQ ID NO: 6) está dirigido contra el sitio de corte y empalme en 5' críptico en el exón 1 del pre-ARNm de la globina (nucleótidos -23 a -10 con respecto al nucleótido 1 del intrón 1).

## Ejemplo 3

5 *Inversión de corte y empalme aberrante mediante un oligonucleótido antisentido dirigido contra el punto de ramificación normal del intrón 1 de la β-globina humana*

En la  $\beta^{110}$ -talasemia, una forma de enfermedad predominante en pacientes de origen griego y chipriota, una mutación de A a G en el nucleótido 110 del primer intrón del gen de la  $\beta$ -globina humana crea un sitio de corte y empalme en 3' adicional, aberrante (R. Spritz *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 2455 (1981)). Pese a la presencia del sitio de corte y empalme en 3' normal, la maquinaria de corte y empalme usa preferentemente el sitio aberrante, lo que da como resultado un ARNm sometido a corte y empalme incorrectamente que contiene 19 nucleótidos de la secuencia del intrón (figura 1). En células transfectadas con el alelo de la  $\beta^{110}$ -globina (M. Busslinger *et al.*, Cell 27, 289 (1981); Y. Fukumaki *et al.*, Cell 28, 585 (1982)) o durante el corte y empalme de su transcripto en los extractos nucleares (R. Reed y T. Maniatis, Cell 41, 95 (1985)) (véase también la figura 2, el carril 2) el ARNm sometido correctamente a corte y empalme constituye sólo aproximadamente el 10% del producto sometido a corte y empalme, lo que concuerda con los niveles marcadamente reducidos de hemoglobina normal observados en los pacientes con esta forma de talasemia. Se encontró que en el pre-ARNm de  $\beta^{110}$ , el sitio de corte y empalme en 3' aberrante incluye el punto de ramificación normal en el nucleótido 93 del intrón, que compite con el sitio de corte y empalme en 3' correcto, y evita así el corte y empalme correcto (R. Reed y T. Maniatis, Cell 41, 95 (1985)). De manera significativa para este trabajo, las mutaciones que inactivan el punto de ramificación normal, activan un punto de ramificación crítico en el nucleótido 107 y dan como resultado el corte y empalme en el sitio de corte y empalme en 3' correcto (Y. Zhuang and A. Weiner, Genes y Dev. 3, 1545 (1989)). El corte y empalme aberrante no puede continuar debido a la proximidad 20 del punto de ramificación crítico al sitio de corte y empalme en 3' mutado en la posición 110.

Para probar si los oligonucleótidos antisentido dirigidos contra la secuencia del punto de ramificación normal forzarían la maquinaria de corte y empalme para seleccionar el punto de ramificación crítico y generar un ARNm sometido a corte y empalme correctamente, se dirigió un 2'-O-metil-oligonucleótido de 14 nucleótidos de largo (oligonucleótido 1, (SEQ ID NO: 1)) contra la secuencia del punto de ramificación en el intrón 1 del pre-ARNm de la  $\beta$ -globina. Se seleccionaron los 2'-O-metil-oligonucleótidos para este y posteriores experimentos, puesto que son resistentes a las nucleasas y forman híbridos estables con el ARN que no se degradan por la ARNasa H (H. Inoue *et al.*, Nucleic Acids Res. 15, 6131 (1987); H. Inoue *et al.*, FEBS Lett. 215, 327 (1987); B. Sproat *et al.*, Nucleic Acids Res. 17, 3373 (1989)). La degradación por la ARNasa H, observada por ejemplo cuando se usan oligodesoxinucleótidos 35 antisentido o sus derivados de fosforotioato, destruiría el pre-ARNm sustrato y evitaría cualquier corte y empalme.

La figura 2 muestra la inversión del corte y empalme aberrante mediante el oligonucleótido 1 dirigido contra el punto de ramificación normal en el intrón 1 del pre-ARNm de la  $\beta$ -globina. Se llevó a cabo el corte y empalme del pre-ARNm de  $\beta^{110}$  marcado con P<sup>32</sup> (aproximadamente 10<sup>5</sup> cpm por reacción, 25 fmoles) *in vitro* en extracto nuclear de células HeLa durante 2 horas, esencialmente tal como se describe (A. Krainer *et al.*, Cell 36, 993 (1984); Z. Dominski y R. Kole, Mol. Cell. Biol. 12, 2108 (1992)) excepto en que el volumen de la reacción se dobló hasta 50  $\mu$ l. Los productos de la reacción se analizaron en un gel de secuenciación de poliacrilamida al 8% y se visualizaron mediante autorradiografía. La estructura de los productos y los productos intermedios se representa a la derecha, su tamaño en nucleótidos se muestra a la izquierda. Un asterisco indica la movilidad aberrante de los productos intermedios que contienen lazo. Carril 1, corte y empalme del pre-ARNm de HBΔ6 control. Carril 2, corte y empalme del pre-ARNm de  $\beta^{110}$ . Carriles 3-8, corte y empalme del pre-ARNm de  $\beta^{110}$  en presencia de cantidades crecientes (indicadas en la parte superior de la figura) del oligonucleótido 1. Carril 9, corte y empalme del pre-ARNm de  $\beta^{110}$  en presencia del oligonucleótido 3, dirigido a una secuencia en el intrón 2 del pre-ARNm de la  $\beta$ -globina.

50 El análisis de estos datos muestra que en la reacción control sin el oligonucleótido (figura 2, carril 2), la razón de los productos sometidos a corte y empalme de manera incorrecta con respecto a los sometidos de manera correcta es de aproximadamente 9:1. La adición del oligonucleótido 1 a concentraciones de 0,01 a 1,0 mg por reacción (0,05-5  $\mu$ M) produce inhibición dependiente de la dosis del corte y empalme aberrante e inducción del corte y empalme correcto del sustrato (figura 2, carriles 3-6). A 1,0  $\mu$ g del oligonucleótido, la razón de los productos sometidos a corte y empalme se invierte a 1:5. El efecto del oligonucleótido es específico de la secuencia, puesto que la adición de 1  $\mu$ g de un oligonucleótido dirigido contra el sitio de corte y empalme en 3' críptico en el segundo intrón del gen de la  $\beta$ -globina (oligonucleótido 3, (SEQ ID NO: 3); véase también más adelante) no afecta a la razón original de los productos sometidos a corte y empalme (figura 2, carril 9). A 2,0 y 4,0  $\mu$ g del oligonucleótido 1, se inhibe el corte y empalme en ambos sitios de corte y empalme y se genera un fragmento de ARN de 243 monómeros (figura 2, carriles 7-8). Este fragmento se acumula sólo en condiciones de corte y empalme, es decir en presencia de ATP y otros componentes de la mezcla de corte y empalme mixture, y lo más probablemente representa un producto de escisión en el sitio de la unión del oligonucleótido mediante una nucleasa dependiente de ATP.

65 El sitio de corte y empalme en 3' aberrante generado por la mutación de  $\beta^{110}$  también parece ser una diana para la inversión del corte y empalme aberrante mediante un oligonucleótido antisentido. El bloqueo de esta secuencia debe ser la forma más simple de forzar a la maquinaria de corte y empalme para que use el sitio de corte y empalme en 3' original al final del intrón. Sin embargo, 14 monómeros (oligonucleótido 2, (SEQ ID NO: 2)) dirigido contra el sitio de corte y empalme aberrante no fue eficaz; a concentraciones crecientes del oligonucleótido se inhibió la acumulación

## ES 2 290 951 T3

de ambos productos sometidos a corte y empalme, inhibiéndose algo más eficazmente el correcto (figura 3, carriles 2-5). Se llevó a cabo el corte y empalme en las mismas condiciones que las descritas en relación con la figura 2. Resulta interesante que la primera etapa de la reacción de corte y empalme, la escisión en el sitio de corte y empalme en 5' y la formación del producto intermedio de exón - lazo, parece resultar menos afectada por el oligonucleótido 2 que la formación del producto sometido a corte y empalme final. Esto se muestra por la presencia de estos productos intermedios incluso cuando se añadieron 1 ó 2  $\mu\text{g}$  del oligonucleótido a la reacción de corte y empalme (figura 3, carriles 5-6). A 4  $\mu\text{g}$  por reacción, se inhibió la escisión en el sitio de corte y empalme en 5' (figura 3, carril 7).

