

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 400 033**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.02.2004 E 04709958 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2012 EP 1597366**

54 Título: **Modulación de la expresión del receptor del factor de crecimiento I similar a la insulina**

30 Prioridad:

11.02.2003 AU 2003900609
27.05.2003 AU 2003902610

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.04.2013

73 Titular/es:

ANTISENSE THERAPEUTICS LTD (100.0%)
LEVEL 1 10 WALLACE AVENUE
TOORAK, VIC 3142, AU

72 Inventor/es:

WRAIGHT, CHRISTOPHER, JOHN;
WERTHER, GEORGE, ARTHUR;
DEAN, NICHOLAS, M. y
DOBIE, KENNETH, W.

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 400 033 T3

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

DESCRIPCIÓN

Modulación de la expresión del receptor del factor de crecimiento I similar a la insulina

5 **Campo de la invención**

La presente descripción da a conocer composiciones y métodos para modular la expresión de un gen de receptor de factor de crecimiento. En particular, la invención se refiere a oligonucleótidos que se hibridan con moléculas de ácido nucleico que codifican para el receptor del factor de crecimiento I similar a la insulina (receptor de IGF-I o IGF-IR).
10 Se muestra a modo de ejemplo en el presente documento que tales oligonucleótidos modulan la proliferación, lo que es relevante para el tratamiento de cáncer y trastornos de la piel proliferativos e inflamatorios. Sin embargo, se entenderá que los oligonucleótidos pueden usarse para cualquier otro estado en el que esté implicado el IGF-IR incluyendo estados inflamatorios.

15 **Antecedentes de la invención**

Se recogen al final de la descripción detalles bibliográficos de las publicaciones a las que se hace referencia por autor en esta memoria descriptiva.

20 La referencia a cualquier técnica anterior en esta memoria descriptiva no es, y no debe tomarse como, un reconocimiento o cualquier forma de sugerencia de que esta técnica anterior forma parte del conocimiento general común en cualquier país.

La psoriasis y otros estados similares son trastornos de la piel proliferativos y/o inflamatorios comunes y a menudo alarmantes que afectan o que tienen el potencial de afectar a una proporción significativa de la población. El estado surge a partir de la sobreproliferación de queratinocitos basales en la capa epidérmica de la piel asociada con inflamación en la dermis subyacente. Aunque se ha desarrollado una gama de tratamientos, ninguno es completamente eficaz ni está libre de efectos secundarios adversos. Aunque la causa subyacente de la psoriasis sigue siendo esquiva, existe algo de consenso de opinión en que el estado surge, al menos en parte, a partir de la sobreexpresión de factores de crecimiento locales y su interacción con sus receptores que favorecen la proliferación de queratinocitos mediante receptores de queratinocitos que parecen ser más abundantes durante la psoriasis.
25

Un grupo importante de factores de crecimiento son los factores de crecimiento similares a la insulina derivados de la piel (IGF) que favorecen la proliferación de queratinocitos. En particular, IGF-1 y IGF-2 son polipéptidos ubicuos cada uno con potentes efectos mitogénicos sobre una amplia gama de células. Las moléculas del tipo de IGF también se conocen como "factores de progresión" que promueven células "competentes" a través de síntesis de ADN. Los IGF actúan a través de un receptor común conocido como receptor de tipo I o IGF-IR, que está unido a tirosina cinasa. Se sintetizan en tejidos mesenquimatosos, incluyendo la dermis, y actúan sobre células adyacentes de origen mesodérmico, endodérmico o ectodérmico. La regulación de su síntesis implica hormona de crecimiento (GH) en el hígado, pero está mal definida en la mayoría de los tejidos (Sara, *Physiological Reviews* 70: 591-614, 1990).
30

Proteínas particulares, denominadas proteínas de unión a IGF (IGFBP), parecen estar implicadas en la regulación autocrina/paracrina de la disponibilidad de IGF tisular (Rechler y Brown, *Growth Regulation* 2: 55-68, 1992). Hasta la fecha se han identificado seis IGFBP. Los efectos exactos de las IGFBP no están claros y los efectos observados *in vitro* han sido inhibidores o estimuladores dependiendo del método experimental empleado (Clemmons, *Growth Regn.* 2:80, 1992). Sin embargo, hay algunas pruebas de que determinadas IGFBP están implicadas en el direccionamiento de IGF-I a su receptor de la superficie celular.
45

La piel, que comprende la epidermis y la dermis subyacente, tiene receptores de GH en fibroblastos dérmicos (Oakes *et al.*, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 73: 1368-1373, 1992). Los fibroblastos sintetizan IGF-1 así como IGFBP-3, 4, 5 y 6 (Camacho-Hubner *et al.*, *J. Biol. Chem.* 267: 11949-11956, 1992) que pueden estar implicadas en el direccionamiento de IGF-1 a células adyacentes así como a la epidermis superpuesta. El tipo de célula epidérmica mayoritario, el queratinocito, no sintetiza IGF-I, pero posee receptores de IGF-I y es sensible a IGF-I (Neely *et al.*, *J. Inv. Derm.* 96: 104, 1991).
50

En la última década, ha habido muchos informes del uso de oligonucleótidos antisentido para explorar la función génica y en el desarrollo de fármacos basados en ácido nucleico. Los oligonucleótidos antisentido inhiben la traducción del ARNm mediante varios modos alternativos que incluyen la destrucción del ARNm diana a través del reclutamiento de ARNasa H, o interferencia con el procesamiento del ARN, la exportación nuclear, el plegamiento o la exploración ribosómica. Más recientemente, un mejor entendimiento de los sitios de acción intracelulares de las diversas modalidades antisentido y mejoras en la química de oligonucleótidos han aumentado el número de informes de inhibición de la expresión validada.
60

65 En el trabajo que condujo a la presente invención, los inventores se centraron en el uso del enfoque antisentido para inhibir el crecimiento de queratinocitos epidérmicos humanos, particularmente en trastornos de crecimiento

epidérmicos humanos tales como psoriasis. La psoriasis es un estado de la piel común y desfigurante asociado a hiperplasia epidérmica grave. Las terapias existentes para la psoriasis son sólo parcialmente eficaces, sin embargo, tratamientos dirigidos a la epidermis han demostrado ser prometedores (Jensen *et al.*, Br. J. Dermatol. 139: 984-991, 1998; van de Kerkhof, Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol. 11: 2-10, 1998). Una estrategia es desarrollar inhibidores antisentido de la expresión de IGF-IR y usarlos para bloquear la supervivencia y división celular estimulada por IGF-I en la epidermis.

El IGF-IR es un receptor de la superficie celular unido a tirosina cinasa (Ullrich *et al.*, EMBO J. 5: 2503-2512, 1986) que regula la división, transformación y apoptosis celulares en muchos tipos de células (LeRoith *et al.*, Endocr. Rev. 16: 143-163, 1995; Rubin y Baserga, Laboratory Investigation 73: 311-331, 1995). Los queratinocitos epidérmicos humanos son altamente sensibles a la activación de IGF-IR (Ristow y Messmer, J. Cell Physiol. 137: 277-284, 1988; Neely *et al.*, J. Invest. Dermatol. 96: 104-110, 1991; Wraight *et al.*, J. Invest. Dermatol. 103: 627-631, 1994) y varios estudios apuntan a un importante papel de la activación de IGF-1R en la patogénesis de la psoriasis (Krane *et al.*, J. Invest. Dermatol. 96: 419-424, 1991; Krane *et al.*, J. Exp. Med. 175: 1081-1090, 1992; Ristow, Growth Regul. 3: 129-137, 1993; Hodak *et al.*, J. Invest. Dermatol. 106: 564-570, 1996; Xu *et al.*, J. Invest. Dermatol. 106: 109-112, 1996; Ristow, Dermatology 195: 213-219, 1997; Wraight *et al.*, J. Invest. Dermatol. 108: 452-456, 1997). El IGF-IR se ha seleccionado como diana previamente por enfoques antisentido en fibroblastos, células hematopoyéticas y células de glioblastoma para investigar su papel en la transformación y la progresión del ciclo celular (Pietrkowski *et al.*, Mol. Cell Biol. 12: 3883-3889, 1992; Porcu *et al.*, Mol. Cell Biol. 12: 5069-5077, 1992; Reiss *et al.*, Oncogene 7: 2243-2248, 1992; Resnicoff *et al.*, Cancer Res. 54: 2218-2222, 1994).

