


Industria y
SUPERINT

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-034740-00008-0000

Fecha: 2013-05-30 15:59:33 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 215

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO6



No. 13-132840-00000-0000

Fecha: 2013-05-30 15:59:33 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 215

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION
DIVISIONAL EXPEDIENTE 11-034.740

21. EXPEDIENTE No.

54. TITULO: OLIGONUCLEÓTIDOS ANTISENTIDO
DIRIGIDOS CONTRA EL FACTOR DE CRECIMIENTO DEL
TEJIDO CONECTIVO Y USOS DE LOS MISMOS

51. CLASIFICACION INTRNACIONAL A61K 48/00

71. SOLICITANTE: EXCALIARD PHARMACEUTICALS, INC. y
ISIS PHARMACEUTICALS, INC

DOMICILIO: California, Estados Unidos de América y.
California, Estados Unidos de América

74. APODERADO DILIA RODRIGUEZ D'ALEMAN

22. BOGOTÁ, D.C.,



No. 13-132840- -00000-0000

Fecha: 2013-05-30 15:59:33 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 215



No. 11-034740- -00008-0000

Fecha: 2013-05-30 15:59:33 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851, DIVISIONAL Folios: 215

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
CONVERSIÓN, DIVISIÓN Y FUSIÓN DE SOLICITUDES

1. Identificación del Trámite

☐ Conversión ☒ División ☐ Fusión
☒ Patente de Invención
☐ Patente de Modelo de Utilidad

2. Datos del solicitante

Persona Natural ☐ Persona Jurídica ☒

EXCALIARD PHARMACEUTICALS, INC. y ISIS PHARMACEUTICALS, INC

Nombre o denominación / Nombre o razón social

Nombre del representante legal

Tipo de empresa Micro ☐ Pequeña ☐ Mediana ☐ Otra ☐

Documento de identificación: ☐ C.C. ☐ C.E. ☐ NIT ☐ Otro Número

Nacionalidad/País de constitución	Dirección del titular	Ciudad
Estados Unidos de América	2141 Palomar Airport Rd, Suite 300 Carlsbad y 1896 Rutherford Rd Carlsbad	California 92011, California 92008

☐ Autorizo expresamente a la Superintendencia de Industria y Comercio para que todas las comunicaciones sean enviadas a través de la dirección de correo electrónico

3. Datos del apoderado:

RODRÍGUEZ D'ALEMAN DILIA MARÍA **C.C. 41.654.882** **20824 CSJ**
Apellidos y Nombre Documento de identificación Tarjeta profesional

Dirección y domicilio		Ciudad
Carrera 11 No. 86-53, Piso 6, Bogotá D.C., Colombia		Bogotá D.C.
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico
notificaciones@clarkemodet.com.co	6350824	6181088

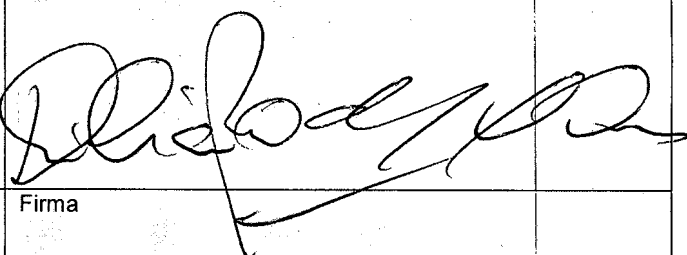
En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sírvase indicar el número de su radicación o protocolo de poder general

P-3805

4. Datos del trámite		
CONVERSION Expediente _____ _____ _____ De: _____ A: _____	DIVISION Expediente _____ _____ _____ De: _____ A: _____	FUSION Expediente _____ _____ _____ De: _____ A: _____

5. Comprobante de Pago No.	Fecha
----------------------------	-------

6. Anexos	
☐	Comprobante de pago de la tasa para la presentación de la corrección y/o modificación
☐	Poder, si fuere el caso con el que se acredita la representación
☐	Número de documento que ordena la comisión o fusión o división
☐	Documento que contiene la conversión, división o fusión de la solicitud
☐	Copia de la solicitud y sus anexos en formato magnético

7. Firma	
DILIA MARÍA RODRÍGUEZ D'ALEMAN Nombre y apellidos	 Firma
C.C. 41.654.882	Tarjeta Profesional 20824 CSJ

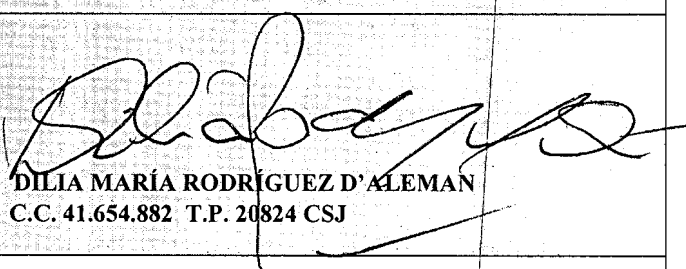


Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Espacio reservado para el adhesivo de radicación

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL – PCT

1	TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☒ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Capítulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)		
Solicitud Internacional No.		PCT/US2009/054973	Fecha 25 de Agosto de 2009
Publicación Internacional No.		WO 2010/042281 A9	Fecha 15 de Abril de 2010
3	TÍTULO DE LA INVENCIÓN (200 caracteres o espacios máximos)		
OLIGONUCLEÓTIDOS ANTISENTIDO DIRIGIDOS CONTRA EL FACTOR DE CRECIMIENTO DEL TEJIDO CONECTIVO Y USOS DE LOS MISMOS			
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP) A61K 48/00		
5	SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE	IDENTIFICACIÓN
EXCALIARD PHARMACEUTICALS, INC. y ISIS PHARMACEUTICALS, INC			
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
DIRECCIÓN: 2141 Palomar Airport Rd, Suite 300 Carlsbad y 1896 Rutherford Rd Carlsbad,		No. TELÉFONO:	
CIUDAD: California 92011, California 92008,		CORREO ELECTRONICO:	
PAÍS DE RESIDENCIA: Estados Unidos de América		LUGAR DE CONSTITUCIÓN: Estados Unidos de América	
7	INVENTOR (ES) VER HOJA INFORMACION COMPLEMENTARIA		
APELLIDOS		NOMBRES	NACIONALIDAD
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:			
8	DATOS INVENTOR (ES)		
DIRECCIÓN		CIUDAD	ESTADO
			PAÍS RESIDENCIA
OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)			
☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.			
9	☐ REPRESENTANTE LEGAL ☒ APODERADO		
APELLIDOS		NOMBRES	IDENTIFICACIÓN
RODRIGUEZ D'ALEMAN		DILIA MARIA	C.C.41.654.882 T.P.20824 CSJ
DIRECCIÓN Cra. 11 No. 86 – 53, Piso 6		No. TELÉFONO 6181088	
CIUDAD Bogotá, D.C.		CORREO ELECTRONICO	
PAÍS Colombia		clarkemodet@clarkemodet.com.co	
10	DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO		
(33) PAÍS DE ORIGEN		CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO
Estados Unidos de América		US	(32) FECHA AAA/MM/DD
			2008/08/25

11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS		
Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.			
12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES		
Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.			
13	REDUCCIÓN DE TASAS		
Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.			
Micro, pequeñas y medianas empresas ☐			
Universidades públicas o privadas ☐			
Entidades sin ánimo de lucro ☐			
Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos			
14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☐ SI ☐ NO		
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.			
15	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	N° 13-052427 // 13-052428	Fecha 30/05/2013 30/05/2013
16	FIRMA DEL APODERADO :		
 DILIA MARÍA RODRÍGUEZ D'ALEMAN C.C. 41.654.882 T.P. 20824 CSJ			
17	ANEXOS		
Documentación Técnica Solicitud Internacional en castellano		Documentación Jurídica	
1. ☒ Descripción N° de folios: 149		9. ☐ Poderes, si fuera el caso.	
2. ☒ Reivindicaciones N° Reivindicaciones: 40		10. ☐ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante.	
3. ☒ Dibujos y/o figuras N° folios: 12		11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso.	
4. ☒ Resumen.		12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso.	
5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso.		13. Reducción de tasas	
6. ☒ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso.		Micro, pequeñas o medianas empresas	
7. ☐ Arte final 12 x 12.		☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea.	
8. ☐ Anexo formato digital.		☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004.	
		Universidades públicas o privadas	
		☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación	
		Entidades sin ánimo de lucro	
		☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio.	
		☐ Hoja de información complementaria.	
		☐ Otros, especificar	
		14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.	
		15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.	
		16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación.	
		17. ☒ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.	
		P-3805	

ANEXO INVENTORES

- 1.) **DEAN, Nicholas, M.**
(2110 Whisper Wind Ln Encinitas, California 92024, Estados Unidos de América);
- 2.) **FOULKES, J. Gordon**
(3756 Brand Crest Encinitas, California 92024, Estados Unidos de América);
- 3.) **O'DONNELL, Niall**
(4400 Lindell Boulevard, Apt. 19E St. Louis, Mountana 63105, Estados Unidos de América);
- 4.) **BENNETT, C. Frank**
(1347 Cassins Street Carlsbad, California 92009, Estados Unidos de América);
- 5.) **FREIER, Susan M.**
(2946 Renault Street San Diego, California 92122, Estados Unidos de América);

4

La presente invención se refiere a nuevos oligonucleótidos antisentido (ASOs) útiles para tratar trastornos hiperprolíficos y enfermedades fibróticas, y para reducir cicatrices que resultan de la curación de heridas.

10

15

20

25

000004

funciones del CTGF así como también otras propiedades ventajosas.

En una modalidad, esta invención específicamente proporciona oligonucleótidos antisentido modificados preferidos para inhibir la expresión del CTGF. Estos se han demostrado por ser significativamente, e inesperadamente más potentes que los CTGF objetivos a ASOs descritos previamente.

El factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF; también conocido como ctgrofact, proteína secretada inducible de fibroblasto, fisp-12, NOV2, proteína 2 relacionada con la proteína de enlace al factor de crecimiento similar a insulina, IGFBP-rP2, IGFBP-8, HBGF-0.8, Hcs24, y ecogenina) es un miembro de la familia CNN (CTGF/CYR61/NOV) de proteínas modulares, nombrados por los primeros miembros de la familia identificados, factor de crecimiento del tejido conectivo, rico en cisteína (CYR61), y sobreexpresado en nefroblastoma (NOV), pero la familia también incluye las proteínas ELM-1 (expresadas en células metastásicas bajas), WISP-3 (proteína secretada inducida por Wnt-1), y COP-1 (WISP-2). Las proteínas de CCN se han encontrado por ser proteínas asociadas a la matriz extracelular secretadas, que regulan los procesos celulares tales como adhesión, migración, mitogénesis, diferenciación, supervivencia, angiogénesis, aterosclerosis, condrogénesis, cicatrización de heridas, tumorigénesis, y enfermedades fibróticas y vasculares como escleroderma (Lau and Lam, Exp. Cell Res., 1999, 248, 44-57). La proteína del factor de crecimiento del tejido conectivo se muestra por estimular la síntesis de ADN y promover la quimiotaxis de fibroblastos

000005

(Bradham et al., J. Cell Biol., 1991, 114, 1285-1294).

En muchos casos, se ha reportado un transcripto del CTGF de 2.4-kilobases único en estudios de expresión, aunque se han reportado transcriptos de 3.5 y 7-kilobases en células de glioblastoma. El factor de crecimiento del tejido conectivo es expresado en fibroblastos durante procesos de diferenciación normal que involucran producción y remodelación de matriz extracelular (ECM), tal como embriogénesis y deciduización uterina después del implante. El factor de crecimiento del tejido conectivo también es frecuentemente sobreexpresado en trastornos fibróticos de la piel tales como esclerosis sistémica, esclerosis localizada en piel, queloides, tejido cicatrizante, fascitis eosinofílica, fascitis nodular y contractura de Dupuytren. El ARNm del factor de crecimiento del tejido conectivo o niveles de proteína son elevados en lesiones fibróticas de órganos y tejidos principales que incluyen el hígado, riñón, pulmón, sistema cardiovascular, páncreas, intestino, ojos y encía. En tumores mamarios, pancreáticos y fibrohistiocíticos caracterizados por significativa participación del tejido conectivo, el factor de crecimiento del tejido conectivo es sobreexpresado en el compartimiento estromal. En muchos casos, la expresión del factor de crecimiento del tejido conectivo es probablemente espacialmente y temporalmente a factor beta de crecimiento de transformación de citocina profibrogénica (TGF-beta) (Moussad and Brigstock, Mol. Genet. Metab., 2000, 71, 276-292).

El factor de crecimiento del tejido conectivo ha sido mapeado a la región cromosomal humana 6q23.1, próxima al gen c-

000006

myb, y anormalidades cromosomales que involucran esta región han sido asociadas con tumores humanos, tales como tumor de Wilms (Martinerie et al., Oncogene, 1992, 7, 2529-2534).

Tumores con componentes vasculares y fibróticos
5 significantes exhiben expresión incrementada del CTGF, y el CTGF puede estar involucrado en la patogénesis de tumores miofibroblásticos pediátricos. De 12 tumores pediátricos examinados, todos mostraron moderada a intensa expresión del CTGF en células tumorales y/o células endoteliales de la
10 vasculatura asociada (Kasaragod et al., Pediatr. Dev. Pathol., 2001, 4, 37-45).

El ARNm del factor de crecimiento del tejido conectivo también es específicamente regulado ascendentemente en linfoblastos leucémicos humanos malignos de niños con
15 leucemia linfoblástica aguda (ALL) (Vorwerk et al., Br. J. Cancer, 2000, 83, 756-760), y niveles tanto de ARNm como de proteína son regulados ascendentemente por TGF-beta en células de cáncer de mama humano Hs578T en una manera dependiente de la dosis, indicando que el CTGF es un factor neuroendocrino
20 importante y un efector corriente abajo crítico de TGF-beta (Yang et al., J. Clin. Endocrinol. Metab., 1998, 83, 2593-2596).

En un modelo de fibrosis pulmonar murina, un incremento en la expresión de ARNm del factor de crecimiento
25 del tejido conectivo es también inducido por bleomicina, un agente fibrogenético pulmonar conocido (Lasky et al., Am. J. Physiol., 1998, 275, L365-371), así como también en células de lavado broncoalveolar de pacientes con fibrosis pulmonar

000007

idiopática y sarcoidosis pulmonar, en comparación con sujetos de control no fumadores sanos, indicando que el factor de crecimiento del tejido conectivo está involucrado en la respuesta fibroproliferativa a la lesión (Allen et al., Am. J. Respir. Cell Moll. Biol., 1999, 21, 693-700). De manera similar, en un modelo experimental de glomerulonefritis proliferativa, la expresión de ARNm del factor de crecimiento del tejido conectivo se incrementó fuertemente en lesiones proliferativas mesangiales y extracapilares y en áreas de fibrosis periglomerula. La sobre expresión del factor de crecimiento del tejido conectivo glomerular temprano coincide con una regulación ascendente sorprendente de proteínas TGF-beta, y las cinéticas de expresión del factor de crecimiento del tejido conectivo sorprendentemente sugiere un papel en la reparación glomerula, posiblemente corriente a bajo de TGF-beta en este modelo de lesión renal temporal (Ito et al., J. Am. Soc. Nephrol., 2001, 12, 472-484).

Descrito y reivindicado en la Patente Estadounidense No. 5,876,730 está un polipéptido aislado o sustancialmente puro caracterizado porque tiene una secuencia de aminoácido que corresponde a los aminoácidos carboxiterminal de una proteína del factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF), en donde el polipéptido tiene una secuencia de aminoácido que pertenece a los residuos de aminoácido 247 a 248 del N-término del factor de crecimiento del tejido conectivo, una secuencia aislada de polinucleótido que codifica el polipéptido del factor de crecimiento del tejido conectivo, un vector de expresión recombinante el cual contiene el polinucleótido, una célula

000308

9

hospedera que contiene el vector de expresión, y una
composición farmacéutica que comprende una cantidad
terapéuticamente efectiva de polipéptido del factor de
crecimiento del tejido conectivo en un portador
5 farmacéuticamente aceptable. Los oligonucleótidos antisentido
son en general, descritos (Brigstock and Harding, 1999).

Descritos y reivindicados en las Patentes
Estadounidenses Nos. 5,783,187; 5,585,270; 6,232,064;
6,150,101; 6,069,006 y Publicación de PCT WO 00/35936 están un
10 polinucleótido aislado que codifica el polipéptido del factor
de crecimiento del tejido conectivo, vectores de expresión,
células hospederas establemente transformadas o transfectadas
con los vectores; un polinucleótido aislado que comprende
secuencias de nucleótido reguladoras no traducidas al 5'
15 aisladas corriente arriba del factor de crecimiento del tejido
conectivo, en donde las secuencias de nucleótido regulador no
traducidas comprenden una región de iniciación transduccional y
transcripcional y en donde la secuencia es un elemento de
respuesta de TGF-beta; un constructo de ácido nucleico aislado
20 que comprende una secuencia reguladora no codificante aislada
corriente arriba de un gen del factor de crecimiento del tejido
conectivo (CTGF), en donde la secuencia reguladora no
codificante está operablemente asociada con una secuencia de
ácido nucleico la cual expresa una proteína de interés o ARN
25 antisentido, en donde la secuencia de ácido nucleico es
heteróloga a la secuencia no codificante; y un fragmento de
polipéptido del factor de crecimiento del tejido conectivo
(CTGF) que tiene la capacidad para inducir la síntesis de ECM,

000000

síntesis de colágeno y/o diferenciación de miofibroblasto, que comprende una secuencia de aminoácido codificada por al menos el exón 2 o exón 3 del polipéptido. Además reivindicado está un método para identificar una composición la cual afecta la expresión del factor de crecimiento del tejido conectivo inducido por TGF-beta, y un método para diagnosticar un estado patológico en un sujeto sospechoso de tener una patología seleccionada del grupo que consiste de enfermedad fibrótica y aterosclerosis, el método comprende obtener una muestra sospechosa de contener el factor de crecimiento del tejido conectivo, con ello detectar una diferencia en el nivel del factor de crecimiento del tejido conectivo en la muestra del sujeto comparada con el nivel del factor de crecimiento del tejido conectivo en la muestra estándar normal es diagnóstico de una patología caracterizada por un trastorno proliferativo celular asociado con el factor de crecimiento del tejido conectivo en el sujeto. Además reivindicado está un método para aliviar un trastorno proliferativo celular asociado con el factor de crecimiento del tejido conectivo, que comprende administrar a un sujeto que tiene el trastorno, en el sitio del trastorno, una composición que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo o fragmento del mismo que se une al factor de crecimiento del tejido conectivo, en donde el anticuerpo o fragmento del mismo no se une a PDGF.

Los oligonucleótidos antisentido son en general descritos (Grotendorst, 2000; Grotendorst and Bradham, 2001; Grotendorst and Bradham, 2000; Grotendorst and Bradham, 1996; Grotendorst and Bradham, 1998; Grotendorst and Bradham, 2000).

000310

Descrito y reivindicado en la Publicación de PCT WO 00/27868 está un polipéptido del factor de crecimiento del tejido conectivo sustancialmente puro o fragmentos funcionales de los mismos, una secuencia aislada de polinucleótido que codifica el polipéptido, la secuencia de polinucleótido en donde T puede también ser U, una secuencia complementaria de ácido nucleico a la secuencia de polinucleótido, y fragmentos de la secuencia que son al menos de 15 bases en longitud y que hibridizarán al ADN el cual codifica la secuencia de aminoácido de la proteína del factor de crecimiento del tejido conectivo bajo condiciones moderadas a altamente rigurosas. Además reivindicado está un vector de expresión que incluye el polinucleótido, una célula hospedera establemente transformada con el vector, un anticuerpo que se une al polipéptido, y un método para producir el polipéptido. Además reivindicado está un método para inhibir la expresión del factor de crecimiento del tejido conectivo en una célula que comprende poner en contacto la célula con un polinucleótido el cual se une a un ácido nucleico objetivo en la célula, en donde el polinucleótido inhibe la expresión del factor de crecimiento del tejido conectivo en la célula, en donde el polinucleótido es un polinucleótido antisentido, así como también un kit para la detección de la expresión del factor de crecimiento del tejido conectivo que comprende medios portadores siendo formado en compartimentos para recibir uno o más contenedores, que comprende al menos un contenedor que contiene al menos un oligonucleótido antisentido que se une al factor de crecimiento del tejido conectivo (Schmidt et al., 2000).

000011

Descrito y reivindicado en la Publicación de PCT WO 00/13706 está un método para tratar o prevenir fibrosis, el método comprende administrar a un sujeto en necesidad de una cantidad efectiva de un agente que modula, regula o inhibe la expresión o actividad del factor de crecimiento del tejido conectivo o fragmentos de los mismos, y en donde el agente es un anticuerpo, un oligonucleótido antisentido, o una molécula pequeña. El método se dirige al tratamiento de fibrosis renal y trastornos renales asociados, en particular, complicaciones asociadas con diabetes e hipertensión (Riser and Denichili, 2000).

Descrita y reivindicada en la Publicación de PCT WO 01/29217 está una molécula aislada de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada de un grupo que comprende NOV1, NOV2 (factor de crecimiento del tejido conectivo), y NOV3, una forma madura o variante de una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo, así como también una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo así como también formas variantes y maduras o fragmentos de los polipéptidos, y el complemento de la molécula de ácido nucleico. Los oligonucleótidos antisentido son en general descritos (Prayaga et al., 2001).

La formación de cicatriz hipertrófica, en particular, es un problema clínico principal en la resolución de quemaduras severas y puede dar origen a cicatrización exuberante que

000012

resulta en pérdida funcional permanente y el estigma de desfiguración. Anualmente, más de 1 millón de personas requieren tratamiento para quemaduras en los Estados Unidos. La incidencia de cicatrización hipertrófica después de quemaduras es un resultado común que crea un problema de magnitud enorme. Por lo tanto, un inhibidor del CTGF tal como un oligonucleótido antisentido (ASO) debe ser altamente efectivo en prevenir la severidad de cicatrizaciones hipertróficas subsecuentes a quemaduras. Esta actividad podría ser evaluada aplicando ASO formulado tópicamente y monitoreando la severidad de la cicatriz desarrollada subsecuente a que ocurra la quemadura.

El CTGF puede ser un objetivo atractivo para modular la cicatrización hipertrófica por varias razones. Como un cofactor y mediador corriente abajo del TGF- β 1 o TGF- β 2, el CTGF puede representar un objetivo más específico que el TGF- β 1 o TGF- β 2 para terapias moleculares dirigidas al gen destinadas a la cicatrización, particularmente puesto que el TGF- β 1 o TGF- β 2 tiene efectos pluripotentes no relacionados con la formación de cicatriz. Además, el CTGF puede tener funciones independientes del TGF- β 1 o TGF- β 2 en el mantenimiento de un fenotipo fibrótico que podría ser descuidado por estrategias anti-TGF- β 1 o TGF- β 2. Debido a avances en el entendimiento de los papeles del CTGF en el aumento de la fibrosis en sistemas de órganos múltiples y en enfermedades dermales crónicas tales como escleroderma, los papeles del CTGF en cicatrización aguda y curación de heridas permanece ampliamente en observación.

Actualmente, no existen agentes terapéuticos conocidos los cuales inhiban efectivamente la síntesis del

factor de crecimiento del tejido conectivo y a la fecha, estrategias investigadas dirigidas a la modulación de la función del factor de crecimiento del tejido conectivo han involucrado el uso de butirato de sodio (NaB), anticuerpos de
5 bloqueo de función y oligonucleótidos antisentido.

Los factores de dieta se cree juegan un papel importante en tanto el desarrollo como prevención de cánceres humanos, que incluyen carcinoma de mama. El micronutriente de dieta NaB es un producto final principal para digestión de
10 almidón y fibra de la dieta, y es un potente inhibidor de crecimiento que inicia la diferenciación celular de muchos tipos de células *in vitro*. El NaB ejerce sus efectos biológicos, en parte, como un inhibidor de desacetilasa histona en células epiteliales mamarias, induce la muerte celular
15 apoptótica en células de cáncer de mama humano no responsables del estrógeno Hs578T, y pueden activar diferentes genes involucrados en la detención del ciclo celular dependiente del tipo de células. El NaB específicamente regula ascendentemente la expresión del factor de crecimiento del tejido conectivo de
20 una manera dependiente de la dosis, estimulando un incremento en niveles tanto de ARNm como de proteína en ambas células mamarias cancerosas y no cancerosas (Tsubaki et al., J. Endocrinol., 2001, 169, 97-110).

El TGF-beta tiene la capacidad única para estimular
25 el crecimiento de fibroblastos normales en agar blando, una propiedad de células transformadas. El factor de crecimiento del tejido conectivo no puede inducir estos fibroblastos de riñón de ratón normal de crecimiento independiente del anclaje

(NRK), pero la síntesis y acción del factor de crecimiento del tejido conectivo son esenciales para la independencia de anclaje inducida por TGF-beta. Los anticuerpos al factor de crecimiento del tejido conectivo específicamente bloquean el crecimiento independiente del anclaje inducido por TGF, y fibroblastos de NRK transformado con un constructo que expresa el gen del factor de crecimiento del tejido conectivo gene en la orientación antisentido en donde no fue responsable a TGF-beta en el ensayo de crecimiento independiente del anclaje (Kothapalli et al., Cell Growth. Differ., 1997, 8, 61-68). Las células de NRK que expresan CTGF-antisentido se usaron también para mostrar que la síntesis de colágeno estimulada con TGF-beta es mediada por el factor de crecimiento del tejido conectivo, indicando que el factor de crecimiento del tejido conectivo puede ser un objetivo útil para terapias antifibróticas (Duncan et al., Faseb J., 1999, 13, 1774-1786).

La región no traducida al 3' (UTR) del ADNc del factor de crecimiento del tejido conectivo humano porta varias secuencias consenso para elementos reguladores. Cuando la 3'-UTR se fusionó corriente abajo de un gen reportero, se encontró actuar como un elemento represivo cis-actuante fuerte, y la 3'-UTR antisentido tiene un efecto similar, pero más fuerte. (Kubota et al., FEBS Lett., 1999, 450, 84-88). La comparación de la 3'-UTR del factor de crecimiento del tejido conectivo humano y de ratón reveló un segmento pequeño conservado de 91 bases. Esta región se amplificó por RT-PCR de fibroblastos de ratón NIH3T3 y usó para hacer un constructo de fusión quimérica para análisis de sus efectos represivos. La 3'-UTR del factor

de crecimiento del tejido conectivo de ratón en ya sea la orientación sentido o antisentido, tiene un fuerte efecto represivo en la transcripción del gen reportero, indicando una independencia de orientación de este elemento regulador (Kondo et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 2000, 278, 119-124).

Un oligonucleótido antisentido de fosforotioato, de 16 nucleótidos en longitud y dirigido al sitio de comienzo de inicio de traducción, se usó para inhibir la expresión del factor de crecimiento del tejido conectivo y suprime la proliferación y migración de células endoteliales vasculares de aorta bovina en cultivo (Shimo et al., J. Biochem. (Tokyo), 1998, 124, 130-140). Este oligonucleótido antisentido se usó también para mostrar que el factor de crecimiento del tejido conectivo induce la apoptosis en células de cáncer de mama humano MCF-7 y que la apoptosis inducida por TGF-beta es mediada, en parte, por el factor de crecimiento del tejido conectivo (Hishikawa et al., J. Biol. Chem., 1999, 274, 37461-37466). El mismo oligonucleótido antisentido se encontró también por inhibir la activación mediada por TGF-beta de capsasa 3 y de este modo inhibe la inducción de apoptosis mediada por TGF-beta en células del músculo blando aórticas humanas (HASc) (Hishikawa et al., Eur. J. Pharmacol., 1999, 385, 287-290). Este oligonucleótido antisentido también se usó para bloquear la expresión del factor de crecimiento del tejido conectivo y demostrar que la alta presión en sangre regula ascendentemente la expresión del factor de crecimiento del tejido conectivo en células mesangiales, las cuales en cambio

000016

intensifican la producción de proteína ECM e inducen apoptosis, contribuyendo a la remodelación del mesangio y finalmente a glomeruloesclerosis (Hishikawa et al., J. Biol. Chem., 2001, 276, 16797-16803).

Consecuentemente, permanece una amplia necesidad de sentido para agentes adicionales capaces de inhibir efectivamente la función del factor de crecimiento del tejido conectivo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Esta invención proporciona compuestos los cuales comprenden oligonucleótidos modificados que comprenden 12-30 nucleósidos ligados, preferiblemente que comprenden 20 o al menos 12 nucleósidos ligados, más preferiblemente al menos 14 nucleósidos ligados, los cuales son capaces de inhibir la expresión del factor del tejido conectivo. Composiciones farmacéuticas y otras que comprenden los compuestos antisentido de la invención también se proporcionan.

Además se proporcionan métodos para tratar un animal, particularmente un humano, que tiene una enfermedad o condición asociada con CTGF administrando una cantidad de tales compuestos efectiva para inhibir la expresión del CTGF, en donde la enfermedad o condición es un trastorno hiperprolífico, tal como cáncer y enfermedades fibróticas. Además se proporciona un método para reducir la cicatrización que resulta de curación de heridas administrando una cantidad de tales compuestos efectiva para inhibir la expresión del CTGF.

000017

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La FIGURA 1 muestra las regiones o segmentos objetivo en la secuencia genómica del CTGF, principalmente segmentos objetivo de exón, contra los cuales se hicieron
5 oligonucleótidos antisentido a CTGF.

La FIGURA 2 muestra las regiones o segmentos objetivo en la secuencia de ARNm del CTGF contra las cuales se hicieron oligonucleótidos antisentido a CTGF.

La FIGURA 3 proporciona una representación gráfica de
10 las pruebas de oligonucleótidos antisentido que se dirigen a secuencias de exón en la secuencia de ARNm del CTGF para inhibición de la expresión del CTGF.

La FIGURA 4 muestra las regiones o segmentos objetivo en la secuencia genómica del CTGF, principalmente segmentos
15 objetivo de intrón, contra los cuales se hicieron oligonucleótidos antisentido a CTGF.

La FIGURA 5 muestra las regiones o segmentos objetivo en la secuencia de ARNm del CTGF contra los cuales se hicieron oligonucleótidos antisentido a CTGF.

20 La FIGURA 6 proporciona una representación gráfica del resultado de las pruebas de oligonucleótidos antisentido que se dirigen principalmente a secuencias de intrón en la secuencia de ARNm del CTGF para inhibición contra la expresión del CTGF.

25 La FIGURA 7 muestra los oligonucleótidos antisentido altamente activos contra CTGF y compara su actividad con aquella de dos oligonucleótidos antisentido previamente diseñados (ISIS 124238 e ISIS 124212) descritos en la Patente

000018

Estadounidense No. 6,965,025 B2.

La Figura 7A que identifica los 8 oligonucleótidos antisentido que se dirigen al exón y la Figura 7B proporciona secuencias preferidas de los oligonucleótidos antisentido.

5 La FIGURA 8 proporciona una representación gráfica de la respuesta de dosis obtenida para las nueve secuencias antisentido principales novedosas altamente activas del CTGF humano para inhibir la expresión del CTGF en células endoteliales de vena umbilical humana cultivadas. La secuencia
10 141923 es un control negativo, y las Secuencias 124238 y 124212 son dos secuencias previamente diseñadas.

La FIGURA 9 proporciona una representación gráfica de los niveles de alanina aminotransferasa (ALT) (FIGURA 9A) y aspartato aminotransferasa (AST) (FIGURA 9B) de plasma en
15 ratones después de cuatro semanas de tratamiento con 25 mg/kg o 50 mg/kg de oligonucleótido antisentido ISIS 412294 (SEC ID NO: 39), ISIS 412295 (SEC ID NO: 40), o ISIS 418899 (SEC ID NO: 166). Los resultados muestran que los niveles de ALT y AST en plasma en ratones dosificados con 25 mg/kg o 50 mg/kg de ISIS
20 412294 (SEC ID NO: 39) o ISIS 412295 (SEC ID NO: 40), o dosificados con 25 mg/kg de ISIS 418899 (SEC ID NO: 166) fueron similares a los niveles en el grupo de control con salina (vehículo); sin embargo ratones dosificados con 50 mg/kg de ISIS 418899 (SEC ID NO: 166) mostraron niveles de ALT y AST
25 significativamente incrementados, arriba de los valores observados en el grupo de control.

La FIGURA 10 proporciona una representación gráfica de los resultados después de cuatro semanas de tratamiento con

000019

oligonucleótidos antisentido que muestran que la ganancia de peso para el grupo tratado con 50 mg/kg de 412295 fue significativamente inferior que la ganancia de peso en el grupo de control.

5 La FIGURA 11 muestra que el tratamiento intradermal de heridas de piel en ratas con 3.0, 1.0, 0.3 o 0.1 mg de oligonucleótido antisentido CTGF resulta en una reducción estadísticamente significativa en la expresión de ARNm tanto del CTGF como CollA2 para todas las dosis. Estos resultados
10 demuestran claramente que la inhibición de la expresión del CTGF con un oligonucleótido antisentido modificado 2'MOE reducirá la deposición de colágeno en la piel.

La FIGURA 12 proporciona una representación gráfica que muestra los niveles significativos del oligonucleótido
15 antisentido CTGF presentes hasta al menos 14 días después de la dosificación intradermal de 50 mg/ml (5 mg de dosis total) en conejos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

20 En una modalidad, esta invención proporciona un compuesto el cual comprende un oligonucleótido modificado que consiste de 12-30 nucleósidos ligados, al menos una porción de secuencia de 12 nucleobases la cual está presente dentro de la región seleccionada de los nucleótidos 718-751, 1388-1423,
25 1457-1689, 2040-2069, 2120- 2147, 2728-2797, 2267-2301, 553-611, 1394-1423, 1469-1508, 1559-1605, 1659-1689, 2100-2129 y 1399-1423 de la SEC ID NO: 9.

En otra modalidad, esta invención proporciona un

000020

21

compuesto el cual comprende un oligonucleótido modificado que consiste de 12-30 nucleósidos ligados, al menos una porción de secuencia de 12 nucleobases la cual está presente dentro de la región seleccionada de los nucleótidos 2540-2559, 2568-2587, 5 2623-2647 y 2623-2642 de la SEC ID NO: 10.

En una modalidad, esta invención proporciona un compuesto el cual comprende un oligonucleótido modificado que comprende 12-30 nucleósidos ligados, al menos una porción de secuencia de 12 nucleobases la cual está presente dentro de 10 las secuencias de nucleobases expuestas en las SEC ID NOS: 28, 30, 39, 40, 43, 44, 45, 50, 51, 52, 56, 78, 125 y 166.

En una modalidad preferida de la invención, el compuesto comprende 20 o al menos 12 nucleósidos ligados, más preferiblemente al menos 14 nucleósidos ligados, el cual está 15 presente dentro de las secuencias de nucleobases expuestas en las SEC ID NOS: 28, 30, 39, 40, 43, 44, 45, 50, 51, 52, 56, 78, 125 y 166.

La selección de estas secuencias se determinó seleccionando resultados presentados en las Figuras 1 a 7, así 20 como también resultados de un estudio de respuesta de dosis en células endoteliales de la vena umbilical humana (HuVEC) (Figura 8). Detalles y datos del experimento se proporcionan en el Ejemplo 8 en la Sección de Ejemplos abajo.

Las secuencias objetivo presentadas en las Figuras 1 25 a 6 incluyen secuencias objetivo tanto de intrón como exón. Una región objetivo es una región estructuralmente definida del ácido nucleico. Por ejemplo, una región objetivo puede abarcar una 3' UTR, una 5' UTR, un exón, un intrón, una región

000021

22

codificante, una región de inicio de traducción, región de terminación de traducción, u otra región de ácido nucleico definida. Dirigir incluye la determinación de al menos un segmento objetivo al cual un compuesto antisentido hibridiza, de manera que ocurre un efecto deseado. En esta modalidad, el efecto deseado es una reducción en los niveles de ácido nucleico objetivo de ARNm.

Secuencias múltiples con mayor actividad aparente que secuencias previamente diseñadas tales como la SEC ID 15 (Isis 124238), se identificaron en secuencias tanto exónicas como intrónicas. Un número de nuevos oligonucleótidos intrónicos (SEC NO. 125) y exónicos (SEC NOs. 28, 30, 40, 45, 52, 50 y 78) parecen ser significativamente más activos que otras secuencias.

Las SEC ID NOs. 39 y 40 se mostraron por ser inhibidores altamente efectivos de la expresión del CTGF en la selección ASO original para actividad (datos mostrados aquí). Para examinar además si esta área en el ARNm del CTGF representa una "mancha de calor" dirigida a ASOs, se designó una secuencia ASO adicional (SEC ID NO 166), la cual es diseñada para hibridizar la secuencia solo corriente arriba de aquella dirigida por las SEC NOs. 39 y 40. Esta ASO (SEC ID NO. 166) también se encontró por ser un inhibidor altamente potente de la expresión de ARNm del CTGF, demostrando que esta sección del ARNm del CTGF es una región atractiva objetivo a inhibidores de ASO.

En una cierta modalidad el compuesto antisentido es complementario a una porción de la región del CTGF elegida como objetivo por oligonucleótidos activos los cuales se estiran de

000022

sitios objetivo 1396 hasta 1424. Este es el espacio de secuencia objetivo por Isis 418899, 412295 y 412294 (SEC ID NOs: 166, 40 y 39, respectivamente).

Esta invención también proporciona un compuesto el cual comprende un oligonucleótido modificado que comprende al menos 12, preferiblemente al menos 14, nucleósidos ligados, la secuencia de nucleobase la cual es una porción de una de la secuencia de nucleobases expuesta en las SEC ID NOs: 28, 30, 39, 40, 43, 44, 45, 50, 51, 52, 56, 78, 125 y 166.

Los compuestos antisentido descritos en la presente pueden comprender un oligonucleótido que tiene 12 a 30, 12 a 20, y preferiblemente 14 a 20 nucleósidos ligados.

En una modalidad de la invención, el oligonucleótido modificado es un oligonucleótido de hebra única o de hebra doble.

La presente invención emplea compuestos oligoméricos, particularmente oligonucleótidos antisentido, para uso en la modulación de la función de moléculas de ácido nucleico que codifican el factor de crecimiento del tejido conectivo, finalmente modulando la cantidad del factor de crecimiento del tejido conectivo producida. Esto se realiza proporcionando compuestos antisentido los cuales hibridizan específicamente con uno o más ácidos nucleicos que codifican el factor de crecimiento del tejido conectivo. Como se usa en la presente, los términos "ácido nucleico objetivo" y "ácido nucleico que codifica al factor de crecimiento del tejido conectivo" abarcan ADN que codifica al factor de crecimiento del tejido conectivo, ARN (que incluye pre-ARNm y ARNm) transcritos de tal ADN, y

000023

también ADNc derivado de tal ARN. La hibridización específica de un compuesto oligomérico con su ácido nucleico objetivo interfiere con la función normal del ácido nucleico. Esta modulación de la función de un ácido nucleico objetivo por compuestos los cuales específicamente hibridizan a este es en general referida como "antisentido". Las funciones de ADN a ser interferido incluyen replicación y transcripción. Las funciones de ARN a ser interferido incluyen todas las funciones vitales, tales como, por ejemplo, translocación del ARN al sitio de traducción de proteína, traducción de proteína del ARN, empalme del ARN para proporcionar una o más especies de ARNm, y actividad catalítica la cual puede ser acoplada en o facilitada por el ARN. El efecto total de tal interferencia con la función de ácido nucleico objetivo es la modulación de la expresión del factor de crecimiento del tejido conectivo. En el contexto de la presente invención, "modulación" significa ya sea un incremento (estimulación) o una reducción (inhibición) en la expresión de un gen. En el contexto de la presente invención, la inhibición es la forma preferida de modulación de expresión del gen y el ARNm es un objetivo preferido.