Los diferentes efectos del oligonucleótido 1 y el oligonucleótido 2 reflejan las interacciones complejas entre los oligonucleótidos, los numerosos factores del corte y empalme y los elementos de secuencia situados en el tramo de 37 nucleótidos entre el punto de ramificación normal y el sitio de corte y empalme en 3' correcto. Claramente, el oligonucleótido 1, hibridado con el punto de ramificación normal en el extremo 5' de esta región, evita la unión de los factores de corte y empalme a esta secuencia, forzándolos a seleccionar el punto de ramificación críptico en el sentido de 3'. Esto conduce a la inhibición del corte y empalme aberrante y a la inducción del corte y empalme correcto del pre-ARNm de  $\beta^{110}$ . Por el contrario, la hibridación del oligonucleótido 2 con su secuencia diana situada centralmente puede impedir la unión de un gran número de factores de corte y empalme que se unen en esta región y evitar cualquier corte y empalme. Obsérvese también que este oligonucleótido bloquea una parte significativa del tracto de polipirimidina que es esencial para el corte y empalme de ambos sitios de corte y empalme en 3' correcto y aberrante. Ésta es una explicación alternativa de porqué este oligonucleótido no pudo restablecer la ruta de corte y empalme correcto.

### Ejemplo 4

#### *Inversión del corte y empalme aberrante mediante oligonucleótidos antisentido contra los sitios de corte y empalme en 3' y en 5' del intrón 2 de la $\beta$ -globina humana*

No obstante se probó adicionalmente si puede usarse, un sitio de corte y empalme en 3' aberrante como una diana para la inversión del corte y empalme incorrecto en pre-ARNm que llevaba una mutación de T a G en la posición 705 del segundo intrón del gen de la  $\beta$ -globina humana. Esta mutación (IVS2<sup>705</sup>) encontrada en pacientes con talasemia mediterránea, crea un sitio de corte y empalme en 5' aberrante adicional 145 nucleótidos en el sentido de 5' del sitio de corte y empalme en 3' normal (C. Dobkin y A. Bank, J. Biol. Chem. 260, 16332 (1985)). Durante el corte y empalme, se activa un sitio de corte y empalme en 3' críptico en la posición 579 del intrón, dando como resultado la eliminación de los nucleótidos 1-578 y 706-850 como intrones separados y la incorporación de la parte restante del intrón en el producto sometido a corte y empalme (figura 1). En este ARN, las distancias entre cada uno de los elementos de secuencia implicados en el corte y empalme superó los 100 nucleótidos y no deben esperarse efectos de impedimento estérico por el oligonucleótido.

En la figura 4 se muestra la inversión del corte y empalme aberrante del pre-ARNm de IVS2<sup>705</sup> mediante el oligonucleótido 3 (SEQ ID NO: 3) dirigido contra el sitio de corte y empalme en 3' críptico y el oligonucleótido 4 (SEQ ID NO: 4) dirigido contra el sitio de corte y empalme en 5' aberrante en el intrón 2 del pre-ARNm de IVS2<sup>705</sup>. Las condiciones de la reacción de corte y empalme fueron las mismas que las descritas con relación a la figura 2 anterior, excepto porque antes de usar el transcripto de ARN se purificó mediante electroforesis en un gel de secuenciación al 6%. Carril 1, ARN de entrada. Carriles 2 y 3, corte y empalme de los transcritos control (indicados en la parte superior de la figura). Carriles 4-8 y 9-13, corte y empalme del pre-ARN de IVS2<sup>705</sup> en presencia del oligonucleótido 3 y el oligonucleótido 4, respectivamente. Las cantidades de los oligonucleótidos en la reacción se indican en la parte superior. "?" a la izquierda indica producto de degradación aparente.

El transcripto control que contiene el segundo intrón del pre-ARNm de la  $\beta$ -globina normal se somete a corte y empalme eficazmente (figura 4, carril 2) generando los productos intermedios esperados (el exón en 5' y los grandes lazos) y el producto sometido a corte y empalme correctamente, de 451 nucleótidos de longitud. El corte y empalme del pre-ARNm de IVS2<sup>705</sup> también es eficaz y da lugar a un producto sometido a corte y empalme adicional de 577 nucleótidos de longitud y un producto intermedio esperado de 348 monómeros, que resulta de la ruta de corte y empalme aberrante producida por la mutación (figura 4, carril 3). La razón 1:2 de los ARN sometidos a corte y empalme de manera correcta con respecto a los sometidos de manera incorrecta es similar a la observada previamente *in vivo*. El oligonucleótido 3 (figura 1) dirigido al sitio de corte y empalme en 3' críptico activado en el nucleótido 579 es muy activo, induciendo la inversión del corte y empalme dependiente de la dosis para la ruta de corte y empalme correcta (figura 4, carriles 4-8). A 0,1 y 0,4  $\mu\text{g}$  del oligonucleótido por reacción, la inversión es prácticamente completa. También se obtiene un corte y empalme correcto a concentraciones similares del oligonucleótido 4 (figura 1) dirigido contra el sitio de corte y empalme en 5' aberrante creado por la mutación en el nucleótido 705 del segundo intrón (figura 4, carriles 9-13). A 1 y 2  $\mu\text{g}$  por reacción, ninguno de los oligonucleótidos tuvo efectos adicionales, a 4  $\mu\text{g}$  por reacción (20  $\mu\text{M}$ ) se inhibió todo el corte y empalme (no mostrado). Las bandas adicionales, incluyendo una banda fuerte marcada mediante "?" en una figura se deben lo más probablemente a la degradación por nucleasa del pre-ARNm largo (1301 nucleótidos).

Estos resultados muestran que el sitio de corte y empalme en 3' críptico, así como el sitio de corte y empalme en 5' mutado, proporcionan dianas adecuadas para la inversión específica del corte y empalme aberrante. Los efectos similares de los oligonucleótidos 3 y 4 sugieren que no hay diferencias principales en su accesibilidad a los sitios de corte y empalme diana. Ambos oligonucleótidos son aproximadamente 10 veces más eficaces que el oligonucleótido

## ES 2 290 951 T3

1 usado en los experimentos mostrados en la figura 2. Esta mayor eficacia puede deberse a varios factores. Los oligonucleótidos 3 y 4 son tres nucleótidos más largos que el oligonucleótido 1 y pueden formar híbridos más estables con el ARN. Bloquean los sitios de corte y empalme aberrantes, permitiendo que la maquinaria de corte y empalme utilice los sitios de corte y empalme correctos y, presumiblemente, el punto de ramificación correcto. Por el contrario, en el 5 pre-ARNm de  $\beta^{110}$ , el oligonucleótido 1 fuerza a la maquinaria de corte y empalme a usar una secuencia subóptima de punto de ramificación críptico, que puede dar como resultado una generación relativamente ineficaz del ARNm sometido a corte y empalme correctamente. En los experimentos mostrados en la figura 4, el pre-ARNm de entrada largo apenas es detectable tras 2 horas de reacción, lo que sugiere su inestabilidad. Por tanto, aunque las concentraciones molares de los oligonucleótidos eran esencialmente las mismas que en los experimentos anteriores, pueden haber 10 estado en un mayor exceso con respecto al pre-ARNm sustrato.

En los experimentos presentados anteriormente, los oligonucleótidos se añadían simultáneamente con los otros componentes de la reacción de corte y empalme. La hibridación previa del oligonucleótido con el pre-ARNm no 15 aumentó su eficacia y los oligonucleótidos añadidos 15 minutos tras el comienzo de la reacción, es decir, una vez que los complejos de corte y empalme tenían posibilidad de formarse (B. Ruskin y M. Green, Cell 43, 131 (1985)), fueron casi igual de eficaces (datos no mostrados). Estos resultados indican que los oligonucleótidos que contienen la modificación de 2'-O-metilo pueden competir eficazmente por sus secuencias diana con los factores de corte y empalme. La alta actividad de estos compuesto se debe lo más probablemente a su fuerte hibridación con el ARN.