Se ha notificado la identificación de oligonucleótidos de fosforotioato propinilados que pueden reducir los niveles de ARNm de IGF-IR cuando se suministran eficazmente al núcleo del queratinocito (White *et al.*, Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 10: 195-203, 2000; Wraight *et al.*, Nat. Biotechnol. 18: 521-526, 2000). Estos oligonucleótidos también eran eficaces en la reducción de la unión a IGF-I, la activación del receptor y la proliferación celular *in vitro* y la proliferación epidérmica *in vivo* (Wraight *et al.*, 2000, citado anteriormente).

Se seleccionaron oligonucleótidos de fosforotioato modificados con propino (Flanagan *et al.*, Nat. Biotechnol. 14: 1139-1145, 1996b; Flanagan y Wagner, Mol. Cell Biochem. 172: 213-225, 1997) porque su afinidad aumentada por el ARNm diana permite la inhibición del ARNm con concentraciones inferiores (Wagner *et al.*, 1993, citado anteriormente) y su longitud de oligonucleótido más corta (Flanagan *et al.*, Nucleic Acids Res. 24: 2936-2941, 1996a) que fosforotioatos no modificados, reduciendo teóricamente la incidencia de efectos aptaméricos sobre células diana.

Aunque se ha demostrado éxito con los oligonucleótidos de fosforotioato modificados con propino, es necesario considerar químicas alternativas para reducir la toxicidad, aumentar la estabilidad, aumentar el perfil de especificidad, mejorar la penetración y/o intensificar la potencia y las propiedades biológicas, químicas o físicas. Oligonucleótidos de químicas alternativas también pueden proporcionar otras ventajas incluyendo fabricación a gran escala conocida, conocimiento del desarrollo clínico en seres humanos y/o aprobación conocida como fármacos.

Sumario de la invención

A lo largo de toda esta memoria descriptiva, a menos que el contexto requiera lo contrario, la palabra "comprenden", o variaciones tales como "comprende" o "que comprende", se entenderá que implica la inclusión de un elemento o número entero o grupo de elementos o de números enteros establecidos pero no la exclusión de cualquier otro elemento o número entero o grupo de elementos o de números enteros.

Se hace referencia a secuencias de nucleótidos y aminoácidos mediante una número identificador de secuencia (SEQ ID NO:). Los SEQ ID NO: corresponden numéricamente a los identificadores de secuencia <400>1 (SEQ ID NO:1), <400>2 (SEQ ID NO:2), etc. Se proporciona un resumen de los identificadores de secuencia en la tabla 1. Se proporciona una lista de secuencias tras las reivindicaciones.

La presente invención se refiere a oligonucleótidos que se dirigen al receptor del factor de crecimiento I similar a la insulina humano (IGF-IR) y que inhiben la expresión de IGF-IR. También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden los oligonucleótidos de la invención. Se dan a conocer métodos de selección de moduladores de la expresión génica de IGF-IR y métodos de modulación de la expresión del gen de IGF-IR en células, tejidos o animales que comprenden poner en contacto dichas células, tejidos o animales con uno o más de los compuestos o las composiciones dadas a conocer en el presente documento. También se exponen en el presente documento métodos de tratamiento de un animal, particularmente un ser humano, que se sospecha que tiene o que es propenso a una enfermedad o estado asociado con la expresión de IGF-IR o su ligando, IGF-I. Tales métodos comprenden administrar una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de uno o más de los oligonucleótidos o las composiciones de la invención a la persona que necesita el tratamiento. La invención proporciona el uso de un oligonucleótido de la invención en la fabricación de un medicamento para tratar a un animal que tiene una enfermedad, estado o trastorno asociado con IGF-IR, en el que dicho oligonucleótido inhibe la expresión de IGF-IR.

También se proporciona un oligonucleótido de la invención para su uso en el tratamiento de un animal que tiene una enfermedad, estado o trastorno asociado con IGF-IR, en el que dicho oligonucleótido inhibe la expresión de IGF-IR.

5 Los oligonucleótidos de la presente invención se denominan en el presente documento oligonucleótidos antisentido o ASO. Los ASO a los que se hace referencia en la memoria descriptiva objeto se enumeran en la tabla 1. Los ASO se identifican mediante un número "ISIS" así como por un número de SEQ ID. Los ASO de la presente invención se basan en las secuencias expuestas en SEQ ID NO: 125 y 160.

10 Otros ASO incluyen ISIS 175308 (SEQ ID NO: 116), ISIS 175302 (SEQ ID NO: 110), ISIS 175314 (SEQ ID NO: 122), ISIS 175307 (SEQ ID NO: 115) e ISIS 175323 (SEQ ID NO: 131).

Otro grupo de ASO incluye ISIS 323744 (SEQ ID NO: 50), ISIS 323747 (SEQ ID NO: 53), ISIS 323767 (SEQ ID NO: 73), ISIS 323762 (SEQ ID NO: 68) e ISIS 323737 (SEQ ID NO: 43).

15 El ASO preferido es ISIS 175317 (SEQ ID NO: 125).

Tabla 1
Resumen de moléculas de ácido nucleico

| N.º de ISIS | REGIÓN | SEQ ID NO DIANA | SITIO DIANA | SECUENCIA/DESCRIPCIÓN | % de inhib. | SEQ ID NO |
|-------------|-----------------|-----------------|-------------|-----------------------|-------------|-----------|
| 323695 | UTR en 5' | NM_000875.2 | 25 | CCTTTTATTTGGGATGAAAT | 50 | 1 |
| 323696 | Codón de inicio | NM_000875.2 | 37 | CCAGACTTCATTCTTTTAT | 44 | 2 |
| 323697 | Codificante | NM_000875.2 | 157 | TGATAGTCGTTGCGGATGTC | 73 | 3 |
| 323698 | Codificante | NM_000875.2 | 162 | GCTGCTGATAGTCGTTGCGG | 72 | 4 |
| 323699 | Codificante | NM_000875.2 | 167 | CTTCAGCTGCTGATAGTCGT | 74 | 5 |
| 323700 | Codificante | NM_000875.2 | 196 | CCCTCGATCACCGTGCAGTT | 56 | 6 |
| 323701 | Codificante | NM_000875.2 | 223 | TTGGAGATGAGCAGGATGTG | 65 | 7 |
| 323702 | Codificante | NM_000875.2 | 228 | CGGCCTTGGAGATGAGCAGG | 66 | 8 |
| 323703 | Codificante | NM_000875.2 | 233 | GTCCTCGGCCTTGGAGATGA | 71 | 9 |
| 323704 | Codificante | NM_000875.2 | 238 | CGGTAGTCCTCGGCCTTGA | 71 | 10 |
| 323705 | Codificante | NM_000875.2 | 367 | TTGTAGAAGAGTTTCCAGCC | 52 | 11 |
| 323706 | Codificante | NM_000875.2 | 396 | TGGTCATCTCGAAGATGACC | 5 | 12 |
| 323707 | Codificante | NM_000875.2 | 401 | GAGATTGGTCATCTCGAAGA | 20 | 13 |
| 323708 | Codificante | NM_000875.2 | 406 | TCCTTGAGATTGGTCATCTC | 41 | 14 |
| 323709 | Codificante | NM_000875.2 | 411 | CAATATCCTTGAGATTGGTC | 29 | 15 |
| 323710 | Codificante | NM_000875.2 | 416 | AAGCCCAATATCCTTGAGAT | 43 | 16 |
| 323711 | Codificante | NM_000875.2 | 443 | CCCCGAGTAATGTTCTCA | 41 | 17 |
| 323712 | Codificante | NM_000875.2 | 459 | TCTCAATCCTGATGGCCCCC | 56 | 18 |
| 323713 | Codificante | NM_000875.2 | 527 | GTTATTGGACACCGCATCCA | 31 | 19 |