Ácidos nucleicos objetivos, Regiones objetivo y Secuencias de Nucleótido

Se prefiere elegir como objetivo ácidos nucleicos específicos para antisentido. "Dirigir" un compuesto antisentido a un ácido nucleico particular, en el contexto de esta invención, es un proceso de etapas múltiples.

000024

15

Se entiende que la secuencia expuesta en cada una de las SEC ID NO en los Ejemplos contenidos aquí es independiente de cualquier modificación a una porción de azúcar, un enlace internucleósido, o una nucleobase. Como tal, compuestos antisentido definidos por una SEC ID NO pueden comprender, independientemente, una o más modificaciones a una porción de azúcar, un enlace internucleósido, o una nucleobase. Los compuestos antisentido descritos por el Número Isis (Isis No) indican una combinación de secuencia de nucleobase y porción.

En una modalidad, una región objetivo es una región estructuralmente definida del ácido nucleico. Por ejemplo, una región objetivo puede abarcar una 3' UTR, una 5' UTR, un exón, un intrón, una región codificante, una región de inicio de traducción, región de terminación de traducción, u otra región de ácido nucleico definida. Las regiones estructuralmente definidas para el ácido nucleico se pueden obtener por el número de acceso de las bases de datos de la secuencia tales como NCBI y tal información se incorpora en la presente por referencia. En otras modalidades, una región objetivo puede abarcar la secuencia de un sitio objetivo al 5' de un segmento objetivo dentro de la región objetivo al sitio objetivo al 3' de otro segmento objetivo dentro de la región objetivo.

Dirigir incluye la determinación de al menos un segmento objetivo al cual un compuesto antisentido hibridiza, de manera tal que ocurre un efecto deseado. En ciertas modalidades, el efecto deseado es una reducción en los niveles de ácido nucleico objetivo al ARNm. En otras modalidades, el efecto deseado es reducción de niveles de proteína codificada

000025

por el ácido nucleico objetivo o un cambio fenotípico asociado con el ácido nucleico objetivo.

Una región objetivo puede contener uno o más segmentos objetivo. Segmentos objetivo múltiples dentro de una región objetivo pueden ser traslapantes. Alternativamente, pueden no ser traslapantes. En una modalidad, segmentos objetivo dentro de una región objetivo se separan por no más de aproximadamente 300 nucleótidos. En otras modalidades, segmentos objetivo dentro de una región objetivo se separan por no más de aproximadamente, 250, 200, 150, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, o 10 nucleótidos en el ácido nucleico objetivo. En otra modalidad, segmentos objetivo dentro de una región objetivo se separan por no más de aproximadamente 5 nucleótidos en el ácido nucleico objetivo. En modalidades adicionales, segmentos objetivo son contiguos.

Segmentos objetivo adecuados se pueden encontrar dentro de una 5' UTR, una región codificante, una 3' UTR, un intrón, o un exón. Segmentos objetivo que contienen un codón de inicio o un codón de detección también son segmentos objetivo adecuados. Un segmento objetivo adecuado puede excluir específicamente una cierta región estructuralmente definida tal como el codón de inicio o codón de detección.

La determinación de segmentos objetivo adecuados puede incluir una comparación de la secuencia de un ácido nucleico objetivo a otras secuencias a través del genoma. Por ejemplo, el algoritmo BLAST puede ser usado para identificar regiones de similitud entre diferentes ácidos nucleicos. Esta comparación puede prevenir la selección de secuencias de

000025

2A

compuesto antisentido que puede hibridizar en una manera no específica a secuencias distintas de un ácido nucleico objetivo seleccionado (es decir, secuencias objetivo y no objetivo).

Puede haber variación en actividad (por ejemplo, como se define por el porcentaje de reducción de niveles de ácido nucleico objetivo) de los compuestos antisentido dentro de una región objetivo activa. En una modalidad, reducciones en niveles de ARNm del CTGF son indicativas de inhibición de la expresión del CTGF. Reducciones en niveles de una proteína del CTGF también son indicativas de inhibición de la expresión de ARNm objetivo. Además, cambios fenotípicos son indicativos de inhibición de la expresión del CTGF. Por ejemplo, un incremento en medición del CTGF es indicativo de inhibición de la expresión del CTGF.

En detalle, el proceso de dirigir usualmente comienza con la identificación de una secuencia de ácido nucleico cuya función es modulada. Esto puede ser, por ejemplo, un gen celular (o ARNm transcrito del gen) cuya expresión está asociada con un estado de enfermedad o trastorno particular, una molécula de ácido nucleico de un gen infeccioso. En la presente invención, el objetivo es una molécula de ácido nucleico que codifica al factor de crecimiento del tejido conectivo. El proceso de dirigir también incluye determinación de un sitio o sitios dentro de este gen para que ocurra la interacción antisentido de manera que el efecto deseado, por ejemplo, detección o modulación de la expresión de la proteína resultará. Dentro del contexto de la presente invención, un sitio intragénico preferido es la región que abarca el codón de

29

terminación o inicio de la traducción de la estructura lectora abierta (ORF) del gen. Puesto que, como se conoce en la técnica, el codón de inicio de la traducción es típicamente 5'-AUG (en moléculas de ARNm transcritas; 5'-ATG en la molécula de ADN correspondiente), el codón de inicio de la traducción también es referido como el "codón AUG", "el codón de inicio" o el "codón de inicio AUG". Una mayoría de genes tiene un codón de inicio de traducción que tiene la secuencia de ARN 5'-GUG, 5'-UUG o 5'-CUG, y 5'-AUA, 5'-ACG y 5'-CUG se han mostrado por funcionar *in vivo*. De este modo, los términos "codón de inicio de la traducción" y "codón de partida" pueden abarcar muchas secuencias de codón, aún aunque el aminoácido iniciador en cada caso sea típicamente metionina (en eucariotas) o formilmetionina (en procariotas). También se conoce en la técnica que genes eucarióticos y procarióticos pueden tener dos o más codones de partida alternativos, cualquiera de los cuales puede ser preferencialmente utilizado para inicio de la traducción en un tipo de célula particular o tejido, o bajo una serie particular de condiciones. En el contexto de la invención, "codón de partida" y "codón de inicio de la traducción" se refiere al codón o codones que son usados *in vivo* para iniciar la traducción de una molécula de ARNm transcrita de un gen que codifica al factor de crecimiento del tejido conectivo, con respecto de la(s) secuencia(s) de tales codones.

También se conoce en la técnica que un codón de terminación de la traducción (o "codón de detención") de un gen puede tener una de las tres secuencias, es decir, 5'-UAA, 5'-

000028

201

UAG y 5'-UGA (las secuencias de ADN correspondientes son 5'-TAA, 5'-TAG y 5'-TGA, respectivamente). Los términos "región de codón de partida" y "región de codón de inicio de la traducción" se refieren a una porción de tal ARNm o gen que
5 abarca desde aproximadamente 25 hasta aproximadamente 50 nucleótidos contiguos en cualquier dirección (es decir, 5' o 3') de un codón de inicio de la traducción. De manera similar, los términos "región de codón de detención" y "región de codón de terminación de la traducción" se refieren a una porción de
10 tal ARNm o gen que abarca desde aproximadamente 25 a aproximadamente 50 nucleótidos contiguos en cualquier dirección (es decir, 5' o 3') de un codón de terminación de la traducción.

La estructura lectora abierta (ORF) o "región
15 codificante, la cual se conoce en la técnica para referirse a la región entre el codón de inicio de la traducción y el codón de terminación de la traducción, es también una región la cual puede ser dirigida efectivamente. Otras regiones objetivo incluyen la región no traducida al 5' (5' UTR), conocida en la
20 técnica para referirse a la porción de un ARNm en la dirección 5' del codón de inicio de la traducción, y de este modo incluyendo nucleótidos entre el sitio de cubierta 5' y el codón de inicio de la traducción de un ARNm o nucleótidos correspondientes en el gen, y la región no traducida al 3' (3'
25 UTR), conocida en la técnica por referirse a la porción de un ARNm en la dirección al 3' del codón de terminación de la traducción, y de este modo incluyendo nucleótidos entre el codón de terminación de la traducción y el extremo 3' de un

000029

30

ARNm o nucleótidos correspondientes del gen. La cubierta 5' de un ARNm comprende un residuo de guanosina N7-metilado unido al mayor residuo 5' del ARNm vía un enlace trifosfato 5'-5'. La región de cubierta al 5' de un ARNm se considera por incluir la estructura de cubierta al 5' misma así como también los primeros 50 nucleótidos adyacentes a la cubierta. La región de cubierta al 5' puede también ser una región objetivo preferida.

Aunque algunos transcriptos de ARNm eucarióticos son directamente traducidos, muchos contienen una o más regiones, conocidas como "intrones", las cuales son ejercidas de un transcripto antes de ser traducidas. Las regiones restantes (y por lo tanto reducidas) son conocidas como "exones" y son empalmadas en conjunto para formar una secuencia de ARN continua. Los sitios de empalme de ARNm, es decir, uniones intrón-exón, también pueden ser regiones objetivo preferidas, y son particularmente útiles en situaciones en donde el empalme aberrante está implicado en la enfermedad, o en donde una sobreproducción de un producto de empalme de ARN particular está implicada en la enfermedad. Las uniones de fusión aberrante debido a reacomodos o deleciones también son objetivos preferidos. Se ha encontrado también que intrones pueden también ser efectivos, y por lo tanto regiones objetivo preferidas, para compuestos dirigidos, por ejemplo, a ADN o pre-ARNm.

También se conoce en la técnica que transcriptos de ARN alternativos pueden ser producidos a partir de la misma región genómica de ADN. Estos transcriptos alternativos son en general conocidos como "variantes". Más específicamente,

000030

31

"variantes de pre-ARNm" son transcriptos producidos del mismo ADN genómico que difiere de otros transcriptos producidos a partir del mismo ADN genómico en ya sea su posición de inicio o detención y contienen regiones tanto intrónicas como
5 extrónicas.

Después de la escisión de una o más regiones de exón o intrón o porciones de las mismas durante el empalme, variantes pre-ARNm producen "variantes de ARNm" más pequeñas. Consecuentemente, variantes de ARNm son variantes pre-ARNm
10 procesadas y cada variante pre-ARNm única debe siempre producir una variante de ARNm única como un resultado del empalme. Estas variantes de ARNm también son conocidas como "variantes de empalme alternativas". Si no ocurre empalme de la variante de pre-ARNm entonces la variante de pre-ARNm es idéntica a la
15 variante de ARNm.

También se conoce en la técnica que se pueden producir variantes a través del uso de señales alternativas para iniciar o detener la transcripción y que los pre-ARNms y ARNms pueden poseer más de un codón de partida o codón de
20 detención. Variantes que se originan de un pre-ARNm o ARNm que usan codones de partida alternativos se conocen como "variantes de inicio alternativas" de tal pre-ARNm o ARNm. Estos transcriptos que usan un codón de detención alternativo se conocen como "variantes de detención alternativa" de tal pre-
25 ARNm o ARNm. Un tipo específico de variante de detención alternativa es la "variante poliA" en la cual los transcriptos múltiples producen resultados de la selección alternativa de una de las "señales de detención poliA" por la maquinaria de

000031

32

transcripción, con ello produciendo transcriptos que terminan en sitios poliA únicos.

Compuestos antisentido son comúnmente usados como reactivos y diagnósticos de búsqueda. Por ejemplo, oligonucleótidos antisentido, los cuales son capaces de inhibir la expresión del gen con especificidad exquisita, son a menudo usados por aquellos de habilidad ordinaria para evitar la función de genes particulares. Compuestos antisentido también son usados, por ejemplo, para distinguir entre funciones de varios miembros de una trayectoria biológica. La modulación antisentido, por lo tanto, ha sido aprovechada para uso de investigación.

Para uso en kits y diagnósticos, los compuestos antisentido de la presente invención, ya sea solos o en combinación con otros compuestos antisentido o terapéuticos, pueden ser usados como herramientas en análisis diferenciales y/o combinatoriales para evitar patrones de expresión de una porción del complemento completo de genes expresados dentro de células y tejidos.

Los patrones de expresión dentro de células o tejidos tratados con uno o más compuestos antisentido son comparados para controlar células o tejidos no tratados con compuestos antisentido y los patrones producidos son analizados para determinar niveles diferenciales de la expresión del gen ya que pertenecen, por ejemplo, a asociación de enfermedad, trayectoria de señalización, localización celular, nivel de expresión, tamaño, estructura o función de los genes examinados. Estos análisis pueden ser realizados en células

000032

estimuladas o no estimuladas y en la presencia o ausencia de otros compuestos los cuales afectan los patrones de expresión.

Ejemplos de métodos de análisis de expresión de gen conocidos en la técnica incluyen arreglos o microarreglos de ADN (Brazma and Vilo, FEBS Lett., 2000, 480, 17-24; Cells, et al., FEBS Lett., 2000, 480, 2-16), SAGE (análisis serial de expresión de gen) (Madden, et al., Drug Discov. Today, 2000, 5, 415-425), READS (amplificación de enzima de restricción de ADNcs digeridos) (Prashar and Weissman, Methods Enzymol., 1999, 303, 258-72), TOGA (análisis de expresión de gen total) (Sutcliffe, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2000, 97, 1976-81), arreglos de proteína y proteómicos (Cells, et al., FEBS Lett., 2000, 480, 2-16; Jungblut, et al., Electrophoresis, 1999, 20, 2100-10), secuenciamiento de etiqueta de secuencia expresada (EST) (Cells, et al., FEBS Lett., 2000, 480, 2-16; Larsson, et al., J. Biotechnol., 2000, 80, 143-57), huella de ARN sustractivo (SuRF) (Fuchs, et al., Anal. Biochem., 2000, 286, 91-98; Larson, et al., Cytometry, 2000, 41, 203-208), clonación sustractiva, despliegue diferencial (DD) (Jurecic and Belmont, Curr. Opin. Microbiol., 2000, 3, 316-21), técnicas de hibridización genómica comparativa (Carulli, et al., J. Cell Biochem. Suppl., 1998, 31, 286-96), FISH (hibridización in situ fluorescente) (Going and Gusterson, Eur. J. Cancer, 1999, 35, 1895-904) y métodos de espectrometría de masas (revisado en (To, Comb. Chem. High Throughput Screen, 2000, 3, 235-41).

Compuestos Antisentido

En el contexto de esta invención, el término

000033

34

"oligonucleótido" se refiere a un oligómero o polímero de ácido ribonucleico (RNA) o ácido desoxirribonucleico (DNA) o miméticos de los mismos. Este término incluye oligonucleótidos compuestos de nucleobases que se originan naturalmente, azúcares y enlaces internucleósidos covalentes (armazón) así como también oligonucleótidos que tienen porciones que no se originan naturalmente las cuales funcionan de manera similar. Tales oligonucleótidos modificados o sustituidos son a menudo preferidos sobre formas nativas debido a propiedades deseables tales como, por ejemplo, absorción celular intensificada, afinidad intensificada para ácido nucleico objetivo y estabilidad incrementada en la presencia de nucleasas.

Mientras los oligonucleótidos antisentido son una forma preferida de compuesto antisentido, la presente invención comprende otros compuestos antisentido oligoméricos, que incluyen pero no se limitan a miméticos de oligonucleótido.

Compuesto antisentido significa un compuesto oligomérico capaz de sufrir hibridización a un ácido nucleico objetivo a través de unión de hidrógeno. Compuestos antisentido incluyen, pero no se limitan a oligonucleótidos, oligonucleósidos, análogos de oligonucleótidos, miméticos de oligonucleótidos, oligonucleótidos antisentido, ARNsi, RNAi, ribozimas, oligonucleótidos de secuencias guía externas (EGS) (oligozimas), y otros nucleótidos los cuales hibridizan al ácido nucleico objetivo y modulan su expresión.

En ciertas modalidades, un compuesto antisentido tiene una secuencia de nucleobase que, cuando se escribe en la dirección 5' a 3', comprende el complemento inverso del

000034

35

segmento objetivo de un ácido nucleico objetivo al cual se dirige. En ciertas de tales modalidades, un oligonucleótido antisentido tiene una secuencia de nucleobase que, cuando se escribe en la dirección 5' a 3', comprende el complemento 5 inverso del segmento objetivo de un ácido nucleico objetivo al cual se dirige.

En ciertas modalidades, un compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico es de 12 a 30 subunidades en longitud. En otras palabras, compuestos antisentido son de 12 a 30 subunidades ligadas. En otras modalidades, el compuesto antisentido es 8 a 80, 12 a 50, 15 a 30, 18 a 24, 19 a 22, o 20 subunidades ligadas. En ciertas de tales modalidades, los compuestos antisentido son 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, u 80 subunidades ligadas en longitud, o un intervalo definido por cualesquiera dos de los valores anteriores. En algunas modalidades el compuesto antisentido es un oligonucleótido antisentido, y las subunidades ligadas son nucleótidos.

En una modalidad preferida de la invención, el compuesto comprende 20 o al menos 14 nucleósidos ligados, en donde el oligonucleótido modificado tiene una secuencia la cual es 100% idéntica a una de las secuencias expuestas en las SEC ID NOs: 28, 30, 39, 40, 45, 52, 56, 78, 125 y 166. En otra modalidad preferida, el compuesto principal de interés

000035

36

tiene la secuencia expuesta en la SEC ID NO: 39 (ISIS 412294).

En ciertas modalidades, un compuesto antisentido acortado o truncado dirigido a un ácido nucleico tiene una subunidad única suprimida del extremo 5' (truncación al 5'), o alternativamente del extremo 3' (truncación al 3'). Un compuesto antisentido acortado o truncado dirigido a un ácido nucleico puede tener dos subunidades suprimidas del extremo 5', o alternativamente puede tener dos subunidades suprimidas del extremo 3', del compuesto antisentido. Alternativamente, los nucleósidos suprimidos pueden ser dispersados a través del compuesto antisentido, por ejemplo, en un compuesto antisentido que tiene un nucleósido suprimido del extremo 5' y un nucleósido suprimido del extremo 3'.

15 Cuando una subunidad adicional única está presente en un compuesto antisentido alargado, la subunidad adicional puede ser localizada al extremo 5' o 3' del compuesto antisentido. Cuando dos o más subunidades adicionales están presentes, las unidades agregadas pueden ser adyacentes entre sí, por ejemplo, en un compuesto antisentido que tiene dos subunidades agregadas al extremo 5' (adición al 5'), o alternativamente al extremo 3' (adición al 3'), del compuesto antisentido. Alternativamente, las subunidades agregadas pueden ser dispersadas a través del compuesto antisentido, por ejemplo, en un compuesto antisentido que tiene una subunidad agregadas al extremo 5' y una subunidad agregada al extremo 3'.

Es posible incrementar o reducir la longitud de un

000036

37

compuesto antisentido, tal como un oligonucleótido antisentido, y/o introducir bases desapareadas sin eliminar la actividad. Por ejemplo, en Woolf et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7305-7309, 1992), se probaron una serie de oligonucleótidos antisentido de 13-25 nucleobases en longitud por su habilidad para inducir desdoblamiento a un ARN objetivo en un modelo de inyección de oocito. Los oligonucleótidos antisentido de 25 nucleobases en longitud con 8 u 11 bases desapareadas cerca de los extremos de los oligonucleótidos antisentido fueron capaces de dirigir el desdoblamiento específico del ARNm objetivo, ya sea a una extensión menor que los oligonucleótidos antisentido que no contienen desapareamientos. De manera similar, el desdoblamiento específico objetivo se logró usando oligonucleótidos antisentido de 13 nucleobases, que incluyen aquellos con 1 o 3 desapareamientos.

Gautschi et al (J. Natl. Cancer Inst. 93:463-471, March 2001) demostró la habilidad de un oligonucleótido que tiene 100% de complementariedad al ARNm bcl-2 y que tiene 3 desapareamientos al ARNm bcl-xL para reducir la expresión de tanto bcl-2 como bcl-xL *in vitro* e *in vivo*. Además, este oligonucleótido demostró potente actividad anti-tumoral *in vivo*.

Maher y Dolnick (Nuc. Acid. Res. 16:3341-3358, 1988) probaron una serie de oligonucleótidos antisentido de 14 nucleobases de uno tras otro, y oligonucleótidos antisentido de 28 y 42 nucleobases comprendidas de la secuencia de dos o tres de los oligonucleótidos antisentido en serie,

000037



respectivamente por su habilidad para detener la traducción de DHFR humano en un ensayo de reticulocito de conejo. Cada uno de los tres oligonucleótidos antisentido de 14 nucleobases solo fue capaz de inhibir la traducción, ya sea a un nivel más modesto que los oligonucleótidos antisentido de 28 o 42 nucleobases.

Bhanot et al. (PCT/US2007/068401) proporciona compuestos antisentido cortos, que incluyen compuestos que comprenden monómeros de alta afinidad químicamente modificados de 8 a 16 monómeros en longitud. Estos compuestos antisentido cortos se mostraron por ser útiles para reducir ácidos nucleicos objetivos y/o proteínas en células, tejidos y animales con potencia incrementada e índice terapéutico mejorado. Compuestos antisentido cortos fueron efectivos a dosis inferiores que compuestos antisentido descritos previamente, permitiendo una reducción en toxicidad y costo de tratamiento. Además, los compuestos antisentido cortos descritos tienen mayor potencial para dosificación oral.

20 Hibridizaciones

Uno o más sitios objetivos han sido identificados, se eligen oligonucleótidos los cuales son suficientemente complementarios al objetivo, es decir, hibridizan suficientemente bien y con suficiente especificidad, para dar el efecto deseado.

En el contexto de esta invención, "hibridización" significa unión de hidrógeno, la cual puede ser de Watson-Crick, Hoogsteen o unión de hidrógeno Hoogsteen inversa,

000038

29

entre nucleósidos complementarios o bases de nucleótidos. Por ejemplo, adenina y timina son nucleobases complementarias las cuales se aparean a través de la formación de enlaces de hidrógeno.

5 En algunas modalidades, ocurre hibridización entre un compuesto antisentido descrito en la presente y un ácido nucleico. El mecanismo más común de hibridización involucra unión de hidrógeno entre nucleobases complementarias de las moléculas de ácido nucleico.

10 La hibridización puede ocurrir bajo condiciones variantes. Condiciones rigurosas son dependientes de la secuencia y se determinan por la composición y naturaleza de las moléculas de ácido nucleico a ser hibridizadas.

 Los métodos para determinar si una secuencia es
15 específicamente hibridizable a un ácido nucleico objetivo son bien conocidos en la técnica. En una modalidad, los compuestos antisentido proporcionados en la presente son específicamente hibridizables con un ácido nucleico.

20 Complementariedad

 "Complementariedad", como se usa en la presente, se refiere a la capacidad para apareamiento preciso entre dos nucleótidos. Por ejemplo, si un nucleótido en una cierta posición de un oligonucleótido es capaz de unión de hidrógeno
25 con un nucleótido a la misma posición de una molécula de ADN o ARN, entonces el oligonucleótido y el ADN o ARN son considerados por ser complementarios entre sí en tal posición. El oligonucleótido y el ADN o ARNA son

000039

complementarios entre sí cuando un número suficiente de posiciones correspondientes en cada molécula están ocupados por nucleótidos los cuales pueden unir hidrógeno entre sí. De este modo, "específicamente hibridizable" y

5 "complementariedad" son términos los cuales son usados para indicar un grado suficiente de complementariedad o apareamiento preciso de manera que ocurre enlace estable y específico entre el oligonucleótido y el ADN o ARN objetivo. Se entiende en la técnica que la secuencia de un compuesto

10 antisentido no necesita ser 100% complementaria a aquella de su ácido nucleico objetivo a ser específicamente hibridizable. Un compuesto antisentido es específicamente hibridizable cuando la unión del compuesto a la molécula de ADN o ARN objetivo interfiere con la función normal del ADN o

15 ARN objetivo para provocar una pérdida de utilidad, y existe un grado suficiente de complementariedad para evitar enlace no específico del compuesto antisentido a secuencias no objetivo bajo condiciones en las cuales se desea el enlace específico, es decir, bajo condiciones fisiológicas en el

20 caso de ensayos *in vivo* o tratamiento terapéutico, y en el caso de ensayos *in vitro*, bajo condiciones en las cuales se realizan los ensayos.

Los compuestos antisentido y otros de la invención los cuales hibridizan al objetivo e inhiben la expresión del

25 objetivo son identificados a través de la experimentación, y las secuencias de estos compuestos son identificadas aquí abajo como modalidades preferidas de la invención. Los sitios objetivos a los cuales estas secuencias preferidas son

000040

complementarias son aquí abajo referidos como "sitios
activos" y son por lo tanto sitios preferidos para
tratamiento. Por lo tanto, otra modalidad de la invención
abarca compuestos los cuales hibridizan a estos sitios
5 activos.

Un compuesto antisentido y un ácido nucleico
objetivo son complementarios entre sí cuando un número
suficiente de nucleobases del compuesto antisentido puede
unir el hidrógeno con las nucleobases correspondientes del
10 ácido nucleico objetivo, de manera que ocurrirá un efecto
deseado (por ejemplo, la inhibición antisentido de un ácido
nucleico objetivo, tal como un ácido nucleico del CTGF).

Non-nucleobases complementarias entre un compuesto
antisentido y un ácido nucleico del CTGF pueden ser toleradas
15 siempre que el compuesto antisentido permanezca capaz de
hibridizar específicamente a un ácido nucleico objetivo. Sin
embargo, un compuesto antisentido puede hibridizar más de uno
o más segmentos de un ácido nucleico del CTGF de manera que
segmentos adyacentes o de intervención no están involucrados
20 en el evento de hibridización (por ejemplo, una estructura de
bucle, estructura de desapareamiento o hairpina).

En algunas modalidades, los compuestos antisentido
proporcionados en la presente son al menos 70%, al menos 75%,
al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al
25 menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99%
complementarios a un ácido nucleico del CTGF. El porcentaje
de complementariedad de un compuesto antisentido con un ácido
nucleico objetivo se puede determinar usando métodos de

22

rutina.

Por ejemplo, un compuesto antisentido en el cual 18 de 20 nucleobases del compuesto antisentido son complementarias con una región objetivo, y podrían por lo tanto hibridizar específicamente, podrían representar 90 por ciento de complementariedad. En este ejemplo, las nucleobases no complementarias restantes pueden ser agrupadas o esparcidas con nucleobases complementarias y no necesitan ser contiguas entre sí o a nucleobases complementarias. Como tal, un compuesto antisentido el cual es de 18 nucleobases en longitud que tiene 4 (cuatro) nucleobases no complementarias las cuales son flanqueadas por dos regiones de completa complementariedad con el ácido nucleico objetivo podría tener 77.8% de complementariedad total con el ácido nucleico objetivo y podría de este modo caer dentro del alcance de la presente invención. Porcentaje de complementariedad de un compuesto antisentido con una región de un ácido nucleico objetivo se puede determinar rutinariamente usando programas BLAST (herramientas de búsqueda de alineación local básica) y programas PowerBLAST conocidos en la técnica (Altschul et al., J. Mol. Biol., 1990, 215, 403 410; Zhang y Madden, Genome Res., 1997, 7, 649 656). El porcentaje de homología, identidad de secuencia o complementariedad, se puede determinar mediante, por ejemplo, el programa Gap (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 por Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison Wis.), usando ajustes por defecto, los cuales usan el algoritmo de Smith y Waterman (Adv. Appl. Math., 1981, 2, 482 489).

000042

43

En otras modalidades, los compuestos antisentido proporcionados en la presente son completamente complementarios (es decir, 100% complementario) a un ácido nucleico objetivo. Por ejemplo, el compuesto antisentido puede ser completamente complementario a un ácido nucleico del CTGF, o una región objetivo, o un segmento objetivo o secuencia objetivo del mismo. Como se usa en la presente, "completamente complementario" significa que cada nucleobase de un compuesto antisentido es capaz de apareamiento de base preciso con las nucleobases correspondientes de un ácido nucleico objetivo.

La ubicación de una nucleobase no complementaria puede estar en el extremo 5' y/o 3' del compuesto antisentido. Alternativamente, la nucleobase o nucleobases no complementarias pueden estar en una posición interna del compuesto antisentido. Cuando dos o más nucleobases no complementarias están presentes, pueden estar contiguas (es decir, ligadas) o no contiguas. En una modalidad, una nucleobase no complementaria se localiza en el segmento de ala de un oligonucleótido antisentido gapmer.

En una modalidad, compuestos antisentido de hasta 20 nucleobases en longitud comprenden no más de 4, no más de 3, no más de 2 o no más de 1 nucleobase(s) complementaria(s) con relación a un ácido nucleico objetivo, tal como un ácido nucleico del CTGF.

En otra modalidad, compuestos antisentido de hasta 30 nucleobases en longitud comprenden no más de 6, no más de 5, no más de 4, no más de 3, no más de 2 o no más de 1

000043

44

nucleobase(s) no complementaria(s) con relación a un ácido nucleico objetivo, tal como un ácido nucleico del CTGF.

Los compuestos antisentido proporcionados aquí también incluyen aquellos los cuales son complementarios con una porción de un ácido nucleico objetivo. Como se usa en la presente, "porción" se refiere a un número definido de nucleobases contiguas (es decir, ligados) dentro de una región o segmento de un ácido nucleico objetivo. Una "porción" puede también referirse a un número definido de nucleobases contiguas de un compuesto antisentido. En una modalidad, los compuestos antisentido son complementarios con al menos una porción de 8 nucleobases de un segmento objetivo. En otra modalidad, los compuestos antisentido son complementarios con al menos una porción de 12 nucleobases de un segmento objetivo. En aún otra modalidad, los compuestos antisentido son complementarios con al menos una porción de 15 nucleobases de un segmento objetivo. También contemplados están compuestos antisentido que son complementarios con al menos una porción de 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, o más nucleobases de un segmento objetivo, o un intervalo definido por cualesquiera dos de estos valores.

Identidad

Los compuestos antisentido proporcionados en la presente también pueden tener un porcentaje de identidad definido con una secuencia de nucleótido particular, SEC ID NO, o compuesto representado por un número Isis específico. Como se usa en la presente, un compuesto antisentido es

000044

45

idéntico a la secuencia descrita en la presente si tiene la misma capacidad de apareamiento de nucleobase. Por ejemplo, un ARN el cual contiene uracilo en lugar de timidina en una secuencia de ADN descrita podrá ser considerado idéntico a la

5 secuencia de ADN puesto que tanto uracilo como timidina se aparean con adenina. Versiones acortadas y alargadas de los compuestos antisentido descritos en la presente así como también compuestos que tienen bases no idénticas con relación a los compuestos antisentido proporcionados en la presente

10 también están contempladas. Las bases no idénticas pueden ser adyacentes entre sí o dispersadas a través del compuesto antisentido. El porcentaje de identidad de un compuesto antisentido se calcula de conformidad con el número de bases que tienen idéntico apareamiento de base con relación a la

15 secuencia a la cual está siendo comparada.

En una modalidad, los compuestos antisentido son al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idénticos a uno o más de los compuestos antisentido o SEC ID NOs, o una porción de los mismos, descritos en la presente.

20

Modificaciones

En una cierta modalidad de la invención, modificaciones a compuestos antisentido abarcan sustituciones o cambios a enlaces internucleósidos, porciones de azúcar, o

25 nucleobases.

En una modalidad de la invención el compuesto comprende al menos una modificación seleccionada del grupo que consiste de un enlace internucleósido modificado, un

000045

46

azúcar modificada, y una nucleobase modificada.

Aunque los oligonucleótidos antisentido que contienen una variedad de enlaces internucleósidos modificados pueden ser empleados, el enlace de nucleósido modificado actualmente preferido es un enlace de fosfotioato entre uno o más de los nucleósidos o en donde todos los enlaces de internucleósidos son enlaces internucleósidos de fosfotioato. En general, también se prefiere que el oligonucleótido antisentido contenga al menos uno y típicamente más de un azúcar modificado, en donde el azúcar es un azúcar bicíclico. Aunque varios azúcares modificados pueden ser empleados se prefiere actualmente emplear un azúcar de 2'-O-metoxietilo.

Además, al menos una y típicamente más de una de las nucleobases contenidas en el oligonucleótido antisentido será un nucleótido modificado tal como una 5-metilcitocina.

Un nucleósido es una combinación de base-azúcar. La porción de nucleobase (también conocida con base) del nucleósido es normalmente una porción de base heterocíclica. Los nucleótidos son nucleósidos que además incluyen un grupo fosfato covalentemente unido a la porción azúcar del nucleósido. Para aquellos nucleósidos que incluyen un azúcar pentafuranosilo, el grupo fosfato puede estar ligado a la porción 2', 3' o 5' hidroxilo del azúcar. Los oligonucleótidos se forman a través del enlace covalente de nucleósidos adyacentes entre sí, para formar un oligonucleótido polimérico lineal. Dentro de la estructura de oligonucleótido, los grupos fosfato son comúnmente referidos

000046

para formar los enlaces internucleósidos del oligonucleótido.

Modificaciones a compuestos antisentido abarcan sustituciones o cambios a enlaces internucleósidos, porciones de azúcar, o nucleobases. Compuestos antisentido modificados son a menudo preferidos sobre formas nativas debido a propiedades deseables tales como, por ejemplo, absorción celular intensificada, afinidad intensificada para ácido nucleico objetivo, estabilidad incrementada en la presencia de nucleasas, o actividad inhibidora incrementada.

10 Nucleósidos químicamente modificados también se pueden emplear para incrementar la afinidad de enlace de un oligonucleótido antisentido acortado o truncado por su ácido nucleico objetivo. Consecuentemente, resultados comparables se pueden obtener a menudo con compuestos antisentido más
15 cortos que tienen tales nucleósidos químicamente modificados.

Enlaces de Internucleótidos Modificados

El enlace de internucleósido que se origina naturalmente de RNA y DNA es un enlace fosfodiéster al 3' a
20 5'. Compuestos antisentido que tienen uno o más enlaces de internucleósidos modificados, es decir que no se originan naturalmente, son a menudo seleccionados sobre compuestos antisentido que tienen enlaces de internucleósidos que se originan naturalmente debido a las propiedades deseables
25 tales como, por ejemplo, absorción celular intensificada, afinidad intensificada para ácidos nucleicos objetivos, y estabilidad incrementada en la presencia de nucleasas.

Oligonucleótidos que tienen enlaces de

490

internucleósidos modificados incluyen enlaces de internucleósidos que retienen un átomo de fósforo así como también enlaces de internucleósidos que no tienen un átomo de fósforo. Fósforos representativos que contienen enlaces de internucleósidos incluyen, pero no se limitan a, fosfodiésteres, fosfotriésteres, metilfosfonatos, fosforamidato, y fosforotioatos. Métodos para la preparación de enlaces que contienen fósforo y que no contienen fósforo son bien conocidos.

10 En una modalidad, compuestos antisentido dirigidos a un ácido nucleico del CTGF comprenden uno o más enlaces de internucleósidos modificados. En algunas modalidades, los enlaces de internucleósidos modificados son enlaces de fosforotioato. En otras modalidades, cada enlace de internucleósido de un compuesto antisentido es un enlace internucleósido de fosforotioato.

 Como se conoce en la técnica, un nucleósido es una combinación de base-azúcar. La porción base del nucleósido es normalmente una base heterocíclica. Las dos clases más comunes de tales bases heterocíclicas son las purinas y pirimidinas. Los Nucleótidos son nucleósidos que además incluyen un grupo fosfato covalentemente ligado a la porción azúcar del nucleósido. Para aquellos nucleósidos que incluyen un azúcar pentofuranosilo, el grupo fosfato puede ser ligado a ya sea la porción hidroxilo al 2', 3' o 5' del azúcar. En la formación de oligonucleótidos, los grupos fosfato covalentemente enlazan nucleósidos adyacentes a otros para formar un compuesto polimérico lineal. A su vez los extremos

000048

49

respectivos de esta estructura polimérica lineal pueden ser además unidas para formar una estructura circular, sin embargo, las estructuras lineales abiertas son en general preferidas. Dentro de la estructura de oligonucleótido, los grupos fosfato son comúnmente referidos para formar el armazón internucleósido del oligonucleótido. El enlace o armazón normal de ARN y ADN es un enlace fosfodiéster al 3' a 5'.

Ejemplos específicos de compuestos antisentido preferidos útiles en esta invención incluyen oligonucleótidos que contienen armazones modificadas o enlaces de internucleósidos no naturales. Como se define en esta especificación, oligonucleótidos que tienen armazones modificadas incluyen aquellos que retienen un átomo de fósforo en el armazón y aquellos que no tienen un átomo de fósforo en el armazón. Para propósitos de esta especificación, y como algunas veces es referencia en la técnica, oligonucleótidos modificados que no tienen un átomo de fósforo en su armazón internucleósido también pueden ser considerados por ser oligonucleósidos.

Armazones de oligonucleótidos modificadas preferidas incluyen, por ejemplo, fosforotioatos, fosforotioatos quirales, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotri-ésteres, metil y otros alquil fosfonatos que incluyen 3'-alquilen fosfonatos, 5'-alquilen fosfonatos y fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidatos que incluyen 3'-amino fosforamidato y aminoalquilfosforamidatos, tiono-fosforamidatos, tionoalquilfosfonatos, tionoalquilfosfo-

000049

50

triésteres, selenofosfatos y boranofosfatos que tienen enlaces normales al 3'-5', análogos ligados al 2'-5' de estos, y aquellos que tienen polaridad invertida en donde uno o más enlaces internucleótidos son un enlace en 3' a 3', 5' a 5' o 2' a 2'. Oligonucleótidos preferidos que tienen polaridad invertida comprenden un enlace único 3' a 3' en el enlace más internucleótido al 3' es decir, un residuo de nucleósido invertido único el cual puede ser abásico (la nucleobase se pierde o tiene un grupo hidroxilo en lugar del mismo). Varias sales, sales combinadas y formas de ácido libre también están incluidas.

Patentes Estadounidenses Representativas que muestran la preparación de los enlaces que contiene fósforo anteriores incluyen, pero no se limitan a, Patentes Estadounidenses Nos.: 3,687,808; 4,469,863; 4,476,301; 5,023,243; 5,177,196; 5,188,897; 5,264,423; 5,276,019; 5,278,302; 5,286,717; 5,321,131; 5,399,676; 5,405,939; 5,453,496; 5,455,233; 5,466,677; 5,476,925; 5,519,126; 5,536,821; 5,541,306; 5,550,111; 5,563,253; 5,571,799; 5,587,361; 5,194,599; 5,565,555; 5,527,899; 5,721,218; 5,672,697 y 5,625,050, algunas de los cuales son de su propiedad con esta solicitud, y cada una de las cuales se incorpora en la presente por referencia.

Armazones de oligonucleótido modificadas preferidas que no incluyen un átomo de fósforo ahí tienen armazones que se forman por alquilo o cicloalquilo de cadena corta, heteroátomo combinado y enlaces de internucleósidos de alquilo o cicloalquilo, o uno o más enlaces de

000050

41

internucleósidos heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta. Estos incluyen aquellos que tienen enlaces morfolino (formados en parte de la porción de azúcar de un nucleósido); armazones de siloxano; armazones de sulfuro, sulfóxido y sulfona; armazones de formacetilo y tioformacetilo; armazones de metilenformacetilo y tioformacetilo; armazones de riboacetilo; armazones que contienen alqueno; armazones de sulfamato; armazones de metilenimino y metilenhidrazino; armazones de sulfonato y sulfonamida; armazones de amida; y otras que tienen partes componentes combinadas de N, O, S y CH_2 .