### 20 Ejemplo 5

#### *Inversión del corte y empalme aberrante con un oligonucleótido antisentido que bloquea el sitio de corte y empalme en 3' críptico de IVS1-5 e IVS1-6*

25 Este experimento se lleva a cabo esencialmente tal como se describió anteriormente, excepto en que las mutaciones talasémicas son las mutaciones IVS1-5 y IVS1-6, en las que se muta el sitio de corte y empalme en 5' auténtico de IVS1. El corte y empalme aberrante que da como resultado talasemia se debe aparentemente al hecho de que las mutaciones IVS1-5 y IVS1-debilitan el sitio de corte y empalme en 5' y permiten que el sitio de corte y empalme críptico situado 16 nucleótidos en el sentido de 5' compita satisfactoriamente por los factores de corte y empalme. En 30 este experimento se probó si un oligonucleótido antisentido para el sitio de corte y empalme críptico puede invertir el corte y empalme aberrante de nuevo al sitio de corte y empalme en 5' mutado y restaurar el corte y empalme correcto a pesar de las mutaciones, puesto que los sitios de corte y empalme similares a los mutados parecen ser funcionales en otros pre-ARNm. El oligonucleótido empleado es el oligonucleótido 6 (SEQ ID NO: 6), un 2'-O-metil-oligorribonucleótido tal como se describe en el ejemplo 2 anterior.

### 35 Ejemplo 6

#### *Inversión del corte y empalme aberrante con un oligonucleótido antisentido que bloquea el sitio de corte y empalme en 5' aberrante de la mutación IVS2<sup>654</sup>*

40 Estos experimentos se llevan a cabo esencialmente tal como se describió anteriormente, excepto en que se emplea el pre-ARNm de la  $\beta$ -globina humana que contiene la mutación IVS2<sup>654</sup> y se emplea el oligonucleótido 5 (SEQ ID NO: 5).

45 La mutación IVS2<sup>654</sup>, identificada frecuentemente en los individuos talasémicos de origen chino, afecta al corte y empalme creando un sitio de corte y empalme en 5' adicional en el nucleótido 653 y activando el sitio de corte y empalme en 3' críptico común en el nucleótido 579 del intrón 2. La eficacia del corte y empalme aberrante del pre-ARNm de IVS2<sup>654</sup> es superior que para el pre-ARNm de IVS2<sup>705</sup> y sólo son detectables pequeñas cantidades de producto sometido a corte y empalme correctamente, con respecto al aberrante, durante el corte y empalme *in vitro*. A 50 pesar de la alta eficacia del corte y empalme aberrante, el oligonucleótido 3, dirigido contra el sitio de corte y empalme en 3' críptico, así como el oligonucleótido 5, dirigido contra el sitio de corte y empalme en 5' aberrante, restauraron el corte y empalme correcto eficazmente a concentraciones similares a las descritas anteriormente. A concentraciones de 2  $\mu$ M de cualquiera de los oligonucleótidos, el producto sometido a corte y empalme correctamente se acumula y el producto aberrante es prácticamente indetectable (datos no mostrados).

### 55 Ejemplo 7

#### *Inversión del corte y empalme aberrante mediante oligonucleótido antisentido que bloquean el punto de ramificación del intrón 1 de la $\beta$ -globina humana*

60 Este experimento se lleva a cabo esencialmente tal como se describió anteriormente para restaurar el corte y empalme correcto en el pre-ARNm mutante de  $\beta$ -110, excepto en que el oligonucleótido se une a una secuencia situada justo en el sentido de 5' de la secuencia del punto de ramificación natural del intrón 1 del gen de la  $\beta$ -globina (nucleótidos 75-88). La secuencia del oligonucleótido es: CCCAAAGACUAUCC (SEQ ID NO: 7). Se restaura el 65 corte y empalme correcto.

# ES 2 290 951 T3

## Ejemplo 8

### *Construcción de líneas celulares que expresan pre-ARNm de β-globina humana talasémica*

5 Se construyó una serie de líneas celulares estables mediante la transfección de células HeLa y células CHO con genes de globina talasémica clonados por el promotor temprano inmediato del citomegalovirus (CMV). Los genes incluyen la mutación IVS1-110, IVS2-654 y IVS1-5.

10 Las líneas celulares estables se obtienen según técnicas convencionales. Véase, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology (P. Ausubel, *et al.* eds. 1987). En resumen, se cotransfectan las células con plásmidos que llevan genes de globina talasémica por el promotor de CMV y plásmidos que llevan el gen de resistencia a neomicina como marcador seleccionable (pSV2neo). La transfección se realiza o bien mediante electroporación, (Z. Dominski y R. Kole, Mol. Cel. Biol. 11: 6075-6083 (1991); Z. Dominski y R. Kole, Mol. Cell. Biol. 12: 2108-2114 (1992)), o bien mediante el método del fosfato de calcio. Las células se sembraron en placa y tras 24-48 horas se expusieron a medio 15 selectivo que contenía G418. Las colonias supervivientes se extendieron y se sometieron a ensayo para determinar la expresión del ARNm de la globina talasémica, tal como sigue.

20 El ARN total se aísla de aproximadamente  $10^5$  células usando un Tri-Reagent comercial (Molecular Research Center, Cincinnati, OH) siguiendo el protocolo del fabricante. Este método permite el fácil procesamiento de un gran número de pequeñas muestras y da altos rendimientos de ARN de buena calidad. Los patrones de corte y empalme se analizan mediante RT-PCR usando la rTth polimerasa y siguiendo el protocolo de los fabricantes (Perkin Elmer). No se requiere más del 1-5% de ARN aislado para la detección del ARN sometido a corte y empalme en las células transfectadas transitoriamente, por lo que el método es suficientemente sensible para la fácil detección en líneas celulares estables. La etapa de la transcriptasa inversa se lleva a cabo con un cebador en 3' que hibrida con las secuencias 25 aberrantes en el ARNm talasémico y abarca la unión del corte y empalme. Esto garantiza que el ADN contaminante y el ARN de la globina normal no se detectan y no interfieren con el ensayo. Las líneas celulares clonadas que expresan el pre-ARNm talasémico se utilizan para el tratamiento con los 2'-O-metil-oligonucleótidos antisentido, tal como se describe más adelante.

## 30 Ejemplo 9

### *Administración de oligonucleótidos antisentido en el cultivo celular*

35 Se hacen crecer las células producidas en el ejemplo 8 anterior en placas de cultivo de 24 pocillos que contienen 200  $\mu$ l de medio por pocillo. Se siembran  $2 \times 10^4$  células por pocillo y cuando se unen, se tratan con 200  $\mu$ l de medio que contiene hasta una concentración de 50  $\mu$ M de oligonucleótidos antisentido. Las células se cultivan hasta 4 días en presencia del oligonucleótido antes de alcanzar la confluencia ( $2 - 3 \times 10^5$  células). Dado que los 2'-O-metil-oligonucleótidos son muy estables en el medio que contiene suero, el medio se cambia no más de cada dos días. La 40 concentración de 50  $\mu$ M (40 mg por pocillo) del oligonucleótido representa un exceso de 100 veces con respecto a la requerida para provocar la restauración eficaz del corte y empalme *in vitro*. Incluso a esta concentración, la síntesis de un único oligonucleótido a una escala de 1  $\mu$ molar, que da 1 - 1,6 mg del oligonucleótido, proporciona material suficiente para de 25 a 40 muestras.

45 En un enfoque alternativo, las células se tratan previamente con el reactivo Lipofectin<sup>TM</sup> (DOTMA, de BRL) a una concentración de 10  $\mu$ g/ml antes de la adición de los oligonucleótidos, según técnicas conocidas. (C. Bennett *et al.*, Mol. Pharm. 41: 1023-1033 (1992)).