ES 2 400 033 T3

| | | | | | | |
|--------|-------------|-------------|------|------------------------|----|----|
| 323714 | Codificante | NM_000875.2 | 532 | ATGTAGTTATTGGACACCGC | 64 | 20 |
| 323715 | Codificante | NM_000875.2 | 537 | CCACAATGTAGTTATTGGAC | 65 | 21 |
| 323716 | Codificante | NM_000875.2 | 571 | CACAGGTCCCCACATTCTT | 42 | 22 |
| 323717 | Codificante | NM_000875.2 | 576 | CTGGACACAGGTCCCCACAT | 45 | 23 |
| 323718 | Codificante | NM_000875.2 | 616 | ATGGTGGTCTTCTCACACAT | 69 | 24 |
| 323719 | Codificante | NM_000875.2 | 621 | TGTTGATGGTGGTCTTCTCA | 66 | 25 |
| 323720 | Codificante | NM_000875.2 | 626 | CTCATTGTTGATGGTGGTCT | 81 | 26 |
| 323721 | Codificante | NM_000875.2 | 632 | GTTGTACTIONATTGTTGATGG | 73 | 27 |
| 323722 | Codificante | NM_000875.2 | 637 | CGGTAGTTGTACTIONATTGTT | 71 | 28 |
| 323723 | Codificante | NM_000875.2 | 642 | AGCAGCGGTAGTTGTACTION | 70 | 29 |
| 323724 | Codificante | NM_000875.2 | 647 | GGTCCAGCAGCGGTAGTTGT | 60 | 30 |
| 323725 | Codificante | NM_000875.2 | 652 | TTTGTGGTCCAGCAGCGGTA | 67 | 31 |
| 323726 | Codificante | NM_000875.2 | 674 | TGGGCACATTTTCTGGCAGC | 57 | 32 |
| 323727 | Codificante | NM_000875.2 | 1283 | GGAGTAATTCCCTTCTAGCT | 21 | 33 |
| 323728 | Codificante | NM_000875.2 | 1324 | TCCCACAGTTGCTGCAAGTT | 73 | 34 |
| 323729 | Codificante | NM_000875.2 | 1678 | ATGTTCCAGCTGTTGGAGCC | 72 | 35 |
| 323730 | Codificante | NM_000875.2 | 1683 | CCACCATGTTCCAGCTGTTG | 78 | 36 |
| 323731 | Codificante | NM_000875.2 | 1750 | GTCCAGGGCTTCAGCCCATG | 74 | 37 |
| 323732 | Codificante | NM_000875.2 | 1786 | GTGAGGGTCACAGCCTTGAC | 59 | 38 |
| 323733 | Codificante | NM_000875.2 | 1791 | CCATGGTGAGGGTCACAGCC | 78 | 39 |
| 323734 | Codificante | NM_000875.2 | 1846 | TTGGTGCGAATGTACAAGAT | 61 | 40 |
| 323735 | Codificante | NM_000875.2 | 2029 | ATTTTGTCTTTGGAGCAGTA | 65 | 41 |
| 323736 | Codificante | NM_000875.2 | 2203 | AGGAAATTCTCAAAGACTTT | 43 | 42 |

ES 2 400 033 T3

| | | | | | | |
|--------|-------------|-------------|------|----------------------|----|----|
| 323737 | Codificante | NM_000875.2 | 2290 | CTGCTTCGGCTGGACATGGT | 84 | 43 |
| 323738 | Codificante | NM_000875.2 | 2295 | TGTTCTGCTTCGGCTGGAC | 76 | 44 |
| 323739 | Codificante | NM_000875.2 | 2368 | CTGCTCTCAAAGAAAGGGTA | 58 | 45 |
| 323740 | Codificante | NM_000875.2 | 2373 | CCACTCTGCTCTCAAAGAAA | 0 | 46 |
| 323741 | Codificante | NM_000875.2 | 2378 | GTTATCCACTCTGCTCTCAA | 57 | 47 |
| 323742 | Codificante | NM_000875.2 | 2383 | TCCTTGTTATCCACTCTGCT | 58 | 48 |
| 323743 | Codificante | NM_000875.2 | 2446 | TTGCAGCTGTGGATATCGAT | 53 | 49 |
| 323744 | Codificante | NM_000875.2 | 2451 | CGTGCTTGCAGCTGTGGATA | 85 | 50 |
| 323745 | Codificante | NM_000875.2 | 2456 | AGCCTCGTGGTTGCAGCTGT | 75 | 51 |
| 323746 | Codificante | NM_000875.2 | 2461 | TTCTCAGCCTCGTGGTTGCA | 62 | 52 |
| 323747 | Codificante | NM_000875.2 | 2466 | CCAGCTTCTCAGCCTCGTGG | 85 | 53 |
| 323748 | Codificante | NM_000875.2 | 2471 | GCAGCCCAGCTTCTCAGCCT | 77 | 54 |
| 323749 | Codificante | NM_000975.2 | 2476 | GCGCTGCAGCCCAGCTTCTC | 71 | 55 |
| 323750 | Codificante | NM_000875.2 | 2578 | TTTAAAAAGATGGAGTTTTT | 8 | 56 |
| 323751 | Codificante | NM_000875.2 | 2583 | GCCACTTTAAAAAGATGGAG | 77 | 57 |
| 323752 | Codificante | NM_000875.2 | 2677 | TCCTGTCTGGACACACATTC | 66 | 58 |
| 323753 | Codificante | NM_000875.2 | 2791 | AAGAACACAGGATCTGTCCA | 38 | 59 |
| 323754 | Codificante | NM_000875.2 | 2796 | CATAGAAGAACACAGGATCT | 33 | 60 |
| 323755 | Codificante | NM_000875.2 | 2992 | GGAACGTACACATCAGCAGC | 36 | 61 |
| 323756 | Codificante | NM_000875.2 | 3076 | ACTCCTTCATAGACCATCCC | 26 | 62 |
| 323757 | Codificante | NM_000875.2 | 3301 | CGGAGATAACTTTTGAGATC | 35 | 63 |
| 323758 | Codificante | NM_000875.2 | 3306 | GAGACCGGAGATAACTTTTG | 29 | 64 |
| 323759 | Codificante | NM_000875.2 | 3478 | ATTTTGACTGTGAAATCTTC | 13 | 65 |

ES 2 400 033 T3

| | | | | | | |
|-------------------|---------------------------|-------------|--------|--|----|----|
| 323760 | Codificante | NM_000875.2 | 3643 | GCGATCTCCCAGAGGACGAC | 72 | 66 |
| 323761 | Codificante | NM_000875.2 | 3870 | TGTAGTAGAAGGAGACCTCC | 26 | 67 |
| 323762 | Codificante | NM_000875.2 | 4000 | GCCTTGTGTCCTGAGTGTCT | 84 | 68 |
| 323763 | Codón de terminación | NM_000875.2 | 4139 | ATCCAAGGATCAGCAGGTCG | 69 | 69 |
| 323764 | UTR en 3' | NM_000875.2 | 4329 | GCTGCTTGCATATTGAAAAA | 77 | 70 |
| 323765 | UTR en 3' | NM_000875.2 | 4334 | AAAAAGCTGCTTGCATATTG | 74 | 71 |
| 323766 | UTR en 3' | NM_000875.2 | 4366 | GCCCATGTCAGTTAAGGGTT | 69 | 72 |
| 323767 | UTR en 3' | NM_000875.2 | 4822 | CCAGCGTGTCTCTCAAATGG | 84 | 73 |
| 323768 | Intrón | NT_035325.2 | 62268 | GGAGTTTAAAGGACAGTGCC | 59 | 74 |
| 323769 | Exón: Unión del intrón | NT_035325.2 | 280527 | CATCACTGACCTCTTTCTAT | 0 | 75 |
| IG-IR 5' (M69229) | | | | secuencia no traducida en 5' de IGF-IR humano | | 76 |
| IGF-IR (NM000875) | | | | secuencia de nucleótidos que codifica para IGF-IR humano | | 77 |
| DT1064 | | | | secuencia de nucleótidos que codifica para el compuesto de partida de C5 propino de IGF-IR CAC AGU UGC UGC AAG DT1064 ₂ | | 78 |
| 13920 | | | | oligonucleótido antisentido control para H-ras humana | | 79 |
| 18078 | | | | oligonucleótido antisentido control para JNK humana | | 80 |
| 15770 | | | | oligonucleótido antisentido control para c-raf de ratón y rata | | 81 |
| 161212 | | | | cebador de PCR para hIGF-RI | | 82 |
| 161214 | | | | cebador de PCR para hIGF-RI | | 83 |
| 161215 | | | | cebador de PCR para hIGF-RI | | 84 |
| 129692 | | | | ASO control negativo | | 85 |
| 121691 | | | | ASO control negativo | | 86 |
| 122291 | | | | ASO control negativo | | 87 |
| R451 | | | | ASO usado para estudio de localización | | 88 |
| 251741 | | | | ASO usado para estudio de localización | | 89 |
| 13920 | | | | ASO usado para estudio de localización | | 90 |