Patentes Estadounidenses Representativas que muestran la preparación de los oligonucleósidos anteriores incluyen, pero no se limitan a, Patentes Estadounidenses Nos.: 5,034,506; 5,166,315; 5,185,444; 5,214,134; 5,216,141; 5,235,033; 5,264,562; 5,264,564; 5,405,938; 5,434,257; 5,466,677; 5,470,967; 5,489,677; 5,541,307; 5,561,225; 5,596,086; 5,602,240; 5,610,289; 5,602,240; 5,608,046; 5,610,289; 5,618,704; 5,623,070; 5,663,312; 5,633,360; 5,677,437; 5,792,608; 5,646,269 y 5,677,439, algunas de los cuales son de su propiedad con esta solicitud, y cada una de las cuales se incorpora en la presente por referencia.

En otros miméticos de oligonucleótido preferido, tanto el azúcar como el enlace de internucleósido, es decir, el armazón, de las unidades de nucleótidos son reemplazados con nuevos grupos. Las unidades base se mantienen para hibridización con un compuesto dirigido al ácido nucleico apropiado. Uno de tal compuesto oligomérico, un mimético de

000051

92

oligonucleótido que ha sido mostrado por tener excelentes propiedades de hibridación, es referido como un ácido nucleico peptídico (PNA). En compuestos de PNA, el armazón de azúcar de un oligonucleótido se reemplaza con un armazón que
5 contiene amida, en particular un armazón de aminoetilglicina. Las nucleobases son retenidas y son unidas directamente o indirectamente a átomos de nitrógeno aza de la porción amida del armazón. Patentes Estadounidenses Representativas que muestran la preparación de compuestos de PNA incluyen, pero
10 no se limitan a, Patentes Estadounidenses Nos.: 5,539,082; 5,714,331; y 5,719,262, cada una de las cuales se incorpora en la presente por referencia. Enseñanzas adicionales de compuestos de PNA se pueden encontrar en Nielsen et al., Science, 1991, 254, 1497-1500.

15 Modalidades más preferidas de la invención son oligonucleótidos con armazones de fosforotioato y oligonucleósidos con armazones de heteroátomos, y en particular $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{O}-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{O}-\text{CH}_2-$ [conocidos como armazón de metileno (metilimino) o MMI], $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$ y $-\text{O}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ [en donde el
20 armazón de fosfodiéster nativo se representa como $-\text{O}-\text{P}-\text{O}-\text{CH}_2-$] de la Patente Estadounidense referenciada anteriormente No. 5,489,677, y los armazones amida de la Patente Estadounidense referenciada anteriormente No. 5,602,240.
25 También son preferidos oligonucleótidos que tienen estructuras de armazón de morfolino de la Patente Estadounidense referenciada anteriormente No. 5,034,506.

000052

53

Porciones de Azúcar Modificadas

Oligonucleótidos modificados también pueden contener una o más porciones de azúcar sustituidas. Por ejemplo, el anillo de azúcar furanosilo puede ser modificado en un número de formas que incluyen sustitución con un grupo sustituyente, puenteado para formar un ácido nucleico bicíclico "BNA2 y sustitución del 4'-O con un heteroátomo tal como S o N(R) como se describe en la Patente Estadounidense No.: 7,399,845 por Seth et al., con ello incorporada por referencia en la presente en su totalidad. Otros ejemplos de BNAs se describen en la Solicitud de Patente Internacional publicada No. WO 2007/146511, con ello incorporada por referencia en la presente en su totalidad.

Compuestos antisentido de la invención pueden contener opcionalmente uno o más nucleótidos que tienen porciones de azúcar modificadas. Las modificaciones de azúcar pueden impartir estabilidad de nucleasa, afinidad de enlace o algunas otras propiedades biológicas benéficas a los compuestos antisentido. El anillo de azúcar furanosilo de un nucleósido puede ser modificado en un número de formas que incluyen, pero no se limitan a: adición de un grupo sustituyente, particularmente en la posición 2'; puenteo de dos átomos del anillo no geminales para formar un ácido nucleico bicíclico (BNA); y sustitución de un átomo o grupo tal como -S-, -N(R)- o -C(R1) (R2) para el oxígeno del anillo en la posición 4'. Azúcares modificados incluyen, pero no se limitan a: azúcares sustituidos, especialmente azúcares sustituidos al 2' que tienen un grupo sustituyente 2'-F, 2'-

000053

54

OCH₂ (2'-OMe) o 2'-O(CH₂)₂-OCH₃ (2'-O-metoxietilo o 2'-MOE);
y azúcares modificados bicíclicos (BNAs), que tienen un
puente al 4'-(CH₂)_n-O-2', en donde n=1 o n=2. Métodos para
las preparaciones de azúcares modificados son bien conocidos
5 por aquellos de habilidad en la técnica.

En ciertas modalidades, un nucleósido 2'-modificado
tiene una porción de azúcar bicíclico. En ciertas de tales
modalidades, la porción de azúcar bicíclico es un azúcar D en
la configuración alfa. En ciertas de tales modalidades, la
10 porción de azúcar bicíclico es un azúcar D en la
configuración beta. En ciertas de tales modalidades, la
porción de azúcar bicíclico es un azúcar L en la
configuración alfa. En ciertas de tales modalidades, la
porción de azúcar bicíclico es un azúcar L en la
15 configuración beta.

En ciertas modalidades, la porción de azúcar
bicíclico comprende un grupo puente entre los átomos de
carbono 2' y 4'. En ciertas de tales modalidades, el grupo
puente comprende de 1 a 8 grupos biradicales ligados. En
20 ciertas modalidades, la porción de azúcar bicíclico comprende
de 1 a 4 grupos biradicales ligados. En ciertas modalidades,
la porción de azúcar bicíclico comprende 2 o 3 grupos
biradicales ligados. En ciertas modalidades, la porción de
azúcar bicíclico comprende 2 grupos biradicales ligados. En
25 ciertas modalidades, un grupo biradical ligado se selecciona
de -O-, -S-, -N(R₁)-, -C(R₁)(R₂)-, C(R₁)=C(R₁)-, -C(R₁)=N-, -
C(=NR₁)-, -Si(R₁)(R₂)-, -S(=O)₂-, -S(=O)-, -C(=O)- y -C(=S)-;
en donde cada R₁ y R₂ es, independientemente, H, hidroxilo,

000054

45

alquilo C1-C12, alquilo C1-C12 sustituido, alqueno C2-C12, alqueno C2-C12 sustituido, alquino C2-C12, alquino C2-C12 sustituido, arilo C5-C20, arilo C5-C20 sustituido, un radical heterociclo, un radical heterociclo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, radical alicíclico C5-C7, radical alicíclico C6-C7 sustituido, halógeno, oxo (-O-) sustituido, amino, amino sustituido, azido, carboxilo, carboxilo sustituido, acilo, acilo sustituido, CN, tiol, tiol sustituido, sulfonilo (S(=O)₂-H), sulfonilo sustituido, sulfoxi (S(=O)-H) o sulfoxi sustituido; y cada grupo sustituyente es, independientemente, halógeno, alquilo C1-C12, alquilo C1-C12 sustituido, alqueno C2-C12, alqueno C2-C12 sustituido, alquino C2-C12, alquino C2-C12 sustituido, amino, amino sustituido, acilo, acilo sustituido, aminoalquilo C1-C12, aminoalcoxi C1-C12, aminoalquilo C1-C12 sustituido, aminoalcoxi C1-C12 sustituido o un grupo protector.

En algunas modalidades, la porción de azúcar bicíclico es puenteada entre los átomos de carbono 2' y 4' con un grupo biradical seleccionado de -O-(CH₂)_p-, -O-CH₂-, -O-CH₂CH₂-, -O-CH(alquilo)-, -NH-(CH₂)_p-, -N(alquilo)-(CH₂)_p-, -O-CH(alquilo)-, -(CH(alquilo))-(CH₂)_p-, -NH-O-(CH₂)_p-, -N(alquilo)-O-(CH₂)_p-, o -O-N(alquilo)-(CH₂)_p-, en donde p es 1, 2, 3, 4 o 5 y cada grupo alquilo puede ser sustituido adicionalmente. En ciertas modalidades, p es 1, 2 ó 3.

En un aspecto, cada uno de los puentes es, independientemente, [C(R₁)(R₂)]_n-, -[C(R₁)(R₂)]_n-O-, -C(R₁R₂)-N(R₁)-O- o C(R₁R₂)-O-N(R₁)-. En otro aspecto, cada uno

000055

5b

de los puentes es, independientemente, $4'-(\text{CH}_2)_3-2'$, $4'-(\text{CH}_2)_2-2'$, $4'-\text{CH}_2-\text{O}-2'$, $4'-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-2'$, $4'-\text{CH}_2-\text{O}-\text{N}(\text{R}_1)-2'$ y $4'-\text{CH}_2-\text{N}(\text{R}_1)-\text{O}-2'$ en donde cada R_1 es, independientemente, H, un grupo protector o alquilo C_1-C_{12} .

5 En nucleótidos que tienen porciones de azúcar modificadas, las porciones de nucleobase (naturales, modificadas o una combinación de las mismas) se mantienen para hibridización con un ácido nucleico objetivo apropiado.

En una modalidad, compuestos antisentido dirigidos a
10 un ácido nucleico comprenden uno o más nucleótidos que tienen porciones de azúcar modificadas. En una modalidad preferida, la porción de azúcar modificada es $2'-\text{MOE}$. En otras modalidades, los nucleótidos modificados $2'-\text{MOE}$ son arreglados en una porción de gapmer.

15 Oligonucleótidos actualmente preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición $2'$: OH; F; O-, S-, o N-alquilo; O-, S-, o N-alquenilo; O-, S- o N-alquinilo; o O-alquil-O-alquilo, en donde el alquilo, alquenilo y alquinilo pueden ser alquilo C_1 a C_{10} o alquenilo y alquinilo C_2 a C_{10}
20 sustituido o insustituido. Particularmente preferidos son $\text{O}[(\text{CH}_2)_n\text{O}]_n$, CH_3 , $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{OCH}_3$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{ONH}_2$, y $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{ON}[(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3]_2$, en donde n y m son de 1 a aproximadamente 10. Otros oligonucleótidos preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición $2'$: alquilo
25 inferior C_1 a C_{10} , alquilo inferior sustituido, alquenilo, alquinilo, alcarilo, aralquilo, O-alcarilo u O-aralquilo, SH, SCH_3 , OCN , Cl, Br, CN, CF_3 , OCF_3 , SOCH_3 , SO_2CH_3 , ONO_2 , NO_2 , N_3 , NH_2 , heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo,

5X

aminoalquilamino, polialquilamino, sililo sustituido, un grupo desdoblante de ARN, un grupo reportero, un intercalador, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido, o un grupo para

5 mejorar las propiedades farmacodinámicas de un oligonucleótido, y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. Una modificación preferida incluye 2'-metoxietoxi ($2'-O-CH_2CH_2OCH_3$, también conocido como 2'-O-(2-metoxietilo) o 2'-MOE) (Martin et al., Helv. Chim. Acta, 1995, 78, 486-504)

10 es decir, un grupo alcoxialcoxi. Una modificación preferida adicional incluye 2'-dimetilaminooxietoxi, es decir, un grupo $O(CH_2)_2ON(CH_3)_2$, también conocido como 2'-DMAOE, y 2'-dimetilaminoetoxietoxi (también conocido en la técnica como 2'-O-dimetilaminoetoxietilo o 2'-DMAEOE), es decir, 2'-O--

15 $CH_2-O-CH_2-N(CH_2)_2$. Una modificación preferida adicional incluye ácido nucleico bicíclico (también referido como ácidos nucleicos bloqueados (LNAs)) en el cual el grupo 2'-hidroxilo está ligado al átomo de carbono 3' o 4' del anillo azúcar con ello formando una porción de azúcar bicíclico. El

20 enlace es preferiblemente un grupo metileno $(-CH_2-)_n$ que puentea el átomo de oxígeno al 2' y el átomo de carbono al 4' en donde n es 1 ó 2 que incluye α -L-Metilenoxi ($4'-CH_2-O-2'$) BNA, β -D-Metilenoxi ($4'-CH_2-O-2'$) BNA y Etilenoxi ($4'-(CH_2)_2-O-2'$) BNA. Azúcares modificados bicíclicos también incluyen

25 ($6'S$)-6'metil BNA, Aminooxi ($4'-CH_2-O-N(R)-2'$) BNA, Oxiamino ($4'-CH_2-N(R)-O-2'$) BNA en donde, R es, independientemente, H, un grupo protector, o alquilo C1-C12. LNAs también forman duplos con ADN, ARN o LNA complementario con altas afinidades



térmicas. El espectro de dicroísmo circular (CD) muestra que los duplos que involucran LNA completamente modificado (esp. LNA:ARN) estructuralmente se parecen a un duplo de forma-A ANR:ARN. La examinación por resonancia magnética nuclear (NMR) de un duplo LNA:ADN confirmó la conformación 3'-endo de un monómero de LNA. El reconocimiento de ADN de doble hebra también ha demostrado sugerir invasión de hebra por LNA. Estudios de secuencias desapareadas muestran que los LNAs obedecen las reglas de apareamiento de base Watson-Crick con selectividad en general mejorada comparada con las hebras de referencia no modificadas correspondientes.

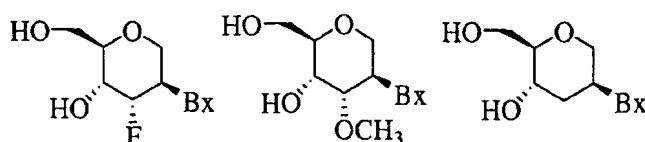
Los LNAs en los cuales el grupo 2'-hidroxilo está ligado al átomo de carbono 4' del anillo azúcar de este modo forman un enlace 2'-C, 4'-C-oximetileno de este modo formando una porción de azúcar bicíclico. El enlace puede ser un grupo metileno $(-\text{CH}_2-)_n$ que puentea el átomo de oxígeno 2' y el átomo de carbono 4' en donde n es 1 ó 2 (Singh et al., Chem. Commun., 1998, 4, 455-456). LNA y análogos de LNA exhiben estabilidades térmicas dúplex muy altas de ADN y ARN complementario ($T_m = +3$ a $+10$ °C), estabilidad hacia la degradación 3'-exonucleolítica y buenas propiedades de solubilidad. Otros grupos puente preferidos incluyen el puente 2'-desoxi-2'- CH_2OCH_2 -4'. Los LNAs y preparación de los mismos se describen en las Solicitudes de Patente Internacional publicadas Nos. WO 98/39352 y WO 99/14226.

Otras modificaciones preferidas incluyen 2'-metoxi (2'-O- CH_3), 2'-aminopropoxi (2'-O $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 2'-alilo (2'- $\text{CH}_2\text{-CH=CH}_2$), 2'-O-alilo (2'-O- $\text{CH}_2\text{-CH=CH}_2$) y 2'-fluoro (2'-F).

000058

5A

La modificación 2'- puede estar en la posición arabino (arriba) o posición ribo (abajo). Una modificación 2'-arabino preferida es 2'-F. También se pueden hacer modificaciones similares a otras posiciones en el oligonucleótido, particularmente la posición 3' del azúcar en el nucleótido terminal 3' o en los oligonucleótidos 2'-5' ligados y la posición 5' del nucleótido terminal 5'. Los oligonucleótidos también pueden tener miméticos o sustitutos de azúcar (algunas veces referidos como análogos de ADN) tales como porciones de ciclobutilo en lugar del azúcar pentofuranosilo. Patentes Estadounidenses Representativas que muestran la preparación de tales estructuras modificadas de azúcar incluyen, pero no se limitan a, Patentes Estadounidenses Nos.: 4,981,957; 5,118,800; 5,319,080; 5,359,044; 5,393,878; 5,446,137; 5,466,786; 5,514,785; 5,519,134; 5,567,811; 5,576,427; 5,591,722; 5,597,909; 5,610,300; 5,627,053; 5,639,873; 5,646,265; 5,658,873; 5,670,633; 5,792,747; y 5,700,920, algunas de las cuales son de su propiedad con la presente solicitud, y cada una de las cuales se incorpora en la presente por referencia en su totalidad. En ciertas modalidades, los nucleósidos son modificados por recolocación del anillo ribosilo con un sistema de anillo sustituto tal como un anillo morfolino, un anillo ciclohexenilo, un anillo ciclohexilo o un anillo tetrahidropiranilo tal como uno que tiene uno de la fórmula:



000050

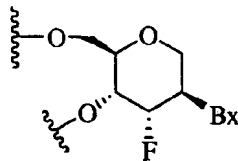
60

Muchos otros sistemas de anillo sustitutos de azúcar biciclo y triciclo también son conocidos en la técnica, que pueden ser usados para modificar nucleósidos para incorporación en compuestos antisentido (véase por ejemplo el artículo revisado: Leumann, Christian J.,). Tales sistemas de anillo pueden sufrir varias sustituciones adicionales para intensificar la actividad.

En una modalidad de la invención, el compuesto comprende al menos un nucleósido modificado por tetrahidropirano en donde un anillo de tetrahidropirano reemplaza el anillo de furanosa.

En otra modalidad de la invención, en donde cada uno de al menos un nucleósido modificado por tetrahidropirano tiene la estructura:

15



en donde Bx es una porción de base heterocíclica opcionalmente protegida.

20

Nucleobases Modificadas

Los oligonucleótidos pueden incluir también modificaciones o sustituciones de nucleobases (a menudo referidas en la técnica simplemente como "base"). Las modificaciones o sustituciones de núcleos base son estructuralmente distinguibles de, aún funcionalmente intercambiables con, nucleobases que se originan naturalmente o sintéticas no modificadas. Ambas nucleobases naturales y

000060

61

modificadas son capaces de participar en la unión de hidrógeno. Tales modificaciones de nucleobase pueden impartir estabilidad de nucleasa, afinidad de enlace o alguna otra propiedad biológica benéfica a compuestos antisentido.

- 5 Nucleobases modificadas incluyen nucleobases sintéticas y naturales tales como, por ejemplo, 5-metilcitocina (5-me-C). Ciertas sustituciones de nucleobase, que incluyen sustituciones de 5-metilcitocina, son particularmente útiles para incrementar la afinidad de enlace de un compuesto
- 10 antisentido para un ácido nucleico objetivo. Por ejemplo, sustituciones de 5-metilcitocina se han mostrado por incrementar la estabilidad doble del ácido nucleico por 0.6-1.2°C (Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. and Lebleu, B., eds., Antisense Research and Applications, CRC Press, Boca Ratón,
- 15 1993, pp. 276-278).

Nucleobases no modificadas adicionales incluyen 5-hidroximetil citocina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metil y otros derivados alquilo de adenina y guanina, 2-propilo y otros derivados alquilo de adenina y guanina, 2-

20 tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitocina, 5-halouracilo y citocina, 5-propinil($-C\equiv C-CH_3$)uracilo y citocina y otros derivados alquinilo de bases de pirimidina, 6-azo uracilo, citocina y timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo y otras 8-

25 adeninas y guaninas sustituidas, 5-halo particularmente 5-bromo, 5-trifluorometilo y otros 5-uracilos y citocinas sustituidos, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 2-F-adenina, 2-amino-adenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-desazaguanina y

62

7-desazaadenina y 3-desazaguanina y 3-desazaadenina.

Porciones de base heterocíclicas pueden incluir también aquellas en las cuales la base purina o pirimidina se reemplaza con otros heterociclos, por ejemplo 7-desaza-
5 adenina, 7-desazaguanosina, 2-aminopiridina y 2-piridona. Nucleobases que son particularmente útiles para incrementar la afinidad de enlace de compuestos antisentido incluyen pirimidinas 5-susituidas, 6-azapirimidinas y N-2, N-6 y O-6 purinas sustituidas, que incluyen 2 aminopropiladenina, 5-
10 propiniluracilo y 5-propinilcitocina.

En una modalidad, compuestos antisentido dirigidos a un ácido nucleico del CTGF comprenden una o más nucleobases modificadas. En una modalidad adicional, oligonucleótidos antisentido de apertura amplia dirigidos a un ácido nucleico
15 del CTGF comprenden una o más nucleobases modificadas. En algunas modalidades, la nucleobase modificada es 5-metilcitocina. En modalidades adicionales, cada citocina es una 5-metilcitocina.

Como se usa en la presente, nucleobases "no
20 modificadas" o "naturales" incluyen las bases de purina adenina (A) y guanina (G), y las bases de pirimidina timina (T), citocina (C) y uracilo (U).

Nucleobases modificadas incluyen otras nucleobases sintéticas y naturales tales como 5-metilcitocina (5-me-C),
25 5-hidroximetil citocina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metilo y otros derivados alquilo de adenina y guanina, 2-propilo y otros derivados alquilo de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitocina, 5-

000062

halouracilo y citocina, 5-propinilo ($-C\equiv C-CH_3$) uracilo y citocina y otros derivados alquinilo de bases de pirimidina, 6-azo uracilo, citocina y timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo y otras 8-adeninas sustituidas y guaninas, 5-halo particularmente 5-bromo, 5-trifluorometilo y otros 5-uracilos sustituidos y citocinas, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 2-F-adenina, 2-amino-adenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-desazaguanina y 7-desazaadenina y 3-desazaguanina y 3-desazaadenina. Nucleobases modificadas adicionales incluyen pirimidinas tricíclicas tales como fenoxazina citidina (1H-pirimido[5,4-b][1,4]benzoxazin-2(3H)-ona), fenotiazina citidina (1H-pirimido[5,4-b][1,4]benzotiazin-2(3H)-ona), abrazaderas-G tales como una fenoxazina citidina sustituida (por ejemplo, 9-(2-aminoetoxi)-H-pirimido[5,4-b][1,4]benzoxazin-2(3H)-ona), carbazol citidina (2H-pirimido[4,5-b]indol-2-ona), piridoindol citidina (H-pirido[3',2':4,5]pirrolo[2,3-d]pirimidin-2-ona). Nucleobases modificadas pueden incluir también aquellas en las cuales la base purina o pirimidina es reemplazada con otros heterociclos, por ejemplo 7-desaza-adenina, 7-desazaguanosina, 2-aminopiridina y 2-piridona. Nucleobases adicionales incluyen aquellas descritas en la Patente Estadounidense No. 3,687,808, aquellas descritas en la The Concise Encyclopedia Of Polimer Science and Engineering, páginas 858-859, Kroschwitz, J. I., ed. John Wiley & Sons, 1990, aquellas descritas por Englisch et al., Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613, y aquellas

000363

descritas por Sanghvi, Y. S., Chapter 15, Antisense Research and Applications, páginas 289- 302, Crooke, S. T. y Lebleu, B. ed., CRC Press, 1993.

Ciertas de estas nucleobases son particularmente
5 útiles para incrementar la afinidad de enlace de los
compuestos oligoméricos de la invención. Estas incluyen
pirimidinas 5-susituidas, 6-azapirimidinas y N-2, N-6 y O-6
purinas sustituidas, que incluyen 2-aminopropiladenina, 5-
propiniluracilo y 5-propinilcitocina. Sustituciones de 5-
10 metilcitocina se han mostrado por incrementar la estabilidad
doble del ácido nucleico por 0.6-1.2°C. (Sanghvi, Y. S.,
Crooke, S. T. and Lebleu, B., eds., Antisense Research and
Applications, CRC Press, Boca Ratón, 1993, pp. 276-278) y son
sustituciones base actualmente preferidas, aún más
15 particularmente cuando se combinan con modificaciones de
azúcar de 2'-O-metoxietilo.

Patentes Estadounidenses Representativas que
muestran la preparación de ciertas de las nucleobases
modificadas indicadas anteriormente así como también otras
20 nucleobases modificadas incluyen, pero no se limitan a, la
Patente Estadounidense indicada anteriormente No. 3,687,808,
así como también Patentes Estadounidenses Nos.: 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;
25 5,552,540; 5,587,469; 5,594,121, 5,596,091; 5,614,617;
5,645,985; 5,830,653; 5,763,588; 6,005,096; y 5,681,941,
algunas de las cuales son de su propiedad con la presente
solicitud, y cada una de las cuales se incorpora en la

000064

65

presente por referencia, y Patente Estadounidense No. 5,750,692, la cual tiene un propietario en común con los propietarios de la presente solicitud y también se incorpora en la presente por referencia.

5

Porciones de Compuestos Antisentido

En cierta modalidad de la invención, el compuesto comprende un oligonucleótido modificado comprendido de (a) un segmento de apertura que consiste de desoxinucleósidos
10 ligados, preferiblemente consiste de trece desoxinucleósidos modificados ligados; (b) un segmento de ala al 5' que consiste de nucleósidos modificados ligados, preferiblemente consiste de dos nucleósidos modificados ligados; y (c) un
15 segmento de ala al 3' que consiste de nucleósidos modificados ligados, preferiblemente consiste de cinco nucleósidos ligados; en donde el segmento de apertura se posiciona entre el segmento de ala al 5' y el segmento de ala al 3', y en donde cada nucleósido modificado dentro de cada segmento de ala comprende un azúcar modificado, preferiblemente comprende
20 un azúcar 2'-O-metoxietilo; y en donde cada enlace de internucleósido es un enlace de fosfotioato. Estos patrones de nucleótidos modificados en un compuesto antisentido son llamados porciones. Estas porciones, confieren a los compuestos antisentido propiedades tales como para
25 intensificar la actividad inhibidora, incrementar la afinidad de enlace para un ácido nucleico objetivo, o incrementar la resistencia a la degradación por nucleasas *in vivo*.

En ciertas modalidades, compuestos antisentido

000065

bb

dirigidos a un ácido nucleico del CTGF tienen subunidades químicamente modificadas arregladas en patrones, o porciones, para conferir a los compuestos antisentido propiedades tales como actividad inhibidora intensificada, afinidad de enlace incrementada para un ácido nucleico objetivo, o resistencia a la degradación por nucleasas *in vivo*.

Compuestos antisentido quiméricos típicamente contienen al menos una región modificada para conferir resistencia incrementada a la degradación de nucleasa, absorción celular incrementada, afinidad de enlace incrementada para el ácido nucleico objetivo, y/o actividad inhibidora incrementada. Una segunda región de un compuesto antisentido quimérico puede opcionalmente servir como un sustrato para la endonucleasa celular RNase H, la cual desdobla la hebra de ARN de un duplo de ARN:ADN.

Compuestos antisentido que tienen una porción de gapmer se consideran compuestos antisentido quiméricos. En un gapmer una región interna que tiene una pluralidad de nucleótidos que soporta el desdoblamiento de RNaseH se posiciona entre regiones externas que tienen una pluralidad de nucleótidos que son químicamente distintos de los nucleósidos de la región interna. En el caso de un oligonucleótido antisentido que tiene una porción de gapmer, el segmento de apertura en general sirve como el sustrato para el desdoblamiento de endonucleasa, mientras los segmentos de ala comprenden nucleósidos modificados. En una modalidad preferida, las regiones de un gapmer son diferenciadas por los tipos de porciones de azúcar que

000066

67

comprenden cada región distinta. Los tipos de porciones de azúcar que se usan para diferenciar las regiones de un gapmer pueden en algunas modalidades incluir β -D-ribonucleósidos, β -D-desoxi-ribonucleósidos, 2'-nucleósidos modificados (tales 5 2'-nucleósidos modificados pueden incluir 2'-MOE, y 2'-O-CH₃, entre otros), y nucleósidos modificados de azúcar bicíclicos (tales nucleósidos modificados de azúcar bicíclicos pueden incluir aquellos que tienen un puente 4'-(CH₂)_n-O-2', en donde n=1 o n=2). Preferiblemente, cada región distinta 10 comprende porciones de azúcar uniformes. La porción ala-apertura-ala es frecuentemente descrita como "X-Y-Z", en donde "X" representa la longitud de la región de ala al 5', "Y" representa la longitud de la región de apertura, y "Z" representa la longitud de la región de ala al 3'. Cualquiera 15 de los compuestos antisentido descritos en la presente puede tener una porción de gapmer. En algunas modalidades, X y Z son los mismos, en otras modalidades son diferentes. En una modalidad preferida, Y es entre 8 y 15 nucleótidos. X, Y o Z pueden ser cualquiera de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 20 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30 o más nucleótidos. De este modo, gapmers de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo 2-13-5, 5-10-5, 4-8-4, 4-12-3, 4-12-4, 3-14-3, 2-16-2, 1-18-1, 3-10-3, 2-10-2, 1-10-1 ó 2 - 8-2.

25 En algunas modalidades, el compuesto antisentido como una porción de "wingmer" ("ala mer"), que tiene una configuración de ala-apertura o apertura-ala, es decir, una configuración X- Y o Y-Z como se describe anteriormente para

000067

69

la configuración de gapmer. De este modo, configuraciones de wingmer de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo 5-10, 8-4, 4-12, 12-4, 3-14, 16-2, 18-1, 10-3, 2-10, 1-10 o 8-2.

5 En una modalidad, compuestos antisentido dirigidos a un ácido nucleico poseen una porción gapmer 5-10-5.

 En algunas modalidades, un compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico tiene una porción de apertura-amplia. En otras modalidades, un oligonucleótido antisentido
10 dirigido a un ácido nucleico tiene una porción de apertura-amplia.

 En una modalidad, un oligonucleótido antisentido de apertura-amplia dirigido a un ácido nucleico tiene un segmento de apertura de catorce 2'-desoxirribonucleótidos
15 posicionados entre segmentos ala de tres nucleósidos químicamente modificados. En una modalidad, la modificación química comprende una modificación de 2'-azúcar. En otra modalidad, la modificación química comprende una modificación de azúcar 2'-MOE.

20 Compuestos antisentido que tienen una porción de gapmer se consideran compuestos antisentido "quiméricos" o "quimeras," las cuales contienen dos o más regiones químicamente distintas, cada una hecha de al menos una unidad monomérica, es decir, un nucleótido en el caso de un
25 compuesto oligonucleótido. Estos oligonucleótidos típicamente contienen al menos una región modificada para conferir resistencia incrementada a la degradación de nucleasa, absorción celular incrementada, afinidad de enlace

000088

incrementada para el ácido nucleico objetivo, y/o actividad inhibidora incrementada. No es necesario para todas las posiciones en un compuesto dado ser uniformemente modificadas, y en efecto más de una de las modificaciones mencionadas anteriormente puede ser incorporada en un compuesto único o aún en un nucleósido único dentro de un oligonucleótido.

Una región adicional del oligonucleótido puede servir como un sustrato para enzimas capaces de desdoblar híbridos de ARN:ADN o ARN:ARN. Por medio del ejemplo, RNase H es una endonucleasa celular la cual desdobla la hebra de ARN de un duplo ARN:ADN. La activación de RNase H, por lo tanto, resulta en desdoblamiento del ARN objetivo, con ello intensificando mayormente la eficiencia de inhibición de oligonucleótido de la expresión del gen. Consecuentemente, resultados comparables se pueden obtener a menudo con oligonucleótidos más cortos cuando se usan oligonucleótidos quiméricos, comparados con desxosioligonucleótidos de fosforotioato hibridizando a la misma región objetivo. El desdoblamiento de ARN objetivo puede ser rutinariamente detectado por electroforesis en gel y, si es necesario, asociado a las técnicas de hibridización de ácido nucleico conocidas en el arte.

Compuestos antisentido quiméricos de la invención se pueden formar como estructuras compuestas de dos o más oligonucleótidos, oligonucleótidos modificados, oligonucleósidos y/o oligonucleótido miméticos como se describe anteriormente. Tales compuestos también han sido

000069

X

referidos en la técnica como híbridos o gapmeros. Patentes Estadounidenses Representativas que muestran la preparación de tales estructuras híbridas incluyen, pero no se limitan a, Patentes Estadounidenses Nos.: 5,013,830; 5,149,797; 5,220,007; 5,256,775; 5,366,878; 5,403,711; 5,491,133; 5,565,350; 5,623,065; 5,652,355; 5,652,356; y 5,700,922, algunas de las cuales son de su propiedad con la presente solicitud, y cada una de las cuales se incorpora en la presente por referencia en su totalidad.

En el caso de un oligonucleótido antisentido que tienen una porción de gapmer, el segmento de apertura en general sirve como el sustrato para desdoblamiento de endonucleasa, mientras los segmentos de ala comprenden nucleósidos modificados. En una modalidad preferida, las regiones de un gapmer son diferenciadas por los tipos de porciones de azúcar que comprenden cada región distinta. Los tipos de porciones de azúcar que se usan para diferenciar las regiones de un gapmer pueden incluir β -D-ribonucleósidos, β -D-desoxirribonucleósidos, 2'-nucleósidos modificados (tales 2'-nucleósidos modificados pueden incluir 2'-MOE), y nucleósidos modificados de azúcar bicíclicos.

Otra modificación de oligonucleótidos de la invención involucra enlazar químicamente al oligonucleótido uno o más porciones o conjugados los cuales intensifican la actividad, distribución celular o absorción celular del oligonucleótido. Los compuestos de la invención pueden incluir grupos conjugados covalentemente unidos a grupos funcionales tales como grupos hidroxilo primarios o

000070

X

secundarios. Grupos conjugados de la invención incluyen intercaladores, moléculas reporteras, poliaminas, poliamidas, polietilen glicoles, poliéteres, grupos que intensifican las propiedades farmacodinámicas de oligómeros, y grupos que
5 intensifican las propiedades farmacocinéticas de oligómeros. Grupos de conjugados típicos incluyen colesteroles, lípidos, fosfolípidos, biotina, fenazina, folato, fenantridina, antraquinona, acridina, fluoresceínas, rodaminas, cumarinas y tintes. Grupos que intensifican las propiedades
10 farmacodinámicas, en el contexto de esta invención, incluyen grupos que mejoran la absorción de oligómeros, intensifican la resistencia del oligómero a degradación y/o refuerzan la hibridización específica de la secuencia con ARN. Grupos que intensifican las propiedades farmacocinéticas, en el contexto
15 de esta invención, incluyen grupos que mejoran la absorción, distribución, metabolismo o excreción del oligómero. Grupos conjugados representativos son descritos en la Solicitud de Patente Internacional PCT/US92/09196, presentada el 23 de Oct. de 1992, la descripción completa de la cual se incorpora
20 en la presente por referencia. Porciones de conjugados incluyen pero no se limitan a porciones lípidas tales como una porción de colesterol (Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 6553-6556), ácido cólico (Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Let., 1994, 4, 1053-1060), un
25 tioéter, por ejemplo, hexil-S-tritiltiol (Manoharan et al., Ann. N. Y. Acad. Sci., 1992, 660, 306-309; Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Let., 1993, 3, 2765-2770), un tiocolesterol (Oberhauser et al., Nucl. Acids Res., 1992, 20,

000071

22

533-538), una cadena alifática, por ejemplo, residuos dodecandiol o undecilo (Saison-Behmoaras et al., EMBO J., 1991, 10, 1111-1118; Kabanov et al., FEBS Lett., 1990, 259, 327-330; Svinarchuk et al., Biochimie, 1993, 75, 49-54), un fosfolípido, por ejemplo, di-hexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato de trietil-amonio (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654; Shea et al., Nucl. Acids Res., 1990, 18, 3777-3783), una poliamina o una cadena de polietilenglicol (Manoharan et al., Nucleósidos & Nucleótidos, 1995, 14, 969-973), o ácido adamantanacético (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654), una porción de palmitilo (Mishra et al., Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264, 229-237), o una porción de octadecilamina u hexilamino-carbonil-oxicolesterol (Crooke et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277, 923-937). Los oligonucleótidos de la invención también pueden ser conjugados a sustancias de fármacos activos, por ejemplo, aspirina, warfarina, fenilbutazona, ibuprofeno, suprofeno, fenbufeno, cetoprofeno, (S)-(+)- pranoprofeno, carprofeno, dansilsarcosina, ácido 2,3,5-triyodobenzoico, ácido flufenámico, ácido folínico, una benzotiadiazida, clorotiazida, una diazepina, indometacina, un barbiturato, una cefalosporina, un fármaco sulfa, un antidiabético, un antibacteriano o un antibiótico. Conjugados de oligonucleótido-fármaco y su preparación se describen en la Solicitud de Patente Estadounidense Ser. No. 09/334,130 (presentada el 15 de Junio de 1999) la cual se incorpora en la presente por referencia en su totalidad.

000072

Patentes Estadounidenses Representativas que muestran la preparación de tales conjugados de oligonucleótido incluyen, pero no se limitan a, Patentes

Estadounidenses Nos.: 4,828,979; 4,948,882; 5,218,105;

5 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;

10 4,958,013; 5,082,830; 5,112,963; 5,214,136; 5,082,830;

5,112,963; 5,214,136; 5,245,022; 5,254,469; 5,258,506;

5,262,536; 5,272,250; 5,292,873; 5,317,098; 5,371,241,

5,391,723; 5,416,203, 5,451,463; 5,510,475; 5,512,667;

5,514,785; 5,565,552; 5,567,810; 5,574,142; 5,585,481;

15 5,587,371; 5,595,726; 5,597,696; 5,599,923; 5,599,928 y

5,688,941, algunas de las cuales son de su propiedad con la presente solicitud, y cada una de las cuales se incorpora en la presente por referencia.

20 En otra modalidad de la invención, el compuesto comprende el oligonucleótido modificado consiste de 20 nucleósidos ligados.

En una modalidad preferida de la invención, el compuesto que comprende la secuencia de nucleobase es la secuencias expuesta en las SEC ID NOs: 39, 40, 45, 52 y 166.

25 En una modalidad de la invención la composición comprende un oligonucleótido modificado que comprende nucleósidos ligados, la secuencia de nucleobase la cual es una secuencia expuesta en una de las SEC ID NOs: 28, 30,

000073

74

39, 40, 43, 44, 45, 50, 51, 52, 56, 78, 125 y 166 o una sal de la misma, y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica.

5 En una modalidad de la invención, el compuesto antisentido es complementario dentro de un intervalo de nucleótidos en la secuencia del CTGF. En ciertas modalidades el compuesto antisentido es complementario dentro del intervalo de nucleótidos 718-751, 1388-1423, 1457-1689, 2040-
10 2069, 2120-2147, o 2267-2301 de la SEC ID NO: 9. En una cierta modalidad el compuesto antisentido es complementario dentro del intervalo de nucleótidos 2728-2797 de la SEC ID NO: 10. Compuestos dirigidos a estos intervalos demuestran al menos 50% de inhibición (es decir, SEC ID NOs: 15, 29, 31,
15 42, 46-49, 53, 72, 81, 82, 152-154, 164, y 165). Ciertos sitios objetivos listados en la Tabla 1 también demuestran al menos 50% de inhibición (es decir, SEC ID NOs: 12, 20, 33, 34, 76, 107, 129, 132, 134, 136, y 146). En ciertas modalidades el compuesto antisentido es complementario dentro
20 del intervalo de nucleótidos 553-611, 1394-1423, 1469-1508, 1559-1605, 1659-1689 o 2100-2129 de la SEC ID NO: 9 y 2623-2647 de la SEC ID NO: 10. Compuestos dirigidos aquí demuestran al menos 60% de inhibición (es decir, SEC ID NOs: 27, 28, 38, 39, 40, 43, 44, 45, 50, 51, 52, 54, 55, 56, 77,
25 78, 79, 138 y 139). Ciertos sitios objetivos adicionales listados en la Tabla 1 también demuestran al menos 60% de inhibición (es decir, SEC ID NOs: 24, 30, 61, 63, 67, 69, 73, 86, 125, 128, y 161). En ciertas modalidades el compuesto

000074

X

antisentido es complementario dentro del intervalo de nucleótidos 1399-1423. Compuestos dirigidos aquí demuestran al menos 70% de inhibición (es decir, SEC ID NOs: 39 y 40). Ciertos sitios objetivos listados en la Tabla 1 también demuestran al menos 70% de inhibición (es decir, SEC ID NOs: 28, 30, 44, 45, 51, 56, 78, 128, y 138). Un sitio objetivo listado en la Tabla 1 también demuestra al menos 80% de inhibición (es decir, SEC ID NO: 44). En ciertas modalidades, el porcentaje de inhibición se logra cuando el compuesto antisentido se suministra a células HuVec a una concentración de 50nm. Para más detalles se proporciona en la presente referencia al Ejemplo 8.