50 Tras el tratamiento, se aísla el ARN total como anteriormente y se somete a ensayo para determinar la presencia de ARNm sometido a corte y empalme correctamente mediante RT-PCR. La amplificación de los cebadores se lleva a cabo en presencia de ATP marcado con alfa-P<sup>32</sup> para aumentar la sensibilidad de la detección y reducir el número de ciclos a 15.

55 Los ejemplos anteriores son ilustrativos de la presente invención, y no se interpretan como limitativos de la misma. La invención se define mediante las reivindicaciones siguientes, incluyéndose en ella equivalentes de las reivindicaciones.

## Ejemplo 10

### *Transfección de liposomas*

60 Se utilizó una línea celular basada en HeLa transfecada establemente con el clón de la β-globina humana que lleva una mutación talasémica IVS2-654 para llevar a cabo los experimentos siguientes. Un subclón de la línea celular ISV2-654 expresa predominantemente ARNm de β-globina sometido a corte y empalme de manera aberrante y pequeñas cantidades de muestras sometidas a corte y empalme correctamente. Un segundo subclón, denominado 65 ISV2-654\*, expresa ARNm de β-globina sometido a corte y empalme de manera aberrante y correcta en aproximadamente una razón de 1:1. Aproximadamente  $10^5$  de las células ISV2-654 crecidas en monocapa se trataron con 3  $\mu$ M del 2'-O-metil-oligorribonucleótido (17 monómeros) antisentido para el sitio de corte y empalme en 3' críptico [oligonucleótido 3; CAUUAUUGCCCUGAAAG; (SEQ ID NO: 3)] en presencia de 20  $\mu$ g/ml del reactivo de transfec-

## ES 2 290 951 T3

ción de liposomas LIPOFECTIN<sup>TM</sup> (BRL) según las especificaciones del fabricante durante 5 horas en medio OPTI-MEM sin suero. Tras la incubación, se extrajo el medio y se devolvieron las células al medio de crecimiento normal (MEM + 10% de suero bovino fetal). Las células no tratadas y las células tratadas con lipofección sólo se utilizaron como controles. Tras el crecimiento durante la noche, se aisló el ARN celular total usando Tri-Reagent (Molecular Research Center, Cincinnati, OH) siguiendo el protocolo del fabricante. Se cuantificó el ARN mediante la absorbancia a 260 nm.

El análisis de corte y empalme se llevó a cabo mediante transcriptasa inversa - PCR (RT-PCR). Se sometió a ensayo una cantidad igual de ARN de cada muestra usando un kit rTth RT-PCR (Cetus-Perkin Elmer). Se siguió el protocolo del fabricante con la excepción de que se añadió 1  $\mu$ Ci de dATP marcado con  $\alpha$ -P<sup>32</sup> a la reacción de RT-PCR. Se analizaron los productos de la PCR en gel de poliacrilamida no desnaturizante al 8%. Se utilizó un oligonucleótido que hibrida con el segundo exón del gen de la  $\beta$ -globina humana como un cebador común. El cebador específico para el corte y empalme aberrante (cebador A) abarcó la unión de corte y empalme aberrante, mientras que el cebador para el corte y empalme correcto (cebador C) abarcó la unión de corte y empalme correcta (figura 5). Se llevó a cabo RT-PCR con el cebador A en los carriles 1, 3 y 5 y con el cebador C en los carriles 2, 4 y 6. La cantidad de producto de PCR cargado en los carriles 1, 3 y 5 fue de 1/5 de la de los carriles 2, 4 y 6. Los carriles 1 y 2 muestran el corte y empalme del pre-ARNm de las células tratadas con el reactivo LIPOFECTIN<sup>TM</sup> y 2'-O-metil-oligorribonucleótido 3  $\mu$ M; los carriles 3 y 4 muestran el corte y empalme de pre-ARNm de las células tratadas con reactivo LIPOFECTIN<sup>TM</sup> solo; y los carriles 5 y 6 muestran el corte y empalme de pre-ARNm de las células no tratadas. Obsérvese el aumento visualmente detectable en el corte y empalme correcto para las células tratadas con el oligonucleótido en presencia del reactivo LIPOFECTIN<sup>TM</sup> en el carril 2.

### Ejemplo 11

#### 25 *Transferencia mediada por adenovirus*

Aproximadamente 10<sup>5</sup> de células ISV2-654\* crecidas en monocapa durante la noche se trataron con 2'-O-metil-oligorribonucleótido 5 y 20  $\mu$ M (17 monómeros) antisentido para el sitio de corte y empalme en 3' críptico (SEQ ID NO: 3) en presencia de 10<sup>6</sup> partículas de adenovirus deficiente en replicación (cepa dl-312, una donación del Dr. Hu de la Universidad de Carolina del Norte en Chapel Hill). Se preincubaron el virus y el oligonucleótido durante 30 minutos en OPTI-MEM, entonces se añadieron al cultivo celular y la incubación continuó durante 2 horas. Se aspiró el medio y se sustituyó con un medio de crecimiento normal. Tras un crecimiento durante la noche, se aisló el ARN total tal como se describió anteriormente. Se llevó a cabo la reacción de RT-PCR igual que anteriormente, con la excepción de que los cebadores hibridaron con los exones segundo y tercero del gen de la  $\beta$ -globina humana, respectivamente. El análisis de los productos fue tal como se facilita en el ejemplo 10 anteriormente, con la excepción de que se cargaron en el gel cantidades iguales de productos de PCR. Los resultados se ilustran en la figura 6. El carril 1 mostró el corte y empalme de las células no tratadas; y los carriles 2 y 3 mostraron el corte y empalme de las células tratadas con oligonucleótido 5 y 20  $\mu$ M, respectivamente, en presencia de adenovirus. Obsérvese el aumento visualmente detectable en el corte y empalme correcto, junto con una disminución correspondiente en el corte y empalme aberrante y de una manera dependiente de la dosis, para las células tratadas con oligonucleótido 5 y 20  $\mu$ M.

### Ejemplo 12

#### Electroporación

45 Aproximadamente 10<sup>5</sup> células IVS2-654\* crecidas durante la noche en monocapa se trataron con tripsina y se transfirieron en 0,5 ml de OPTI-MEM a una cubeta de electroporación de 10 mm. Se añadió 2'-O-metil-oligorribonucleótido 5 ó 50  $\mu$ M antisentido para el sitio de corte y empalme en 5' aberrante [oligonucleótido 4; (CCUCUUAC CUCAGUUAC) (SEQ ID NO: 4)] por muestra y se sometió a electroporación la muestra con un pulso de 1500 V usando un conjunto electroporador del Laboratorio de Electrónica de la Universidad de Wisconsin a 0,75  $\mu$ F. Tras la electroporación, se resuspendieron las células en medio de crecimiento normal y se hicieron crecer en monocapa durante la noche. Se aisló el ARN total tal como se describió anteriormente y se analizó mediante RT-PCR, tal como se describió en el ejemplo 11 anteriormente.

55 Los resultados se ilustran en la figura 7. Obsérvese una disminución visualmente detectable en el corte y empalme aberrante, junto con un aumento correspondiente en el corte y empalme correcto, particularmente cuando se administra 50  $\mu$ M del oligonucleótido.

60

65

**REIVINDICACIONES**

1. Un oligonucleótido antisentido para su uso como un medicamento para combatir el corte y empalme aberrante en una molécula de pre-ARNm que contiene una mutación,

en el que dicha molécula de pre-ARNm contiene un primer conjunto de elementos de corte y empalme que definen un intrón natural que se elimina mediante corte y empalme cuando dicha mutación está ausente para producir una primera molécula de ARNm que codifica para una proteína natural;

y en el que dicho pre-ARNm contiene además un segundo conjunto de elementos de corte y empalme inducidos por dicha mutación y que definen un intrón aberrante diferente de dicho intrón natural, intrón aberrante que se elimina mediante corte y empalme cuando dicha mutación está presente para producir una segunda molécula de ARNm aberrante diferente de dicha primera molécula de ARNm;

comprendiendo dicho medicamento:

un oligonucleótido antisentido que puede hibridar con dicha molécula de pre-ARNm para crear una molécula doble en condiciones que permiten el corte y empalme,

en el que dicho oligonucleótido antisentido no activa a la ARNasa H;

y en el que dicho oligonucleótido bloquea un miembro de dicho segundo conjunto aberrante de elementos de corte y empalme;

de modo que se elimina dicho intrón natural mediante corte y empalme y se produce dicha primera molécula de ARNm que codifica para una proteína, y en el que dicha etapa de hibridación se lleva a cabo en una célula, y en el que dicho primer ARNm se traduce en dicha proteína natural.