ES 2 400 033 T3

| | | | | | | |
|--------|-----------|---------------|-----|--|----|-----|
| 147979 | | | | ASO usado para estudio de localización | | 91 |
| | | | | hebra sentido a modo de ejemplo | | 92 |
| | | | | hebra antisentido a modo de ejemplo | | 93 |
| | | | | cebador de PCR para hGAPDH | | 94 |
| | | | | cebador de PCR para hGAPDH | | 95 |
| | | | | sonda de de PCR para hGAPDH | | 96 |
| | | | | Secuencia de nucleótidos de IGF-IR con regiones no traducidas en 3' y 5' | | 97 |
| 18078 | | | | ASO control negativo | | 98 |
| 298948 | | | | ASO control negativo | | 99 |
| 175292 | UTR en 5' | SEQ ID NO: 97 | 930 | agtctcaaacctcagctctcg | 78 | 100 |
| 175293 | UTR en 5' | SEQ ID NO: 97 | 42 | gtaaatgctgaaacaaga | 40 | 101 |
| 175294 | UTR en 5' | SEQ ID NO: 97 | 558 | gaagtcgggtcacaggcga | 77 | 102 |
| 175295 | UTR en 5' | SEQ ID NO: 97 | 29 | aacaagagccccagcctcgc | 76 | 103 |
| 175296 | UTR en 5' | SEQ ID NO: 97 | 38 | atgctgtaaacaagagccc | 57 | 104 |
| 175297 | UTR en 5' | SEQ ID NO: 97 | 37 | tgctgtaaacaagagcccc | 61 | 105 |
| 175298 | UTR en 5' | SEQ ID NO: 97 | 516 | ggagtcaaatgaatgagcg | 74 | 106 |
| 175299 | UTR en 5' | SEQ ID NO: 97 | 665 | aatctgcctaggcgaggaaa | 78 | 107 |
| 175300 | UTR en 5' | SEQ ID NO: 97 | 36 | gctgtaaacaagagcccca | 54 | 108 |
| 175301 | UTR en 5' | SEQ ID NO: 97 | 671 | agcccaaatctgcctaggcg | 77 | 109 |
| 175302 | UTR en 5' | SEQ ID NO: 97 | 730 | cctccatttcaaacccgga | 93 | 110 |
| 175303 | UTR en 5' | SEQ ID NO: 97 | 260 | gaaggtcacagccgaggcga | 82 | 111 |
| 175304 | UTR en 5' | SEQ ID NO: 97 | 265 | tcgctgaaggtcacagccga | 76 | 112 |
| 175305 | UTR en 5' | SEQ ID NO: 97 | 410 | atccaggacacacaaaagc | 81 | 113 |
| 175306 | UTR en 5' | SEQ ID NO: 97 | 557 | aagtcgggtcacaggcgag | 54 | 114 |
| 175307 | UTR en 5' | SEQ ID NO: 97 | 931 | aagtctcaaacctcagctctc | 86 | 115 |
| 175308 | UTR en 5' | SEQ ID NO: 97 | 738 | gctgctggcctccatttca | 94 | 116 |

ES 2 400 033 T3

| | | | | | | |
|--------|-----------|---------------|-----|-----------------------|----|-----|
| 175309 | UTR en 5' | SEQ ID NO: 97 | 526 | gcagaaacgcgagtcacaaa | 72 | 117 |
| 175310 | UTR en 5' | SEQ ID NO: 97 | 429 | gcggcgagctcctcccaaa | 76 | 118 |
| 175311 | UTR en 5' | SEQ ID NO: 97 | 40 | taatgctggtaacaagagc | 53 | 119 |
| 175312 | UTR en 5' | SEQ ID NO: 97 | 723 | ttcaaaccggagaggcag | 31 | 120 |
| 175313 | UTR en 5' | SEQ ID NO: 97 | 657 | taggcgaggaaaaacaagcc | 62 | 121 |
| 175314 | UTR en 5' | SEQ ID NO: 97 | 266 | ctcgcgtaaggctcacagccg | 87 | 122 |
| 175315 | UTR en 5' | SEQ ID NO: 97 | 798 | gcagcggcccagggtcggc | 75 | 123 |
| 175316 | UTR en 5' | SEQ ID NO: 97 | 267 | gctcgcgtaaggctcacagcc | 82 | 124 |
| 175317 | UTR en 5' | SEQ ID NO: 97 | 889 | cgaaggaaacaataactccga | 84 | 125 |
| 175318 | UTR en 5' | SEQ ID NO: 97 | 523 | gaaacgcgagtcacaaatga | 68 | 126 |
| 175319 | UTR en 5' | SEQ ID NO: 97 | 884 | gaaacaataactccgaagggc | 63 | 127 |
| 175320 | UTR en 5' | SEQ ID NO: 97 | 414 | ccaaatccaggacacacaca | 64 | 128 |
| 175321 | UTR en 5' | SEQ ID NO: 97 | 734 | tcggcctccatttcaaac | 78 | 129 |
| 175322 | UTR en 5' | SEQ ID NO: 97 | 554 | tccgggtcacaggcgaggcc | 67 | 130 |
| 175323 | UTR en 5' | SEQ ID NO: 97 | 508 | aatgaatgagcggctcccc | 82 | 131 |
| 175324 | UTR en 5' | SEQ ID NO: 97 | 261 | tgaaggctcacagccgaggcg | 57 | 132 |
| 175325 | UTR en 5' | SEQ ID NO: 97 | 259 | aaggctcacagccgaggcgag | 55 | 133 |
| 175326 | UTR en 5' | SEQ ID NO: 97 | 415 | cccaaattccaggacacacac | 74 | 134 |
| 175327 | UTR en 5' | SEQ ID NO: 97 | 933 | acaagtctcaactcagtct | 61 | 135 |
| 175328 | UTR en 5' | SEQ ID NO: 97 | 33 | ggtaacaagagccccagcc | 64 | 136 |
| 90444 | | | 930 | cgaagactgagttgagact | | 137 |
| 90446 | | | 558 | tcgcctgtgacccggacttc | | 138 |
| 90447 | | | 29 | gcgaggctgggctctgtt | | 139 |
| 90448 | | | 38 | gggctctgtttaccagcat | | 140 |
| 90449 | | | 37 | ggggctctgtttaccagca | | 141 |