En una modalidad de la composición, el oligonucleótido modificado es un oligonucleótido de hebra única o hebra doble. En otra modalidad de la invención, comprende un oligonucleótido modificado, en donde el oligonucleótido modificado consiste de 20 nucleósidos ligados.

En otra modalidad de la invención, se proporciona un método para inhibir la expresión del factor de crecimiento del tejido conectivo en una célula o un tejido el cual comprende poner en contacto la célula o tejido con el compuesto de interés bajo condiciones de manera que la expresión del factor de crecimiento del tejido conectivo se inhibe.

Composiciones y Métodos para Formular Composiciones Farmacéuticas

000075

76

Los oligonucleótidos antisentido pueden ser mezclados con sustancias inertes y/o activas farmacéuticamente aceptables para la preparación de composiciones o formulaciones farmacéuticas. Composiciones y métodos para la formulación de composiciones farmacéuticas son dependientes de un número de criterios, que incluyen, pero no se limitan a, ruta de administración, extensión de la enfermedad o dosis a ser administrada.

Compuestos antisentido dirigidos a un ácido nucleico pueden ser utilizados en composiciones farmacéuticas combinando el compuesto antisentido con un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable adecuado. Un diluyente farmacéuticamente aceptable incluye salina amortiguada con fosfato (PBS). El PBS es un diluyente adecuado para uso en composiciones a ser suministradas parenteralmente. Por consiguiente, en una modalidad, empleado en los métodos descritos en la presente está una composición farmacéutica que comprende un compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico y un diluyente farmacéuticamente aceptable. En una modalidad, el diluyente farmacéuticamente aceptable es PBS. En otra modalidad, el diluyente farmacéuticamente aceptable es salina de grado farmacéutico o PBS de grado farmacéutico. En otras modalidades, el compuesto antisentido es un oligonucleótido antisentido.

Composiciones farmacéuticas que comprenden compuestos antisentido abarcan algunas sales farmacéuticamente aceptables, ésteres, o sales de tales ésteres, o cualquier otro oligonucleótido el cual, después de

000076

X

la administración a un animal, que incluye un humano, es capaz de proporcionar (directamente o indirectamente) el residuo o metabolito del mismo biológicamente activo. Por consiguiente, por ejemplo, la descripción también se dirige a sales farmacéuticamente aceptables de compuestos antisentido, profármacos, sales farmacéuticamente aceptables de tales profármacos, y otros bioequivalentes. Sales farmacéuticamente aceptables adecuadas incluyen, pero no se limitan a, sales de sodio y potasio.

10 Un profármaco puede incluir la incorporación de nucleósidos adicionales en uno o ambos extremos de un compuesto antisentido los cuales son desdoblados por nucleasas endógenas dentro del cuerpo, para formar el compuesto antisentido activo. En particular, versiones de
15 profármaco de los oligonucleótidos de la invención se preparan como derivados de SATE [(S-acetil-2-tioetil)fosfato] de conformidad con los métodos descritos en WO 93/24510 por Gosselin et al., publicado el 9 de Dic. de 1993 o en el documento WO94/26764 y Patente Estadounidense No. 5,770,713
20 por Imbach et al.

El término "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales farmacéuticamente y fisiológicamente aceptables de los compuestos de la invención: es decir, sales que retienen la actividad biológica deseada del compuesto
25 precursor y no imparten efectos toxicológicos indeseados a estos.

Sales de adición de base farmacéuticamente aceptables se forman con metales o aminas, tales como álcalis

000077

79

y metales alcalinotérreos o aminas orgánicas. Ejemplos de metales usados como cationes son sodio, potasio, magnesio, calcio y similares. Ejemplos de aminas adecuadas son N,N'-dibenciletilendiamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, 5 diciclohexilamina, etilendiamina, N-metilglucamina, y procaína (véase, por ejemplo, Berge et al., "Pharmaceutical Salts," J. of Pharma Sci., 1977, 66, 1-19). Las sales de adición de base de los compuestos ácidos se preparan poniendo en contacto la forma de ácido libre con una cantidad 10 suficiente de la base deseada para producir la sal en una manera convencional. La forma de ácido libre puede ser regenerada poniendo en contacto la forma de sal con un ácido y aislar el ácido libre en la manera convencional. La forma de ácido libre difiere de sus formas de sal respectivas un 15 poco en ciertas propiedades fisiológicas tales como solubilidad en solventes polares, pero de otro modo las sales son equivalentes a su ácido libre respectivo para propósitos de la presente invención. Como se usa en la presente, una "sal de adición farmacéutica" incluye una sal 20 farmacéuticamente aceptable de una forma de ácido de uno de los componentes de las composiciones de la invención. Estas incluyen sales de ácido orgánico o inorgánico de las aminas. Sales de ácido preferidas son los clorhidratos, acetatos, salicilatos, nitratos y fosfatos. Otras sales 25 farmacéuticamente aceptables adecuadas son bien conocidas por aquellos expertos en la técnica e incluyen sales básicas de una variedad de ácidos orgánicos e inorgánicos, tales como, por ejemplo, con ácidos inorgánicos, tales como por ejemplo

000073

A

ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico o ácido fosfórico; con ácidos sulfo o fosfo, sulfónico, carboxílico orgánicos, o ácido sulfámicos N-sustituídos, por ejemplo ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido succínico, ácido maleico, ácido hidroximaleico, ácido metilmaleico, ácido fumárico, ácido málico, ácido tartárico, ácido láctico, ácido oxálico, ácido glucónico, ácido glucárico, ácido glucurónico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido salicílico, ácido 4-aminosalicílico, ácido 2-fenoxibenzoico, ácido 2-acetoxibenzoico, ácido embónico, ácido nicotínico o ácido isonicotínico; y con aminoácidos, tales como los 20 alfa-aminoácidos involucrados en la síntesis de proteínas en la naturaleza, por ejemplo ácido glutámico o ácido aspártico, y también con ácido fenilacético, ácido metansulfónico, ácido etansulfónico, ácido 2-hidroxietansulfónico, ácido etan-1,2-disulfónico, ácido bencensulfónico, ácido 4-metilbencensulfónico, ácido naftalen-2-sulfónico, ácido naftalen-1,5-disulfónico, 2- o 3-fosoglicerato, glucosa-6-fosfato, ácido N-ciclohexilsulfámico (con la formación de ciclamatos), o con otros compuestos orgánicos de ácido, tales como ácido ascórbico. Sales farmacéuticamente aceptables de compuestos también se pueden preparar con un catión farmacéuticamente aceptable. Cationes farmacéuticamente aceptables adecuados son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica e incluyen cationes alcalinos, alcalinotérreos, amonio y amonio cuaternario. Carbonatos o carbonatos de hidrógeno también son posibles.

000079

80

Para oligonucleótidos, ejemplos preferidos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen pero no se limitan a (a) sales formadas con cationes tales como sodio, potasio, amonio, 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, ácido benzoico, ácido tánico, ácido palmítico, ácido alginico, ácido poliglutámico, ácido naftalensulfónico, ácido metansulfónico, ácido p-toluensulfónico, ácido naftalendisulfónico, ácido poligalacturónico, y similares; y (d) sales formadas de aniones elementales tales como cloro, bromo y yodo.

En cierta modalidad de la invención, un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable es un ingrediente en una composición que carece de actividad farmacológica, pero es farmacéuticamente necesaria o deseable como un solvente, agente de suspensión o cualquier otro vehículo farmacéuticamente inerte para suministro de uno o más ácido nucleicos a un humano o animal no humano. Portadores farmacéuticos son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica.

Portadores

000080

21

Ciertas composiciones de la presente invención también incorporan compuestos portadores en la formulación. Como se usa en la presente, "compuesto portador" o "portador" puede referirse a un ácido nucleico, o análogo del mismo, el cual es inerte (es decir, no posee actividad biológica *per se*) pero es reconocido como un ácido nucleico por procesos *in vivo* que reducen la biodisponibilidad de un ácido nucleico que tiene actividad biológica mediante, por ejemplo, degradando el ácido nucleico biológicamente activo o promoviendo su remoción de la circulación. La coadministración de un ácido nucleico y un compuesto portador, típicamente con un exceso de la última sustancia, puede resultar en una reducción sustancial de la cantidad de ácido nucleico recuperado en el hígado, riñón u otros reservorios extracirculatorios, presumiblemente debido a competición entre el compuesto portador y el ácido nucleico para un receptor común. Por ejemplo, la recuperación de un oligonucleótido parcialmente fosforotioato en tejido hepático puede ser reducida cuando se coadministra con ácido poliinosínico, sulfato de dextrano, ácido policitídico o ácido 4-acetamido-4'isotiociano-estilben-2,2'-disulfónico (Miyao et al., Antisense Res. Dev., 1995, 5, 115-121; Takakura et al., Antisense & Nucl. Acid Drug Dev., 1996, 6, 177-183).

Excipientes

Contrario a un compuesto portador, un "excipiente" o "portador farmacéutico" es un solvente farmacéuticamente

000081

2
99

aceptable, agente de suspensión o cualquier otro vehículo farmacológicamente inerte para suministrar uno o más ácido nucleicos a un animal. El excipiente puede ser líquido o sólido y se selecciona, con la manera de administración planeada en mente, para proporcionar el volumen deseado, consistencia, etc., cuando se combina con un ácido nucleico y los otros componentes de una composición farmacéutica dada. Farmacéuticos portadores típicos incluyen, pero no se limitan a, agentes enlazantes (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa, etc.); rellenos (por ejemplo, lactosa y otros azúcares, celulosa microcristalina, pectina, gelatina, sulfato de calcio, etilcelulosa, poliacrilatos o fosfato hidrógeno de calcio, etc.); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco, sílice, dióxido de silicio coloidal, ácido esteárico, estearatos metálicos, aceites vegetales hidrogenados, almidón de maíz, polietilenglicoles, benzoato de sodio, acetato de sodio, etc.); desintegrantes (por ejemplo, almidón, glicolato almidón sódico, etc.); y agentes humectantes (por ejemplo, laurilsulfato de sodio, etc.).

Excipientes orgánicos o inorgánicos farmacéuticamente aceptables adecuados para administración no parenteral los cuales no reacciona deletéreamente con ácidos nucleicos también pueden ser usados para formular las composiciones de la presente invención. Portadores farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, pero no se limitan a, agua, soluciones de sal, alcoholes,

000082

93

polietilenglicoles, gelatina, lactosa, amilosa, estearato de magnesio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidona y similares.

Formulaciones para administración tópica de ácidos nucleicos pueden incluir soluciones acuosas estériles y no estériles, soluciones no acuosas en solventes comunes tales como alcoholes, o soluciones de los ácidos nucleicos en bases aceitosas líquidas o sólidas. Las soluciones también pueden contener amortiguadores, diluyentes y otros aditivos adecuados. También se pueden usar excipientes orgánicos o inorgánicos farmacéuticamente aceptables adecuados para administración no parenteral los cuales no reaccionan deletéreamente con ácido nucleicos.

En una modalidad de la invención, la composición comprende un oligonucleótido modificado que comprende un oligonucleótido de hebra única o de doble hebra, y en donde el oligonucleótido modificado consiste de 20 nucleósidos ligados.

En otra modalidad de la invención involucra un método para inhibir la expresión del factor de crecimiento del tejido conectivo en una célula o un tejido el cual comprende poner en contacto la célula o tejido con cualquiera de los compuestos mencionados anteriormente bajo condiciones de manera que la expresión del factor de crecimiento del tejido conectivo se inhibe.

En cierta modalidad de la invención involucra un método para tratar un animal que tiene una enfermedad o condición asociada con la expresión del factor de crecimiento

000083

94

del tejido conectivo el cual comprende administrar al animal una cantidad del compuesto descrito en la presente anteriormente, efectiva para inhibir la expresión del factor de crecimiento del tejido conectivo para con ello tratar al animal.

En la práctica del método de esta invención, un animal incluye un humano así como también un animal no humano, preferiblemente humano.

La presente invención también incluye composiciones farmacéuticas y formulaciones las cuales incluyen los compuestos antisentido de la invención. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden ser administradas en un número de formas que dependen de si el tratamiento local o sistémico se desea y sobre el área a ser tratada. La administración puede ser tópica (que incluye membranas oftálmica y/o mucosas que incluyen suministro vaginal y rectal), pulmonar, por ejemplo, por inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, que incluyen nebulizador; intratraqueal, intranasal, epidermal y transdérmico), oral o parenteral. La administración parenteral incluye inyección o infusión intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular; o intracraneal, por ejemplo, administración intratecal o intraventricular. Oligonucleótidos con al menos una modificación 2'-O-metoxietilo se cree son particularmente útiles para administración oral.

Composiciones farmacéuticas y formulaciones para administración tópica pueden incluir parches transdérmicos,

000084

as

ungüentos, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, atomizadores, líquidos y polvos. Farmacéuticos portadores convencionales, bases acuosas, en polvo o aceitosas, espesantes y similares pueden ser necesarias o deseables.

5 Condonos revestidos, guantes similares también pueden ser útiles. Formulaciones tópicas preferidas incluyen aquellas en las cuales los oligonucleótidos de la invención están en mezcla con un agente de suministro tópico tales como lípidos, liposomas, ácidos grasos, ésteres de ácido graso, esteroides, 10 agentes quelantes y tensoactivos. Lípidos y liposomas preferidos incluyen neutral (por ejemplo, dioleoilfosfatidil DOPE etanolamina, dimiristoilfosfatidil colina DMPC, diestearoilfosfatidil colina) negativo (por ejemplo, dimiristoilfosfatidil glicerol DMPG) y catiónico (por 15 ejemplo, dioleoiltetrametilaminopropilo DOTAP y dioleoilfosfatidil etanolamina DOTMA). Oligonucleótidos de la invención se pueden encapsular dentro de liposomas o pueden formar complejos de estos, en particular a liposomas catiónicos. Alternativamente, los oligonucleótidos se pueden 20 formar en complejos a lípidos, en particular a lípidos catiónicos. Ácidos grasos y ésteres preferidos incluyen pero no se limitan a ácido araquidónico, ácido oleico, ácido eicosanoico, ácido láurico, ácido caprílico, ácido cáprico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido 25 linoleico, ácido linolénico, dicaprato, tricaprato, monooleína, dilaurina, 1-monocaprato de glicerilo, 1-dodecilazacicloheptan-2-ona, una acilcarnitina, una acilcolina, o un alquiléster C₁-C₁₀ (por ejemplo,

000085

66

isopropilmiristato IPM), monoglicérido, diglicérido o sal del mismo farmacéuticamente aceptable. Formulaciones tópicas se describen en detalle en la Solicitud de Patente Estadounidense Serie No. 09/315,298 presentada el 20 de Mayo de 1999 la cual se incorpora en la presente por referencia en su totalidad.

Composiciones y formulaciones para administración oral incluyen polvos o gránulos, micropartículas, nanopartículas, suspensiones o suspensiones en medio acuoso o no acuoso, cápsulas, cápsulas de gel, saquillos, tabletas o minitabledas. Espesantes, agentes saborizantes, diluyentes, emulsificantes, auxiliares dispersantes o aglutinantes pueden ser deseables. Formulaciones orales preferidas son aquellas en las cuales los oligonucleótidos de la invención se administran en conjunto con uno o más intensificadores de penetración, tensoactivos y quelantes. Tensoactivos preferidos incluyen ácidos grasos y/o ésteres o sales de los mismos, ácidos biliares y/o sales de los mismos. Ácidos/sales biliares preferidos incluyen ácido quenodesoxicólico (CDCA) y ácido ursodesoxiquenodesoxicólico (UDCA), ácido cólico, ácido deshidrocólico, ácido desoxicólico, ácido glucólico, ácido glicólico, ácido glicodesoxicólico, ácido taurocólico, ácido taurodesoxicólico, tauro-24 sódico, 25-dihidro-fusidato, glicodihidrofusidato sódico. Ácidos grasos preferidos incluyen ácido araquidónico, ácido undecanoico, ácido oleico, ácido láurico, ácido caprílico, ácido cáprico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoleico, ácido linolénico, dicaprato, tricaprato, monooleína,

000086

27

dilaurina, 1-monocaprato de glicerilo, 1-dodecilazacicloheptan-2-ona, una acilcarnitina, una acilcolina, o un monoglicérido, un diglicérido o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, sodio).

- 5 También son preferidas combinaciones de intensificadores de penetración, por ejemplo, ácidos grasos/sales en combinación con ácidos/sales biliares. Una combinación particularmente preferida es la sal sódica de ácido láurico, ácido cáprico y UDCA. Intensificadores adicionales de la penetración incluyen
- 10 polioxietilen-9-lauril éter, polioxietilene-20-cetil éter. Oligonucleótidos de la invención pueden ser suministrados oralmente en forma granular que incluye partículas secadas por atomización, o en complejo para formar micro o nanopartículas. Agentes que forman complejos de
- 15 oligonucleótidos incluyen poli-amino ácidos; poliiminas; poliacrilatos; polialquilacrilatos, polioxetanos, polialquilcianoacrilatos; gelatinas cationizadas, albúminas, almidones, acrilatos, polietileneglicoles (PEG) y almidones; polialquilcianoacrilatos; poliiminas derivadas de DEAE,
- 20 pululanos, celulosas y almidones. Agentes formadores de complejos particularmente preferidos incluyen quitosán, N-trimetilquitosán, poli-L-lisina, polihistidina, poliornitina, poliesperminas, protamina, polivinilpiridina, politiodietilaminometil-etileno P(TDAE), poliaminoestireno
- 25 (por ejemplo, p-amino), poli(metilcianoacrilato), poli(etilcianoacrilato), poli(butilcianoacrilato), poli(isobutilcianoacrilato), poli (iso-hexilcianoacrilato), DEAE-metacrilato, DEAE-hexilacrilato, DEAE-acrilamida, DEAE-

000087

GK

albúmina y DEAE-dextrano, polimetil-acrilato, polihexilacrilato, poli(ácido D,L-láctico), poli(ácido DL-láctico-co-glicólico) (PLGA), alginato, y polietilenglicol (PEG). Formulaciones orales para oligonucleótidos y su
5 preparación se describen en detalle en las Solicitudes Estadounidenses Serie No. 08/886,829 (presentada el 1 de Julio de 1997), Serie No. 09/108,673 (presentada el 1 de Julio de 1998), Serie No. 09/256,515 (presentada el 23 de Febrero de 1999), Serie No. 09/082,624 (presentada el 21 de
10 Mayo de 1998) y Serie No. 09/315,298 (presentada el 20 de Mayo de 1999) cada una de las cuales se incorpora en la presente por referencia en su totalidad.

Composiciones y formulaciones para administración parenteral, intratecal o intraventricular pueden incluir
15 soluciones acuosas estériles las cuales también pueden contener amortiguadores, diluyentes y otros aditivos adecuados tales como, pero no se limitan a, intensificadores de la penetración, compuestos portadores y otros portadores o excipientes farmacéuticamente aceptables.

20 Las composiciones de la presente invención, incluyen, pero no se limitan a, formulaciones que contienen soluciones, emulsiones y liposomas. Estas composiciones se pueden generar de una variedad de componentes que incluyen, pero no se limitan a, líquidos preformados, sólidos auto-
25 emulsificantes y semisólidos auto-emulsificantes.

Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención, las cuales pueden convenientemente ser presentados en forma de dosificación unitaria, pueden ser preparadas de

000088

99

conformidad con las técnicas convencionales bien conocidas en la industria farmacéutica. Las técnicas incluyen la etapa de llevar en asociación con los ingredientes activos con los portadores o excipientes farmacéuticos. En general, las formulaciones se preparan uniformemente o íntimamente llevando en asociación los ingredientes activos con portadores líquidos o portadores sólidos finamente divididos o ambos, y entonces, si es necesario, formar el producto.

Las composiciones de la presente invención se puede formular en cualquiera de muchas de las formas de dosificación posibles tales como, pero no se limitan a, tabletas, cápsulas, cápsulas de gel, jarabes líquidos, geles suaves, supositorios y enemas. Las composiciones de la presente invención también se pueden formular como suspensiones en medio acuoso, no acuoso o mixto. Las suspensiones además contener sustancias las cuales incrementan la viscosidad de la suspensión que incluye, por ejemplo, carboximetil-celulosa de sodio, sorbitol y/o dextrano. La suspensión puede también contener estabilizadores.

En una modalidad de la presente invención, las composiciones farmacéuticas se pueden formular y usar como espumas. Espumas farmacéuticas incluyen formulaciones tales como, pero no se limitan a, emulsiones, microemulsiones, cremas, jaleas y liposomas. Mientras básicamente de forma similar en la naturaleza, estas formulaciones varían en los componentes y la consistencia del producto final. La preparación de las composiciones y formulaciones es

000089

generalmente conocida por aquellos expertos en las técnicas farmacéuticas y de formulación, y se pueden aplicar a la formulación de las composiciones de la presente invención.

5 Emulsiones

Las composiciones de la presente invención, se pueden preparar y formular como emulsiones. Las emulsiones son sistemas típicamente heterogéneos de un líquido dispersado en otro en la forma de gotas usualmente que
10 exceden 0.1 μ m de diámetro. (Idson, en Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volumen 1, p. 199; Rosoff, en Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Volumen 1,
15 p. 245; Block in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volumen 2, p. 335; Higuchi et al., en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 301). Las emulsiones son a menudo sistemas bifásicos
20 que comprenden dos fases líquidas inmiscibles íntimamente mezcladas y dispersadas entre sí. En general, las emulsiones pueden ser ya sea agua en aceite (a/ac) o de la variedad aceite en agua (ac/a). Cuando la fase acuosa es finamente dividida en y dispersada como gotas diminutas en una fase
25 aceitosa en volumen, la composición resultante es llamada una emulsión agua en aceite (a/ac). Alternativamente, cuando una fase aceitosa es finamente dividida en y dispersada como gotas diminutas en una fase acuosa en volumen, la composición

resultante es llamada una emulsión aceite en agua (ac/a). Las emulsiones pueden contener componentes adicionales en adición a las fases dispersadas y el fármaco activo el cual puede estar presente como una solución en ya sea fase acuosa, fase
5 aceitosa o por sí misma como una fase separada. Los excipientes farmacéuticos tales como emulsificadores, estabilizadores, tintes y anti-oxidantes pueden también estar presentes en emulsiones como se necesiten. Las emulsiones farmacéuticas pueden también ser emulsiones múltiples que
10 están comprendidas de más de dos fases tales como, por ejemplo, en el caso de emulsiones aceite en agua en aceite (ac/a/ac) y agua en aceite en agua (a/ac/a). Estas formulaciones en complejo a menudo proporcionan ciertas ventajas que las emulsiones binarias simples no. Las
15 emulsiones múltiples en las cuales las gotas de aceite individuales de una emulsión ac/a adjunta gotas de agua pequeñas que constituyen una emulsión a/ac/a. Igualmente un sistema de gotas de aceite adjuntadas en glóbulos de agua estabilizada en uno aceitoso continuo, proporciona una
20 emulsión ac/a/ac.

Las emulsiones se caracterizan por poca o nada de estabilidad termodinámica. A menudo, la fase dispersada o discontinua de la emulsión es así dispersada en la fase externa o continua y mantenida en esta forma a través de los
25 medios de emulsificadores o la viscosidad de la formulación. Cualquiera de las fases de la emulsión puede ser un semisólido o un sólido, como es el caso de bases para ungüentos de tipo emulsión y cremas. Otros medios para

92

emulsiones estabilizantes implican el uso de emulsificadores que pueden ser incorporados en cualquier fase de la emulsión. Los emulsificadores pueden ampliamente ser clasificados en cuatro categorías: tensoactivos sintéticos, emulsificadores que se originan naturalmente, bases de absorción y sólidos finamente dispersadas (Idson, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volumen 1, p. 199).

Tensoactivos sintéticos, también conocidos como agentes activos de superficie, han encontrado amplia aplicabilidad en la formulación de emulsiones y se han revisado en la literatura (Rieger, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volumen 1, p. 285; Idson, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, volumen 1, p. 199). Los tensoactivos son típicamente anfifílicos y comprenden una porción hidrofílica y una porción hidrofóbica. La proporción de la naturaleza hidrofílica a la hidrofóbica del tensoactivo se ha denominado el balance hidrofílico/lipofílico (HLB) y es una herramienta valiosa para categorizar y seleccionar tensoactivos en la preparación de formulaciones. Los tensoactivos se puede clasificar en diferentes clases en base a la naturaleza del grupo hidrofílico: no iónico, aniónico, catiónico y anfotérico (Rieger, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volumen 1, p. 285).

000092

93

Emulsificadores que se originan naturalmente usados en formulaciones de emulsión incluyen lanolina, cera de abeja, fosfátidos, lecitina y acacia. Las bases de absorción poseen propiedades hidrofílicas tales que pueden absorber

5 agua para formar emulsiones a/ac, aún retener sus consistencias de semisólido, tal como lanolina anhidra y petrolato hidrofílico. También se han usado sólidos finamente divididos como buenos emulsificadores, especialmente en combinación con tensoactivos y en preparaciones viscosas.

10 Estas incluyen sólidos inorgánicos polares, tales como hidróxidos de metal pesado, arcillas sin abultamiento tales como bentonita, atapulgita, hectorita, caolín, montmorillonita, silicato de aluminio coloidal y silicato de aluminio de magnesio coloidal, pigmentos y sólidos no polares

15 tales como triestearato de carbono o glicerilo.

También se incluyen una amplia variedad de materiales no emulsificantes en formulaciones de emulsión y contribuyen a las propiedades de emulsiones. Estas incluyen

grasas, aceites, ceras, ácidos grasos, alcoholes grasos,

20 ésteres grasos, humectantes, coloides hidrofílicos, preservativos y antioxidantes (Block, en Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volumen 1, p. 335; Idson, en Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and

25 Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volumen 1, p. 199).

Coloides o hidrocoloides hidrofílicos incluyen gomas que se originan naturalmente y polímeros sintéticos tales

000093

94

como polisacáridos (por ejemplo, acacia, agar, ácido
algínico, carragenano, goma guar, goma de karaya y
tragacanto), derivados de celulosa (por ejemplo,
carboximetilcelulosa y carboxipropilcelulosa), y polímeros
5 sintéticos (por ejemplo, carbómeros, éteres de celulosa y
polímeros de carboxivinilo). Estos desaparecen o se hinchan
en agua para formar soluciones coloidales que estabilizan
emulsiones formando películas interfaciales fuertes alrededor
de las gotas de fase dispersada e incrementando la viscosidad
10 de la fase externa.

Ya que las emulsiones a menudo contienen un número
de ingredientes tales como carbohidratos, proteínas,
esteroles y fosfáticos que pueden fácilmente soportar el
crecimiento de microbios, estas formulaciones a menudo
15 incorporan preservativos. Preservativos comúnmente usados
incluidos en las formulaciones de emulsión incluyen metil
parabeno, propil parabeno, sales de amonio cuaternario,
cloruro de benzalconio, ésteres de ácido p-hidroxibenzoico y
ácido bórico. Los antioxidantes también son comúnmente
20 agregados a formulaciones de emulsión para prevenir el
deterioro de la formulación. Los antioxidantes usados pueden
ser depuradores de radical libre tales como tocoferoles,
alquil galatos, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno
butilado, o agentes de reducción tal como ácido ascórbico y
25 metabisulfito de sodio, y antioxidantes sinérgicos tal
como ácido cítrico, ácido tartárico y lecitina.

La aplicación de formulaciones de emulsión vía ruta
dermatológica, oral y parenteral y métodos para su

000094

98

manufactura, se han revisado en la literatura (Idson, en Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, INC., New York, N.Y., volumen 1, p. 199). Las formulaciones de emulsión para suministro oral han sido muy ampliamente usadas debido a las razones de fácil formulación, eficacia de un punto de vista de absorción y biodisponibilidad. (Rosoff, en Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volumen 1, p. 245; Idson, en Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volumen 1, p. 199). Laxantes a base de aceite mineral, vitaminas solubles en agua y preparaciones nutritivas altas en grasa están entre los materiales que se han comúnmente administrados oralmente como emulsiones ac/a.

En una modalidad de la presente invención, las composiciones de oligonucleótidos y ácidos nucleicos se formulan como microemulsiones. Una microemulsión puede ser definida como un sistema de agua, aceite y anfifílico el cual es una solución líquida ópticamente isotrópica y termodinámicamente estable única (Rosoff, en Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volumen 1, p. 245). Típicamente las microemulsiones son sistemas que se preparan primero dispersando un aceite en una solución de tensoactivo acuoso y después agregando una cantidad suficiente de un cuarto componente, generalmente un alcohol de cadena larga intermediario para formar un sistema transparente. Por lo

000095

76

tanto, las microemulsiones se han descrito como dispersiones termodinámicamente estables, isotrópicamente claras de dos líquidos inmiscibles que son estabilizados por películas interfaciales de moléculas de superficie activa (Leung and Shah, en: Controlled Release of Drugs: Polymers and Aggregate Systems, Rosoff, M., Ed., 1989, VCH Publishers, New York, páginas 185-215). Las microemulsiones comúnmente se preparan vía una combinación de tres a cinco componentes que incluyen aceite, agua, tensoactivo, cotensoactivo y electrolito. Si la microemulsión es del tipo agua en aceite (a/ac) o aceite en agua (ac/a) depende de las propiedades del aceite y tensoactivo usado y en la estructura y empaque geométrico de las cabezas polares y colas de hidrocarburo de las moléculas de tensoactivo (Schott, en Remington's Pharmaceuticals Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 271).

Los diagramas de fase que utilizan procedimiento fenomenológico se han estudiado extensivamente y ha proporcionado un conocimiento comprensivo, a un experto en la técnica, de cómo formular microemulsiones (Rosoff, en Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volumen 1, p. 245; Block, en Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volumen 1, p. 335). Comparado a emulsiones, microemulsiones convencionales ofrecen la ventaja de solubilizar fármacos insolubles en agua en una formulación de gotas termodinámicamente estables que se forman espontáneamente.

000096

97

Los tensioactivos usados en la preparación de microemulsiones incluyen, pero no se limitan a, tensioactivos iónicos, tensioactivos no iónicos, Brij 96, éteres de polioxietilen oleilo, ésteres de ácido graso de poliglicerol, monolaurato de tetraglicerol (ML310), monooleato de tetraglicerol (MO310), monooleato de hexaglicerol (PO310), pentaoleato de hexaglicerol (PO500), monocaprato de decaglicerol (MCA750), monooleato de decaglicerol (MO750), sesquioleato de decaglicerol (SO750), decaoleato de decaglicerol (DAO750), solo o en combinación con cotensioactivos. El cotensioactivo, usualmente un alcohol de cadena corta tal como etanol, 1-propanol y 1-butanol, sirve para incrementar la fluidez interfacial penetrando en la película de tensioactivo y consecuentemente crea una película desordenada debido al espacio vacío generado entre las moléculas de tensioactivo. Las microemulsiones pueden, sin embargo, ser preparados con el uso de cotensioactivos y sistemas de microemulsión auto-emulsificables libres de alcohol conocidos en la técnica. La fase acuosa puede típicamente ser, pero no se limita a, agua, una solución acuosa del fármaco, glicerol, PEG300, PEG400, poligliceroles, propilen glicoles y derivados de etilen glicol. La fase aceitosa puede incluir, pero no se limita a, materiales tales como Captex 300, Captex 355, Capmul MCM, ésteres de ácido graso, mono, di y tri-glicéridos de cadena media (C8-C12), ésteres de ácido graso de glicerilo polioxietilados, alcoholes grasos, glicéridos poliglicolizados, glicéridos C8-C10 poliglicolizados saturados, aceites vegetales y aceite de

000097

98

silicona.

Las microemulsiones son particularmente de interés del punto de vista de solubilización de fármaco y la absorción intensificada de fármacos. Las microemulsiones a base de lípido (tanto ac/a como a/ac) se han propuesto para intensificar la biodisponibilidad oral de fármacos, que incluyen péptidos (Constantinides et al., Pharmaceutical Research, 1994, 11, 1385-1390; Ritschel, Metch. Find. Exp. Clin. Pharmacol., 1993, 13, 205). Las microemulsiones proporcionan ventajas para mejorar la solubilización del fármaco, protección de fármaco de la hidrólisis enzimática, posible intensificación de absorción del fármaco debido a alteraciones inducidas por tensoactivo en fluidez y permeabilidad de membrana, facilidad de preparación, facilidad de administración oral sobre formas de dosificación sólida, potencia clínica mejorada y toxicidad disminuida (Constantinides et al., Pharmaceutical Research, 1994, 11, 1385; Ho et al., J. Pharm. Sci., 1996, 85, 138-143). A menudo las microemulsiones se pueden formar espontáneamente cuando sus componentes se mezclan a temperatura ambiente. Esto puede ser particularmente ventajoso cuando se formulan fármacos, péptidos u oligonucleótidos termolábiles. Las microemulsiones también son efectivas en el suministro transdérmico de componentes activos en aplicaciones tanto cosméticas como farmacéuticas. Se espera que las composiciones y formulaciones de microemulsión de la presente invención puedan facilitar la absorción sistémica incrementada de oligonucleótidos y ácidos nucleicos del tracto

000098

gastrointestinal, así como también mejora la absorción celular local de oligonucleótidos y ácidos nucleicos dentro del tracto gastrointestinal, vagina, cavidad bucal y otras áreas de administración.

5 Las microemulsiones de la presente invención también pueden contener componentes y aditivos adicionales tales como monoestearato de sorbitán (Grill 3), Labrasol, e intensificadores de penetración para mejorar las propiedades de la formulación y para intensificar la absorción de los
10 oligonucleótidos y ácidos nucleicos de la presente invención. Los intensificadores de penetración usados en las microemulsiones de la presente invención pueden ser clasificados por pertenecer a uno de cinco tensoactivos de categoría amplia, ácidos grasos, sales biliares, agentes
15 quelantes y no tensoactivos no quelantes (Lee et al., Critical Reviewa in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p. 92). Cada una de estas clases se han discutido anteriormente.

20 Liposomas

Existen muchas estructuras de tensoactivo organizadas además de microemulsiones que se ha estudiado y usado para la formulación de fármacos. Estas incluyen monocapas, micelas, bicapas y vesículas. Las vesículas, tales
25 como liposomas, tienen mayor interés atraído debido a su especificidad y la duración de acción que ofrecen desde el punto de vista de suministro del fármaco. Como se usa en la presente invención, el término "liposoma" significa una

100

vesícula compuesta de lípidos anfifílicos ordenados en una bicapa o bicapas esféricas.

Los liposomas son vesículas unilaminares o multilaminares las cuales tienen una membrana formada de un material lipofílico y un interior acuoso. La porción acuosa contiene la composición a ser suministrada. Los liposomas catiónicos poseen la ventaja de ser capaces de fusionarse a la pared celular. Los liposomas no catiónicos, aunque no son capaces de fusionarse eficientemente con la pared celular, son captados por macrófagos *in vivo*.

Para atravesar la piel de mamífero intacta, las vesículas de lípido pueden pasar a través de una serie de poros finos, cada uno con un diámetro menor de 50 nm, bajo la influencia de un gradiente transdérmico adecuado. Por lo tanto, es deseable usar un liposoma el cual es muy deformable y capaz de pasar a través de los poros finos.

Ventajas adicionales de liposomas incluyen; liposomas obtenidos de fosfolípidos naturales son biocompatibles y biodegradables; los liposomas pueden incorporar un amplio intervalo de fármacos solubles en agua y lípido; los liposomas pueden proteger fármacos encapsulados en sus compartimientos internos del metabolismo y degradación (Rosoff, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volumen 1, p. 245). Consideraciones importantes en la preparación de formulaciones de liposoma son la carga de superficie del lípido, tamaño de vesícula y el volumen acuoso de los liposomas.

000100

101

Los liposomas son útiles para la transferencia y suministro de los ingredientes activos al sitio de acción. Debido a la membrana liposomal es estructuralmente similar a las membranas biológicas, cuando los liposomas se aplican a un tejido, los liposomas inician a combinarse con las membranas celulares. Con forme la combinación de los liposomas y célula progresa, los contenidos liposomales se vacían en la célula en donde el agente activo puede actuar.

Las formulaciones liposomales han sido el foco de investigaciones extensivas como la forma de suministro para muchos fármacos. Existen evidencias de crecimiento para administración tópica, los liposomas presentan varias ventajas sobre otras formulaciones. Estas ventajas incluyen efectos secundarios reducidos relacionados a alta absorción sistémica del fármaco administrado, acumulación incrementada del fármaco administrado en el objetivo deseado y la capacidad para administrar una amplia variedad de fármacos, tanto hidrofílico como hidrofóbico, en la piel.

Varios reportes han detallado la capacidad de liposomas para suministrar agentes que incluyen ADN de peso molecular alto en la piel. Los compuestos que incluyen analgésicos, anticuerpos, hormonas y ADNs de peso molecular alto se han administrado a la piel. La mayoría de las aplicaciones resultan en el objetivo de la epidermis superior.

Los liposomas caen en dos clases amplias. Liposomas catiónicos son liposomas positivamente cargados los cuales interactúan con las moléculas de ADN negativamente cargadas

000101

102

para formar un complejo estable. El complejo ADN/liposoma positivamente cargado se une a la superficie celular negativamente cargada y se internaliza en un endosoma. Debido al pH ácido dentro del endosoma, los liposomas se rompen, liberando sus contenidos en el citoplasma celular (Wang et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1987, 147, 980-985).

Los liposomas los cuales son sensibles al pH o negativamente cargados, atrapan ADN en lugar del complejo. Ya que tanto el ADN como el lípido están similarmente cargados, ocurre la repulsión en lugar de la formación del complejo. Sin embargo, algo de ADN es atrapado dentro del interior acuoso de estos liposomas. Los liposomas sensibles al pH se han usado para suministrar ADN que codifica el gen timidina cinasa a monocapas celulares en el cultivo. Se detecta la expresión del gen exógeno en las células objetivo (Zhou et al., Journal of Controlled Release, 1992, 19, 269-274).

Un tipo principal de composición liposomal incluye fosfolípidos diferentes de fosfatidilcolina naturalmente derivados. Las composiciones de liposoma neutral, por ejemplo, se puede formar de dimiristoil fosfatidilcolina (DMPC) o dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC). Las composiciones de liposoma aniónico generalmente se forman de dimiristol fosfatidilglicerol, mientras los liposomas fusogénicos aniónicos se forman principalmente de dioleoil fosfatidiletanolamina (DOPE). Otro tipo de composición liposomal se forma de fosfatidilcolina (PC) tal como, por ejemplo, PC de frijol de soya y PC de huevo. Otro tipo es formado de mezclas de fosfolípido y/o fosfatidilcolina y/o

000102

colesterol.

Varios estudios han valorado el suministro tópico de formulaciones de fármaco liposomal a la piel. La aplicación de liposomas que contienen interferona a piel de cobayos resulta en una reducción de llagas de herpes en la piel mientras se suministra la interferona vía otros medios (por ejemplo, como una solución o como una emulsión) son inefectivos (Weiner et al., Journal of Drug Targeting, 1992, 2, 405-410). Además, un estudio adicional probó la eficacia de interferona administrada como parte de una formulación liposomal para la administración de interferona usando un sistema acuoso, y concluye que la formulación liposomal es superior a la administración acuosa (du Plessis et al., Antiviral Research, 1992, 18, 259-265).

También se han examinado sistemas liposomales no iónicos para determinar su utilidad en el suministro de fármacos a la piel, en sistemas particulares que comprenden tensoactivo no iónico y colesterol. Formulaciones liposomales no iónicas que comprenden Novasome™ I (dilaurato de glicerilo/colesterol/éter de polioxietilen-10-estearilo) y Novasome™ II (diestearato de glicerilo/colesterol/éter de polioxietilen-10-estearilo) se usan para suministrar ciclosporina-A en la dermis de piel de ratón. Los resultados indican que los sistemas liposomales no iónicos son efectivos facilitando la deposición de ciclosporina-A en diferentes capas de la piel (Hu et al. S.T.P. Pharma. Sci., 1994, 4, 6, 466).