2. Oligonucleótido antisentido según la reivindicación 1, en el que dicho oligonucleótido antisentido bloquea un elemento de corte y empalme mutado.

3. Oligonucleótido antisentido según la reivindicación 1, en el que dicho oligonucleótido antisentido bloquea un elemento de corte y empalme natural.

4. Oligonucleótido antisentido según la reivindicación 1, en el que dicho oligonucleótido antisentido bloquea un elemento de corte y empalme críptico.

5. Oligonucleótido antisentido según la reivindicación 1, en el que dicho oligonucleótido antisentido bloquea un sitio de corte y empalme en 5'.

6. Oligonucleótido antisentido según la reivindicación 1, en el que dicho oligonucleótido antisentido bloquea un sitio de corte y empalme en 3'.

7. Oligonucleótido antisentido según la reivindicación 1, en el que dicho oligonucleótido antisentido bloquea un punto de ramificación.

8. Oligonucleótido antisentido según la reivindicación 1, en el que dicha proteína natural es la  $\beta$ -globina.

9. Oligonucleótido antisentido según la reivindicación 1, en el que dicha proteína natural es la  $\beta$ -globina humana.

10. Oligonucleótido antisentido según la reivindicación 1, en el que dicho oligonucleótido antisentido tiene desde 8 hasta 50 nucleótidos de longitud.

11. Oligonucleótido antisentido según la reivindicación 1, en el que dicho oligonucleótido antisentido contiene un residuo fosfato de unión entre nucleótidos modificado seleccionado del grupo que consiste en metilfosfonatos, metilfosfonotioatos, fosforomorfolidatos, fosforopiperazidatos y fosforamidatos.

12. Oligonucleótido antisentido según la reivindicación 1, en el que dicho oligonucleótido antisentido contiene un nucleótido que tiene un sustituyente de alquilo inferior en la posición 2' del mismo.

13. Un oligonucleótido antisentido para su uso como un medicamento para regular por incremento la expresión de una proteína natural en una célula que contiene ADN que codifica para dicha proteína natural, ADN que contiene una mutación que produce la regulación por disminución de dicha proteína natural mediante el corte y empalme aberrante del mismo,

en el que dicho ADN codifica para un pre-ARNm;

## ES 2 290 951 T3

en el que dicho pre-ARNm contiene un primer conjunto de elementos de corte y empalme que definen un intrón natural que se elimina mediante corte y empalme cuando dicha mutación está ausente para producir un primer ARNm que codifica para dicha proteína natural;

5 y en el que dicho pre-ARNm contiene además un segundo conjunto de elementos de corte y empalme inducidos por dicha mutación y que definen un intrón aberrante diferente de dicho intrón natural, intrón aberrante que se elimina mediante corte y empalme cuando dicha mutación está presente para producir un segundo ARNm aberrante diferente de dicho primer ARNm;

10 comprendiendo dicho medicamento:

un oligonucleótido antisentido que hibrida con dicho pre-ARNm para crear un doble del mismo en condiciones que permiten el corte y empalme,

15 en el que dicho oligonucleótido antisentido no activa a la ARNasa H;

y en el que dicho oligonucleótido antisentido bloquea un miembro de dicho segundo conjunto aberrante de elementos de corte y empalme; de modo que se elimina dicho intrón natural mediante corte y empalme y se produce dicha proteína natural.

20 14. Oligonucleótido antisentido según la reivindicación 13, en el que dicha célula es una célula eucariota seleccionada del grupo que consiste en células de levadura, insecto y mamífero.

25 15. Oligonucleótido antisentido en una disolución de vehículo acuosa fisiológicamente aceptable para combatir el corte y empalme aberrante *in vivo* en una molécula de pre-ARNm que contiene una mutación,

en el que dicha molécula de pre-ARNm contiene un primer conjunto de elementos de corte y empalme que definen un intrón natural que se elimina mediante corte y empalme cuando dicha mutación está ausente para producir una primera molécula de ARNm que codifica para una proteína natural;

30 35 y en el que dicho pre-ARNm contiene además un segundo conjunto de elementos de corte y empalme inducidos por dicha mutación y que definen un intrón aberrante diferente de dicho intrón natural, intrón aberrante que se elimina preferentemente mediante corte y empalme cuando dicha mutación está presente para producir una segunda molécula de ARNm aberrante diferente de dicha primera molécula de ARNm;

comprendiendo dicho oligonucleótido antisentido un oligonucleótido que:

(i) hibrida con dicho pre-ARNm para formar una molécula doble;

40 (ii) no activa a la ARNasa H; y

(iii) bloquea un miembro de dicho segundo conjunto aberrante de elementos de corte y empalme.

45 16. Oligonucleótido antisentido según la reivindicación 15, en el que dicho oligonucleótido tiene de 8 a 50 nucleótidos de longitud.

17. Oligonucleótido antisentido según la reivindicación 15, en el que dicho oligonucleótido contiene un residuo fosfato de unión entre nucleótidos modificado seleccionado del grupo que consiste en metilfosfonatos, metilfosfonotioatos, fosforomorfolidatos, fosforopiperazidatos y fosforamidatos.

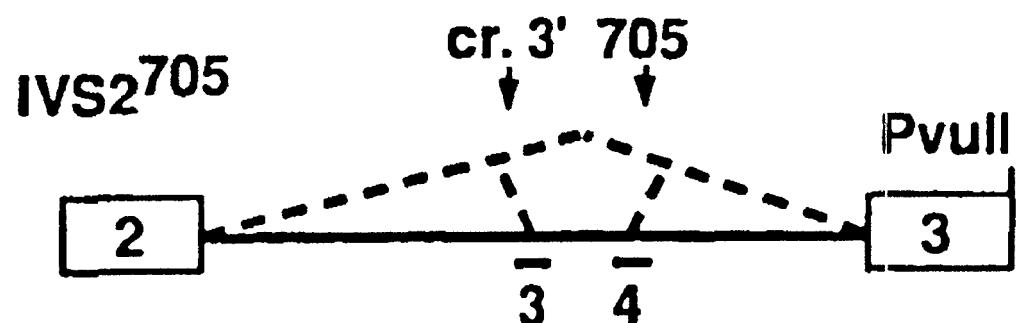
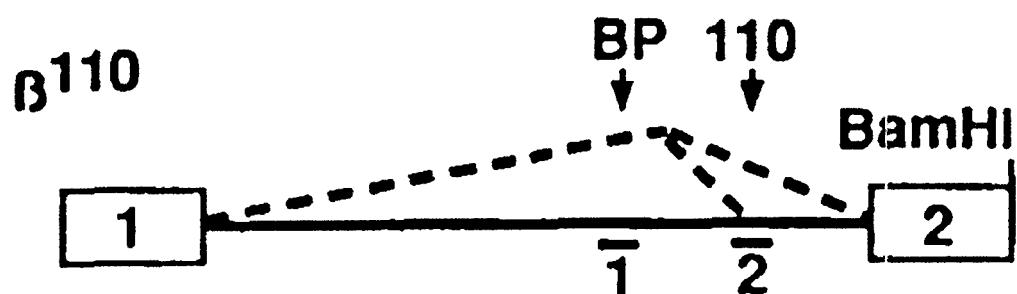
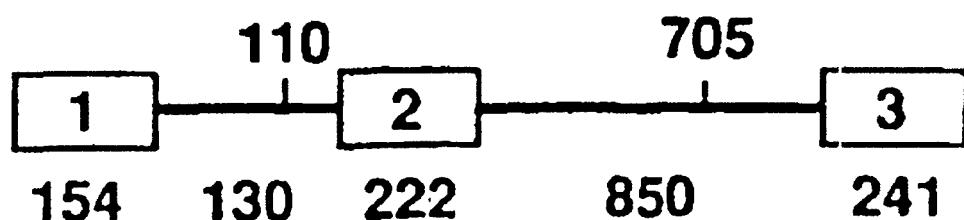
50 18. Oligonucleótido antisentido según la reivindicación 16, en el que dicho oligonucleótido antisentido contiene un nucleótido que tiene un sustituyente de alquilo inferior en la posición 2' del mismo.