ES 2 400 033 T3

| | | | | | | |
|-------|--|--|-----|----------------------|--|-----|
| 90450 | | | 516 | cgctcattcatttgactcc | | 142 |
| 90451 | | | 665 | ttcctcgcctaggcagatt | | 143 |
| 90452 | | | 36 | tggggctctgtttaccagc | | 144 |
| 90453 | | | 671 | cgctaggcagamgggct | | 145 |
| 90454 | | | 730 | tccgggttgaaaatggagg | | 146 |
| 90455 | | | 260 | tcgcctcgctgtgacctc | | 147 |
| 90456 | | | 265 | tcggctgtgacctcagcga | | 148 |
| 90457 | | | 410 | gcttgtgtgtcctggat | | 149 |
| 90458 | | | 557 | ctgcctgtgacctcgactt | | 150 |
| 90459 | | | 931 | gaagactgagttgagactt | | 151 |
| 90460 | | | 738 | tgaaaatggaggccgacgac | | 152 |
| 90461 | | | 526 | tttgactccggtttctgc | | 153 |
| 90462 | | | 429 | ttgggaaggagctcgccgc | | 154 |
| 90463 | | | 40 | gctctgtttccagcatta | | 155 |
| 90465 | | | 657 | ggctgttttctcgccta | | 156 |
| 90466 | | | 266 | cggctgtgacctcagcgag | | 157 |
| 90467 | | | 798 | gccgagccctggccgctgc | | 158 |
| 90468 | | | 267 | ggctgtgacctcagcgagc | | 159 |
| 90469 | | | 889 | tcggagtattgttcctcg | | 160 |
| 90470 | | | 523 | tcatttgactccggtttc | | 161 |
| 90471 | | | 884 | gccctcggagtattgttc | | 162 |
| 90472 | | | 414 | tgtgtgtcctggattgg | | 163 |
| 90473 | | | 734 | ggtttgaaaatggaggccga | | 164 |
| 90474 | | | 554 | ggcctcgcctgtgacctgga | | 165 |
| 90475 | | | 508 | gggggagccgctcattcatt | | 166 |
| 90476 | | | 261 | cgctcggctgtgacctca | | 167 |
| 90477 | | | 259 | ctgcctcggctgtgacctt | | 168 |
| 90478 | | | 415 | gtgtgtcctggattggg | | 169 |
| 90479 | | | 933 | agactgagttgagactgt | | 170 |
| 90480 | | | 33 | ggctgggctctgtttacc | | 171 |

¹ ASO, oligonucleótido antisentido

² Todas las C y U están propinadas en C5

Breve descripción de las figuras

5

La figura 1 es una representación esquemática de una biopsia de piel mantenida *ex vivo*.

La figura 2 es una representación de (A) la secuencia de nucleótidos de la región del gen de IGF-IR (NM000875 que es una combinación de X04434 y M69229; SEQ ID NO: 77).

10

CARACTERÍSTICAS Ubicación/Calificadores

fuate 1..4989

ES 2 400 033 T3

```

/organismo = "Homo sapiens"
/dbx_ref = "taxón:9606"
5   /cromosoma = "15"
    /mapa = "15q25-q26"
    /clon = "(lambda)IGF-1-R.85, (lambda)IGF-1-R.76"
10  /tipo_tejido = "placenta"
    /lib_clon = "(lamda)gt10"
15  gen      1..4989
    /gen = "IGF1R"
    /nota = "sinónimo: JTK13"
20  /dbx_ref = "LocusID:3480"
    /dbx_ref = "MIM:147370"
25  CDS     46..4149
    /gen = "IGF1R"
    /numero_EC = "2.7.1.112"
30  /codón_iniciación = 1
    /producto = "precursor del receptor de factor de crecimiento 1 similar a insulina"
35  /id_proteína = "NP000866.1"
    /dbx_ref = "GI:4557665"
    /dbx_ref = "LocusID:3480"
40  /dbx_ref = "MIM:147370"
    péptido_señ      46..135
45  /gen = "IGF1R".
    péptido_mat      136..2265
    /gen = "IGF1R"
50  /producto = "cadena alfa del receptor de factor de crecimiento 1 similar a insulina"
    característica_misc      196..531
55  /gen = "IGF1R"
    /nota = "dominio_L-recept: Región: dominio L de receptor. Los dominios L para
60  estos receptores constituyen el sitio de unión al ligando bilobal. Cada dominio L
    consiste en una beta-hélice destrógira monocatenaria. Esta entrada de Pfam no
    aparece en los primeros 50 residuos de aminoácidos del dominio"
    característica_misc      dbx_ref = "CDD:pfam01030"
    568..1044
65  /gen = "IGF1R"

```

ES 2 400 033 T3

| | | |
|----|---------------------|--|
| | | /nota = "similar a furina; Región: región rica en cisteína similar a furina" |
| | | /dbx_ref = "CDD:pfam00757" |
| 5 | característica_misc | 694..1041 |
| | | /gen = "IGF1R" |
| 10 | | /nota = "VSP; Región: proteína de superficie específica variante de <i>Giardia</i> " |
| | | /dbx_ref = "CDD:pfam03302" |
| | característica_misc | 724..855 |
| 15 | | /gen = "IGF1R" |
| | | /nota = "FU; Región: repeticiones similares a furina" |
| | | /dbx_ref = "CDD:smart00261" |
| 20 | característica_misc | 1168..1479 |
| | | /gen = "IGF1R" |
| 25 | | /nota = "dominio_L_recep; Región: dominio L de receptor. Los dominios L para estos receptores constituyen el sitio de unión al ligando bilobal. Cada dominio L consiste en una beta-hélice destrógira monocatenaria. Esta entrada de Pfam no aparece en los primeros 50 residuos de aminoácidos del dominio" |
| 30 | | /dbx_ref = "CDD:pfam01030" |
| | característica_misc | 1519..1800 |
| | | /gen = "IGF1R" |
| 35 | | /nota = "FN3; Región: Dominio de fibronectina tipo 3" |
| | | /dbx_ref = "CDD:smart00060" |
| 40 | péptido_mat | 2266..4146 |
| | | /gen = "IGF1R" |
| | | /producto = "cadena beta del receptor de factor de crecimiento 1 similar a insulina" |
| 45 | característica_misc | 2542..2787 |
| | | /gen = "IGF1R" |
| 50 | | /nota = "FN3; Región: Dominio de fibronectina tipo 3" |
| | | /dbx_ref = "CDD:smart00060" |
| 55 | característica_misc | 2548..2796 |
| | | /gen = "IGF1R" |
| | | /nota = "fn3; Región: Dominio de fibronectina tipo III" |
| 60 | | /dbx_ref = "CDD:pfam000411" |
| | característica_misc | 2836..2910 |
| | | /gen = "IGF1R" |
| 65 | | /nota = "región transmembrana (AA 906 - 929); sitio de región transmembrana" |

ES 2 400 033 T3

| | | |
|----|---------------------|---|
| 5 | característica_misc | 3040..3843 /gen = "IGF1R" /nota = "cinasa; Región: Dominio de proteína cinasa" /dbx_ref = "CDD:pfam00069" |
| 10 | característica_misc | 3040..3843 /gen = "IGF1R" /nota = "TyrKc; Región: Tirosina cinasa, dominio catalítico" /dbx_ref = "CDDsmart00219" |
| 15 | | |
| 20 | característica_misc | 3052..3837 /gen = "IGF1R" /nota = "S_TKc; Región: Serina/treonina proteína cinasas, domino catalítico" /dbx_ref = "CDD:smart00220" |
| 25 | característica_misc | 122..2251 /gen = "IGF1R" /nota = "subunidad alfa (AA 1 - 710)" |
| 30 | | |
| 35 | característica_misc | 182..190 /gen = "IGF1R" /nota = "sitio de glicosilación unido a pot.N (AA 21 - 23)" |
| 40 | característica_misc | 335..343 /gen = "IGF1R" /nota = "sitio de glicosilación unido a pot.N (AA 72 - 74)" |
| 45 | característica_misc | 434..442 /gen = "IGF1R" /nota = "sitio de glicosilación unido a pot.N (AA 105 - 107)" |
| 50 | característica_misc | 761..769 /gen = "IGF1R" /nota = "sitio de glicosilación unido a pot.N (AA 214 - 216)" |
| 55 | variación | 948 /gen = "IGF1R" |
| 60 | | /alelo = "C" /alelo = "A" /dbx_ref = "dbSNP:2229764" |
| 65 | característica_misc | 971..979 |