Los liposomas también incluyen liposomas

104

"estéricamente estabilizados", un término el cual, como se usa en la presente, se refiere a liposomas que comprenden uno o más de lípidos especializados que, cuando se incorporan en liposomas, resulta en la vida completa de circulación intensificada en relación a liposomas que carecen de lípidos especializados. Ejemplos de liposomas estéricamente estabilizados son aquellos en la cual parte de la porción de lípido que forma vesícula del liposoma (A) comprende uno o más glicolípidos, tales como monosialogangliósido G_{M1} , o (B) su derivado con uno o más polímeros hidrofílicos, tal como una porción de polietilen glicol (PEG). Mientras que no se desee estar unido por cualquier teoría, se piensa en la técnica anterior que, al menos para liposomas estéricamente estabilizadas que contienen gangliósidos, esfingomielina o lípidos derivados de PEG, la vida media de circulación intensificada de los liposomas estéricamente estabilizados derivados de una captación reducida en células del sistema reticuloendotelial (RES) (Allen et al., FEBS Letters, 1987, 223, 42; Wu et al., Cancer Research, 1993, 53, 3765).

Se conocen en la técnica varios liposomas que comprenden uno o más glicolípidos. Papahadjopoulos et al. (Ann. N.Y. Acad. Sci., 1987, 507, 64) reporta la capacidad de monosialogangliósido G_{M1} , sulfato de galactocerebrósido y fosfatidilinositol para mejorar la vida media de la sangre de liposomas. Estos hallazgos se exponen por Gabizon et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1988, 85, 6949). Patente Estadounidense No. 4,837,028 y WO 88/04924, ambos de Allen et al., describen liposomas que comprenden (1) esfingomielina y

000104

105

(2) el gangliósido G_{M1} o un éster de sulfato galactocerebrósido. La Patente Estadounidense No. 5,543,152 (Webb et al.) describe liposomas que comprenden esfingomielina. Liposomas que comprenden 1,2-sn-dimiristoilfosfatidilcolina se describen en WO 97/13499 (Lim et al.).

Muchos liposomas que comprenden lípidos derivados con uno o más polímeros hidrofílicos, y métodos de preparación de los mismos, se conocen en la técnica. Sunamoto et al. (Bull. Chem. Soc. Jpn., 1980, 53, 2778) describe liposomas que comprenden un detergente no iónico, $2C_{12}$ 15G, que contiene una porción PEG. Illum et al. (FEBS Lett., 1984, 167, 79) nota que el recubrimiento hidrofílico de partículas poliestireno con glicoles poliméricos resulta en vida media de sangre significativamente intensificada. Fosfolípidos sintéticos modificados por la unión de grupos carboxílicos de polialquilen glicoles (por ejemplo, PEG) se describen por Sears (Patentes Estadounidenses Nos. 4,426,330 y 4,534,899). Klibanov et al. (FEBS Lett., 1990, 268, 235) describe experimentos que demuestran que los liposomas que comprenden fosfatidiletanol-amina (PE) derivado con PEG o estearato de PEG tienen incremento significativo en vida media de circulación de sangre. Blume et al. (Biochimica et Biophysica Acta, 1990, 1029, 91) ha ampliado las observaciones a otros fosfolípidos derivados de PEG, por ejemplo, DSPE-PEG, formados de la combinación de diestearoilfosfatidiletanolamina (DSPE) y PEG. Los liposomas que tienen porciones PEG covalentemente unidas en su

106

superficie externa, se describen en la Patente Europea No. EP 0 445 131 B1 y WO 90/04384 por Fisher. Las composiciones de liposoma que contienen 1-20 por ciento en mole de PE derivado con PEG, y métodos de uso de las mismas, se describen por

5 Woodle et al. (Patentes Estadounidenses Nos. 5,013,556 y 5,356,633) y Martin et al. (Patente Estadounidense No. 5,213,804 y Patente Europea No. EP 0 496 813 B1). Los liposomas que comprenden un número de otros conjugados lípido-polímero se describen en WO 91/05545 y Patente

10 Estadounidense No. 5,225,212 (ambos por Martin et al.) y en WO 94/20073 (Zalipsky et al.). Se describen liposomas que comprenden lípidos de ceramida modificados con PEG en WO 96/10391 (Choi et al.). Las Patentes Estadounidenses Nos. 5,540,935 (Miyazaki et al.) y 5,556,948 (Tagawa et al.)

15 describe liposomas que contienen PEG que pueden ser derivados adicionalmente con porciones funcionales en sus superficies.

Se conocen en la técnica un número limitado de liposomas que comprenden ácidos nucleicos. WO 96/40062 por Thierry et al., describe métodos para encapsular ácidos

20 nucleicos de peso molecular alto en liposomas. La Patente Estadounidense No. 5,264,221 por Tagawa et al., describe liposomas unidas a proteína y afirma que los contenidos de los liposomas pueden incluir un ARN antisentido. La Patente Estadounidense No. 5,665,710 por Rahman et al., describe

25 ciertos métodos para encapsular oligodesoxinucleótidos en liposomas. WO 97/04787 por Love et al., describe liposomas que comprenden oligonucleótidos antisentido dirigidos al gen raf.

000106

107

Las transfersomas son aún otro tipo de liposomas, y son agregados de lípido muy deformables los cuales son candidatos atractivos para vehículos de suministro del fármaco. Las transfersomas se pueden describir como gotas de lípido las cuales son muy deformables de forma que son fácilmente capaces de penetrar a través de poros los cuales son más pequeños que la gota. Las transfersomas son adaptables al ambiente en el cual se usan, por ejemplo, son auto-optimizables (adaptado a la forma de poros en la piel), auto-reparables, frecuentemente alcanzan sus objetivos son fragmentación, y a menudo auto-cargables. Para elaborar transfersomas es posible agregar activadores de borde de superficie, usualmente tensoactivos, a una composición liposomal estándar. Las transfersomas se han usado para suministrar albúmina de suero a la piel. El suministro mediado por transfersoma de albúmina de suero se ha mostrado por ser efectivo como inyección subcutánea de una solución que contiene albúmina de suero.

Los tensoactivos encuentran amplia aplicación en formulaciones tales como emulsiones (que incluyen microemulsiones) y liposomas. La forma más común para clasificar y categorizar las propiedades de muchos tipos diferentes de tensoactivos, tanto natural como sintético, es por el uso del balance hidrofílico/lipofílico (HLB). La naturaleza del grupo hidrofílico (también conocido como la "cabeza") proporciona los medios más útiles para categorizar los diferentes tensoactivos usados en formulaciones (Rieger, en Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Dekker, Inc., New

000107

108

York, N.Y., 1988, p. 285).

Si la molécula de tensoactivo no es ionizada, se clasifica como un tensoactivo no iónico. Los tensoactivos no iónicos encuentran amplia aplicación en productos farmacéuticos y cosméticos, y son utilizables en un amplio intervalo de valores de pH. En general, sus valores HLB varían de 2 hasta aproximadamente 18 dependiendo de su estructura. Tensoactivos no iónicos incluyen ésteres no iónicos tales como ésteres de etilen glicol, ésteres de propilen glicol, ésteres de glicerilo, ésteres de poliglicerilo, ésteres de sorbitán, ésteres de sacarosa y ésteres etoxilados. También se incluyen alcanolamidas y éteres no iónicos tales como alcohol graso etoxilados, alcoholes propoxilados y polímeros en bloque etoxilados/propoxilados en esta clase. Los tensoactivos polioxietileno son los miembros más populares de la clase de tensoactivo no iónico.

Si la molécula de tensoactivo porta una carga negativa cuando se disuelve o dispersa en agua, el tensoactivo se clasifica como aniónico. Los tensoactivos aniónicos incluyen carboxilados tales como jabones, acil lactilatos, acil amidas de aminoácidos, ésteres de ácido sulfúrico tales como sulfatos de alquilo y sulfatos de alquilo etoxilados, sulfonatos tales como sulfonatos de alquil benceno, acil isetionatos, acil tauratos y sulfosuccinatos, y fosfatos. Los miembros más importantes de la clase de tensoactivo aniónico son los sulfatos de alquilo y los jabones.

000108

109

Si la molécula de tensoactivo porta una carga positiva cuando se disuelve o dispersa en agua, el tensoactivo se clasifica como catiónico. Los tensoactivos catiónicos incluyen sales de amonio cuaternario y aminas etoxiladas. Las sales de amonio cuaternario son los miembros más usados de esta clase.

Si la molécula de tensoactivo tiene la capacidad para portar ya sea una carga positiva o negativa, el tensoactivo se clasifica como anfotérico. Los tensoactivos anfotéricos incluyen derivados de ácido acrílico, alquilamidas sustituidas, N-alquiltetrahidobetasinas y fosfatidos.

Se ha revisado el uso de tensoactivos en productos fármacos, formulaciones y en emulsiones (Rieger, en Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, p. 285).

Intensificadores de Penetración

En una modalidad, la presente invención emplea varios intensificadores de penetración para efectuar el suministro eficiente de ácido nucleicos, particularmente oligonucleótidos, a la piel de animales. Muchos fármacos se presentan en solución en formas tanto ionizada como no ionizada. Sin embargo, usualmente únicamente lípidos solubles o fármacos lipofílicos fácilmente atraviesan las membranas celulares. Se ha descubierto que aún fármacos no lipofílicos pueden atravesar membranas celulares si la membrana a ser atravesada se trata con un intensificador de penetración. Además, ayuda a la difusión de fármacos no lipofílicos a

través de las membranas celulares, los intensificadores de penetración también intensifican la permeabilidad de fármacos lipofílicos.

Los intensificadores de penetración pueden ser clasificados como pertenecientes a una de las cinco categorías amplias, es decir, tensoactivos, ácidos grasos, sales biliares, agentes quelantes y no tensoactivos no quelantes (Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p. 92). Cada una de las clases mencionadas anteriormente de intensificadores de penetración se describe posteriormente en mayor detalle.

Tensoactivos: En conexión con la presente invención, los tensoactivos (o "agentes de superficie activa") son entidades químicas las cuales, cuando se disuelven en una solución acuosa, reduce la tensión de superficie de la solución o la tensión interfacial entre la solución acuosa y otro líquido, con el que resulta de la absorción de oligonucleótidos a través de la mucosa es intensificado. Además a sales biliares y ácidos grasos, estos intensificadores de penetración incluyen, por ejemplo, lauril sulfato de sodio, éter de polioxietilen-9-lauril y éter de polioxietilen-20-cetilo) (Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p. 92); y emulsiones perfluoroquímicas, tales como FC-43. Takahashi et al., J. Pharm. Pharmacol., 1988, 40, 252).

Ácidos grasos: Varios ácidos grasos y sus derivados los cuales actúan como intensificadores de penetración incluyen, por ejemplo, ácido oleico, ácido láurico, ácido

000110

cáprico (ácido n-decanoico), ácido mirístico, ácido
palmítico, ácido esteárico, ácido linoleico, ácido
linolénico, dicaprato, tricaprato, monooleína (1-monooleoil-
rac-glicerol), dilaurin, ácido caprílico, ácido araquidónico,
5 1-monocaprato de glicerol, 1-dodecilazacicloheptan-2-ona,
acilcarnitinas, acilcolinas, ésteres de alquilo C₁₋₁₀ del
mismo (por ejemplo, metilo, isopropilo y t-butilo), y mono- y
di-glicéridos del mismo (es decir, oleato, laurato, caprato,
miristato, palmitato, estearato, linoleato, etc.) (Lee et
10 al., Critical Reviews in Therapeutics Drug Carrier Systems,
1991, p. 92; Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug
Carrier Systems, 1990, 7, 1-33; El Hariri et al., J. Pharm.
Pharmacol., 1992, 44, 651-654).

Sales Biliares: El papel fisiológico de la bilis
15 incluye la facilitación de dispersión y absorción de lípidos
y vitaminas solubles en grasa (Brunton, Capítulo 38 en:
Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics,
9va Ed., Hardman et al. Eds., McGraw-Hill, New York, 1996,
pp. 934-935). Varias sales biliares naturales, y sus
20 derivados sintéticos, actúa como intensificadores de
penetración. De esta forma el término "sales biliares"
incluyen cualquiera de los componentes que se originan
naturalmente de la bilis, así como también cualquiera de sus
derivados. Las sales biliares de la invención incluyen, por
25 ejemplo, ácido cólico (o su sal de sodio farmacéuticamente
aceptable, colato de sodio), ácido deshidrocólico
(deshidrocolato de sodio), ácido desoxicólico (desoxicolato
de sodio), ácido glucólico (glucolato de sodio), ácido

112

glicólico (glicolato de sodio), ácido glicodesoxicólico (glicodesoxicolato de sodio), ácido taurocólico (taurocolato de sodio), ácido taurodesoxicólico (taurodesoxi colato de sodio), ácido quenodesoxicólico (quenodesoxicolato de sodio),
5 ácido ursodesoxicólico (UDCA), tauro-24,25-dihidro-fusidato de sodio (STDHF), glicohidrofusidato de sodio y éter polioxietilen-9-lauril (POE) (Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, página 92; Swinyard, Capítulo 39 en: Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ava
10 Ed., Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990, páginas 782-783; Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33; Yamamoto et al., J. Pharm. Exp. Ther., 1992, 263, 25; Yamashita et al., J. Pharm. Sci., 1990, 79, 579-583).

15 Agentes Quelantes: Los agentes quelantes, como se usa en conexión con la presente invención, se pueden definir como compuestos que remueven iones metálicos de la solución formando complejos con ellos, con el resultado que la absorción de oligonucleótidos a través de la mucosa es
20 intensificada. Con respecto a su uso como intesificadores de penetración en la presente invención, los agente quelantes tienen la ventaja adicional de también servir como inhibidores de ADNase, como nucleasas de ADN más caracterizadas requieren un ión de metal divalente para
25 catálisis y son de esta forma inhibidos por agentes quelantes (Jarrett, J. Chromatogr., 1993, 618, 315-339). Los agentes quelantes de la invención incluyen, pero no se limitan a etilendiaminatetraacetato de disodio (EDTA), ácido cítrico,

113

salicilatos (por ejemplo, salicilato de sodio, 5-metoxisalicilato y homovanilato), derivados N-acilo de colágeno, derivados laureth-9 y N-amino acilo de beta-dicetonas (enaminas) (Lee et al., Critical Reviews in Therapeutics Drug Carrier Systems, 1991, página 92; Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33; Buur et al., J. Control Rel., 1990, 14, 43-51).

No tensoactivos no quelantes: Como se usa en la presente compuestos intensificadores de penetración no tensoactivos no quelantes se pueden definir como compuestos que demuestran actividad insignificante como agentes quelantes o como tensoactivos pero que sin embargo la absorción intensificada de oligonucleótidos a través de la mucosa alimentaria (Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33). Esta clase de intensificadores de penetración incluye, por ejemplo, ureas cíclicas insaturadas, derivados de 1-alquilo y 1-alquenilazacilo-alcanona (Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, página 92), y agentes anti-inflamatorios no esteroideos tales como diclofenaco sódico, indometacina y fenilbutazona (Yamashita et al., J. Pharm. Pharmacol., 1987, 39, 621-626).

Agentes que intensifican la captación de oligonucleótidos a nivel celular, también se pueden agregar al fármaco u otras composiciones de la presente invención. Por ejemplo, lípidos catiónicos, tales como lipofectina (Junichi et al., Patente Estadounidense No.

114

5,705,188), derivados de glicerol catiónico y moléculas policatiónicas, tales como polilisina (Lollo et al., Solicitud PCT WO 97/30731), también se conocen por intensificar la captación celular de oligonucleótidos.

5 Otros agentes que se pueden utilizar para intensificar la penetración de los ácidos nucleicos administrados, que incluyen glicoles tales como etilen glicol y propilen glicol, pirroles tales como 2-pirrol, azonas y terpenos tales como limoneno y mentona.

10

Otros compuestos

Las composiciones de la presente invención pueden adicionalmente contener otros componentes adjuntos convencionalmente encontrados en composiciones farmacéuticas, en sus niveles de uso establecidos en la técnica. De esta forma, por ejemplo, las composiciones pueden contener materiales farmacéuticamente activos, adicionales, compatibles tales como, por ejemplo, antiprurítricos, astringentes, anestésicos locales o agentes anti-inflamatorios, o pueden contener materiales adicionales útiles en físicamente formulación de varias formas de dosificación de las composiciones de la presente invención, tales como tintes, agentes saborizantes, preservativos, antioxidantes, opacificadores, agentes espesantes y estabilizadores. Sin embargo, los materiales cuando se agregan, no deben indebidamente interferir con las actividades biológicas de los componentes de las composiciones de la presente invención. Las formulaciones

000114

115

pueden ser esterilizadas y, si se desea mezcladas con agentes auxiliares, por ejemplo, lubricantes, preservativos, estabilizadores, agentes humectantes, emulsificadores, sales para influenciar la presión osmótica, amortiguadores, colorantes, saborizantes y/o sustancias aromáticas y similares, las cuales no interactúa perjudicialmente con los ácidos nucleicos de la formulación.

Suspensiones acuosas pueden contener sustancias las cuales incrementan la viscosidad de la suspensión incluyendo, por ejemplo, carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol y/o dextrano. La suspensión puede también contener estabilizadores.

Ciertas modalidades de la invención, proporcionan composiciones farmacéuticas que contienen (a) uno o más compuestos antisentido y (b) uno o más de otros agentes quimioterapéuticos los cuales funcionan por un mecanismo no antisentido. Ejemplos de los agentes quimioterapéuticos incluyen, pero no se limitan a daunorubicina, daunomicina, dactinomicina, doxorubicina, epirubicina, idarubicina, esorubicina, bleomicina, mafosfamida, ifosfamida, citocina arabinósido, bis-cloroetilnitrosurea, busulfan, mitomicina C, actinomicina D, mitramicina, prednisona, hidroxiprogesterona, testosterona, tamoxifeno, dacarbazina, procarbazina, hexametilmelamina, pentametilmelamina, mitoxantrona, amsacrina, clorambucilo, metilciclohexilnitrosurea, nitrógeno, mostaza, melfalano, ciclofosfamida, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-azacitidina, hidroxiurea, desoxicoformicina, 4-

000115

116

hidroxiperoxíciclofosforamida, 5-fluorouracilo (5-FU), 5-fluorodesoxiuridina (5-FUdR), metotrexato (MTX), colquicina, taxol, vincristina, vinblastina, etopósido (VP-16), trimetrexato, irinotecano, topotecano, gemcitabina, 5 tenipósido, cisplatino y dietilestilbestrol (DES). Véase, generalmente, The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 15ava Ed., 1987, pp. 1206-1228, Berkow et al., Eds., Rahway, N.J. Cuando se usan con los compuestos de la invención, estos agentes quimioterapéuticos se pueden usar individualmente 10 (por ejemplo, 5-FU y oligonucleótido), secuencialmente (por ejemplo, 5-FU y oligonucleótido por un periodo de tiempo seguido por MTX y oligonucleótido), o en combinación con uno o más de otros agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, 5-FU, MTX y oligonucleótido, o 5-FU, radioterapia y 15 oligonucleótido). Fármacos anti-inflamatorios, que incluyen pero no se limitan a fármacos anti-inflamatorios no esteroideos y corticoesteroides, y fármacos antivirales, que incluyen pero no se limitan a ribivirina, vidarabina, aciclovir y ganciclovir, pueden también ser combinados en 20 composiciones de la invención. Véase, generalmente, The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 15ava Ed., Berkoe et al., eds., 1987, Rahway, N.J., páginas 2499-2506 y 46-49, respectivamente). Otros agentes quimioterapéuticos no antisentido también están dentro del alcance de esta 25 invención. También se pueden usar juntos o secuencialmente dos o más compuestos combinados. En otra modalidad relacionada, las composiciones de la invención pueden contener uno o más compuestos antisentido, particularmente

000116

oligonucleótidos, dirigidos a un primer ácido nucleico y uno o más compuestos antisentido adicionales dirigidos a un segundo ácido nucleico objetivo. Numerosos ejemplos de compuestos antisentido se conocen en la técnica. Dos o más compuestos combinados se pueden usar juntos o secuencialmente.

Los compuestos antisentido usados de conformidad con esta invención, pueden ser convenientemente y rutinariamente hechos a través de la técnica bien conocida de síntesis de fase sólida. El equipamiento para esta síntesis se vende por varios proveedores que incluyen, por ejemplo, Applied Biosystems (Foster City, CA). Cualquier otro medio para esta síntesis conocida en la técnica puede adicionalmente o alternativamente ser empleado. Se conoce bien el uso de técnicas similares para preparar oligonucleótidos tales como los fosforotioatos y derivados alquilados.

Los compuestos antisentido de la invención se sintetizan *in vitro* y no incluyen composiciones antisentido de origen biológico, o constructos del vector genético diseñados para dirigir la síntesis *in vivo* de moléculas antisentido. Los compuestos de la invención pueden también ser mezclados, encapsulados, conjugados o de otra forma asociados con otras moléculas, estructuras moleculares o mezclas de compuestos, como por ejemplo, liposomas, receptores dirigidos a moléculas, formulaciones orales, rectales, tópicos u otras, para ayudar a la captación, distribución y/o absorción. Patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de la captación,

110

distribución y/o absorción que ayudan a las formulaciones incluyen, pero no se limitan a, Patentes Estadounidenses Nos.

5,108,921; 5,354,844; 5,416,016; 5,459,127; 5,521,291;

5,543,158; 5,547,932; 5,583,020; 5,591,721; 4,426,330;

5 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, cada una de las

cuales se incorpora en la presente por referencia.

10

Ciertas Indicaciones

La especificidad y sensibilidad de antisentido también se aprovecha por aquellos expertos en la técnica para usos terapéuticos. Oligonucleótidos antisentido se han

15 empleado como porciones terapéuticas en el tratamiento de estados de enfermedad en animales y humanos. Fármacos de oligonucleótido antisentido, que incluyen ribozimas, han sido seguramente y efectivamente administrados a humanos y

numerosos ensayos clínicos están actualmente en curso. Por lo

20 que se establece que los oligonucleótidos pueden ser modalidades terapéuticas útiles que pueden ser configuradas para ser útiles en regímenes de tratamiento para el tratamiento de células, tejidos y animales, especialmente humanos.

25

En cierta modalidad de la invención proporciona un método para tratar una enfermedad o condición asociada con expresión del CTGF, en donde la enfermedad es un trastorno hiperproliferativo el cual incluye cáncer, en donde el cáncer

000118

119

es de mama, próstata, renal, pancreático, cabeza y cuello, gástrico, y cáncer de mieloma múltiple (Véase, Pickles M and Leask A, J Cell Commun Signal. 2007 Sep; 1(2):85-90. Epub 2007 Jul 17; Mullis T.C., Tang X., Chong K.T., J Clin Pathol. 2008 Mayo; 61(5):606-10; Liu L.Y., et al. World J Gastroenterol. 2008 Abril 7; 14(13):2110-4; Chintalapudi M.R., et al., Carcinogenesis. 2008 Abril; 29(4):696-703. Epub 2008 Enero 22; Numemasa S., et al., Br J Haematol. 2007 Oct; 139(1):41-50; Shimo T., et al. J Bone Miner Res. 2006 Jul; 21(7):1045-59; y Yang F., et al., Cancer Res. 2005 Oct 1; 65(19):8887-95).

En una modalidad de la invención, el método comprende tratar una enfermedad o condición, en donde la enfermedad o trastorno es una enfermedad fibrótica. En una modalidad del método de la invención, la enfermedad fibrótica es una cicatriz hipertrófica, queloides, cicatriz de la piel, fibrosis de hígado, fibrosis pulmonar, fibrosis renal, fibrosis cardiaca o restenosis.

En otra modalidad de la invención, el método además comprende tratar la enfermedad o condición antes mencionada, en donde la enfermedad o trastorno es fibrosis de articulación (que incluye síndrome de hombro congelado, lesión del nervio periférico y tendón), lesión de la médula espinal, derivación coronaria, adhesiones abdominales y peritoneales (que incluyen endometriosis, leiomiomata uterina y fibroides), queratotomía radial y querectomía fotorefractaria, cirugía de reinserción retinal, fibrosis mediada por dispositivo (en por ejemplo, diabetes),

120

adhesiones de tendón, contractura Dupuytren, o escleroderma.

En otra modalidad de la invención también proporciona un método para reducir cicatriz hipertrófica que resulta de curación de herida dérmica en un sujeto en
5 necesidad del mismo, el cual comprende administrar al sujeto una cantidad del compuesto de un oligonucleótido antisentido efectivo para inhibir la expresión del factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF) en el sujeto de forma que se reduce la cicatriz de la curación de herida en el sujeto. El
10 sujeto puede incluir un humano o un animal no humano.

La formulación de composiciones terapéuticas y su administración subsecuente se cree estar dentro de la experiencia de aquellos en la técnica. La dosificación es dependiente de la severidad y respuesta del estado de
15 enfermedad a ser tratado, con el curso del tratamiento que dura por varios días a varios meses, o hasta que se efectúa una cura o se logra una disminución del estado de enfermedad. Esquemas de dosificación óptima pueden ser calculados de mediciones de acumulación de fármaco en el cuerpo del
20 paciente. Las personas de experiencia ordinaria pueden fácilmente determinar dosificaciones óptimas, metodologías de dosificación y proporciones de repetición. Las dosificaciones óptimas pueden variar dependiendo de la potencia relativa de oligonucleótidos individuales, y pueden generalmente ser
25 estimadas en base a EC_{50} encontrados por ser efectivos en modelos animales *in vitro* o *in vivo*. En general, la dosificación es de 0.01 μ g hasta 100 g por kg de peso corporal, y puede ser proporcionado una o más veces

000120

121

diariamente, semanalmente, mensualmente o anualmente, o aún una vez cada 2 hasta 20 años. Las personas de experiencia ordinaria en la técnica pueden fácilmente estimar proporciones de repetición para dosificación en base a
5 tiempos de residencia medidos y concentraciones del fármaco en fluidos o tejidos corporales. Después del tratamiento exitoso, puede ser deseable que el paciente se someta a terapia de mantenimiento para prevenir la recurrencia del estado de enfermedad, en donde el oligonucleótido se
10 administra en dosis de mantenimiento, que varía de 0.01 µg hasta 100 g por kg del peso corporal, una o más veces diariamente, hasta una vez cada 20 años.

En otra modalidad de esta invención, el método además comprende reducir las cicatrices hipertróficas que
15 resultan de curación de herida dérmica, en donde la curación de herida es cicatrización en una herida seleccionada del grupo que consiste de ruptura de la piel, incisiones quirúrgicas y quemaduras.

En ciertas modalidades, la invención proporciona
20 métodos para tratar un individuo que comprende administrar uno o más composiciones farmacéuticas de la presente invención. En ciertas modalidades, el individuo tiene uno de los trastornos mencionados anteriormente. En ciertas modalidades, el individuo está en riesgo de uno de los
25 trastornos mencionados anteriormente. En ciertas modalidades, el individuo ha sido identificado por estar en necesidad de la terapia. En ciertas modalidades, la invención proporciona métodos para reducir profilácticamente expresión del CTGF en

122

un individuo.

Ciertas modalidades incluyen tratar un individuo en necesidad del mismo administrando a un individuo una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto antisentido
5 dirigido a un ácido nucleico del CTGF.

En una modalidad, la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico del CTGF es acompañado por monitoreo de niveles del CTGF en el suero de un individuo,
10 para determinar una respuesta del individuo a la administración del compuesto antisentido. Una respuesta del individuo a la administración del compuesto antisentido se usa por un médico para determinar la cantidad y duración de la intervención terapéutica.

15 En una modalidad, la administración de un compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico del CTGF resulta en la reducción de expresión del CTGF por al menos 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 99%, o un intervalo definido por cualquiera de dos de estos
20 valores. En una modalidad, la administración de un compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico del CTGF resulta en un cambio en una medición del CTGF como se mide por una prueba estándar, por ejemplo, pero no se limita a, CTGF. En algunas modalidades, la administración de un compuesto
25 antisentido del CTGF incrementa la medición por al menos 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 99%, o un intervalo definido por cualquiera de dos de estos valores. En algunas modalidades, la administración de

000122

129

un compuesto antisentido del CTGF disminuye la medición por al menos 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 99%, o un intervalo definido por cualquiera de dos de estos valores.

5 En ciertas modalidades, la composición farmacéutica comprende un compuesto antisentido dirigido al CTGF se usa para la preparación de un medicamento para tratar un paciente que sufre o es susceptible a cualquiera de una de los trastornos antes mencionados.

10

Ciertas Terapias de Combinación

En ciertas modalidades, una o más de las composiciones farmacéuticas de la presente invención se co-
15 administran con uno o más de otros agentes farmacéuticos. En ciertas modalidades, uno o más de otros agentes farmacéuticos se diseñan para tratar la misma enfermedad o condición como una o más de las composiciones farmacéuticas de la presente invención. En ciertas modalidades, uno o más de otros agentes
20 farmacéuticos diseñados para tratar una enfermedad o condición diferente a una o más de las composiciones farmacéuticas de la presente invención. En ciertas modalidades, uno o más de otros agentes farmacéuticos se diseñan para tratar un efecto indeseado de una o más
25 composiciones farmacéuticas de la presente invención. En ciertas modalidades, una o más de las composiciones farmacéuticas de la presente invención se co-administran con otro agente farmacéutico para tratar un efecto indeseado de

000123

124

otro agente farmacéutico. En ciertas modalidades, una o más composiciones farmacéuticas de la presente invención y uno o más de otros agentes farmacéuticos se administran al mismo tiempo. En ciertas modalidades, una o más composiciones farmacéuticas de la presente invención y uno o más de otros agentes farmacéuticos se administran a tiempos diferentes. En ciertas modalidades, una o más composiciones farmacéuticas de la presente invención y uno o más de otros agentes farmacéuticos se preparan juntos en una formulación única. En ciertas modalidades, una o más composiciones farmacéuticas de la presente invención y uno o más de otros agentes farmacéuticos se preparan separadamente.

En ciertas modalidades, los agentes farmacéuticos que pueden ser co-administrados con una composición farmacéutica de la presente invención incluyen un segundo agente terapéutico. En ciertas modalidades, los agentes farmacéuticos que se pueden co-administrar con una composición farmacéutica de la presente invención incluye, pero no se limitan a un segundo agente terapéutico. En ciertas modalidades, el segundo agente terapéutico se administra antes de la administración de una composición farmacéutica de la presente invención. En ciertas modalidades, el segundo agente terapéutico se administra después de la administración de una composición farmacéutica de la presente invención. En ciertas modalidades, el segundo agente terapéutico se administra al mismo tiempo que la composición farmacéutica de la presente invención. En ciertas modalidades, la dosis de un segundo agente terapéutico co-

125

administrado es la misma que dosis que puede ser administrada si el segundo agente terapéutico se administra solo. En ciertas modalidades, la dosis de un segundo agente terapéutico co-administrado es menor que la dosis que puede ser administrada si el segundo agente terapéutico se administra solo. En ciertas modalidades, la dosis de un segundo agente terapéutico co-administrado es mayor que la dosis que puede ser administrada si el segundo agente terapéutico se administra solo.

10 En ciertas modalidades, la co-administración de un segundo compuesto intensifica el efecto terapéutico de un primer compuesto, de forma que la co-administración de los compuestos resulta en un efecto terapéutico que es mayor que el efecto de administrar el primer compuesto solo, un efecto
15 sinérgico. En otras modalidades, la co-administración resulta en efectos terapéuticos que son adicionales a los efectos de los compuestos cuando se administran solos. En otras modalidades, la co-administración resulta en efectos terapéuticos que son supra-adicionales de los efectos de los
20 compuestos cuando se administran solos. En algunas modalidades, el primer compuesto es un compuesto antisentido. En algunas modalidades, el segundo compuesto es un compuesto antisentido.

Esta invención se ilustra en la Sección Detallada
25 Experimental que sigue. Esta sección se establece para ayudar en un entendimiento de la invención pero no se pretende, y no debe ser construida para limitar en cualquier forma la invención como se establece en las reivindicaciones las

000125

cuales siguen posteriormente.

Ejemplos

EJEMPLO 1: Cultivo celular y tratamiento de compuestos antisentido

Los efectos de compuestos antisentido en el nivel, actividad o expresión de ácidos nucleicos del CTGF se pueden probar in vitro en una variedad de tipos celulares. Los tipos celulares usados para los análisis están disponibles por proveedores comerciales (por ejemplo, American Type Culture Collection, Manassus, VA; Zen-Bio, Inc., Research Triangle Park, NC; Clonetics Corporation, Walkersville, MD) y las células se cultivan de conformidad con las instrucciones del proveedor usando reactivos comercialmente disponibles (por ejemplo, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). Tipos celulares ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, células HepG2, células Hep3B y hepatocitos primarios.

Ejemplo 2: Pruebas in vitro de oligonucleótidos antisentido

Descritos en la presente están métodos para el tratamiento de células con oligonucleótidos antisentido, los cuales pueden ser modificados apropiadamente para el tratamiento con otros compuestos antisentido.

En general, las células se tratan con oligonucleótidos antisentido cuando las células alcanzan aproximadamente 60-80% de confluencia en cultivo.

Un reactivo comúnmente usado para introducir oligonucleótidos antisentido en cultivos celulares incluye el

128

reactivo de transfección de lípido catiónico LIPOFECTIN® (Invitrogen, Carlsbad, CA). Los oligonucleótidos antisentido se mezclan con LIPOFECTIN® en OPTI-MEM® 1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) para lograr la concentración final deseada de oligonucleótido antisentido y una concentración de LIPOFECTIN® que típicamente varía de 2 hasta 12 µg/ml por 100 nM de oligonucleótido antisentido.

Otro reactivo usado para introducir oligonucleótidos antisentido en células cultivadas incluye LIPOFECTAMINE® (Invitrogen, Carlsbad, CA). El oligonucleótido antisentido se mezcla con LIPOFECTAMINE® en OPTI-MEM® 1 reduce el medio de suero (Invitrogen, Carlsbad, CA) para lograr la concentración deseada de oligonucleótido antisentido y una concentración de LIPOFECTAMINA® que típicamente varía de 2 hasta 12 µg/ml por 100 nM de oligonucleótido antisentido.

Las células se tratan con oligonucleótidos antisentido por métodos de rutina. Las células son típicamente recolectadas 16-24 horas después del tratamiento con oligonucleótido antisentido, tiempo en el cual los niveles de ARN o proteína de ácidos nucleicos objetivos se miden por métodos conocidos en la técnica y se describen en la presente. En general, cuando se realizan los tratamientos en replicas múltiples, los datos se presentan como el promedio de los tratamientos replicados.

La concentración del oligonucleótido antisentido usado varía de línea celular a línea celular. Métodos para determinar la concentración de oligonucleótido antisentido óptima para una línea celular particular son bien conocidos

000127

128

en la técnica. Los oligonucleótidos antisentido son típicamente usados a concentraciones que varía de 1 nM hasta 300 nM.

5 EJEMPLO 3: Aislamiento de ARN

El análisis ARN se puede realizar en ARN celular total o ARNm poli(A)+. Métodos de aislamiento de ARN son bien conocidos en la técnica. El ARN se prepara usando métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, usando el Reactivo
10 TRIZOL® (Invitrogen, Carlsbad, CA) de conformidad con los protocolos recomendados por el fabricante.

EJEMPLO 4: Análisis de inhibición de niveles o expresión dirigidos

15 La inhibición de niveles o expresión de un ácido nucleico del CTGF puede ser sometida a ensayo en una variedad de formas conocidas en la técnica. Por ejemplo, se pueden cuantificar niveles de ácido nucleico objetivo por, por ejemplo, análisis de manchado Northern, reacción en cadena de
20 polimerasa competitiva (PCR) o PCR en tiempo real cuantitativo. El análisis de ARN se puede realizar en ARN celular total o ARNm poli(A)+. Los métodos para aislar ARN son bien conocidos en la técnica. El análisis de manchado Northern también es de rutina en la técnica. El PCR en tiempo
25 real cuantitativo puede ser convencionalmente logrado usando el Sistema de Detección de Secuencia ABI PRISM® 7600, 7700 o 7900 comercialmente disponible, disponible de PE-Applied Biosystems, Foster City, CA y usado de conformidad con las

instrucciones del fabricante.

Ejemplo 5: Análisis por PCR en tiempo real Cuantitativo de Niveles de ARN objetivos

5 La cuantificación de niveles de ARN objetivo se puede lograr por PCR en tiempo real cuantitativo usando el Sistema de Detección de Secuencia ABI PRISM® 7600, 7700 o 7900 (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA) de conformidad con las instrucciones del fabricante. Los métodos de PCR en
10 tiempo real cuantitativo son bien conocidos en la técnica.

 Antes del PCR en tiempo real, el ARN aislado se somete a reacción de transcriptasa inversa (RT), la cual produce ADN complementario (ADNc) que después se usa como el sustrato para amplificación PCR en tiempo real. Las
15 reacciones RT y PCR en tiempo real se realizan secuencialmente en la misma muestra. Los reactivos RT y PCR en tiempo real se obtienen de Invitrogen (Carlsbad, CA). Las reacciones RT, PCR en tiempo real se llevan a cabo por métodos bien conocidos por aquellos expertos en la técnica.

20 Las cantidades dirigidas del gen (o ARN) obtenidas por PCR en tiempo real se normalizan usando ya sea el nivel de expresión de un gen cuya expresión es constante, tal como ciclofilina A, o cuantificando el ARN total usando RIBOGREEN® (Invitrogen, Inc. Carlsbad, CA). La expresión de ciclofilina
25 A se cuantifica por PCR en tiempo real, siendo corrida simultáneamente con el objetivo, multiplexado o separadamente. El ARN total se cuantifica usando el reactivo de cuantificación de ARN RIBOGREEN® (Invitrogen, Inc. Eugene,

130

OR). Los métodos de cuantificación de ARN por RIBOGREEN® se enseñan en Jones, L.J., et al., (Analytical Biochemistry, 1988, 265, 368-374). Se usa un instrumento CYTOFLUOR® 4000 (PE Applied Biosystems) para medir la fluorescencia

5 RIBOGREEN®.

Sondas y cebadores se diseñan para hibridizar a un ácido nucleico del CTGF. Métodos para diseñar sondas y cebadores PCR en tiempo real son bien conocidos en la técnica, y pueden incluir el uso del software tal como el

10 Software PRIMER EXPRESS® (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Ejemplo 6: Análisis de Niveles de Proteína

La inhibición antisentido de ácidos nucleicos del

15 CTGF se puede valorar midiendo los niveles de proteína del CTGF. Los niveles de proteína del CTGF se pueden evaluar o cuantificar en una variedad de formas bien conocidas en la técnica, tal como inmunoprecipitación, análisis de manchado Western (inmunomanchado) como se describe en el Ejemplo 9

20 posterior, ensayo inmunsorbente enlazado a la enzima (ELISA), ensayos de proteína cuantitativa, ensayos de actividad de proteína (por ejemplo, ensayos de actividad de caspasa), inmunohistoquímica, inmunocitoquímica o clasificación celular activada por fluorescencia (FACS).

25 Anticuerpos dirigidos a un objetivo se pueden identificar y obtener a partir de una variedad de fuentes, tales como el catálogo MSRS de anticuerpos (Aerie Corporation, Birmingham, MI) o se pueden preparar vía métodos de generación de

000130

anticuerpo monoclonal o policlonal convencionales bien conocido en la técnica. Anticuerpos útiles para la dirección del CTGF humano y rata están comercialmente disponibles.