19. Oligonucleótido antisentido según la reivindicación 16 en una vesícula lipídica.

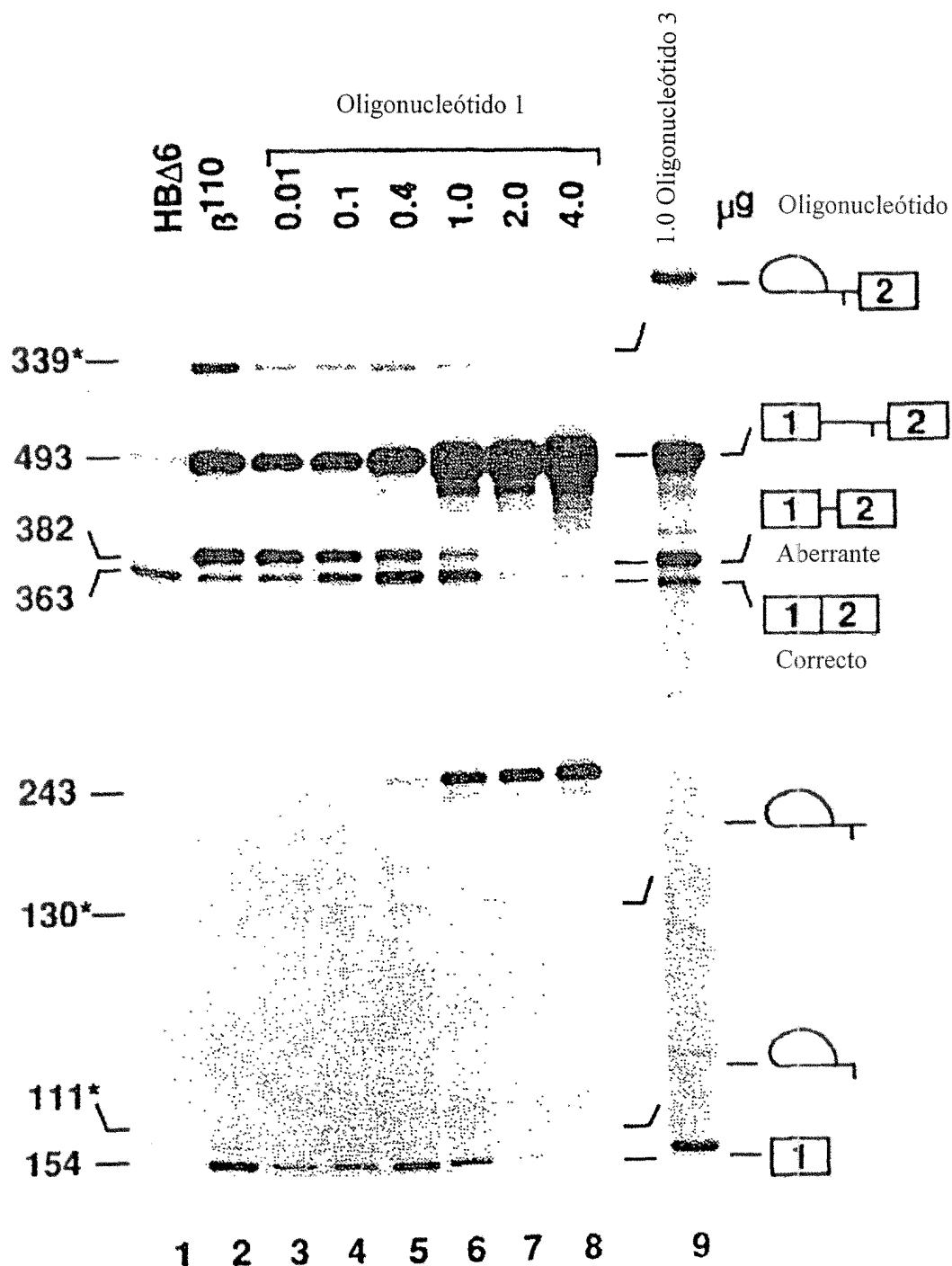
55 20. Uso de oligonucleótido antisentido según la reivindicación 1, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad que implica el corte y empalme aberrante.

21. Uso de un oligonucleótido antisentido según la reivindicación 20, en el que dicha enfermedad se selecciona del grupo que consiste en  $\beta$ -talasemia,  $\alpha$ -talasemia, síndrome de Tay-Sachs, fenilcetonuria y fibrosis quística.