ES 2 400 033 T3

| | | |
|----|---------------------|--|
| | | /gen = "IGF1R" |
| 5 | característica_misc | /nota = "sitio de glicosilación unido a pot.N (AA 284 - 286)" 1280..1288 |
| | | /gen = "IGF1R" |
| 10 | característica_misc | /nota = "sitio de glicosilación unido a pot.N (AA 387 - 389)" 1343..1351 |
| | | /gen = "IGF1R" |
| 15 | característica_misc | /nota = "sitio de glicosilación unido a pot.N (AA 408 - 410)" 1631..1639 |
| | | /gen = "IGF1R" |
| 20 | variación | /nota = "sitio de glicosilación unido a pot.N (AA 504 - 506)" 1731 |
| 25 | | /gen = "IGF1R" |
| | | /alelo = "G" |
| 30 | | /alelo = "A" |
| | | /dbx_ref = "dbSNP:2228531" |
| 35 | característica_misc | 1850..1858 |
| | | /gen = "IGF1R" |
| | | /nota = "sitio de glicosilación unido a pot.N (AA 577 - 579)" |
| 40 | característica_misc | 1895..1903 |
| | | /gen = "IGF1R" |
| | | /nota = "sitio de glicosilación unido a pot.N (AA 592 - 594)" |
| 45 | característica_misc | 1949..1957 |
| | | /gen = "IGF1R" |
| 50 | característica_misc | /nota = "sitio de glicosilación unido a pot.N (AA 610 - 612)" 2240..2251 |
| | | /gen = "IGF1R" |
| 55 | característica_misc | /nota = "sitio de procesamiento del supuesto pro-receptor (AA 707 -710)" 2252..4132 |
| | | /gen = "IGF1R" |
| 60 | característica_misc | /nota = "subunidad beta (AA 711 - 1337)" 2270..2278 |
| 65 | | /gen = "IGF1R" |

ES 2 400 033 T3

| | | |
|----|---------------------|---|
| | | /nota = "sitio de glicosilación unido a pot.N (AA 717 - 719]" |
| 5 | característica_misc | 2297..2305 |
| | | /gen = "IGF1R" |
| | | /nota = "sitio de glicosilación unido a pot.N (AA 726 - 728)" |
| 10 | característica_misc | 2321..2329 |
| | | /gen = "IGF1R" |
| | | /nota = "sitio de glicosilación unido a pot.N (AA 734 - 736)" |
| 15 | variación | 2343 |
| | | /gen = "IGF1R" |
| 20 | | /alelo = "T" |
| | | /alelo = "C" |
| | | /dbx_ref = "dbSNP:3743262" |
| 25 | característica_misc | 2729..2737 |
| | | /gen = "IGF1R" |
| 30 | | /nota = "sitio de glicosilación unido a pot.N (AA 870 - 872)" |
| | característica_misc | 2768..2776 |
| | | /gen = "IGF1R" |
| 35 | | /nota = "sitio de glicosilación unido a pot.N (AA 883 - 885)" |
| | característica_misc | 2918..2926 |
| 40 | | /gen = "IGF1R" |
| | | /nota = "sitio de glicosilación unido a pot.N (AA 933 - 935)" |
| 45 | característica_misc | 3047..3049 |
| | | /gen = "IGF1R" |
| | | /nota = "sitio de unión pot.ATP (AA 976)" |
| 50 | característica_misc | 3053..3055 |
| | | /gen = "IGF1R" |
| | | /nota = "sitio de unión pot.ATP (AA 978)" |
| 55 | característica_misc | 3062..3064 |
| | | /gen = "IGF1R" |
| 60 | | /nota = "sitio de unión pot.ATP (AA 981)" |
| | característica_misc | 3128..3130 |
| | | /gen = "IGF1R" |
| 65 | | /nota = "sitio de unión pot.ATP (AA 1003)" |

ES 2 400 033 T3

| | | |
|----|-----------|---|
| | variación | 3174 |
| 5 | | /gen = "IGF1R" /alelo = "G" /alelo = "A" |
| 10 | | /dbx_ref = "dbSNP:2229765" |
| | variación | complemento(4205) |
| 15 | | /alelo = "G" /alelo = "C" /dbx_ref = "dbSNP:3825954" |
| 20 | variación | 4267 |
| 25 | | /gen = "IGF1R" /alelo = "T" /alelo = "A" /dbx_ref = "dbSNP: 1065304" |
| 30 | variación | 4268 |
| 35 | | /gen = "IGF1R" /alelo = "T" /alelo = "A" /dbx_ref "dbSNP:1065345" |
| 40 | variación | complemento(4567) |
| 45 | | /alelo = "AG" /alelo = "-" /dbx_ref = "dbSNP:3833015" |

ORIGEN RECUESTO BASES 1216 a 1371 c 1320 g 1082 t

50 (B) Secuencia de nucleótidos de IGR-IR y secuencia de aminoácidos correspondiente con regiones no traducidas en 3' y 5' (NM000).

La figura 3 es una representación gráfica que muestra (A) el efecto de ISIS de ASO de IGF-IR de partida de 175292 a 175328 sobre ARNm de IGF-IR en células A549 en relación con ISIS 13650, ISIS 18078 e ISIS 29848 controles negativos. (B) El efecto de ISIS de ASO de IGF-IR de partida 175314, ISIS 175317 e ISIS 175323 sobre ARNm de IGR-IR en células A459. Para (A) y (B), se transfectaron las células A459 con lipofectina complejada con oligonucleótidos antisentido y control a una razón de lípido 2: oligonucleótido 1. Se aisló el ARN celular total 16-20 h más tarde en un proceso automatizado (por ejemplo Qiagen Inc., Valencia, CA, EE.UU.). El histograma representa mediciones por triplicado a partir de un único experimento, que muestran los niveles medios de ARNm de IGF-IR como un % de los niveles en control no tratado \pm DE, (C) secuencias de nucleótidos de compuestos ASO, oligonucleótidos control y oligonucleótidos cebador/sonda.

La figura 4 es una representación gráfica que muestra el efecto de DT1064 (SEQ ID NO: 43) y ASO de IGR-IR de partida (ISIS 175314 (SEQ ID NO: 27), ISIS 175317 (SEQ ID NO: 30) e ISIS 175323 (SEQ ID NO: 36)) sobre los niveles de ARNm de IGR-IR en queratinocitos HaCaT. Se trataron células HaCaT confluentes en un 85-90% con GSV (2 μ g/ml), con o sin oligonucleótidos antisentido y control (6,25, 25, 100 o 400 nM). Se transfectaron las células

una vez (18 h antes de la recogida; A) o dos veces (a las 24 y 48 h antes de la recogida; B). Se recuperó el ARN total y se sometió a transcripción inversa antes de someterse a ensayo por duplicado en PCR en tiempo real. Se normalizó el ARNm de IGF-IR frente a 18S y se expresó como un % de los niveles en las células control tratadas con GSV. Los resultados representan la media \pm EEM de pocillos por duplicado de dos experimentos separados. UT = células no tratadas, GSV = células tratadas con GSV solamente.

La figura 5 es una representación fotográfica y gráfica que muestra el efecto de DT1064 (SEQ ID NO: 43) y ASO de IGR-IR de partida (ISIS 175314 (SEQ ID NO: 27), ISIS 175317 (SEQ ID NO: 30) e ISIS 175323 (SEQ ID NO: 36)) sobre la proteína IGF-IR en queratinocitos HaCaT. Se transfectaron células HaCaT confluentes en un 85-90% cada 24 h durante 3 días. Se recogieron los lisados celulares y se resolvieron cantidades iguales de proteína (o bien 25 o bien 30 μ g) de cada muestra mediante SDS-PAGE al 7% p/v. Se sometió la proteína a transferencia a membrana de PVDF y se sondó con IgG anti-conejo que reconoce la subunidad β de IGF-IR. (A) Una inmunotransferencia representativa (Western 3) que muestra la intensidad de la señal de IGF-IR. Se corrieron las muestras en 4 geles; las células tratadas y no tratadas con GSV de cada gel se muestran junto con las muestras que han corrido en el mismo gel. (B) Cuantificación de la intensidad de banda de la proteína IGF-IR expresada como un % de los niveles del control tratado con GSV. El histograma muestra la media \pm EEM para los datos de tres experimentos separados en los que se evalúan los tratamientos por duplicado. Se realizó un ANOVA unilateral seguido por comparaciones por emparejamiento mediante la prueba de Dunnett: *P<0,05, Δ P<0,001 frente a células tratadas con GSV. UT = células no tratadas, GSV = células tratadas con GSV solamente.