5 **Ejemplo 7: Prueba in vivo de Compuestos Antisentido**

Compuestos antisentido, por ejemplo oligonucleótidos antisentido, se prueban en animales para valorar su capacidad para inhibir la expresión del CTGF y produce cambios fenotípicos. La prueba se puede realizar en animales normales, o en modelos de enfermedad experimentales. Para administración a animales, se formulan oligonucleótidos antisentido en un diluyente farmacéuticamente aceptable, tal como salina amortiguada de fosfato. La administración incluye rutas parenterales de administración, tal como intraperitoneal, intravenosa y subcutánea. El cálculo de dosificación de oligonucleótido antisentido y frecuencia de dosificación están dentro de las capacidades de aquellos expertos en la técnica, y depende de factores tales como ruta de administración y peso corporal del animal. Después de un periodo de tratamiento con oligonucleótidos antisentido, se aísla el ARN de tejido de hígado y se miden cambios en expresión de ácido nucleico del CTGF. También se miden cambios en niveles de proteína del CTGF usando los métodos descritos antes en el Ejemplo 6.

25

Ejemplo 8: Selección de Candidato de Oligonucleótido Antisentido (CTGF) de Factores de Crecimiento del Tejido Conectivo Humano Principal

000131

132

Introducción

De conformidad con la presente invención, se diseñan una serie de oligonucleótidos para dirigirse a diferentes regiones del ARN del factor de crecimiento del tejido conectivo humano, usando secuencias publicadas (Número de acceso a GenBank: NM_001901.2, incorporada en la presente como SEC ID NO: 9 y número de acceso al GenBank NT_025741.14, incorporada en la presente como SEC ID NO: 10).

Este estudio analiza el espacio de secuencia disponible y oligonucleótidos antisentido modificados dirigidos a espacio tanto exónico como intrónico del CTGF. Se sintetizan y evalúan aproximadamente 150 nuevas secuencias objetivo por actividad contra el CTGF en cultivo celular. Los oligonucleótidos se muestran en la Tabla 1. Todos los compuestos en la Tabla 1 son oligonucleótidos quiméricos ("gapmeros") de 20 nucleótidos en longitud, compuestos de una región "gap" central que consiste de ya sea diez 2'-desoxinucleótidos, el cual es flanqueado en ambos lados (direcciones 5' y 3') por cinco nucleótidos "alas" o 13 2'-desoxinucleótidos, el cual es flanqueado en ambos lados (direcciones 5' y 3') por dos y cinco nucleótidos "alas", respectivamente. Los alas se componen de nucleótidos 2'-metoxietilo (2'-MOE). Los linajes de internucleósido (armazón) son fosforotioato (P=S) por todo el oligonucleótido. Todos los residuales de cistidina son 5-meticitidinas. Los compuestos se analizan por su efecto en niveles de ARNm del factor de crecimiento del tejido conectivo humano por PCR en tiempo real cuantitativo como se

000132

733

describe en otros ejemplos en la presente. Los datos son promedios de dos experimentos. Si está presente, "N.D" indica "no datos".

Tabla 1

Inhibición de niveles de ARNm del factor de crecimiento del tejido conectivo humano por oligonucleótidos de fosforotioato quimérico que tiene alas 2'-MOE y una apertura desoxi

ISIS #	REGIÓN	SEC ID NO OBJETIVO	SITIO OBJETIVO	SECUENCIA	% INHIB	SEC ID NO.
124173	CDS	9	380	CCAGCTGCTTGGCGCAGACG	35	11
124189	CDS	9	1003	GCCAGAAAGCTCAAACCTGA	57	12
124212	3'-UTR	9	1783	CCACAAGCTGTCCAGTCTAA	47	13
124235	3'-UTR	9	2267	GGTCACACTCTCAACAAATA	47	14
124238	3'-UTR	9	2282	AAACATGTAACCTTTGGTCA	53	15
412271	5'-UTR	9	4	GGGAAGAGTTGTTGTGTGAG	0	16
412272	5'-UTR	9	38	AGGGTGGAGTCGCACTGGCT	46	17
412273	CDS	9	228	ACGAAGGCGACGCGGACGGG	35	18
412274	CDS	9	265	GCCGACGGCCGGCCGGCTGC	40	19
412275	CDS	9	475	GGTGACACGCGCGATCTTGC	52	20
412276	CDS	9	483	TCTTTGGCGGTGCACACGCC	0	21
412277	CDS	9	489	GCACCATCTTTGGCGGTGCA	0	22
412278	CDS	9	496	GCAGGGAGCACCATCTTTGG	16	23
412279	CDS	9	501	AAGATGCAGGGAGCACCATC	63	24
412280	CDS	9	507	CCACCGAAGATGCAGGGAGC	0	25
412281	CDS	9	512	CCGTACCACCGAAGATGCAG	47	26
412282	CDS	9	553	GTACTTGACAGTCTCTGGA	68	27
412283	CDS	9	592	GGGCATGCAGCCCACCGCCC	72	28
412284	CDS	9	718	AGGCCCAACCACGGTTTGGT	59	29
412285	CDS	9	723	AGGGCAGGCCCAACCACGGT	79	30
412286	CDS	9	732	TAAGCCGCGAGGGCAGGCCC	55	31
412287	CDS	9	829	CCCACAGGTCTTGAACAGG	30	32
412288	CDS	9	839	AGATGCCCATCCACAGGTC	55	33
412289	3'-UTR	9	1273	CCAGTCTAATGAGTTAATGT	56	34
412290	3'-UTR	9	1281	TTCAAGTTCAGTCTAATGA	10	35
412291	3'-UTR	9	1361	TTTTCCCCAGTTAGAAAAA	38	36
412292	3'-UTR	9	1388	CACAATGTTTGAATTGGGT	50	37
412293	3'-UTR	9	1394	ACATGGCACAATGTTTGTGAA	67	38
412294	3'-UTR	9	1399	GTTTGACATGGCACAATGTT	73	39
412295	3'-UTR	9	1404	TATTTGTTTGACATGGCACA	74	40
412296	3'-UTR	9	1412	TGATAGACTATTTGTTTGAC	35	41
412297	3'-UTR	9	1457	GTTCCACTGTCAAGTCTTAA	55	42
412298	3'-UTR	9	1469	TGTACTAATGTAGTTCCACT	69	43
412299	3'-UTR	9	1482	CATTCTGGTGTGTGTACTA	86	44
412300	3'-UTR	9	1489	TAATATACATTCTGGTGTG	76	45
412301	3'-UTR	9	1495	ACACCTTAATATACATTCTG	54	46
412302	3'-UTR	9	1502	TAAAGCCACACCTTAATATA	54	47
412303	3'-UTR	9	1520	GTACCTCCCACTGCTCCTA	53	48
412304	3'-UTR	9	1554	AAGATGCTATCTGATGATAC	52	49
412305	3'-UTR	9	1559	CGTATAAGATGCTATCTGAT	69	50
412306	3'-UTR	9	1577	AATAGCAGGCATATTACTCG	74	51
412307	3'-UTR	9	1586	TACACTTCAAATAGCAGGCA	69	52
412308	3'-UTR	9	1591	TCAATTACACTTCAAATAGC	50	53
412309	3'-UTR	9	1659	GGAGAATGCACATCCTAGCT	66	54
412310	3'-UTR	9	1665	ATGGCTGGAGAATGCACATC	60	55
412311	3'-UTR	9	1670	TCTTGATGGCTGGAGAATGC	71	56

000133

ISIS #	REGIÓN	SEC ID NO OBJETIVO	SITIO OBJETIVO	SECUENCIA	% INHIB	SEC ID NO.
412312	3'-UTR	9	1729	GAATCAGAAATGTCAGAGCTG	37	57
412313	3'-UTR	9	1946	CATTGAAATATCAAAGCATT	0	58
412314	3'-UTR	9	1952	GGCTAACATTGAAATATCAA	25	59
412315	3'-UTR	9	1958	AATTGAGGCTAACATTGAAA	1	60
412316	3'-UTR	9	1965	GTTTCAGAAATTGAGGCTAAC	65	61
412317	3'-UTR	9	1971	TATGGTGTTCAGAAATTGAG	13	62
412318	3'-UTR	9	1976	CTACCTATGGTGTTCAGAAA	61	63
412319	3'-UTR	9	1982	TACATTCTACCTATGGTGT	38	64
412320	3'-UTR	9	1991	GACAAGCTTTACATTCTACC	24	65
412321	3'-UTR	9	1996	GATCAGACAAGCTTTACATT	37	66
412322	3'-UTR	9	2007	ATGCTTTGAACGATCAGACA	64	67
412323	3'-UTR	9	2012	ATTTTCATGCTTTGAACGATC	44	68
412324	3'-UTR	9	2018	GTATCCATTTCATGCTTTGA	60	69
412325	3'-UTR	9	2026	CCATATAAGTATCCATTTCA	48	70
412326	3'-UTR	9	2032	GAATTTCCATATAAGTATCC	28	71
412327	3'-UTR	9	2040	TCTGAGCAGAATTTCCATAT	58	72
412328	3'-UTR	9	2050	TGTCATTCTATCTGAGCAGA	61	73
412329	3'-UTR	9	2060	TTTGACGGACTGTCATTCTA	47	74
412330	3'-UTR	9	2070	AACAATCTGTTTTCGACGGAC	48	75
412331	3'-UTR	9	2088	TGATGCCTCCCCCTTTGCAAA	53	76
412332	3'-UTR	9	2100	TGCCAAGGACACTGATGCCT	68	77
412333	3'-UTR	9	2105	CAGCTTGCCAAGGACACTGA	75	78
412334	3'-UTR	9	2110	GAAATCAGCCTGCCAAGGAC	60	79
412335	3'-UTR	9	2115	ACCTAGAAATCAGCCTGCCA	46	80
412336	3'-UTR	9	2120	TTCTACCTAGAAATCAGCC	51	81
412337	3'-UTR	9	2128	TACCACATTTCTACCTAGA	59	82
412338	3'-UTR	9	2134	TGAGGCTACCACATTTCTTA	0	83
412339	3'-UTR	9	2140	TAAAAGTGAGGCTACCACAT	48	84
412340	3'-UTR	9	2213	CAAATGCTTCCAGGTGAAAA	49	85
412341	3'-UTR	9	2219	TAGAAACAAATGCTTCCAGG	66	86
412342	3'-UTR	9	2230	TCATATCAAAGTAGAAACAA	12	87
412343	3'-UTR	9	2242	TCCGAAAAACAGTCATATCA	24	88
412368	Intron 1	10	1308	ACCCGGCTGCAGAGGGCGAG	0	89
412369	Intron 1	10	1313	CGCTTACCCGGCTGCAGAGG	0	90
412370	Intron 1	10	1410	GACAGGGCGGTCAGCGGCGC	0	91
412371	Intron 2	10	1730	AGTCCGAGCGGTTTCTTTT	0	92
412372	Intron 2	10	1735	AACTCAGTCCGAGCGGTTTC	19	93
412373	Intron 2	10	1740	AAAGAAACTCAGTCCGAGCG	10	94
412374	Intron 2	10	1745	TGGAGAAAGAAACTCAGTCC	45	95
412375	Intron 2	10	1750	GCAGCTGGAGAAAGAACTC	14	96
412376	Intron 2	10	1755	TGGCAGCAGCTGGAGAAAGA	46	97
412377	Intron 2	10	1887	AGGGAGCACCATCTTTGGCT	20	98
412378	Intron 3	10	2125	TCACCCGCGAGGGCAGGCC	33	99
412379	Intron 3	10	2137	GGAAGACTCGACTCACCCGC	0	100
412380	Intron 3	10	2142	TTAGAGGAAGACTCGACTCA	0	101
412381	Intron 3	10	2150	ACCTGACTTAGAGGAAGAC	47	102
412382	Intron 3	10	2155	TCACGACCCTGACTTAGAGG	31	103
412383	Intron 3	10	2160	GAGAAATCACGACCCTGACTT	2	104
412384	Intron 3	10	2165	TGGGAGAGAAATCACGACCCT	31	105
412385	Intron 3	10	2170	CTCCCTGGGAGAGAAATCACG	0	106
412386	Intron 3	10	2191	GGTCGGCACAGTTAGGACTC	53	107
412387	Intron 3	10	2196	CGTTCGGTCGGCACAGTTAG	30	108
412388	Intron 3	10	2216	CCTGGATAAGGTATTTCCTCC	0	109
412389	Intron 3	10	2235	ACAAACACCATGTAACACGC	11	110

124
105

ISIS #	REGIÓN	SEC ID NO OBJETIVO	SITIO OBJETIVO	SECUENCIA	% INHIB	SEC ID NO.
412390	Intron 3	10	2241	GAGCACACAAACACCATGTA	0	111
412391	Intron 3	10	2251	TGCGAGAGCAGAGCACACAA	0	112
412392	Intron 3	10	2256	TAAGCTGCCGAGCAGAGCA	2	113
412393	Intron 3	10	2261	GTCGGTAAGCTGCCGAGAGCA	23	114
412394	Intron 3	10	2266	TTCCAGTCGGTAAGCTGCGA	15	115
412395	Intron 4	10	2472	ACATGTACCTTAATGTTCTC	0	116
412396	Intron 4	10	2477	GCAGAACATGTACCTTAATG	0	117
412397	Intron 4	10	2482	TAGGAGCAGAACATGTACCT	9	118
412398	Intron 4	10	2487	GTTAATAGGAGCAGAACATG	19	119
412399	Intron 4	10	2496	TGAAAAATAGTTAATAGGAG	0	120
412400	Intron 4	10	2511	CCACTGTTTTTCTCTGTGAAA	10	121
412401	Intron 4	10	2525	AAGTTGGGTCCTATCCACTG	28	122
412402	Intron 4	10	2530	GCCCTAAGTTGGGTCCTATC	20	123
412403	Intron 4	10	2535	CAAGAGCCCTAAGTTGGGTC	0	124
412404	Intron 4	10	2540	CGTGCAAGAGCCCTAAGTT	64	125
412405	Intron 4	10	2558	CGGGCTTATACTAACAAGCG	6	126
412406	Intron 4	10	2563	GATAACGGGCTTATACTAAC	33	127
412407	Intron 4	10	2568	TTGGAGATAACGGGCTTATA	73	128
412408	Intron 4	10	2573	TAGTTTTGGAGATAACGGGC	51	129
412409	Intron 4	10	2578	TTAGATAGTTTTGGAGATAA	24	130
412410	Intron 4	10	2584	CAATGGTTAGATAGTTTTGG	36	131
412411	Intron 4	10	2589	CAGTCAATGGTTAGATAGT	53	132
412412	Intron 4	10	2594	CAAAACAGCTCAATGGTTAG	34	133
412413	Intron 4	10	2599	TCCAGCAAAACAGCTCAATG	59	134
412414	Intron 4	10	2604	CTCATTCAGCAAAACAGCT	42	135
412415	Intron 4	10	2609	AAGCTCTCATTCAGCAAAA	57	136
412416	Intron 4	10	2614	TACACAAGCTCTCATTCAG	44	137
412417	Intron 4	10	2623	GGTTGCTATTACACAAGCTC	72	138
412418	Intron 4	10	2628	CTGGTGGTTGCTATTACACA	61	139
412419	Intron 4	10	2633	GAAAACTGGTGGTTGCTATT	29	140
412420	Intron 4	10	2638	TAGTGGAAACTGGTGGTTG	5	141
412421	Intron 4	10	2663	TTAAGTAACCTGTGGAAGA	15	142
412422	Intron 4	10	2672	TGTCTGAATTAATAACCC	4	143
412423	Intron 4	10	2677	TGGAATGCTCTGAATTAAT	0	144
412424	Intron 4	10	2691	GCCAGAGCCTCTCTTGAAT	36	145
412425	Intron 4	10	2698	AAAAATAGCCAGAGCCTCTC	59	146
412426	Intron 4	10	2703	TGTCCAAAAATAGCCAGAGC	28	147
412427	Intron 4	10	2708	TGCTATGTCCAAAAATAGCC	15	148
412428	Intron 4	10	2713	TCATTTGCTATGTCCAAAAA	28	149
412429	Intron 4	10	2718	GAGTCTCATTTGCTATGTCC	20	150
412430	Intron 4	10	2723	AGTTTGAGTCTCATTTGCTA	30	151
412431	Intron 4	10	2728	GAGGAAGTTTGAGTCTCATT	55	152
412432	Intron 4	10	2763	CTTCTGTTGCTGACTTCTG	55	153
412433	Intron 4	10	2778	CCTCTGTGTTTAGTCTTCT	56	154
412434	Intron 4	10	2788	TTTCTTCAACCTCTGTGTT	15	155
412435	Intron 4	10	2796	GGAGTGGCTTCTTCAACCC	43	156
412436	Intron 4	10	2849	AGGAAGACAAGGGAAAAGAG	20	157
412437	Intron 4	10	2854	TTCTAAGGAAGACAAGGGAA	0	158
412438	Intron 4	10	2859	TGCCCTTCTAAGGAAGACAA	31	159
412439	Intron 2	10	1791	GGATGCGAGTTGGGATCTGG	0	160
412440	CDS	9	380	CCAGCTGCTTGGCGCAGACG	64	161
412441	CDS	9	1003	GCCAGAAAGCTCAAACCTGA	37	162
412442	3'-UTR	9	1783	CCACAAGCTGTCCAGTCTAA	32	163
412443	3'-UTR	9	2267	GGTCACACTCTCAACAAATA	59	164
412444	3'-UTR	9	2282	AAACATGTAACCTTTGGTCA	55	165
418899	3'-UTR	9	1391	TGACATGGCACAATGTTTG	ND*	166

25 *ND - es decir, no determinado en el experimento, pero es muy activo en otro ensayo.

Como se muestra en la Tabla 1, las SEC ID NOs: 11-

000135

135
136

15, 17-20, 24, 26-34, 36-57, 59, 61, 63-82, 84-86, 88, 95,
97, 99, 102, 103, 105, 107, 108, 122, 125, 127-140, 145, 146,
149, 151-154, 156, 159, 161-165 demuestran al menos 24% de
inhibición de expresión del factor de crecimiento del tejido
5 conectivo humano en este ensayo y por lo tanto son
preferidos. Los sitios objetivos a los cuales estas
secuencias preferidas son complementarias son referidos en la
presente como "sitios activos" y son por lo tanto sitios
preferidos para ser objetivos por compuestos de la presente
10 invención.

El compuesto antisentido es complementario dentro
del intervalo de nucleótidos en la secuencia del CTGF, es
decir, dentro del intervalo de nucleótidos 718-751, 1388-
1423, 1457-1689, 2040-2069, 2120-2147 o 2267-2301 de la SEC
15 ID NO: 9. En cierta modalidad, el compuesto antisentido es
complementario dentro del intervalo de nucleótidos 2728-2797
de la SEC ID NO: 10. Los compuestos dirigidos a estos
intervalos demuestran al menos 50% de inhibición (es decir,
SEC ID NOs: 15, 29, 31, 42, 46-49, 53, 72, 81, 82, 152-154,
20 164 y 165). Ciertos sitios objetivos listados en la Tabla 1
también demuestran al menos 50% de inhibición (es decir, SEC
ID NOs: 12, 20, 33, 34, 6, 107, 129, 132, 134, 136 y 146).

En ciertas modalidades, el compuesto antisentido es
complementario dentro del intervalo de nucleótidos 553-611,
25 1394-1423, 1469-1508, 1559-1605, 1659-1689 o 2100-2129. Los
compuestos dirigidos en este sentido demuestran al menos 60%
de inhibición (es decir, SEC ID NOs: 27, 38, 43, 50, 52, 54,
55, 77, 79 y 86). Ciertos sitios objetivos listados en la

126
137

Tabla 1 también demuestran al menos 60% de inhibición (es decir, SEC ID NOs: 24, 61, 63, 67, 69, 73, 125, 139 y 161).

El compuesto antisentido también es complementario dentro del intervalo de nucleótidos 1399-1423. Los compuestos dirigidos en este sentido demuestran al menos 70% de inhibición (es decir, SEC ID NOs: 39 y 40). Ciertos sitios objetivos listados en la Tabla 1 también demuestran al menos 70% de inhibición (es decir, SEC ID NOs: 28, 30, 45, 51, 56, 78, 128 y 138). Un sitio objetivo listado en la Tabla 1 también demuestra al menos 80% de inhibición (es decir, SEC ID NO: 44). En ciertas modalidades, el porcentaje de inhibición se logra cuando el compuesto antisentido se suministra a células HuVec a una concentración de 50 nm.

Conductores múltiples con aparente actividad mayor que la secuencia principal ASO histórica, SEC ID NO: 15 (ISIS 124238), se identifican en secuencias tanto exónicas como intrónicas.

Estudios de respuesta a la dosis en nueve secuencias muy activas (SEC ID NOs: 28, 30, 39, 40, 45, 52, 56, 78, 125) se completaron (véase Figura 8). SEC ID NO: 13 y 15 (ISIS 124212 y 124238) son los oligonucleótidos previamente designados y SEC ID NO: 167 (ISIS 141923, secuencia CCTCCCTGA AGGTCCTCC) es el control negativo.

25 **Materiales y Métodos**

Se seleccionan y confirman oligonucleótidos a una concentración de 50 nM en células endoteliales de vena umbilical (HuVEC) usando transfección mediada por

000137

137
138

Lipofectina. Las células HuVEC de Cascade Biologics (Portland, OR) mantenidas en Medio 200 suplementado con Suplemento de Crecimiento Bajo en Suero (de Cascade Biologics) se colocan en placas de 96 cavidades a 5,000
5 células por cavidad y se incuban durante la noche a 37°C en la presencia de CO₂ al 5%. Al siguiente día el medio se aspira y reemplaza con Opti-MEM I precalentado (Invitrogen) que contiene mezcla Oligo-Lipofectamina 2000 (Invitrogen) (3 mg de Lipofectamina 2000 por 1 ml de medio Opti-MEM). Después
10 de 4 horas, la mezcla de transfección se intercambia por Medio 200 fresco suplementado con Suplemento de Crecimiento Bajo en Suero y se incuba a 37°C en la presencia de CO₂ al 5%. Después de 16-24 horas, a aproximadamente 80% de confluencia, las células se lavan con salina amortiguada de
15 fosfato (PBS) y se lisan por purificación de ARN con el Kit RNeasy de Qiagen. Se mide el mensaje del CTGF por reacción en cadena de polimerasa en tiempo real cuantitativa (RT-PCR) (series de Cebador/Sonda mostradas a continuación) y los resultados se normalizan a ARN total.

20

Análisis Estadístico

Cada una de las muestras se analiza por duplicado, y las barras verticales representan el espaciado entre las dos mediciones.

25

Resultados y Discusión

De las aproximadamente 150 nuevas secuencias objetivo sintetizadas y evaluadas por actividad contra el

000138

130
134

CTGF en cultivo celular, los nuevos oligonucleótidos del CTGF (SEC ID NOs: 28, 30, 39, 40, 45, 52, 56, 78, 125 y 166) muestran excelente inhibición de expresión ARNm del CTGF. Los oligonucleótidos muy activos identificados se proporcionan en la Figura 7.

Un número de nuevos oligonucleótidos intrónicos (Figuras 4, 5 y 6) y exónicos (Figuras 1, 2 y 3) sorprendentemente son significativamente más activos que los compuestos previamente seleccionados históricos, que incluyen ISIS 124238.

La eficiencia de exones objetivo antisentido es generalmente mayor que aquellos intrones objetivo (Figura 7A). Se proporcionan un listado de estas secuencias de nucleótido exónico en la Figura 7B.

Los oligonucleótidos antisentido más activos 10 de la parte superior se confirman en experimentos de respuesta a la dosis en células HuVEC usando el método descrito anteriormente.

Ejemplo 9: Análisis de Manchado Western de Niveles de Proteína del Factor de Crecimiento del Tejido Conectivo

El análisis de manchado Western (análisis de inmunomanchado) se llevan a cabo usando métodos estándar. Las células se recolectan 16-20 horas después del tratamiento con oligonucleótido, se lavan una vez con PBS, se suspenden en amortiguador Laemmli (100 µl/cavidad), se hierven por 5 minutos y se cargan en un gel SDS-PAGE al 16%. Los geles se corren por 1.5 horas a 150 V, y se transfieren a la membrana

134
140

para manchado western. Se usa el anticuerpo primario apropiado dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo, con un anticuerpo secundario radioetiquetado o fluorescentemente etiquetado dirigido contra las especies de anticuerpo primario. Se visualizan bandas usando un PHOSPHORIMAGER™ (Molecular Dynamics, Sunnyvale CA).

Ejemplo 10: Estudio Piloto de Toxicología de Oligonucleótido Antisentido del CTGF de Ratón

10

Objetivo del Estudio

El propósito de este estudio toxicológico piloto es para evaluar tres oligonucleótidos dirigidos al CTGF humano para potencial toxicidad en ratones BALB/c machos normales. Los oligonucleótidos probados son secuencias ISIS 412294 (SEC ID NO: 39), 412295 (SEC ID NO: 40), y 418899 (SEC ID NO: 166).

Métodos

Ratones BALB/c machos (aproximadamente 8 semanas de edad) que pesan aproximadamente 25 gramos, se alimentaron con una dieta de alimento para laboratorio normal durante el estudio. Los ratones se dosificaron subcutáneamente (SQ) dos veces por semana con 25 o 50 mg/kg de oligonucleótidos antisentido por 4 semanas (n=6). Se midieron los siguientes criterios de valoración:

- Pesos Corporales Semanalmente;
- Químicas de Plasma Sanguíneo durante 4 semanas;

000140

141

- Peso del órgano, peso corporal en la necropsia; y
- Cepa H&E de Hígado y Riñón.

Resultados

5 Los resultados después de 4 semanas de dosificación con 25 mg/kg o 50 mg/kg de oligonucleótido antisentido ISIS 412294 (SEC ID NO: 39), ISIS 412295 (SEC ID NO: 40) o ISIS 418899 (SEC ID NO: 166) indican un número de criterios de valoración que difieren significativamente del grupo control
10 de ratones tratado con salina. Estos incluyen:

1) Niveles de alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST) en plasma después de 4 semanas de tratamiento con 25 mg/kg o 50 mg/kg de ISIS 412295 (SEC ID NO: 39) o ISIS 412295 (SEC ID NO: 40) o con 25 mg/kg
15 de ISIS 418899 (SEC ID NO: 166) son similares a los niveles en el control de salina (vehículo), sin embargo los ratones dosificados con 50 mg/kg de ISIS 418899 (SEC ID NO: 166), muestran niveles de ALT/AST significativamente incrementados por arriba de los valores observados en el grupo control
20 (véase Figuras 9A y 9B). Esto es un resultado sorprendente que no se pronostica en estudios previos o por los ensayos a base de célula.

2) La ganancia de peso para el grupo tratado con 50 mg/kg de 412295 es significativamente menor que la ganancia de
25 peso en el grupo control (véase Figura 10).

Conclusión

La SEC ID NO: 39 (ISIS 412294) no exhibe muchas

000141

144
742

característica toxicológica indeseables como la SEC ID NO: 40 (ISIS 412295) y SEC ID NO: 166 (ISIS 41899). Este resultado es completamente inesperado, y no se pronostica por el comportamiento del cultivo celular de estas secuencias de oligonucleótido.

Ejemplo 11: Efecto de un Oligonucleótido Antisentido del CTGF de Rata (SEC ID NO: 163) en Expresión de ARNm del CTGF y Colágeno en Ratitas Heridas

Objetivo

Se usa el oligonucleótido antisentido del CTGF de SEC ID NO: 163 (ISIS 412442) para examinar la capacidad de un oligonucleótido antisentido del CTGF para reducir la expresión de tanto del CTGF como de CollA2 (un biomarcador de cicatrización) en un modelo animal de cicatrización e rata. Este oligonucleótido antisentido tiene una estructura química idéntica como la SEC ID NO: 39 (ISIS 412294), sin embargo la secuencia se ha modificado ligeramente para ser 100% complementaria a la secuencia de ARNm del CTGF de rata.

Herida

Se introducen cuatro punzones para biopsia de 0.8 centímetros de espesor total en las espaldas de ratas sin pelo de 10 semanas de edad (día 1 de estudio), dos en cada lado de la línea media de la espina. Las heridas se dejan abiertas, pero se cubren con un vendaje oclusivo estéril.

000142

142
143**Dosificación de Oligonucleótido Antisentido**

Los dos sitios de biopsia en el lado derecho del animal se tratan intra-dérmicamente con oligonucleótido antisentido del CTGF en los días 1, 5, 9 y 13 después de la biopsia en cualquiera de 3.0, 1.0, 0.3 o 0.1 mg del nucleótido antisentido. Los sitios de biopsia en el lado izquierdo del animal se tratan intra-dérmicamente con salina amortiguada de fosfato (PBS). Los animales se sacrificaron en el Día 15 después de la biopsia. Se suministra un volumen total de 200 µl de oligonucleótido antisentido o PBS a cada sitio de biopsia perforado. Estos 200 µl de volumen se divide en cuatro alícuotas de 50 µl las cuales se inyectan alrededor de la periférica de la herida, a aproximadamente 0.25 cm hasta 0.5 cm de los lados izquierdo, derecho, superior e inferior de la herida.

Muestra Recolectada/Sacrificio

En la fecha del sacrificio, los animales se sometieron a eutanasia y se obtiene una muestra de la piel del centro de la herida con una perforación de biopsia de 0.5 cm, y se extrae el ARNm de estas muestras usando procedimientos estándar. Se realiza el análisis de ARNm por RT-PCR del CTGF y CollA2 de rata usando la metodología de curva estándar para análisis de datos y RiboGreen como el gen de mantenimiento/normalización.

Resultados

El tratamiento de las ratas en todas las dosis

000143

143
144

resulta en una reducción estadísticamente significativa en expresión de ARNm tanto de CTGF como de CollA2 (véase Figura 11). Estos resultados claramente demuestran que la inhibición de expresión del CTGF con un oligonucleótido antisentido modificado 2'MOE puede disminuir la deposición de colágeno en la piel, lo cual puede resultar en una reducción en la severidad de formación de cicatriz en la piel.

Ejemplo 12: Estudio de Farmacocinética Intra-dérmica en una Dosis única de Oligonucleótido Antisentido del CTGF en Conejos

Objetivo del Estudio

El propósito de este estudio de farmacocinética en conejo es para evaluar la concentración de un oligonucleótido antisentido del CTGF (SEC ID NO: 39, ISIS 412294) en la piel del conejo en diferentes tiempos subsecuente a una inyección intra-dérmica única.

Diseño del Estudio

En el día 0 del estudio, todos los animales se dosificaron intra-dérmicamente (ID) con una inyección de 10 µl única del oligonucleótido antisentido del CTGF de SEC ID NO: 39 a una concentración de 50 mg/ml (5 mg de dosis total). Los animales se dosificaron con el oligonucleótido antisentido en un sitio de la parte izquierda de la línea media espinal, casi en paralelo a los hombros del conejo. La aguja se inserta de forma que el material de prueba se

000144

144
745

inyecta en forma descendente hacia la base del cuerpo del animal. En los días 1, 3, 7 o 14, los conejos se someten a eutanasia y se obtienen dos perforaciones para biopsia de 1.0 cm de espesor total, una centrada sobre el sitio de inyección original y la otra verticalmente por debajo a 0.5 cm separada. Las muestras se congelan por completo y se almacenan a -80°C antes del análisis de los niveles del fármaco de oligonucleótido antisentido. Los resultados representan los niveles medios de oligonucleótido antisentido de ambas biopsias en el tiempo indicado.

Resultados y Conclusiones

Niveles significantes del oligonucleótido antisentido se representa hasta por al menos el día 14 después de la dosificación intradérmica (véase Figura 12). Las concentraciones terapéuticas del fármaco están entre 1 y 100 µg/gramo de tejido. Estos resultados demuestran que para este primer tiempo existe una residencia de tiempo prolongada de un oligonucleótido antisentido de 2'MOE con esta configuración química en la piel, y estos resultados claramente muestran el potencial terapéutico de esta clase de compuesto en la piel.

EJEMPLO 13: Búsqueda del Genoma

El potencial para la SEC ID NO: 39 para inducir efectos antisentido no deseados que puede ser traducido en toxicidad "fuera de objetivo" se valora conduciendo una búsqueda de la base de datos del genoma humano para

000145

145
146

secuencias que tienen homología o complementariedad completa o parcial con la secuencia de nucleótido SEC ID NO: 39.

Se conduce una búsqueda comprehensiva en la base de datos de secuencia de ADN humano publicada para evaluar si las secuencias que comprenden SEC ID NO: 39 tienen suficiente homología con el arreglo conocido de genes humanos, de forma que el antisentido u otra actividad inhibitoria no buscada pueda ser ejercida contra la expresión de productos del gen humano diferente a la del CTGF objetivo (factor de crecimiento del tejido conectivo) y con ello inducir efectos "fuera de objetivo". La búsqueda implica selección para secuencias homólogas que varían de 20 nucleótidos (es decir, la longitud completa de la SEC ID NO: 39 descendiendo a 12 nucleótidos.

No se detectaron sitios fuera de objetivo en el genoma humano con 20, 19 o 18 bases de homología con la SEC ID NO: 39. La ausencia completa de sitios fuera de objetivo con 18, 19 o 20 bases indica que la probabilidad de cualquier actividad fuera de objetivo consecucional es mínima. Se identifican tres homologías de 17 base con la SEC ID NO: 39. Una de estas está dentro del intrón del gen LRFN2. Los intrones están típicamente empalmados con el transcripto antes que el ARNm llegue al citoplasma, el sitio de acción de la SEC ID NO: 39. Por esta razón, la SEC ID NO: 39 no se espera que afecte la expresión de LRFN2. Las otras dos homologías de 17 base se localizan dentro de las regiones del espaciador inter-gen. Los espaciadores inter-gen generalmente no se transcriben pero existen como ADN de

144
147

hebra doble en el compartimiento nuclear, separado del sitio de acción de la SEC ID NO: 39. Por lo tanto, no existen homologías de 17 base de interés.

Entre las homologías de 16 base, 15 base y 14 base encontradas, únicamente una se localiza dentro de un transcrito conocido o esperado (es decir, FRMD5, el cual codifica un activo de transferasa de biosíntesis de lípido en el hígado). Sin embargo, la homología de la SEC ID NO: 39 de 16 base con un transcrito de sentido de ARNm no puede ser conductivo a actividad antisentido (es decir, la hibridización puede únicamente ser posible si una porción de la secuencia de la SEC ID NO: 39 es complementaria, no homóloga, a la secuencia del transcrito de ARNm). Por lo tanto, la SEC ID NO: 39 puede no afectar este transcrito.

Todas las otras homologías de 16 base hasta 14 base corresponden a intrones o espaciadores inter-gen sin transcritos traslapados, transcritos pronosticados o etiquetas de secuencia expresadas. No existen homologías en 13 base. Cualquiera de los transcritos a base de únicamente la homología de 12 nucleótidos o más corta puede presentar un objetivo termodinámicamente desfavorable, comparado a la unión de un oligonucleótido de 20 base similar a la SEC ID NO: 39 con su objetivo planeado. Por lo tanto, homologías de 12 base o más corta no presenta un potencial significativo para actividad antisentido fuera de objetivo.

Por lo tanto, la búsqueda en la base de datos del genoma humano muestra que la SEC ID NO: 39 tiene un alto grado de especificidad para el objetivo planeado con

000147

147
148

potencial mínimo para efectos fuera de objetivo.

Ejemplo 14: Estudio Clínico Intra-dérmico de dosis única
5 **de Fase 1 para Valorar la Seguridad y Tolerancia de un**
Oligonucleótido Antisentido del CTGF (SEC ID NO: 39)

Objetivo del Estudio

El oligonucleótido antisentido del CTGF humano de
10 SEC ID NO: 39 (ISIS No. 412294) se administra a seis
pacientes por dosificación intra-dérmica (80 mg de dosis
total) como parte de un protocolo de estudio de Fase 1 para
valorar la seguridad y tolerancia de una dosis única del
fármaco.

15

Resultados

No se reportaron eventos adversos diferentes a
reacciones en el sitio de inyección local como eritema,
inflamación, comezón y endurecimiento. Se reportan eventos
20 adversos listados en aproximadamente 50% de los sujetos a un
nivel de severidad de "mínimo". No se notaron cambios en la
química del suero, hematología, análisis de orina, ECGs,
signos vitales, examen físico y activación del complemento.

25

Conclusiones

La administración del oligonucleótido antisentido
del CTGF a dosis anticipada para estar dentro del intervalo

000148

148
149

terapéutico, así como también tolerancia en humanos, que demuestra la seguridad de este compuesto para tratar cicatrización de la piel.

5 **EJEMPLO 15: Niveles de Fármaco de Oligonucleótido Antisentido de la SEC ID NO: 39 en Piel Humana después de la Dosificación Intra-dérmica**

Se evalúan niveles del fármaco en la piel es un grupo de pacientes en un estudio clínico inicial, en donde 5
10 pacientes cada uno recibe 40 mg del oligonucleótido antisentido (ASO) (administrado como 10 dosis iguales de 4 mg cada una). Se obtienen biopsias de la piel en el día 21 después de la administración de dosis única del ASO al Día 1 en el sitio de la herida quirúrgica simulada (línea dibujada
15 en la piel como una referencia para a los lugares de las dosificaciones). La perforación para biopsia consiste de un centro cilíndrico de 4 mm de muestra de tejido. Se determinan los niveles del ASO usando electroforesis capilar y sondas específicas a la secuencia fluorescentemente etiquetadas y
20 son 84.2 µg/gramo de tejido. Las concentraciones terapéuticas proyectadas del fármaco ASO se anticipan por estar entre 1 y 100 µg/ gramo de tejido.

Estos resultados demuestran que por primera vez existe un tiempo de residencia prolongado de un
25 oligonucleótido antisentido 2'MOE con esta configuración química en piel humana después de la administración intradérmica, y estos resultados claramente muestran el potencial terapéutico de esta clase de compuesto en la piel.

000149

149
150

Ejemplo 16: Un Estudio de Eficacia y Seguridad Clínica Controlada dentro del Sujeto, de Doble ciego, Aleatorizado de Fase 2 de la SEC ID NO: 39 en Reducción de la Severidad de Cicatriz en Sujetos que Sufren una Abdominoplastia Electiva

Este estudio es un estudio controlado dentro del sujeto, de Doble Ciego, aleatorizado que evalúa la eficacia y seguridad del oligonucleótido antisentido del CTGF de la SEC ID NO: 39 (es decir, el producto del fármaco). El producto del fármaco se administra adyacente a ambos lados de la incisión de abdominoplastia vía inyecciones intradérmicas en sujetos que son sometidos a abdominoplastia electiva.

Una sección de la incisión de abdominoplastia en cualquiera de los lados de la mitad, solo el lateral al vello púbico, se trata con el producto del fármaco o placebo, después la incisión quirúrgica se cierra.

La duración del estudio es de aproximadamente 24 semanas. Los sujetos recibieron la abdominoplastia en el Día 1, seguido por dosificación del producto del fármaco y placebo durante un periodo de 10 semanas. Se realizaron observación y valoración de la cicatriz durante 4 semanas hasta 12 semanas, y nuevamente a la semana 24.

Se determina la eficacia variando cada par apareado de incisiones.

Se evalúa la eficacia a las semanas 12 y 14 después de la cirugía de abdominoplastia usando los dos siguientes métodos variando la severidad de cicatrices incisionales:

000150

15

- Valoración del Panel Experto de fotografías ciegas usando escala análoga visual (VAS);

- Escala de Valoración de Cicatriz Sometida a Escala de Valoración de Cicatriz del Investigador;

5 SEC ID NO: 39 es eficaz por este criterio.

Ejemplo 17: Estudio de Eficacia y Seguridad Clínica Controlada Dentro del Sujeto, de Doble Ciego, Aleatorizado de Fase 2 de la SEC ID NO: 39 en la Reducción de Cicatrización de la Piel en Sujetos sometidos a una Revisión Electiva de Cicatrices Centrales de la Reducción de Mama Previa o Cirugía de Mastopexia

15 Este estudio es un estudio controlado dentro del sujeto, de doble ciego, aleatorizado para evaluar la eficacia y seguridad de oligonucleótido antisentido del CTGF de la SEC ID NO: 39 (es decir, el producto del fármaco). El producto del fármaco se administra a la porción media de las
20 cicatrices de reducción de mama revisadas vía inyecciones intradérmicas. Una sección de cualquier lado de la porción media de la herida/cicatriz de mama revisada se trata con producto del fármaco o placebo, después la incisión quirúrgica se cierra.