**HBΔ6**



**FIG. 1**



**FIG. 2**

ES 2 290 951 T3

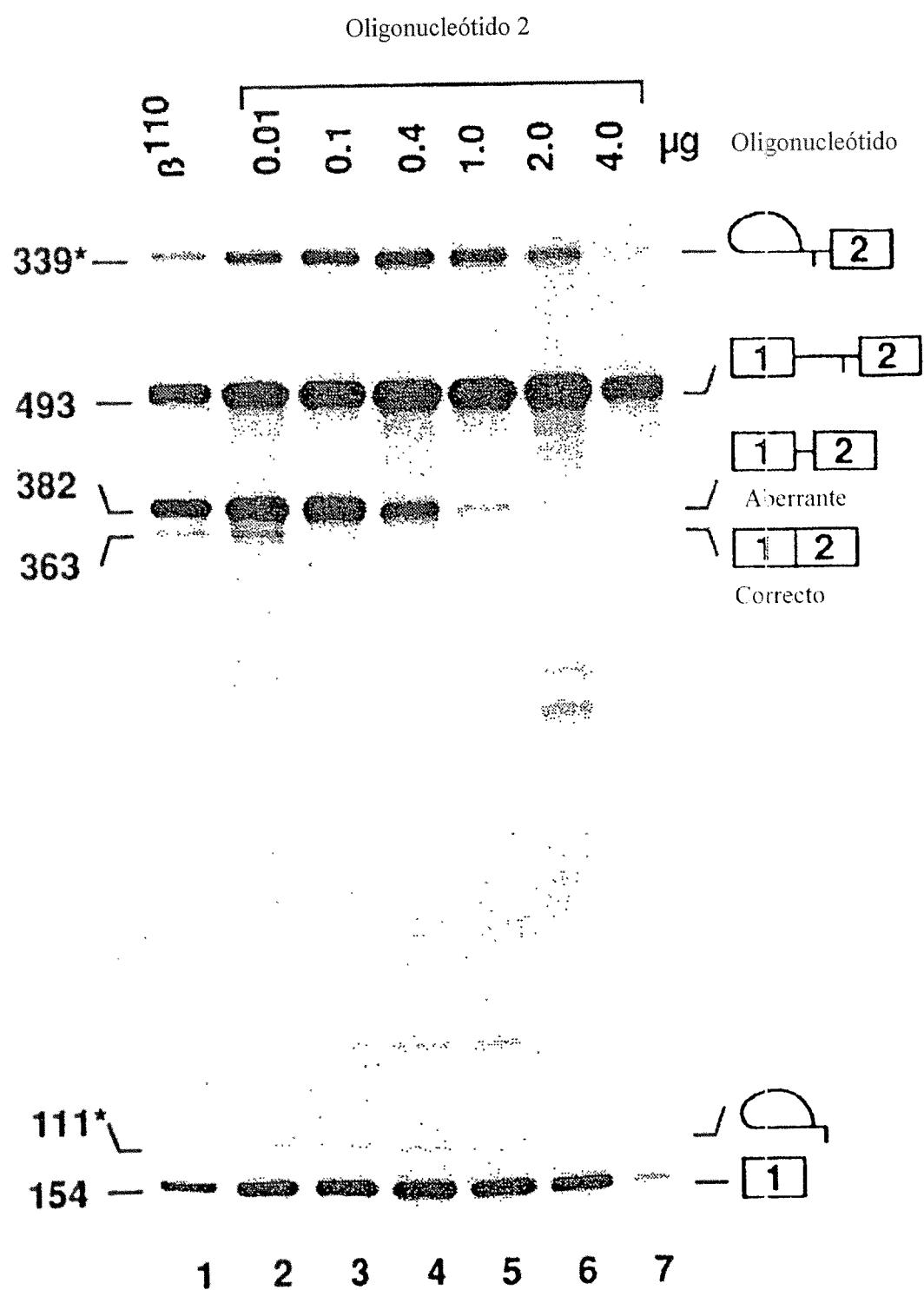


FIG. 3

ES 2 290 951 T3

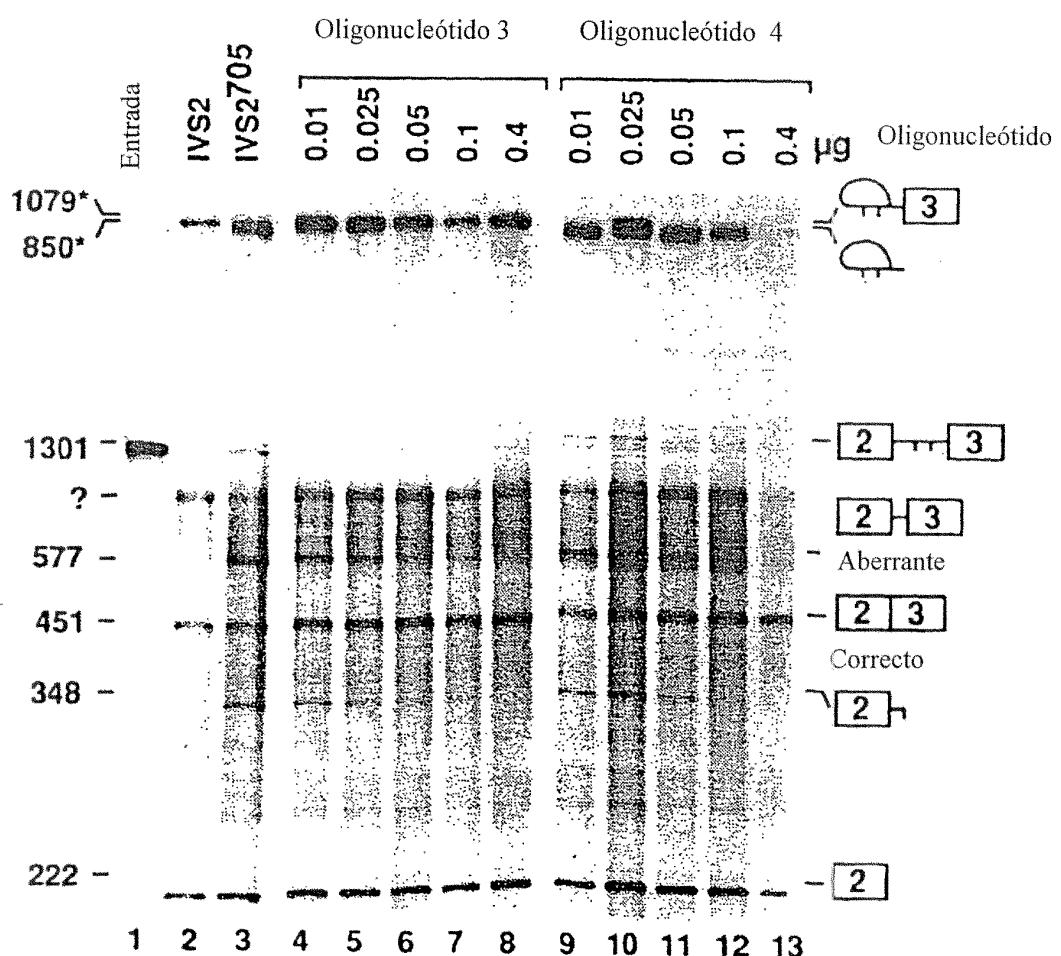
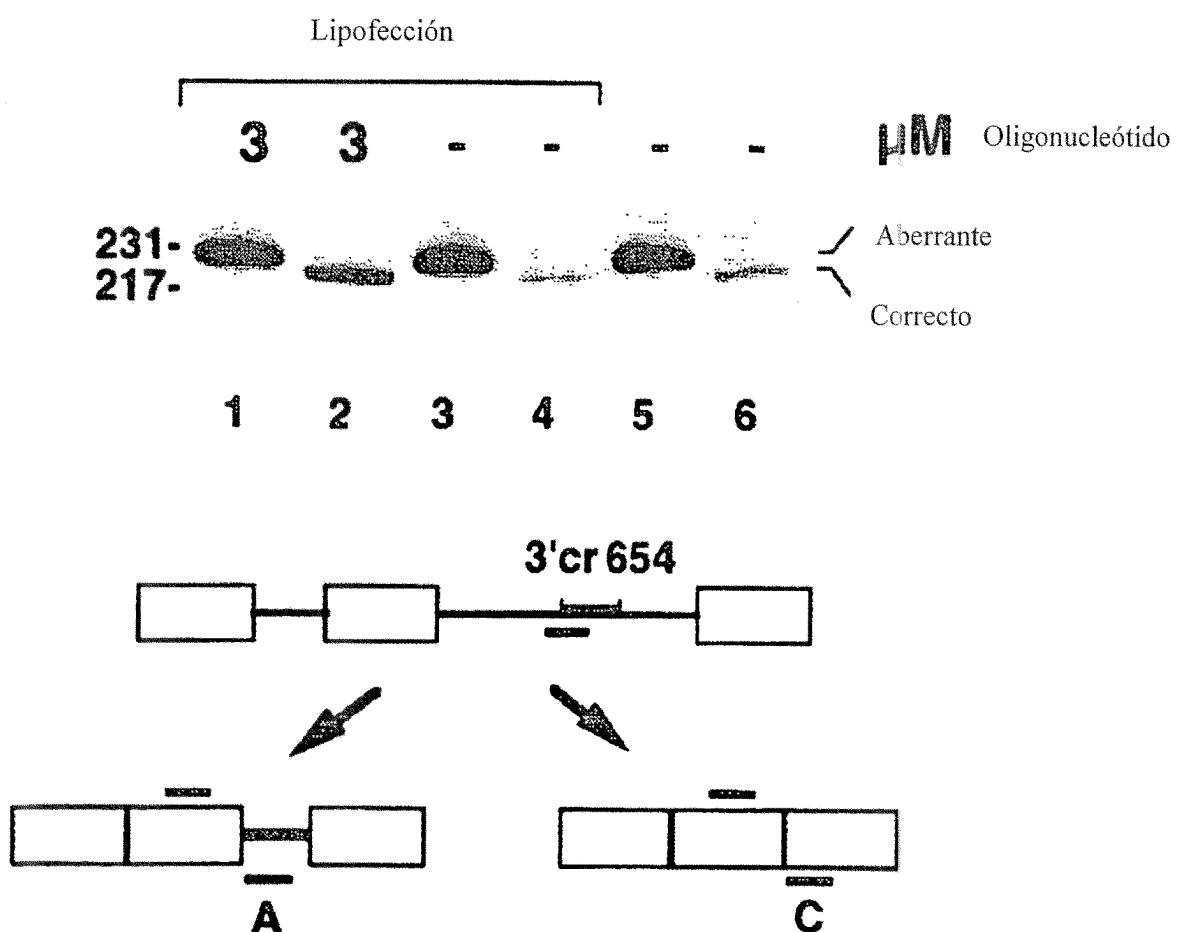
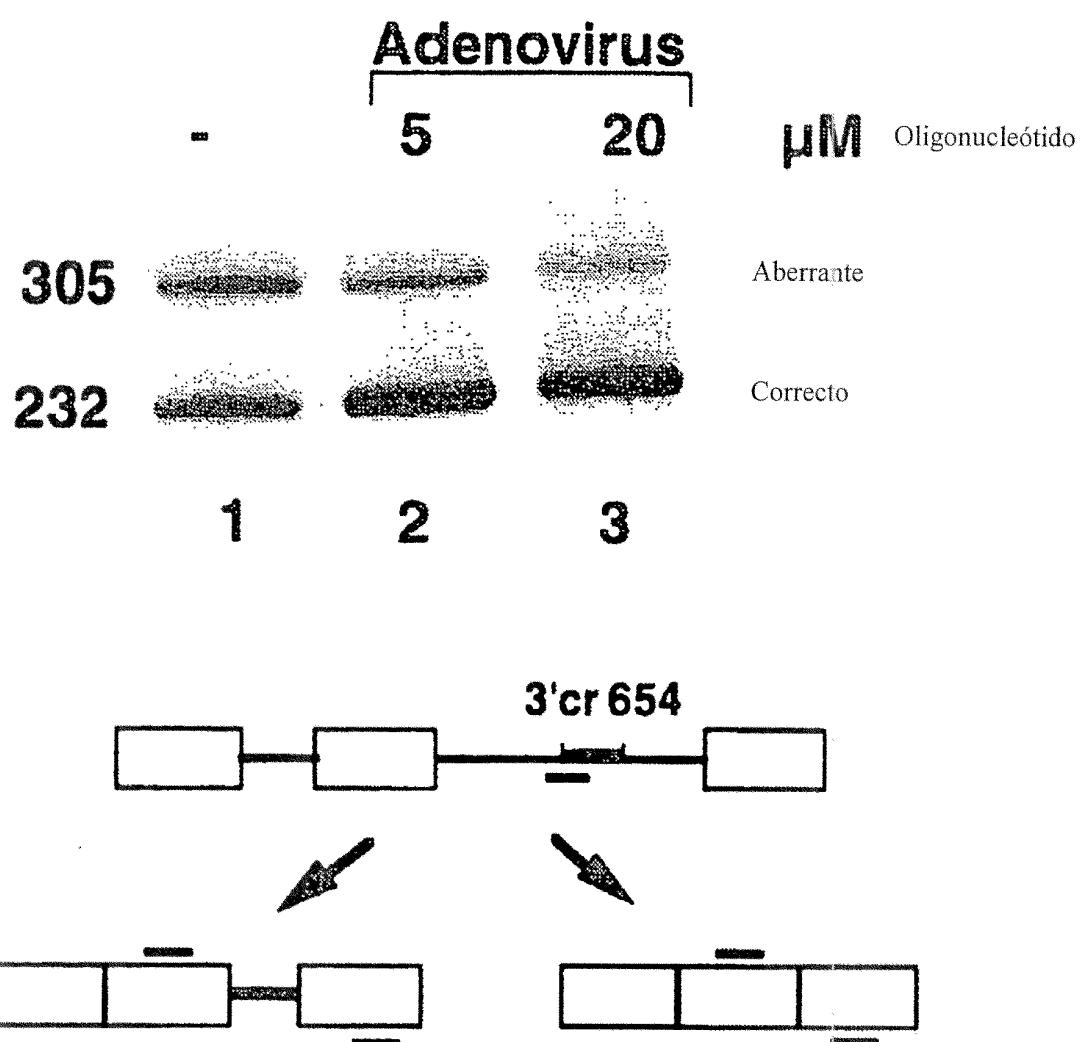