La figura 6 es una representación gráfica que muestra el efecto de DT1064 y ASO de IGR-IR de partida sobre las tasas de proliferación celular en queratinocitos HaCaT. Se transfectaron células HaCaT subconfluentes con GSV solamente (2 μ g/ml) o GSV (2 μ g/ml) complejo con oligonucleótidos antisentido o control (6,25, 25, 100 ó 400 nM) cada 24 h durante hasta 3 días. Se estimó el número de células usando ensayo con negro de amido en el momento de la primera transfección, y a intervalos de 24 h posteriores. Los datos se representan como media \pm EEM de dos experimentos separados en los que se determinó el número de células por duplicado. UT = células no tratadas, GSV = células tratadas con GSV solamente.

La figura 7 es una representación de la secuencia de desoxirribonucleótidos de la región no traducida en 5' del gen del IGF-IR (M69229; SEQ ID NO: 76) que muestra la ubicación de dianas para ISIS 175314, ISIS 175317 e ISIS 175323.

La figura 8 es una representación gráfica que muestra el efecto de ISIS 175317, ASO de partida de IGF-IR y DT1064 sobre los niveles de ARNm del receptor de IGF-I en queratinocitos HaCaT.

Se trataron células HaCaT confluentes en un 85% (pases 62-63) durante 20 h con GSV (2 μ g/ml), con o sin oligonucleótidos antisentido o control (6, 13, 25, 50, 100 ó 200 nM). Se extrajo el ARN total y se sometió a transcripción inversa antes de someterse a ensayo por duplicado mediante PCR en tiempo real. Se normalizó el ARNm del receptor de IGF-I frente a 18S y se expresó como un porcentaje de los niveles de ARNm de IGF-IR en células tratadas con GSV. Los resultados representan la media \pm DE (n = 4) de pocillos por duplicado de dos experimentos separados. UT = células no tratadas, GSV = células tratadas con GSV solamente.

La figura 9 es una representación gráfica que muestra el efecto de ISIS 175317, otros ASO de partida de IGF-IR y DT1064 sobre los niveles de ARNm del receptor de IGF-I en queratinocitos HaCaT. Se trataron células HaCaT confluentes en un 85% (pases 62-63) durante 20 h con GSV (2 μ g/ml), con o sin oligonucleótidos antisentido o control (6, 13, 25, 50, 100 ó 200 nM). Se extrajo el ARN total y se sometió a transcripción inversa antes de someterse a ensayo por duplicado mediante PCR en tiempo real. Se normalizó el ARNm del receptor de IGF-I frente a 18S y se expresó como un porcentaje de los niveles de ARNm de IGF-IR en células tratadas con GSV. Los resultados representan la media \pm DE (n = 4) de pocillos por duplicado de dos experimentos separados. UT = células no tratadas, GSV = células tratadas con GSV solamente.

En este experimento ASO de IGR-IR de partida: ISIS175317, ASO de IGR-IR de partida: ISIS 323737, ISIS 323744, ISIS 323762, ISIS 323767.

La figura 10 es una representación gráfica que muestra el efecto de ISIS 175317, cuatro ASO de partida de IGF-IR recién identificados y DT1064 sobre los niveles de ARNm del receptor de IGF-I en queratinocitos HaCaT. se trataron células HaCaT confluentes en un 85% (pase 45) durante 20 h con GSV (2 μ g/ml), con o sin oligonucleótidos antisentido o control (0,3, 1,6, 3, 6, 25 ó 100 nM). Se extrajo el ARN total y se sometió a transcripción inversa antes de someterse a ensayo por duplicado mediante PCR en tiempo real. Se normalizó el ARNm del receptor de IGF-I frente a 18S y se expresó como un porcentaje de los niveles de ARNm de IGF-IR en células tratadas con GSV. Los resultados representan la media \pm DE (n = 2) de pocillos por duplicado de un único experimento. UT = células no tratadas, GSV = células tratadas con GSV solamente.

En este experimento: ASO de IGR-IR de partida: ISIS 175317. ASO de IGR-IR de partida: ISIS 323737, ISIS 323744, ISIS 323762, ISIS 323767. Gapmeros de 2'MOE control: ISIS 129691 (al azar), ISIS 306064 (8

apareamientos erróneos). ASO de IGR-IR de C-5 propino: DT1064. C-5 propino control: 6416 (15 apareamientos erróneos).

5 La figura 11 es una representación gráfica que muestra las curvas de concentración-respuesta para los efectos de los cuatro ASO identificados recientemente e ISIS 175317 sobre los niveles relativos de ARNm de IGF-IR en queratinocitos HaCaT. Se trataron células HaCaT confluentes en un 85% (pase 45) durante 20 h con GSV (2 µg/ml), con o sin oligonucleótidos antisentido o control (0,4, 1,6, 3, 6, 25 ó 100 nM). Se extrajo el ARN total y se sometió a transcripción inversa antes de someterse a ensayo por duplicado mediante PCR en tiempo real. Se normalizó el ARNm del receptor de IGF-I frente a 18S y se expresó como un porcentaje de células tratadas con GSV. Los resultados representan la media ± DE (n = 2) de pocillos por duplicado de un único experimento. UT = células no tratadas, GSV = células tratadas con GSV solamente.

10 En este experimento: ASO de IGR-IR de partida: ISIS 175317. ASO de IGR-IR de partida: ISIS 323737, ISIS 323744, ISIS 323762, ISIS 323767.

15 La figura 12 es una representación gráfica que muestra los niveles medios de ARNm de IGF-IR en biopsias de piel psoriásica tras la aplicación tópica de ISIS 175317 (SEQ ID NO: 125). Las barras representan el nivel promedio de ARNm de IGF-IR en la epidermis y la dermis de biopsias tratadas con vehículo y tratadas con ISIS 175317 (SEQ ID NO: 125). Los datos se expresan en relación con el nivel promedio de ARNm de IGF-IR en la epidermis de las muestras tratadas con vehículo, las barras de error son una desviación estándar. ISIS 175317 (SEQ ID NO: 125) aplicado por vía tópica (10% en crema de ISIS) redujo significativamente los niveles de ARNm de IGF-IR en la epidermis y la dermis 24 h tras la aplicación tópica a explantes. En todos los casos n = 11. (* = p<0,05, *** = p<0,001).

20 La figura 13 es una representación gráfica que muestra los niveles medios de ARNm de IGF-IR en biopsias de piel psoriásica tras la aplicación tópica de ISIS 175317 (SEQ ID NO: 125). Las barras representan el nivel promedio de ARNm de IGF-IR en la epidermis psoriásica y la epidermis normal de biopsias tratadas con vehículo y tratadas con ISIS 175317 (SEQ ID NO: 125). Los datos se expresan en relación con el nivel promedio de ARNm de IGF-IR en la epidermis de las muestras tratadas con vehículo, las barras de error son una desviación estándar. ISIS 175317 aplicado por vía tópica (SEQ ID NO: 125) (10% en crema de ISIS) redujo significativamente los niveles de ARNm de IGF-IR en la epidermis y la dermis 24 h tras la aplicación tópica a explantes. En todos los casos n = 11. (* = p<0,05, *** = p<0,001).

25 La figura 14 es una representación gráfica que muestra los niveles medios de ARNm de IGF-IR en biopsias de piel psoriásica tras la aplicación tópica de ISIS 175317 a tejido de epidermis que muestra especificidad de ISIS 175317 para IGF-IR y no para GAPDH, HPRT, receptor de insulina, Casp. 3 y Bax. Las barras representan el nivel promedio de ARNm de IGF-IR en la epidermis y la dermis de biopsias tratadas con vehículo y tratadas con ISIS 175317. Los datos se expresan en relación con el nivel promedio de ARNm de IGF-IR en la epidermis de las muestras tratadas con vehículo, las barras de error son una desviación estándar. ISIS 175317 aplicado por vía tópica (10% en crema de ISIS) redujo significativamente los niveles de ARNm de IGF-IR en la epidermis y la dermis 24 h tras la aplicación tópica a explantes. En todos los casos n = 11. (* = p<0,05, *** = p<0,001).