25 Hasta 40 sujetos son contratados en este estudio. La duración del estudio es aproximadamente de 24 semanas. Los sujetos reciben las revisiones de cicatriz en el Día 1, seguido por dosificación del producto del fármaco y placebo

000151

152

durante un periodo de 10 semanas. Se realizan la observación y valoración de cicatriz cada 4 semanas hasta la semana 12, y nuevamente en la semana 24.

La eficacia de determina variando cada par apareado de incisiones. Se evalúa la eficacia a las semanas 12 y 24 después de la revisión de las porciones médicas de la cicatriz de reducción de mama usando dos métodos que varían la severidad de cicatrices incisionales:

- Valoración del Panel Experto de fotografías ciegas usando escala análoga visual (VAS);

- Escala de Valoración de Cicatriz Sometida a Escala de Valoración de Cicatriz del Investigador;

SEC ID NO: 39 es eficaz por este criterio.

15

20

25

NOVEDAD DE LA INVENCION

000152

152
15

Habiéndose descrito la presente se considera como novedad, y por lo tanto, se reclama como propiedad lo contenido en las siguientes:

5

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto caracterizado porque comprende un oligonucleótido modificado que consiste de 12-30 nucleósidos ligados, al menos una porción de secuencia de 12 nucleobases la cual está presente dentro de la región seleccionada de los nucleótidos 718-751, 1388-1423, 1457-1689, 2040-2069, 2120-2147, 2728-2797, 2267-2301, 553-611, 1394-1423, 1469-1508, 1559-1605, 1659-1689, 2100-2129 y 1399-1423 de la SEC ID NO:

15 9.

2. Un compuesto caracterizado porque comprende un oligonucleótido modificado que consiste de 12-30 nucleósidos ligados, al menos una porción de secuencia de 12 nucleobases la cual está presente dentro de las secuencias de nucleobase expuestas en las SEC ID NOs: 28, 30, 39, 40, 43, 44, 45, 50, 51, 52, 56, 78, 125 y 166.

20

3. Un compuesto de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque el oligonucleótido modificado consiste de 20 nucleósidos ligados.

25 4. Un compuesto caracterizado porque comprende un oligonucleótido modificado que comprende al menos 12 nucleósidos ligados, la secuencia de nucleobase la cual está presente dentro de las secuencias de nucleobase expuestas en

000153

153
154

las SEC ID NOs: 28, 30, 39, 40, 43, 44, 45, 50, 51, 52, 56, 78, 125 y 166.

5. Un compuesto de conformidad con la reivindicación 4, caracterizado porque el oligonucleótido modificado comprende al menos 14 nucleósidos ligados.

6. El compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, caracterizado porque el oligonucleótido modificado es un oligonucleótido de hebra única.

7. El compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, caracterizado porque el oligonucleótido modificado es un oligonucleótido de hebra doble.

8. El compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque el oligonucleótido modificado tiene una secuencia la cual es 100% idéntica sobre su longitud a una porción de una de las secuencias expuestas en las SEC ID NOs: 28, 30, 39, 40, 43, 44, 45, 50, 51, 52, 56, 78, 125 y 166.

9. El compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque el oligonucleótido modificado comprende al menos un enlace de internucleósido modificado.

10. El compuesto de conformidad con la reivindicación 9, caracterizado porque al menos un enlace de internucleósido modificado es un enlace internucleósido de fosfotioato.

11. El compuesto de conformidad con la reivindicación 10, caracterizado porque todos los enlaces internucleósidos son enlaces internucleósidos de fosfotioato.

154
155

12. El compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, caracterizado porque al menos un nucleósido comprende un azúcar modificado.

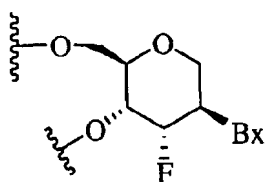
13. El compuesto de conformidad con la
5 reivindicación 12, caracterizado porque el azúcar modificado es un azúcar bicíclico.

14. El compuesto de conformidad con la reivindicación 12, caracterizado porque al menos uno del azúcar modificado comprende un 2'-O-metoxietilo.

10 15. El compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, caracterizado porque comprende al menos un nucleósido modificado por tetrahidropirano en donde un anillo de tetrahidropirano reemplaza el anillo de furanosa.

15 16. El compuesto de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado porque cada uno de al menos un nucleósido modificado por tetrahidropirano tiene la estructura:

20



en donde Bx es una porción de base heterocíclica opcionalmente protegida.

17. El compuesto de conformidad con cualquiera de
25 las reivindicaciones 1-7, caracterizado porque al menos un nucleósido comprende una nucleobase modificada.

18. El compuesto de conformidad con la reivindicación 17, caracterizado porque la nucleobase

000155

153

modificada es una 5'-metilcitocina.

19. El compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, caracterizado porque el oligonucleótido modificado comprende:

5 (a) un segmento de apertura que consiste de desoxinucleósidos ligados;

(b) un segmento de ala al 5' que consiste de nucleósidos modificados ligados; y

10 (c) un segmento de ala al 3' que consiste de nucleósidos modificados ligados;

en donde el segmento de apertura se posiciona entre el segmento de ala al 5' y el segmento de ala al 3' y en donde cada nucleósido modificado dentro de cada segmento de ala comprende un azúcar modificado.

15 20. El compuesto de conformidad con la reivindicación 19, caracterizado porque el oligonucleótido modificado comprende:

(a) un segmento de apertura que consiste de trece desoxinucleósidos ligados;

20 (b) un segmento de ala al 5' que consiste de dos nucleósidos modificados ligados; y

(c) un segmento de ala al 3' que consiste de cinco nucleósidos modificados ligados;

25 en donde el segmento de apertura se posiciona entre el segmento de ala al 5' y el segmento de ala al 3', en donde cada nucleósido modificado dentro de cada segmento de ala comprende un azúcar de 2'-O-metoxietilo; y en donde cada enlace de internucleósido es un enlace de fosfotioato.

156
157

21. El compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, caracterizado porque el oligonucleótido modificado consiste de 20 nucleósidos ligados.

5 22. El compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, caracterizado porque la secuencia de nucleobase es la secuencia expuesta en la SEC ID NO: 39.

10 23. El compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, caracterizado porque la secuencia de nucleobase es la secuencia expuesta en la SEC ID NO:40.

15 24. El compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, caracterizado porque la secuencia de nucleobase es la secuencia expuesta en la SEC ID NO: 45.

20 25. El compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, caracterizado porque la secuencia de nucleobase es la secuencia expuesta en la SEC ID NO: 52.

26. El compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, caracterizado porque la secuencia de nucleobase es la secuencia expuesta en la SEC ID NO:166.

25 27. Una composición caracterizada porque comprende un oligonucleótido modificado que comprende nucleósidos ligados, la secuencia de nucleobase la cual es una secuencia expuesta en una de las SEC ID NOs: 28, 30, 39, 40, 43, 44,

000157

45, 50, 51, 52, 56, 78, 125 y 166, o una sal de la misma, y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

28. El compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, caracterizado porque la secuencia de nucleobase es 100% complementaria dentro del intervalo de nucleótidos (por ejemplo, 1388-1423, A-B, C-D, y E-F) de la SEC ID NO:9 mientras un oligonucleótido previamente diseñado no caiga dentro del intervalo.

29. El compuesto de conformidad con la reivindicación 28, caracterizado porque el oligonucleótido modificado es un oligonucleótido de hebra única.

30. El compuesto de conformidad con la reivindicación 28, caracterizado porque el oligonucleótido modificado es un oligonucleótido de hebra doble.

31. El compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 28 a 30, caracterizado porque el oligonucleótido modificado consiste de 20 nucleósidos ligados.

32. Un método para inhibir la expresión del factor de crecimiento del tejido conectivo en una célula o tejido, caracterizado porque comprende poner en contacto la célula o tejido con el compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 31, bajo condiciones tales que la expresión del factor de crecimiento del tejido conectivo se inhibe.

33. Un método para tratar un animal que tiene una enfermedad o condición asociada con la expresión del factor de crecimiento del tejido conectivo caracterizado porque

158
159

comprende administrar al animal una cantidad del compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 31 efectiva para inhibir la expresión del factor de crecimiento del tejido conectivo para con ello tratar el animal.

5 34. El método de conformidad con la reivindicación 33, caracterizado porque la enfermedad o condición es un trastorno hiperproliferativo.

 35. El método de conformidad con la reivindicación 34, caracterizado porque el trastorno hiperproliferativo es
10 un cáncer.

 36. El método de conformidad con la reivindicación 33, caracterizado porque la enfermedad o trastorno es una enfermedad fibrótica.

 37. El método de conformidad con la reivindicación
15 36, caracterizado porque la enfermedad fibrótica es cicatrización hipertrófica, queloides, cicatrización de piel, fibrosis hepática, fibrosis pulmonar, fibrosis renal, fibrosis cardiaca o restenosis.

 38. El método de conformidad con la reivindicación
20 33, caracterizado porque la enfermedad o trastorno es fibrosis de articulación (que incluye síndrome de hombro congelado, tendón y nervio periférico dañado), daño a la médula espinal, derivación coronaria, adhesiones abdominales y peritoneales (que incluyen endometriosis, leiomiomata
25 uterino y fibroides), queratotomía radial y querectomía fotorefractiva, cirugía de reinserción retinal, fibrosis mediada por dispositivo (en por ejemplo diabetes), adhesiones de tendón, contractura de Dupuytren, o escleroderma.

000159

154
160

39. Un método para reducir la cicatrización que resulta de curación de heridas en un sujeto en necesidad del mismo, caracterizado porque comprende administrar al sujeto una cantidad del compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 32 efectiva para inhibir la expresión del factor de crecimiento del tejido conectivo en el sujeto para así con ello reducir la cicatrización que resulta de la curación de herida en el sujeto.

40. El método de conformidad con la reivindicación 39, caracterizado porque la cicatrización de herida es curación en una herida seleccionada del grupo que consiste de rompimiento de piel, incisiones quirúrgicas, y quemaduras.

15

20

25

000160

160
161

5

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a compuestos los
cuales comprenden oligonucleótidos modificados capaces de
inhibir la expresión del factor de crecimiento del tejido
10 conectivo y composiciones que contienen los mismos así como
también métodos para tratar trastornos hiperprolíficos y
enfermedades fibróticas, y de reducir la cicatrización que
resulta de la curación de heridas usando tales compuestos.

15

000161

161
162

LISTADO DE SECUENCIA

<110> Excaliard Pharmaceuticals, Inc.
ISIS Pharmaceuticals, Inc.

<120> Oligonucleótidos antisentido dirigidos contra la expresión del factor de crecimiento del
tejido conectivo y usos de los mismos

<160> 165

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido de control positivo dirigido a H-ras humano

<400> 1
tccgtcatcg ctcttcaggg 20

<210> 2
<211> 2075
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> exón
<222> (130)..(1180)

<400> 2
cccggccgac agccccgaga cgacagcccc gcgcgtcccc gtccccacct ccgaccaccg 60
ccagcgctcc aggccccgcg ctccccgctc gccgccaccg cgccctccgc tccgcccga 120
gtgccaacc atg acc gcc gcc agt atg ggc ccc gtc cgc gtc gcc ttc gtg 171
Met Thr Ala Ala Ser Met Gly Pro Val Arg Val Ala Phe Val
1 5 10
gtc ctc ctc gcc ctc tgc agc cgg ccg gcc gtc ggc cag aac tgc agc 219
Val Leu Leu Ala Leu Cys Ser Arg Pro Ala Val Gly Gln Asn Cys Ser
15 20 25 30
ggg ccg tgc cgg tgc ccg gac gag ccg gcg ccg cgc tgc ccg gcg ggc 267
Gly Pro Cys Arg Cys Pro Asp Glu Pro Ala Pro Arg Cys Pro Ala Gly
35 40 45
gtg agc ctc gtg ctg gac ggc tgc ggc tgc tgc cgc gtc tgc gcc aag 315
Val Ser Leu Val Leu Asp Gly Cys Gly Cys Cys Arg Val Cys Ala Lys
50 55 60
cag ctg ggc gag ctg tgc acc gag cgc gac ccc tgc gac ccg cac aag 363
Gln Leu Gly Glu Leu Cys Thr Glu Arg Asp Pro Cys Asp Pro His Lys
65 70 75
ggc ctc ttc tgt gac ttc ggc tcc ccg gcc aac cgc aag atc ggc gtg 411
Gly Leu Phe Cys Asp Phe Gly Ser Pro Ala Asn Arg Lys Ile Gly Val
80 85 90

000162

162
163

2

tgc acc gcc aaa gat ggt gct ccc tgc atc ttc ggt ggt acg gtg tac Cys Thr Ala Lys Asp Gly Ala Pro Cys Ile Phe Gly Gly Thr Val Tyr 95 100 105 110	459
cgc agc gga gag tcc ttc cag agc agc tgc aag tac cag tgc acg tgc Arg Ser Gly Glu Ser Phe Gln Ser Ser Cys Lys Tyr Gln Cys Thr Cys 115 120 125	507
ctg gac ggg gcg gtg ggc tgc atg ccc ctg tgc agc atg gac gtt cgt Leu Asp Gly Ala Val Gly Cys Met Pro Leu Cys Ser Met Asp Val Arg 130 135 140	555
ctg ccc agc cct gac tgc ccc ttc ccg agg agg gtc aag ctg ccc ggg Leu Pro Ser Pro Asp Cys Pro Phe Pro Arg Arg Val Lys Leu Pro Gly 145 150 155	603
aaa tgc tgc gag gag tgg gtg tgt gac gag ccc aag gac caa acc gtg Lys Cys Cys Glu Glu Trp Val Cys Asp Glu Pro Lys Asp Gln Thr Val 160 165 170	651
gtt ggg cct gcc ctg gcg gct tac cga ctg gaa gac acg ttt ggc cca Val Gly Pro Ala Leu Ala Tyr Arg Leu Glu Asp Thr Phe Gly Pro 175 180 185 190	699
gac cca act atg att aga gcc aac tgc ctg gtc cag acc aca gag tgg Asp Pro Thr Met Ile Arg Ala Asn Cys Leu Val Gln Thr Thr Glu Trp 195 200 205	747
agc gcc tgt tcc aag acc tgt ggg atg ggc atc tcc acc cgg gtt acc Ser Ala Cys Ser Lys Thr Cys Gly Met Gly Ile Ser Thr Arg Val Thr 210 215 220	795
aat gac aac gcc tcc tgc agg cta gag aag cag agc cgc ctg tgc atg Asn Asp Asn Ala Ser Cys Arg Leu Glu Lys Gln Ser Arg Leu Cys Met 225 230 235	843
gtc agg cct tgc gaa gct gac ctg gaa gag aac att aag aag ggc aaa Val Arg Pro Cys Glu Ala Asp Leu Glu Glu Asn Ile Lys Lys Gly Lys 240 245 250	891
aag tgc atc cgt act ccc aaa atc tcc aag cct atc aag ttt gag ctt Lys Cys Ile Arg Thr Pro Lys Ile Ser Lys Pro Ile Lys Phe Glu Leu 255 260 265 270	939
tct ggc tgc acc agc atg aag aca tac cga gct aaa ttc tgt gga gta Ser Gly Cys Thr Ser Met Lys Thr Tyr Arg Ala Lys Phe Cys Gly Val 275 280 285	987
tgt acc gac ggc cga tgc tgc acc ccc cac aga acc acc acc ctg ccg Cys Thr Asp Gly Arg Cys Cys Thr Pro His Arg Thr Thr Thr Leu Pro 290 295 300	1035
gtg gag ttc aag tgc cct gac ggc gag gtc atg aag aag aac atg atg Val Glu Phe Lys Cys Pro Asp Gly Glu Val Met Lys Lys Asn Met Met 305 310 315	1083
ttc atc aag acc tgt gcc tgc cat tac aac tgt ccc gga gac aat gac Phe Ile Lys Thr Cys Ala Cys His Tyr Asn Cys Pro Gly Asp Asn Asp 320 325 330	1131
atc ttt gaa tcg ctg tac tac agg aag atg tac gga gac atg gca tga a Ile Phe Glu Ser Leu Tyr Tyr Arg Lys Met Tyr Gly Asp Met Ala	1180

000163

163
164

335	340	345	
gccagagagt	gagagacatt	aactcattag	actggaactt gaactgattc acatctcatt 1240
tttccgtaaa	aatgatttca	gtagcacaag	ttattttaaact ctgtttttct aactggggga 1300
aaagattccc	acccaattca	aaacattgtg	ccatgtcaaa caaatagtct atcttcccca 1360
gacactgggt	tgaagaatgt	taagacttga	cagtggaaact acattagtac acagcaccag 1420
aatgtatatt	aaggtgtggc	tttaggagca	gtgggaggggt accggcccg ttagtatcat 1480
cagatcgact	cttatacgag	taatatgcct	gctatttgaa gtgtaattga gaaggaaaat 1540
tttagcgtgc	tactgacct	gcctgtagcc	ccagtgcag ctaggatgtg cattctccag 1600
ccatcaagag	actgagtcaa	gttggttcct	aagtcagaac agcagactca gctctgacat 1660
tctgattcga	atgacactgt	tcaggaatcg	gaatcctgtc gattagactg gacagcttgt 1720
ggcaagtga	tttgcctgta	acaagccaga	ttttttaaaa ttatatattgt aaatattgtg 1780
tgtgtgtgtg	tgtgtgtata	tatatatata	tatgtacagt tatctaagtt aatttaaagt 1840
tgttgtgccc	tttttatttt	tgtttttaat	gctttgatat ttcaatgtta gcctcaattt 1900
ctgaacacca	taggtagaat	gtaaagcttg	tctgatcggt caaagcatga aatggatact 1960
tatatggaaa	ttctgctcag	atagaatgac	agtcctgcaa aacagattgt ttgcaaaggg 2020
gaggcatcag	tgtcttgcca	ggctgatttc	taggtaggaa atgtggtagc tcacg 2075

<210> 3
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador de PCR delantero dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 3
acaagggcct cttctgtgac tt 22

<210> 4
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador de PCR inverso dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 4
ggtacaccgt accaccgaag at 22

<210> 5
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

164
163

<220>		
<223>	Sonda de PCR dirigida al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)	
<400>	5	23
	tgtgcaccgc caaagatggt gct	
<210>	6	
<211>	19	
<212>	ADN	
<213>	Secuencia Artificial	
<220>		
<223>	Cebador de PCR delantero dirigido a GAPDH humano	
<400>	6	19
	gaaggtgaag gtcggagtc	
<210>	7	
<211>	20	
<212>	ADN	
<213>	Secuencia Artificial	
<220>		
<223>	Cebador de PCR inverso dirigido a GAPDH humano	
<400>	7	20
	gaagatggtg atgggatttc	
<210>	8	
<211>	20	
<212>	ADN	
<213>	Secuencia Artificial	
<220>		
<223>	Sonda de PCR dirigida a GAPDH humano	
<400>	8	20
	caagcttccc gttctcagcc	
<210>	9	
<211>	2358	
<212>	ADN	
<213>	Homo sapiens	
<220>		
<221>	exón	
<222>	(207)..(1256)	
<400>	9	60
	aaactcacac aacaactctt ccccgtgag aggagacagc cagtgcgact ccaccctcca	
	gctcgacggc agccgccccg gccgacagcc ccgagacgac agcccggcgc gtcccgggtcc	120
	ccacctccga ccaccgccag cgtccaggc cccgccgctc cccgctcgcc gccaccgcgc	180
	cctccgctcc gcccgagtg ccaacc atg acc gcc gcc agt atg ggc ccc gtc	233

165
166

5

Met Thr Ala Ala Ser Met Gly Pro Val																
1										5						
cgc gtc gcc ttc gtg gtc ctc ctc gcc ctc tgc agc cgg ccg gcc gtc	Arg Val Ala Phe Val Val Leu Leu Ala Leu Cys Ser Arg Pro Ala Val	10	15	20	25	281										
ggc cag aac tgc agc ggg ccg tgc cgg tgc ccg gac gag ccg gcg ccg	Gly Gln Asn Cys Ser Gly Pro Cys Arg Cys Pro Asp Glu Pro Ala Pro	30	35	40	329											
cgc tgc ccg gcg ggc gtg agc ctc gtg ctg gac ggc tgc ggc tgc tgc	Arg Cys Pro Ala Gly Val Ser Leu Val Leu Asp Gly Cys Gly Cys Cys	45	50	55	377											
cgc gtc tgc gcc aag cag ctg ggc gag ctg tgc acc gag ccg gac ccc	Arg Val Cys Ala Lys Gln Leu Gly Glu Leu Cys Thr Glu Arg Asp Pro	60	65	70	425											
tgc gac ccg cac aag ggc ctc ttc tgt gac ttc ggc tcc ccg gcc aac	Cys Asp Pro His Lys Gly Leu Phe Cys Asp Phe Gly Ser Pro Ala Asn	75	80	85	473											
cgc aag atc ggc gtg tgc acc gcc aaa gat ggt gct ccc tgc atc ttc	Arg Lys Ile Gly Val Cys Thr Ala Lys Asp Gly Ala Pro Cys Ile Phe	90	95	100	521											
ggt ggt acg gtg tac cgc agc gga gag tcc ttc cag agc agc tgc aag	Gly Gly Thr Val Tyr Arg Ser Gly Glu Ser Phe Gln Ser Ser Cys Lys	110	115	120	569											
tac cag tgc acg tgc ctg gac ggg gcg gtg ggc tgc atg ccc ctg tgc	Tyr Gln Cys Thr Cys Leu Asp Gly Ala Val Gly Cys Met Pro Leu Cys	125	130	135	617											
agc atg gac gtt cgt ctg ccc agc cct gac tgc ccc ttc ccg agg agg	Ser Met Asp Val Arg Leu Pro Ser Pro Asp Cys Pro Phe Pro Arg Arg	140	145	150	665											
gtc aag ctg ccc ggg aaa tgc tgc gag gag tgg gtg tgt gac gag ccc	Val Lys Leu Pro Gly Lys Cys Cys Glu Glu Trp Val Cys Asp Glu Pro	155	160	165	713											
aag gac caa acc gtg gtt ggg cct gcc ctc gcg gct tac cga ctg gaa	Lys Asp Gln Thr Val Val Gly Pro Ala Leu Ala Ala Tyr Arg Leu Glu	170	175	180	761											
gac acg ttt ggc cca gac cca act atg att aga gcc aac tgc ctg gtc	Asp Thr Phe Gly Pro Asp Pro Thr Met Ile Arg Ala Asn Cys Leu Val	190	195	200	809											
cag acc aca gag tgg agc gcc tgt tcc aag acc tgt ggc atg ggc atc	Gln Thr Thr Glu Trp Ser Ala Cys Ser Lys Thr Cys Gly Met Gly Ile	205	210	215	857											
tcc acc ccg gtt acc aat gac aac gcc tcc tgc agg cta gag aag cag	Ser Thr Arg Val Thr Asn Asp Asn Ala Ser Cys Arg Leu Glu Lys Gln	220	225	230	905											
agc cgc ctg tgc atg gtc agg cct tgc gaa gct gac ctg gaa gag aac	Ser Arg Leu Cys Met Val Arg Pro Cys Glu Ala Asp Leu Glu Glu Asn	235	240	245	953											

000166

166
767

6

att aag aag ggc aaa aag tgc atc cgt act ccc aaa atc tcc aag cct Ile Lys Lys Gly Lys Lys Cys Ile Arg Thr Pro Lys Ile Ser Lys Pro 250 255 260 265	1001
atc aag ttt gag ctt tct ggc tgc acc agc atg aag aca tac cga gct Ile Lys Phe Glu Leu Ser Gly Cys Thr Ser Met Lys Thr Tyr Arg Ala 270 275 280	1049
aaa ttc tgt gga gta tgt acc gac ggc cga tgc tgc acc ccc cac aga Lys Phe Cys Gly Val Cys Thr Asp Gly Arg Cys Cys Thr Pro His Arg 285 290 295	1097
acc acc acc ctg ccg gtg gag ttc aag tgc cct gac ggc gag gtc atg Thr Thr Thr Leu Pro Val Glu Phe Lys Cys Pro Asp Gly Glu Val Met 300 305 310	1145
aag aag aac atg atg ttc atc aag acc tgt gcc tgc cat tac aac tgt Lys Lys Asn Met Met Phe Ile Lys Thr Cys Ala Cys His Tyr Asn Cys 315 320 325	1193
ccc gga gac aat gac atc ttt gaa tgc ctg tac tac agg aag atg tac Pro Gly Asp Asn Asp Ile Phe Glu Ser Leu Tyr Tyr Arg Lys Met Tyr 330 335 340 345	1241
gga gac atg gca tga agccagagag tgagagacat taactcatta gactggaact Gly Asp Met Ala	1296
tgaactgatt cacatctcat ttttccgtaa aaatgatttc agtagcaciaa gttattttaa	1356
tctgttttttc taactggggg aaaagattcc cacccaattc aaaacattgt gccatgtcaa	1416
acaaatagtc tatcaacccc agacactggt ttgaagaatg ttaagacttg acagtggaaac	1476
tacattagta cacagcacca gaatgtatat taagggtgtgg ctttaggagc agtgggaggg	1536
taccagcaga aaggttagta tcatcagata gcatcttata cgagtaatat gcctgctatt	1596
tgaagtgtaa ttgagaagga aaatttttagc gtgctcactg acctgcctgt agccccagtg	1656
acagctagga tgtgcattct ccagccatca agagactgag tcaagttgtt ccttaagtca	1716
gaacagcaga ctgagctctg acattctgat tcgaatgaca ctgttcagga atcggaatcc	1776
tgctcgattag actggacagc ttgtggcaag tgaatttgcc tgtaacaagc cagatttttt	1836
aaaattttata ttgtaaatat tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tatatatata tatatgtaca	1896
gttatctaag ttaattttaa gttgtttgtg cttttttatt tttgttttta atgctttgat	1956
atttcaatgt tagcctcaat ttctgaacac cataggtaga atgtaaagct tgtctgatcg	2016
ttcaaagcat gaaatggata cttatatgga aattctgctc agatagaatg acagtccgtc	2076
aaaacagatt gtttgcaaag gggaggcatc agtgtccttg gcaggctgat ttctaggtag	2136
gaaatgtggt agcctcactt ttaatgaaca aatggccttt attaaaaact gagtgactct	2196
atatagctga tcagtttttt cacctggaag catttgtttc tactttgata tgactgtttt	2256
tcggacagtt tatttgttga gagtgtgacc aaaagttaca tgtttgcacc tttctagttg	2316
aaaataaagt gtatatTTTT tctataaaaa aaaaaaaaaa aa	2358

000167

167
168

<210> 10
<211> 6001
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 10
tatattattc actgtcaatc ttagtttata tccagataca acaggggtaca ctgctcttgt 60
aatggaatca gacttcttat tttaacaaga caaaccaaat ccaatccaca tttgaagatt 120
ataggtttta atataagaaa atgcactcat ttctcaaaga ccctagttaa gctgtgttta 180
aatgctccta ggtgaacccc ctttgcatcc cagtgttccc accctgacac ccagagcccc 240
tacctacca acacagaatc atttgctctg atagaacaat ggatcccttt ttctggaaac 300
attgatggcc actcctccct tgtccttgcc tatataaaac tcctacatat attaagagaa 360
aactaagcaa gagttttgga aatctgcccc aggagactgc atcctgagtc acacgcgtct 420
ttgttctctt tcttgctcca aaaccgttac ctcaagtgc aaatgatcaa atctcaaata 480
tagaattcag ggttttacag gtaggcatct tgaggatttc aaatggttaa aagcaactca 540
ctccttttct actcttttga gagtttcaag agcctatagc ctctaaaacg caaatcattg 600
ctaagggttg ggggggagaa acccttttca attttttagg aattcctgct gtttgccctt 660
tcagctacct acttcctaaa aaggatgtat gtcagtggac agaacagggc aaacttattc 720
gaaaaagaaa taagaaataa ttgccagtgt gtttataaat gatatgaatc aggagtgggtg 780
cgaagaggat agggaaaaaa aaattctatt tgggtgctgga aatactgcgc tttttttttt 840
cctttttttt tttttctgtg agctggagtg tgccagcttt ttcagacgga ggaatgctga 900
gtgtcaaggg gtcaggatca atccggtgtg agttgatgag gcaggaaggt ggggaggaat 960
gcgaggaatg tccctgtttg tgtaggactc cattcagctc attggcgagc cgcggccgcc 1020
cggagcgtat aaaagcctcg ggccgcccgc cccaaactca cacaacaact cttccccgct 1080
gagaggagac agccagtgcg actccaccct ccagctcgac ggagccgcc cggccgaca 1140
gccccgagac gacagcccgg cgcgtcccgg tccccacctc cgaccaccgc cagcgtcca 1200
ggccccgccg ctccccgctc gccgccaccg cgccctccgc tccgccgca gtgccaacca 1260
tgaccgccgc cagtatgggc cccgtccgcg tcgccttcgt ggtcctcctc gccctctgca 1320
gccgggtaag cgccgggagc cccgctgcg gccggcggt gccagggagg gactcggggc 1380
cggccgggga gggcgtgcgc gccgaccgag cgccgctgac cgccctgtcc tccctgcagc 1440
cggccgtcgg ccagaactgc agcgggccgt gccggtgccc ggacgagccg gcgccgcgt 1500
gccccggcgg cgtgagcctc gtgctggacg gctgcggctg ctgccgcgtc tgcgccaagc 1560
agctgggcga gctgtgcacc gagcgcgacc catgcgaccc gcacaagggc ctattctgtc 1620
acttcggctc cccggccaac cgcaagatcg gcgtgtgcac cggttaagacc cgcagcccc 1680

160
169

accgctaggt gtccggccgc ctccctccctc acgcccaccc gcccgctgga aaaagaaacc	1740
gctcggactg agtttctttc tccagctgct gccagcccgc cccctgcagc ccagatccca	1800
actcgcattc ctgacgctct ggatgtgaga gtgcccgaat gcctgacctc tgcattcccc	1860
acccctctct tcccttcctc ttctccagcc aaagatgggt ctccctgcat cttcgggtgg	1920
acggtgtacc gcagcggaga gtccttccag agcagctgca agtaccagt cactgcctg	1980
gacggggcgg tgggtgcat gcccctgtgc agcatggacg ttcgtctgcc cagccctgac	2040
tgcccccttc cgaggagggt caagctgccc gggaaatgct gcgaggagt ggtgtgtgac	2100
gagcccaagg accaaaccgt ggttgggcct gccctcgcgg gtgagtcgag tcttcctcta	2160
agtcagggtc gtgattctct cccagggagg gagtcctaac tgtgccgacc gaacggggga	2220
aataccttat ccaggcggtt tacatggtgt ttgtgtgtct tgctctgca gcttaccgac	2280
tgaagacac gtttggccca gacccaacta tgattagagc caactgcctg gtccagacca	2340
cagagtggag cgcctgttcc aagacctgtg ggatgggcat ctccaccggt gttaccaatg	2400
acaacgcctc ctgcaggcta gagaagcaga gccgcctgtg catggtcagg ccttgcaag	2460
ctgacctgga agagaacatt aaggtagatg ttctgtctct attactatt ttccacagga	2520
aaaacagtgg ataggacca acttagggct cttgccacgc ttgttagtat aagcccgta	2580
tctccaaaac tatctaacca ttgagctgtt ttgttggaat gagagcttgt gtaatagcaa	2640
ccaccagttt tccactacga aatcttccac aggggttagtt aattcaagac attccaagag	2700
aggctctggc tatttttggg catagcaaat gagactcaaa ctccctcccc tcaaatata	2760
aacagaagtc agacaacaga agactaaaac acagagggtt gaagaaagcc actcctctg	2820
tagagtcgct gatttttttt ttctctctct cttttccctt gtcttcctta gaagggcaaa	2880
aagtgcattc gtactcccaa aatctccaag cctatcaagt ttgagctttc tggctgcacc	2940
agcatgaaga cataccgagc taaattctgt ggagtatgta ccgacggccg atgctgcacc	3000
ccccacagaa ccaccacct gccggtggag ttcaagtgcc ctgacggcga ggtcatgaag	3060
aagaacatga tgttcatcaa gacctgtgcc tgccattaca actgtcccgg agacaatgac	3120
atctttgaat cgctgtacta caggaagatg tacggagaca tggcatgaag ccagagagt	3180
agagacatta actcattaga ctggaacttg aactgattca catctcattt ttccgtaaaa	3240
atgatttcag tagcacaagt tatttaaattc tgtttttcta actgggggaa aagattccca	3300
ccaattcaa aacattgtgc catgtcaaac aaatagtcta tcaaccccag aactgggtt	3360
gaagaatggt aagacttgac agtggaacta cattagtaca cagcaccaga atgtatatta	3420
agggtgtggc ttaggagcag tgggagggtt ccagcagaaa ggtagtatc atcagatagc	3480
atcttatagc agtaatatgc ctgctatttg aagtgaatt gagaaggaaa attttagcgt	3540

169
170

gctcactgac ctgcctgtag cccagtgac agctaggatg tgcattctcc agccatcaag	3600
agactgagtc aagttgttcc ttaagtcaga acagcagact cagctctgac attctgattc	3660
gaatgacact gttcaggaat cggaatcctg tcgattagac tggacagctt gtggcaagt	3720
aatttgccctg taacaagcca gattttttaa aatttatatt gtaaataattg tgtgtgtgtg	3780
tgtgtgtgtg tatatatata tatgtacagt tatctaagtt aatttaaagt tgtttgtgcc	3840
tttttatatt tgtttttaat gctttgatat ttcaatgtta gcctcaattt ctgaacacca	3900
taggtagaat gtaaagcttg tctgatcgtt caaagcatga aatggatact tatatggaaa	3960
ttctgctcag atagaatgac agtccgtcaa aacagattgt ttgcaaaggg gaggcacag	4020
tgtccttggc aggctgattt ctaggtagga aatgtggtag cctcactttt aatgaacaaa	4080
tggcctttat taaaaactga gtgactctat atagctgac agttttttca cctggaagca	4140
tttgtttcta ctttgatatg actgtttttc ggacagttta tttgttgaga gtgtgaccaa	4200
aagttacatg tttgcacctt tctagttgaa aataaagtgt atattttttc tataaagggc	4260
ttggttatc atttatcctt ctaaacattt ctgagttttc ttgagcataa ataggaagt	4320
cttattaatc ataagataat tcaccaataa ttttctaaat atctttaatt attctataca	4380
ttaataaatt gattattcca tagaattttt atgtaaacat acttcacact gaatcaagta	4440
tcacagactt gcaggcatac acaccacatt gactatacag ccattttttt tgttatcttc	4500
acagaacttt atagacactt taaattcaat tctctctaga ttacttcagt ctccattaac	4560
cctgttgtat tacacttggc ccttttgga tttgtacctc tctggccgtt ataggttagt	4620
ttccaacctt tcacatcaca aactagtcta tgtgccttgc acgtggaaaa tgtttacatt	4680
ttttaaaaat tttatgctct aggtctgttt ctgaacttca ttaccttact gttaaactctg	4740
aaaattatga aatgaaatcc tcattttaat ggagctattt cataagtctt gttttgtata	4800
attccgtttt tggttgccat gataaccaat gacaaacaga tggcataaat agaaaaggga	4860
ggatgagcaa atcttcatt cattaacatt aatagaaatt tgttttgaaa gtaattcctc	4920
catttgccca agtctttagc tttatcagac ttccagatta atgcaccta ccttaccaag	4980
tggtttatac atgagaaaat ggaattgttc aagaagcctc atgtggaaac aatattgtac	5040
ctaccaggt aggtttttac taaagagtga accaaagtga atggtaaaca aaagcaatac	5100
accaaaggca actagaatct tctccacatg aggatagctg aggattctag gggaaaaaaa	5160
aattgcagac agactaactt ttcccaaggc aattagcaac gttgtagtgc caatgtcatt	5220
tggacagaca aaaatacacc tgaaaataaa gactagctct acaaacaact gtccacacca	5280
caaaccaaag ggaacttc ccgtgttcag aatgtgaaaa tttatggtca aaactctggg	5340
ctttaaggat acaccacat ctgtatatag cagtgtgcc aggagcagca cccacctcc	5400
ccaaataaat gcgcatgtac acatacacat aggcacacac acagagtaca ctgttagttc	5460

171

10

acacttcctt tctgtcaatt aattcctaac tgcaaagatg aagggccatg catgataaac 5520
gagactgact actgaattag agcattctgg aaatatagaa gcagcaggaa aagcatagat 5580
ttcacatttt ccaatacccc acattaaaga aaaaaaaaaag agtcactaga ttgcaaaaca 5640
aaaatcccac aggcaatggt tctacaaaaa ttagatggca atgcacactt tcacccccca 5700
aatatcggag gtagggggtg ccaaatcatc aaccaccgta agatctgcac cgtgtcagca 5760
catgtgtgag aaaagcagag aaacaacaag gtatctgatg cttctgagaa cacgagagct 5820
ctcaaacagc cagcaggtag tcactagata tatagaaggc caggctgaca gcagctgttg 5880
aatctagtag gggtttgcc tagcactcca acaaagctta caagccaggg ctgcctccca 5940
ggagaagatc ctcatctcc tggaagtgga atctaaattg agcaggtcac cagacagatg 6000
t 6001

<210> 11
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido
conectivo humano (CTGF)

<400> 11
ccagctgctt ggcgcagacg 20

<210> 12
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido
conectivo humano (CTGF)

<400> 12
gccagaaagc tcaaacttga 20

<210> 13
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido
conectivo humano (CTGF)

<400> 13
ccacaagctg tccagtctaa 20

<210> 14
<211> 20

000171

171
172

<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 14
ggtcacactc tcaacaaata 20

<210> 15
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 15
aaacatgtaa cttttggtca 20

<210> 16
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 16
gggaagagtt gttgtgtgag 20

<210> 17
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 17
agggtggagt cgcactggct 20

<210> 18
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 18
acgaaggcga cgcggacggg 20

<210> 19
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

172
173

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 19
gccgacggcc ggccggctgc 20

<210> 20
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 20
ggtgcacacg ccgatcttgc 20

<210> 21
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 21
tctttggcgg tgcacacgcc 20

<210> 22
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 22
gcaccatctt tggcgggtgca 20

<210> 23
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 23
gcagggagca ccatctttgg 20

<210> 24
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

173
174

<400> 24
aagatgcagg gagcaccatc 20

<210> 25
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 25
ccaccgaaga tgcagggagc 20

<210> 26
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 26
ccgtaccacc gaagatgcag 20

<210> 27
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 27
gtacttgcag ctgctctgga 20

<210> 28
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 28
gggcatgcag cccaccgccc 20

<210> 29
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 29
aggcccaacc acggtttggt 20

174
175

<210> 30
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 30
agggcaggcc caaccacggt 20

<210> 31
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 31
taagccgcga gggcaggccc 20

<210> 32
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 32
cccacaggtc ttggaacagg 20

<210> 33
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 33
agatgcccac cccacaggtc 20

<210> 34
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 34
ccagtctaag gagttaatgt 20

<210> 35

175
176

<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 35
ttcaagttcc agtctaataga 20

<210> 36
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 36
ttttcccca gttagaataaa 20

<210> 37
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 37
cacaatgttt tgaattgggt 20