FIG. 4



**FIG. 5**



**FIG. 6**

Electroporación

5      50      -      -       $\mu\text{M}$  Oligonucleótido

305      -      -      -      -      Aberrante

232      -      -      -      -      Correcto

1      2      3      4

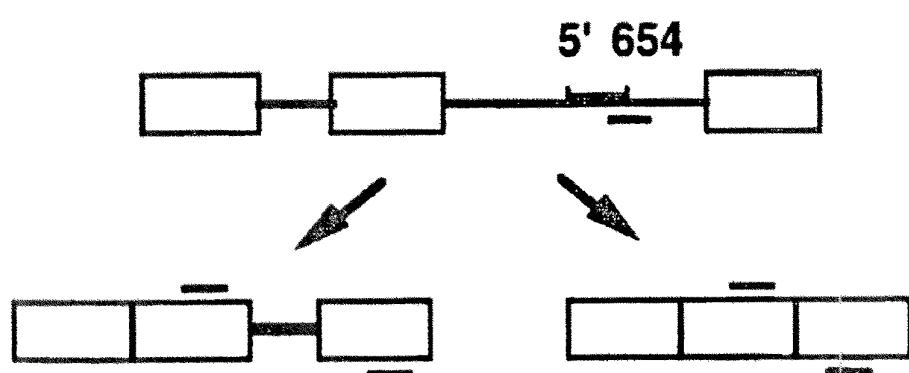


FIG. 7

## **LISTA DE SECUENCIAS**

## (1) INFORMACIÓN GENERAL:

- 5 (i) SOLICITANTE: Kole, Ryszard  
Dominski, Zbigniew T.

10 (ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: Oligonucleótidos antisentido que combate el corte y empalme aberrante y métodos de uso de los mismos

15 (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 7

20 (iv) DIRECCIÓN DE CORRESPONDENCIA:  
(A) DESTINATARIO: Kenneth D. Sibley: Bell. Seltzer. Park y Gibson  
(B) CALLE: Post Office Drawer 34009  
(C) CIUDAD: Charlotte  
(D) ESTADO: Carolina del Norte  
(E) PAÍS: EE.UU.  
(F) CÓDIGO POSTAL 28234

25 (v) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:  
(A) TIPO DE MEDIO: Disquete  
(B) ORDENADOR: PC compatible con IBM  
(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS  
(D) SOFTWARE: Patent In Release nº 1.0. Versión nº 1.25

30 (vi) DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL:  
(A) NÚMERO DE SOLICITUD:  
(B) FECHA DE PRESENTACIÓN:  
(C) CLASIFICACIÓN:

35 (vii) INFORMACIÓN DEL APODERADO/AGENTE:  
(A) NOMBRE: Sibley. Kenneth D.  
(B) NÚMERO DE REGISTRO: 31.665  
(C) NÚMERO DE REFERENCIA/EXPEDIENTE: 5470-63

40 (ix) INFORMACIÓN DE TELECOMUNICACIÓN:  
(A) TELÉFONO: 919-881-3140  
(B) TELEFAX: 919-881-3175  
(C) TELEX: 575102

45 50 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 1:  
(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:  
(A) LONGITUD: 14 pares de bases  
(B) TIPO: ácido nucleico  
(C) TIPO DE CADENA: sencilla  
(D) TOPOLOGÍA: lineal

55 60 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ARN (genómico)  
(iv) ANTISENTIDO: SÍ  
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 1:

GUCA GUGCCU AUCA

ES 2 290 951 T3

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 14 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ARN (genómico)

(iv) ANTISENTIDO: SÍ

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 2:

AUAGACUAAU AGGC

14

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 17 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ARN (genómico)

(iv) ANTISENTIDO: SÍ

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 3:

CAUUAUUGCC CUGAAAG

17

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 17 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ARN (genómico)

(iv) ANTISENTIDO: SÍ

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 4:

CCUCUUACCU CAGUUAC

17

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 18 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ARN (genómico)

(iv) ANTISENTIDO: SÍ

ES 2 290 951 T3

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 5:

GCUAUUACCU UAACCCAG

18

5 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 10 (A) LONGITUD: 14 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

15 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ARN (genómico)

(iv) ANTISENTIDO: SÍ

20 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 6:

GCCUGACCAC CAAC

14

25 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 30 (A) LONGITUD: 14 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

35 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ARN (genómico)

(iv) ANTISENTIDO: SÍ

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 7:

40 CCCAAAGACU AUCC

14

45

50

55

60

65