<210> 38
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 38
acatggcaca atgttttgaa 20

<210> 39
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 39
gtttgacatg gcacaatgtt 20

<210> 40
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

176
177

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 40
tatttgtttg acatggcaca 20

<210> 41
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 41
tgatagacta ttgttttgac 20

<210> 42
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 42
gttccactgt caagtcttaa 20

<210> 43
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 43
tgtactaatg tagttccact 20

<210> 44
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 44
cattctggtg ctgtgtacta 20

<210> 45
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

177
17x

<400> 45
taatatacat tctggtgctg 20

<210> 46
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 46
acaccttaat atacattctg 20

<210> 47
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 47
taaagccaca ccttaatata 20

<210> 48
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 48
gtaccctccc actgctccta 20

<210> 49
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 49
aagatgctat ctgatgatac 20

<210> 50
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 50
cgtataagat gctatctgat 20

178
179

<210> 51
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 51
aatagcaggc atattactcg 20

<210> 52
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 52
tacacttcaa atagcaggca 20

<210> 53
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 53
tcaattacac ttcaaatagc 20

<210> 54
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 54
ggagaatgca catcctagct 20

<210> 55
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 55
atggctggag aatgcacatc 20

<210> 56

179
180

<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 56
tcttgatggc tggagaatgc 20

<210> 57
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 57
gaatcagaat gtcagagctg 20

<210> 58
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 58
cattgaaata tcaaagcatt 20

<210> 59
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 59
ggctaacatt gaaatatcaa 20

<210> 60
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 60
aattgaggct aacattgaaa 20

<210> 61
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

1006
181

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 61
gttcagaaat tgaggctaac 20

<210> 62
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 62
tatggtgttc agaaattgag 20

<210> 63
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 63
ctacctatgg tgttcagaaa 20

<210> 64
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 64
tacattctac ctatggtgtt 20

<210> 65
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 65
gacaagcttt acattctacc 20

<210> 66
<211> 20
<212> ADN

10
182

<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 66
gatcagacaa gctttacatt 20

<210> 67
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 67
atgctttgaa cgatcagaca 20

<210> 68
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 68
atttcattgct ttgaacgatc 20

<210> 69
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 69
gtatccattt catgctttga 20

<210> 70
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 70
ccatataagt atccatttca 20

<210> 71
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

182
183

<220>			
<223>	Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)		
<400>	71		20
	gaatttccat ataagtatcc		
<210>	72		
<211>	20		
<212>	ADN		
<213>	Secuencia Artificial		
<220>			
<223>	Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)		
<400>	72		20
	tctgagcaga atttccatat		
<210>	73		
<211>	20		
<212>	ADN		
<213>	Secuencia Artificial		
<220>			
<223>	Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)		
<400>	73		20
	tgtcattcta tctgagcaga		
<210>	74		
<211>	20		
<212>	ADN		
<213>	Secuencia Artificial		
<220>			
<223>	Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)		
<400>	74		20
	tttgacggac tgtcattcta		
<210>	75		
<211>	20		
<212>	ADN		
<213>	Secuencia Artificial		
<220>			
<223>	Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)		
<400>	75		20
	aacaatctgt tttgacggac		
<210>	76		
<211>	20		
<212>	ADN		

183
184

<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 76
tgatgcctcc cctttgcaaa 20

<210> 77
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 77
tgccaaggac actgatgcct 20

<210> 78
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 78
cagcctgcca aggacactga 20

<210> 79
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 79
gaaatcagcc tgccaaggac 20

<210> 80
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 80
acctagaaat cagcctgcca 20

<210> 81

134
185

<211>	20	
<212>	ADN	
<213>	Secuencia Artificial	
<220>		
<223>	Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)	
<400>	81	
	ttcctaccta gaaatcagcc	20
<210>	82	
<211>	20	
<212>	ADN	
<213>	Secuencia Artificial	
<220>		
<223>	Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)	
<400>	82	
	taccacattt cctacctaga	20
<210>	83	
<211>	20	
<212>	ADN	
<213>	Secuencia Artificial	
<220>		
<223>	Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)	
<400>	83	
	tgaggctacc acatttccta	20
<210>	84	
<211>	20	
<212>	ADN	
<213>	Secuencia Artificial	
<220>		
<223>	Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)	
<400>	84	
	taaaagtgag gctaccacat	20
<210>	85	
<211>	20	
<212>	ADN	
<213>	Secuencia Artificial	
<220>		
<223>	Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)	
<400>	85	
	caaatgcttc caggtgaaaa	20

186

25

<210> 86
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido
conectivo humano (CTGF)

<400> 86
tagaaacaaa tgcttccagg 20

<210> 87
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido
conectivo humano (CTGF)

<400> 87
tcatatcaaa gtagaaacaa 20

<210> 88
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido
conectivo humano (CTGF)

<400> 88
tccgaaaaac agtcatatca 20

<210> 89
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 89
acccggctgc agagggcgag 20

<210> 90
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 90
cgcttaccg gctgcagagg 20

106
187

<210> 91
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 91
gacagggcgg tcagcggcgc 20

<210> 92
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 92
agtccgagcg gtttcttttt 20

<210> 93
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 93
aactcagttcc gagcggtttc 20

<210> 94
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 94
aaagaaactc agtccgagcg 20

<210> 95
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 95
tggagaaaga aactcagttcc 20

<210> 96
<211> 20

127
188

<212>	ADN	
<213>	Secuencia Artificial	
<220>		
<223>	Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)	
<400>	96	
gcagctggag aaagaaactc		20
<210>	97	
<211>	20	
<212>	ADN	
<213>	Secuencia Artificial	
<220>		
<223>	Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)	
<400>	97	
tggcagcagc tggagaaaga		20
<210>	98	
<211>	20	
<212>	ADN	
<213>	Secuencia Artificial	
<220>		
<223>	Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)	
<400>	98	
agggagcacc atctttggct		20
<210>	99	
<211>	20	
<212>	ADN	
<213>	Secuencia Artificial	
<220>		
<223>	Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)	
<400>	99	
tcacccgcga gggcaggccc		20
<210>	100	
<211>	20	
<212>	ADN	
<213>	Secuencia Artificial	
<220>		
<223>	Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)	
<400>	100	
ggaagactcg actcaccgcg		20
<210>	101	
<211>	20	
<212>	ADN	
<213>	Secuencia Artificial	

188
184

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 101
ttagaggaag actcgactca 20

<210> 102
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 102
accctgactt agaggaagac 20

<210> 103
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 103
tcacgaccct gacttagagg 20

<210> 104
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 104
gagaatcacg accctgactt 20

<210> 105
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 105
tgaggagaaa tcacgaccct 20

<210> 106
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

109
100

<400> 106	
ctccctggga gagaatcacg	20
<210> 107	
<211> 20	
<212> ADN	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)	
<400> 107	
ggtcggcaca gtaggactc	20
<210> 108	
<211> 20	
<212> ADN	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)	
<400> 108	
cgttcggtcg gcacagttag	20
<210> 109	
<211> 20	
<212> ADN	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)	
<400> 109	
cctggataag gtatttcccc	20
<210> 110	
<211> 20	
<212> ADN	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)	
<400> 110	
acaaacacca tgtaaacgc	20
<210> 111	
<211> 20	
<212> ADN	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)	
<400> 111	
gagcacacaa acaccatgta	20

140
141

30

<210> 112
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 112
tgcgagagca gagcacacaa 20

<210> 113
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 113
taagctgcga gagcagagca 20

<210> 114
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 114
gtcggtaagc tgcgagagca 20

<210> 115
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 115
ttccagtcgg taagctgcga 20

<210> 116
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 116
acatgtacct taatgttctc 20

<210> 117
<211> 20

191
142

<212>	ADN	
<213>	Secuencia Artificial	
<220>		
<223>	Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)	
<400>	117	
	gcagaacatg taccttaatg	20
<210>	118	
<211>	20	
<212>	ADN	
<213>	Secuencia Artificial	
<220>		
<223>	Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)	
<400>	118	
	taggagcaga acatgtacct	20
<210>	119	
<211>	20	
<212>	ADN	
<213>	Secuencia Artificial	
<220>		
<223>	Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)	
<400>	119	
	gttaatagga gcagaacatg	20
<210>	120	
<211>	20	
<212>	ADN	
<213>	Secuencia Artificial	
<220>		
<223>	Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)	
<400>	120	
	tgaaaaatag ttaataggag	20
<210>	121	
<211>	20	
<212>	ADN	
<213>	Secuencia Artificial	
<220>		
<223>	Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)	
<400>	121	
	ccactgtttt tcctgtgaaa	20
<210>	122	
<211>	20	
<212>	ADN	
<213>	Secuencia Artificial	

192
193

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 122
aagttgggtc ctatccactg 20

<210> 123
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 123
gccctaagtt gggtcctatc 20

<210> 124
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 124
caagagccct aagttgggtc 20

<210> 125
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 125
cgtggcaaga gccctaagtt 20

<210> 126
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 126
cgggcttata ctaacaagcg 20

<210> 127
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

193
144

<400> 127		
gataacgggc ttataactaac		20
<210> 128		
<211> 20		
<212> ADN		
<213> Secuencia Artificial		
<220>		
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)		
<400> 128		
ttggagataa cgggcttata		20
<210> 129		
<211> 20		
<212> ADN		
<213> Secuencia Artificial		
<220>		
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)		
<400> 129		
tagttttgga gataacgggc		20
<210> 130		
<211> 20		
<212> ADN		
<213> Secuencia Artificial		
<220>		
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)		
<400> 130		
ttagatagtt ttggagataa		20
<210> 131		
<211> 20		
<212> ADN		
<213> Secuencia Artificial		
<220>		
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)		
<400> 131		
caatggtag atagttttgg		20
<210> 132		
<211> 20		
<212> ADN		
<213> Secuencia Artificial		
<220>		
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)		
<400> 132		
cagctcaatg gtagatagt		20

144
145

<210> 133
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 133
caaaacagct caatggtag 20

<210> 134
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 134
tccagcaaaa cagctcaatg 20

<210> 135
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 135
ctcattccag caaaacagct 20

<210> 136
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 136
aagctctcat tccagcaaaa 20

<210> 137
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 137
tacacaagct ctcattccag 20

<210> 138
<211> 20

195
146

<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 138
ggttgctatt acacaagctc 20

<210> 139
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 139
ctggtggttg ctattacaca 20

<210> 140
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 140
gaaaactggt ggttgctatt 20

<210> 141
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 141
tagtggaaaa ctggtggttg 20

<210> 142
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 142
ttaactaacc ctgtggaaga 20

<210> 143
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

146
147

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 143
tgtcttgaat taactaacc 20

<210> 144
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 144
tggaatgtct tgaattaact 20

<210> 145
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 145
gccagagcct ctcttggaat 20

<210> 146
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 146
aaaaatagcc agagcctctc 20

<210> 147
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 147
tgtccaaaaa tagccagagc 20

<210> 148
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

197
148

<400> 148 20
tgctatgtcc aaaaatagcc

<210> 149
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 149 20
tcatttgcta tgcctcaaaaa

<210> 150
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 150 20
gagtctcatt tgctatgtcc

<210> 151
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 151 20
agtttgagtc tcatttgcta

<210> 152
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 152 20
gaggaagttt gagtctcatt

<210> 153
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 153 20
cttctgttgt ctgacttctg

198
199

<210> 154
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 154
cctctgtggt ttagtcttct 20

<210> 155
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 155
tttcttcaac cctctgtggt 20

<210> 156
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 156
ggagtggctt tcttcaaccc 20

<210> 157
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 157
aggaagacaa gggaaaagag 20

<210> 158
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 158
ttctaaggaa gacaaggga 20

<210> 159
<211> 20

149
20

<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 159
tgcccttcta aggaagacaa 20

<210> 160
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 160
ggatgcgagt tgggatctgg 20

<210> 161
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 161
ccagctgctt ggcgagacg 20

<210> 162
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 162
gccagaaagc tcaaacttga 20

<210> 163
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 163
ccacaagctg tccagtctaa 20

<210> 164
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

201

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 164
ggtcacactc tcaacaata 20

<210> 165
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 165
aaacatgtaa cttttggtca 20

<210> 166
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 166
tgacatggca caatgttttg 20

<210> 167
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 167
ccttcctga aggttcctcc 20

Figura 1

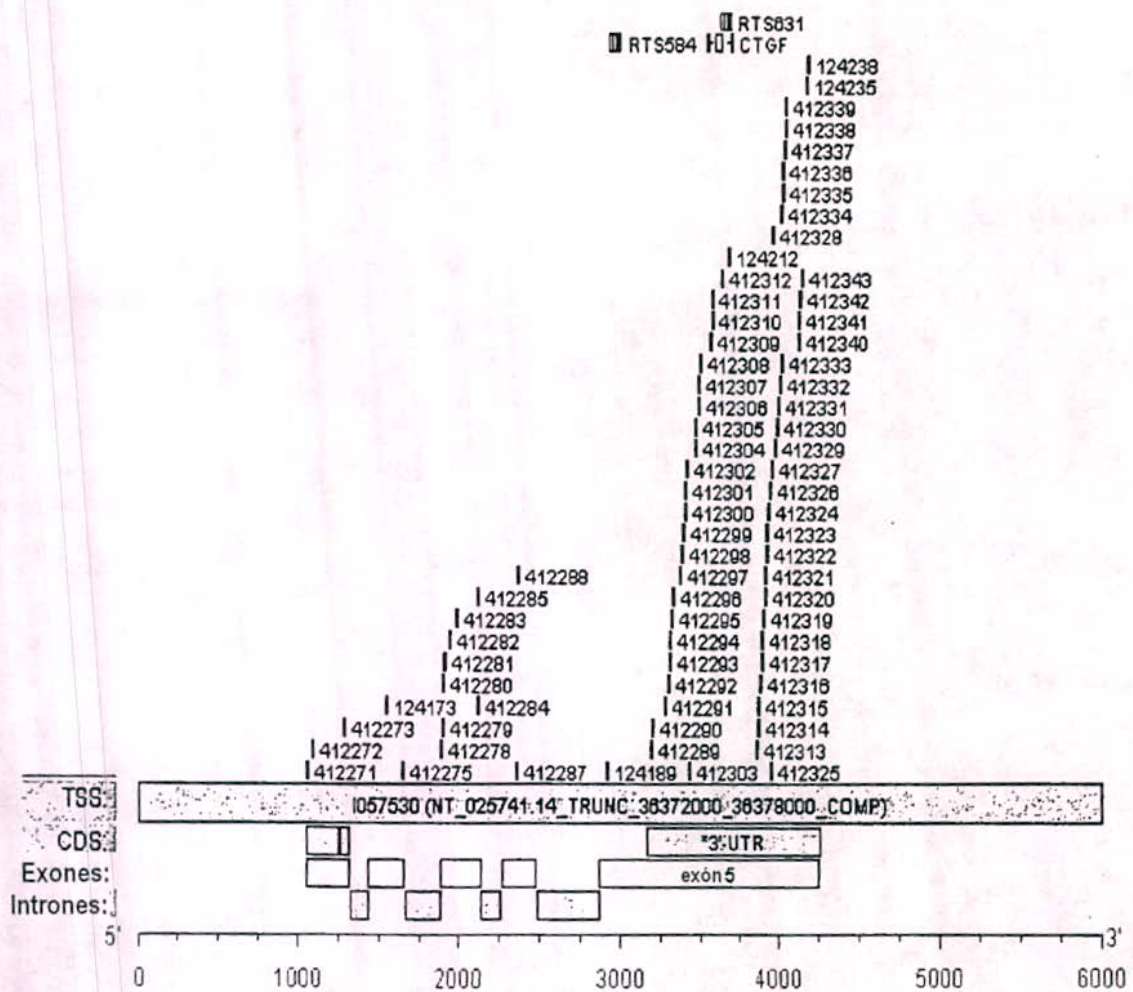


Figura 2

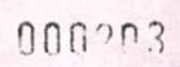
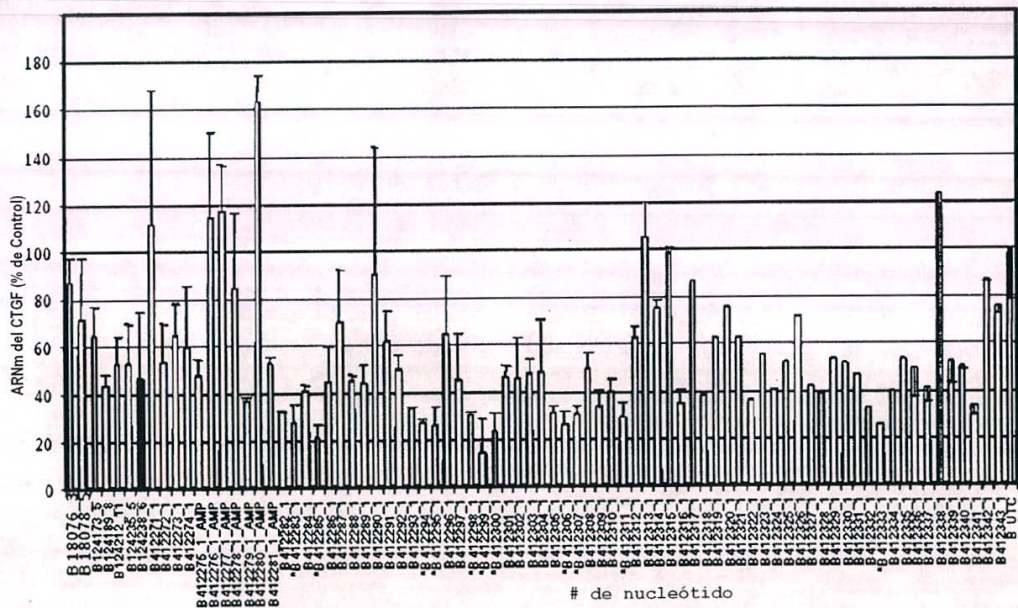


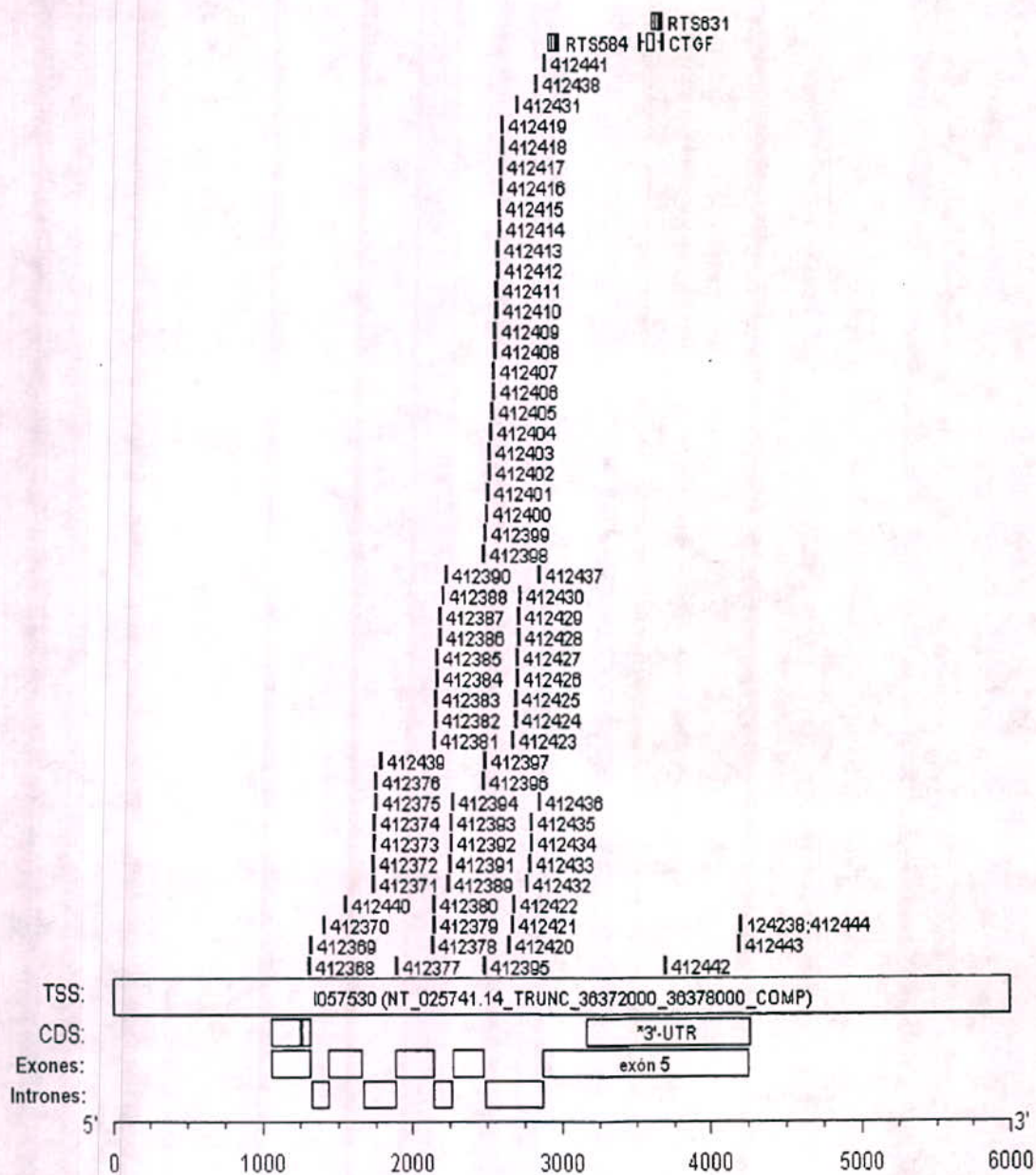
Figura 3



000000

204

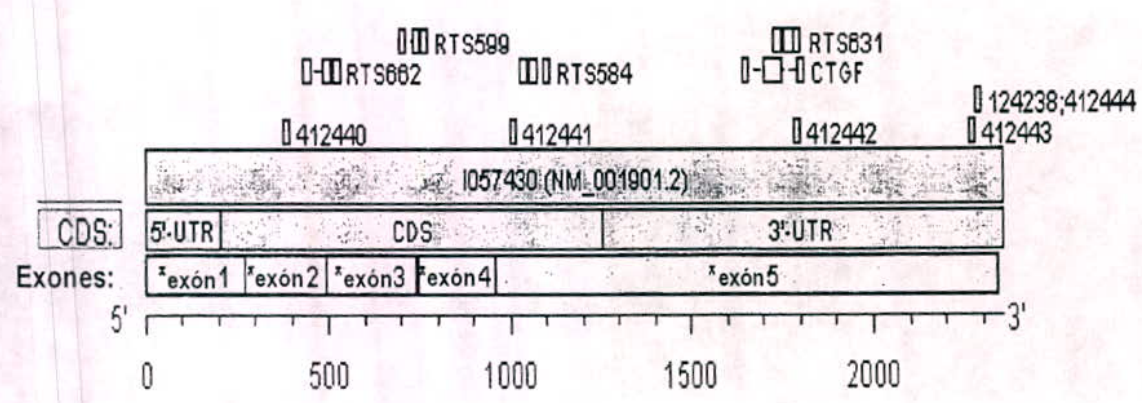
Figura 4



000205

205
206

Figura 5



287
708

Figura 7A

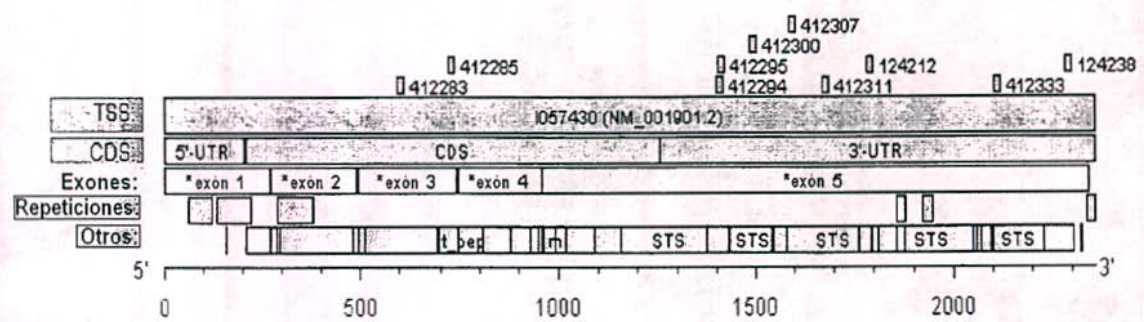
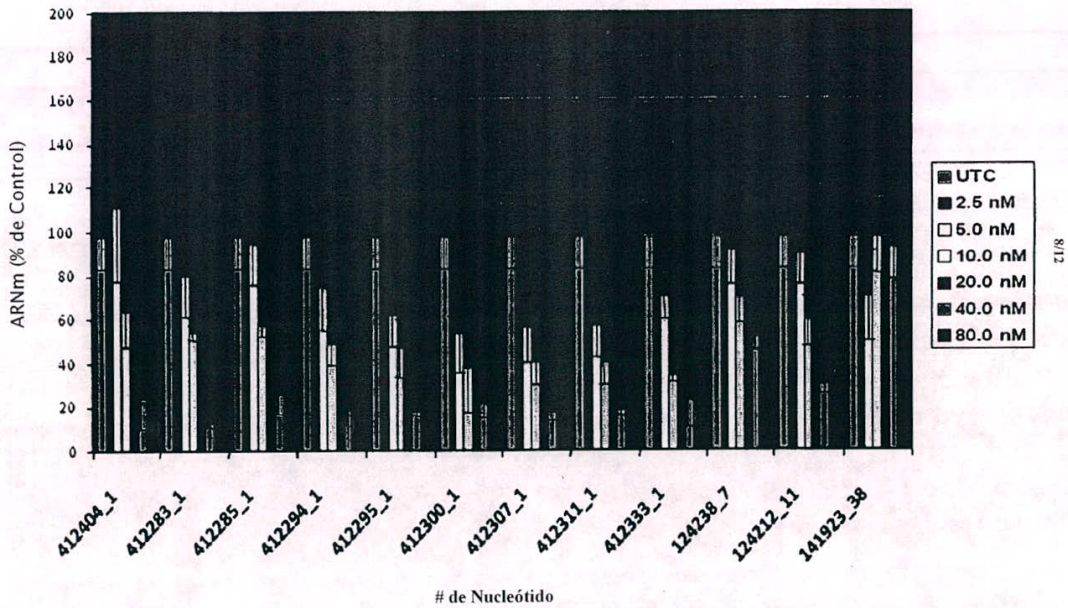


Figura 7B

# de Oligonucleótido	Secuencia
412404	CGTGGCAAGAGCCCTAAGTT (INTRON)
412283	GGGCATGCAGCCCACCGCCC (EXÓN 3)
412285	AGGGCAGGCCCAACCACGGT (EXÓN 3)
412294	GTTTGACATGGCACAATGTT (EXÓN 3)
412295	TATTTGTTTGACATGGCACA (EXÓN 3)
412300	TAATATACATTCTGGTGCTG (EXÓN 3)
412307	TACACTTCAAATAGCAGGCA (EXÓN 3)
412311	TCTTGATGGCTGGAGAATGC (EXÓN 3)
412333	CAGCCTGCCAAGGACACTGA (EXÓN 3)
124238	AAACATGTAACTTTTGGTCA (Principales anteriores)
124212	CCACAAGCTGTCCAGTCTAA (Principales anteriores)

Figura 8



000000

10/2/09

209
210

9/12

Figura 9A

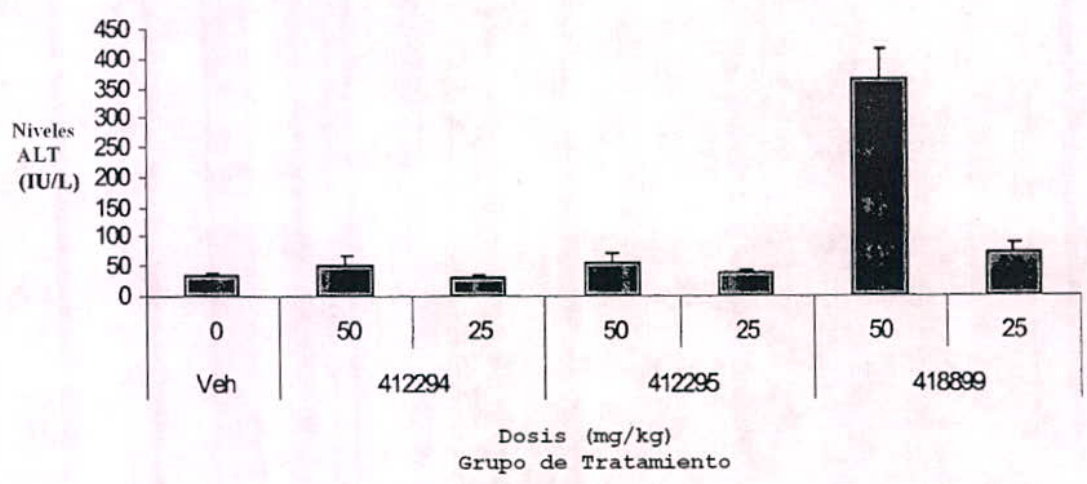
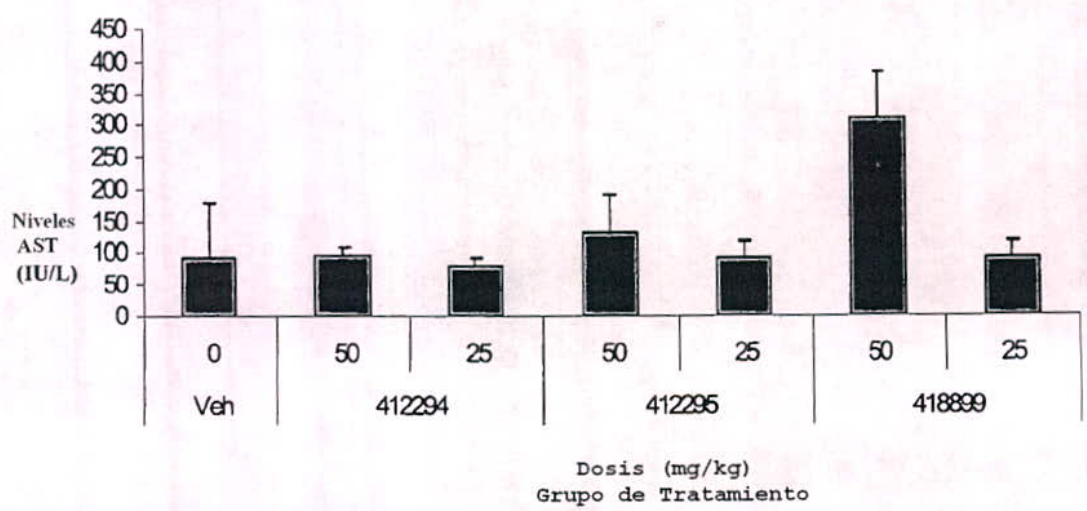


Figura 9B

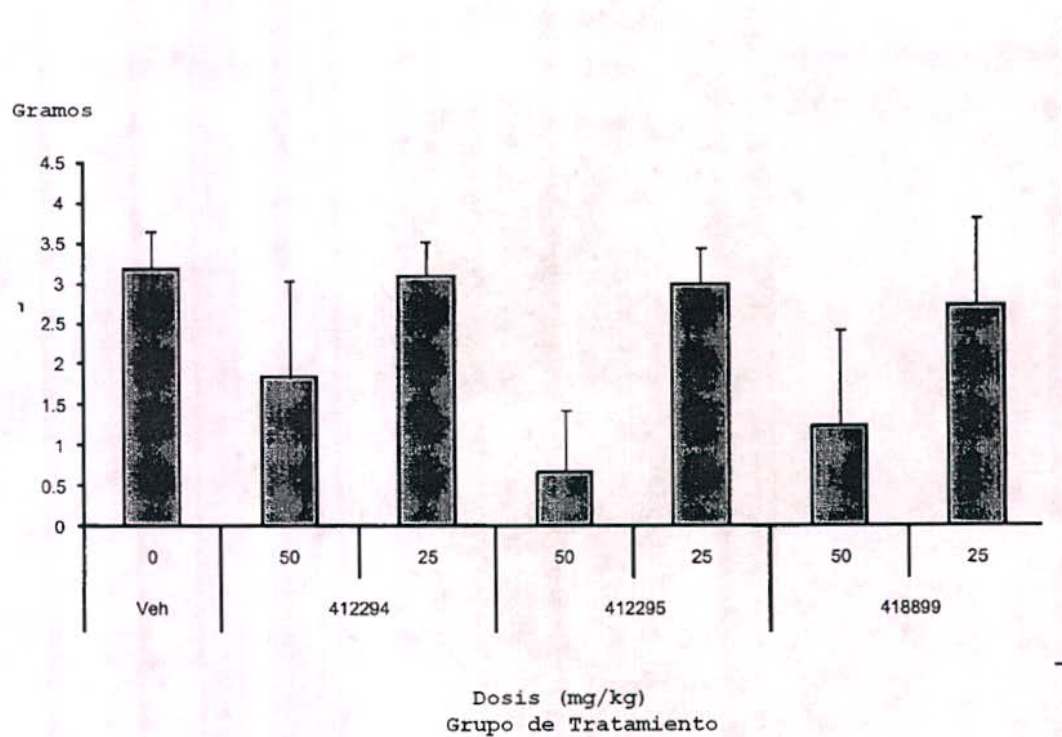


000210

240/211
200

10/12

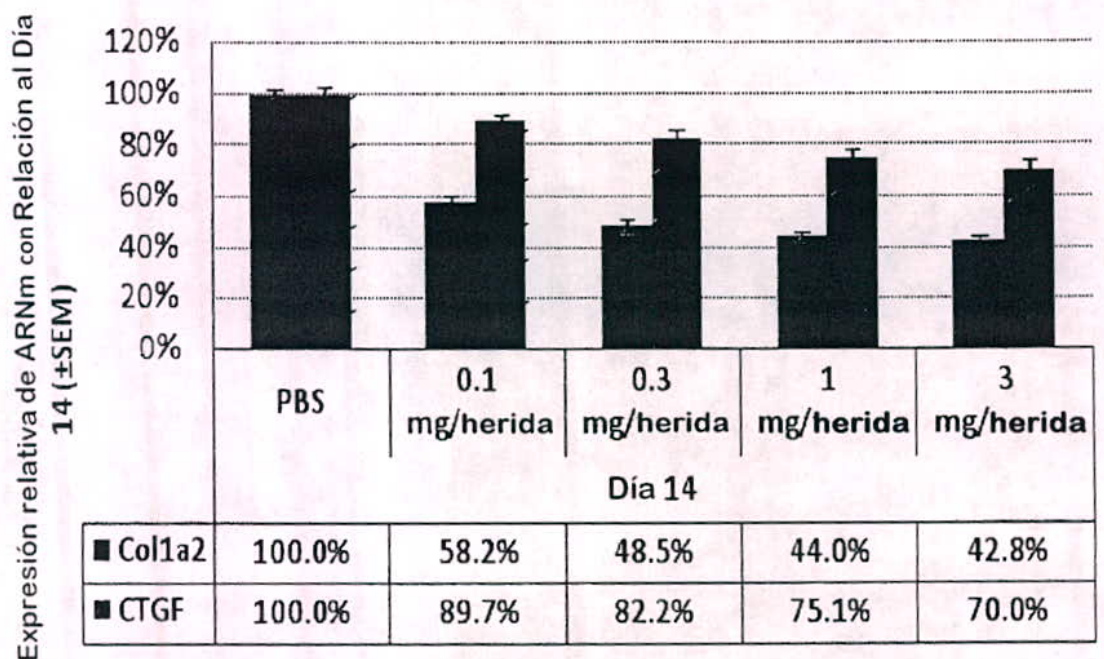
Figura 10



900211

21/2

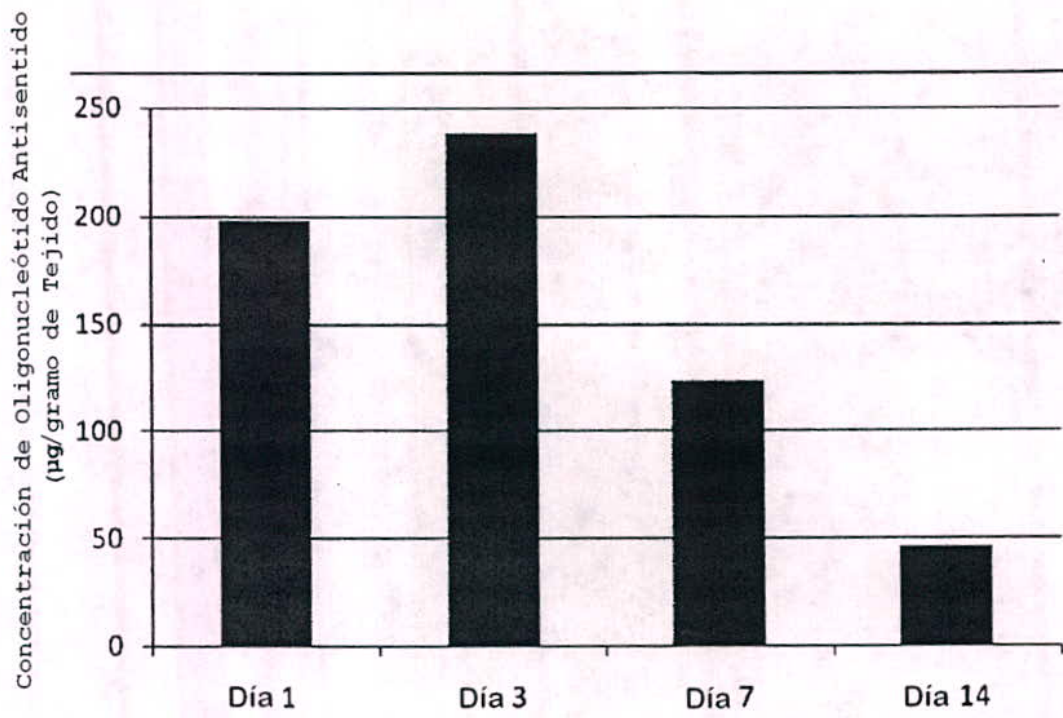
Figura 11



2/2
2/3

12/12

Figura 12



006213

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Handwritten signature/initials.

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 13 - 0052427
		Bogotá D.C., Mayo 30 de 2013 - 10:24:15

RECIBIDO DE : CLARKE MODET					NI 830.008.643
*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
RECIBO DE CA	999999999	40920	30/04/2013		530.000.00
RECIBO DE CA	999999999	51531	28/05/2013		500.000.00
RECIBO DE CA	999999999	51532	28/05/2013		500.000.00

*** Conceptos Pagados ***					
CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO		
1 50005-01-01 SOLICITUDES	2205 DIVISIONAL SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN CONT. DERE	450.000.00	450.000.00		
			\$450.000.00		

SON: **CUATROCIENTOS CINCUENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-034740- -00008-0000

Fecha: 2013-05-30 15:59:33 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 215

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO6



No. 13-132840- -00000-0000

Fecha: 2013-05-30 15:59:33 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 215

000214

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Mayo 30 de 2013 - 10:24:16

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

2/25

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 13 - 0052428
		Bogotá D.C., Mayo 30 de 2013 - 10:24:15

RECIBIDO DE : CLARKE MODET					NI 830.008.643
*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
RECIBO DE CA	999999999	40920	30/04/2013		530.000.00
RECIBO DE CA	999999999	51531	28/05/2013		500.000.00
RECIBO DE CA	999999999	51532	28/05/2013		500.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
30 50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	30.000.00	900.000.00
			<u>900.000.00</u>
			=====

SON: **NOVECIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-034740- -00008-0000

Fecha: 2013-05-30 15:59:33 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 215

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO6



No. 13-132840- -00000-0000

Fecha: 2013-05-30 15:59:33 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 215

000215

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Mayo 30 de 2013 - 10:24:16