Descripción detallada de la realización preferida

45 A. Visión general de la invención

La presente descripción da a conocer compuestos, preferiblemente oligonucleótidos y especies similares para su uso en la modulación de la función o el efecto de moléculas de ácido nucleico que codifican para el receptor del factor de crecimiento I similar a insulina y, en una realización particular, el receptor del factor de crecimiento I similar a insulina humano (IGF-IR). La invención proporciona oligonucleótidos que se hibridan específicamente con una molécula de ácido nucleico que codifica para IGF-IR. Tal como se usan en el presente documento, las expresiones “ácido nucleico diana” y “molécula de ácido nucleico que codifica para IGF-IR” se han usado por conveniencia para englobar ADN que codifica para IGF-IR, ARN (incluyendo pre-ARNm y ARNm o partes del mismo) transcrito a partir de tal ADN y también ADNc derivado de tal ARN. La hibridación de un oligonucleótido de esta invención con su ácido nucleico diana se denomina generalmente “antisentido”. Por consiguiente, el mecanismo preferido que se cree que está incluido en la práctica de algunas realizaciones preferidas de la invención se denomina en el presente documento “inhibición antisentido.” Tal inhibición antisentido se basa normalmente en hibridación basada en puentes de hidrógeno de cadenas o segmentos de oligonucleótido de manera que al menos una cadena o segmento se escinde, degrada o se vuelve invariable de otro modo. Con respecto a esto, se prefiere actualmente dirigir moléculas de ácido nucleico específicas y sus funciones para tal inhibición antisentido.

Las funciones del ADN con el que va a interferirse pueden incluir replicación y transcripción. La replicación y la transcripción, por ejemplo, pueden proceder de un molde celular endógeno, un vector, un constructo de plásmido o de otro modo. Las funciones del ARN con la que va a interferirse pueden incluir funciones tales como translocación del ARN a un sitio de traducción de proteínas, translocación del ARN a sitios dentro de la célula que están distantes del sitio de síntesis de ARN, traducción de proteínas a partir del ARN, corte y empalme del ARN para producir una o

más especies de ARN, y actividad catalítica o formación de complejos que implican al ARN que pueden acoplarse en o facilitarse por el ARN. El resultado de tal interferencia con la función del ácido nucleico diana es la modulación de la expresión de IGF-IR. “Modulación” y “modulación de la expresión” significa o bien un aumento (estimulación) o bien una disminución (inhibición) en la cantidad o niveles de una molécula de ácido nucleico que codifica para el gen, por ejemplo, ADN o ARN. En el contexto de la invención, la inhibición es la forma de modulación de la expresión y el ARNm a menudo es un ácido nucleico diana preferido.

En el contexto de esta invención, “hibridación” significa el emparejamiento de cadenas complementarias de compuestos oligoméricos. En la presente invención, el mecanismo preferido de emparejamiento implica puentes de hidrógeno, que pueden ser puentes de hidrógeno de Watson-Crick, Hoogsteen o Hoogsteen inversos, entre bases complementarias de nucleósidos o nucleótidos (nucleobases) de las cadenas de compuestos oligoméricos. Por ejemplo, adenina y timina son nucleobases complementarias que se emparejan a través de la formación de puentes de hidrógeno. La hibridación puede producirse en diversas circunstancias.

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

En la presente invención el término “condiciones de hibridación rigurosas” o “condiciones rigurosas” se refiere a condiciones en las que un oligonucleótido de la invención se hibridará con su secuencia diana, pero hasta un número mínimo de otras secuencias. Condiciones rigurosas son dependientes de secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias y en el contexto de esta invención, las “condiciones rigurosas” en las que se hibridan los oligonucleótidos con una secuencia diana se determinan por la naturaleza y la composición de los oligonucleótidos y los ensayos en los que se están investigando.

“Complementario,” tal como se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad de emparejamiento preciso entre dos nucleobases de un compuesto oligomérico. Por ejemplo, si una nucleobase en una posición determinada de un oligonucleótido (un compuesto oligomérico), puede formar puentes de hidrógeno con una nucleobase en una posición determinada de un ácido nucleico diana, siendo dicho ácido nucleico diana una molécula de ADN, ARN u oligonucleótido, entonces se considera que la posición de la formación de puentes de hidrógeno entre el oligonucleótido y el ácido nucleico diana es una posición complementaria. El oligonucleótido y la molécula de ADN, ARN u oligonucleótido adicional son complementarias entre sí cuando un número suficiente de posiciones complementarias en cada molécula están ocupadas por nucleobases que pueden formar puentes de hidrógeno entre sí. Por tanto, “que puede hibridarse específicamente” y “complementario” son términos que se usan para indicar un grado suficiente de emparejamiento o complementariedad preciso a lo largo de un número suficiente de nucleobases de manera que se produzca la unión estable y específica entre el oligonucleótido y un ácido nucleico diana.

Se entiende en la técnica que no es necesario que la secuencia de un compuesto antisentido sea complementaria en un 100% a la de su ácido nucleico diana con la que puede hibridarse específicamente. Además, un oligonucleótido puede hibridarse a lo largo de uno o más segmentos de manera que segmentos intermedios o adyacentes no están implicados en el acontecimiento de hibridación (por ejemplo, una estructura de bucle o estructura de horquilla). Se prefiere que los compuestos antisentido dados a conocer en el presente documento comprendan al menos una complementariedad de secuencia del 70% con una región diana dentro del ácido nucleico diana, más preferiblemente que comprendan una complementariedad de secuencia del 90% e incluso más preferiblemente que comprendan una complementariedad de secuencia del 95% con la región diana dentro de la secuencia del ácido nucleico diana al que se dirigen. Por ejemplo, un compuesto antisentido en el que 18 de 20 nucleobases del compuesto antisentido son complementarias a una región diana, y se hibridarían por tanto específicamente, representaría una complementariedad del 90 por ciento. En este ejemplo, las nucleobases no complementarias restantes pueden agruparse o intercalarse con nucleobases complementarias y no es necesario que sean contiguas entre sí o a nucleobases complementarias. Como tal, un compuesto antisentido que tiene 18 nucleobases de longitud que tiene 4 (cuatro) nucleobases no complementarias que están flanqueadas por dos regiones de complementariedad completa con el ácido nucleico diana tendría una complementariedad global del 77,8% con el ácido nucleico diana.

La complementariedad en porcentaje de un compuesto antisentido con un región de un ácido nucleico diana puede determinarse de manera rutinaria usando programas BLAST (herramientas de búsqueda de alineación local básica) y programas PowerBLAST conocidos en la técnica (Altschul *et al.*, J. Mol. Biol. 215: 403-410, 1990; Zhang y Madden, Genome Res. 7: 649-656, 1997).

B. Compuestos de la invención

Según la presente descripción, los compuestos incluyen compuestos oligoméricos antisentido, oligonucleótidos antisentido, ribozimas, oligonucleótidos de secuencia guía externa (EGS), secuencias de corte y empalme alternas,

cebadores, sondas y otros compuestos oligoméricos que se hibridan con al menos una parte del ácido nucleico diana. Como tales, estos compuestos pueden introducirse en forma de compuestos oligoméricos monocatenarios, bicatenarios, circulares o en horquilla y pueden contener elementos estructurales tales como protuberancias o bucles internos o terminales. Una vez introducidos en un sistema, tales compuestos pueden provocar la acción de que una o más enzimas o proteínas estructurales efectúen la modificación del ácido nucleico diana.

Un ejemplo no limitativo de una enzima de este tipo es la ARNasa H, una endonucleasa celular que escinde la cadena de ARN de un dúplex ARN:ADN. Se conoce en la técnica que los compuestos antisentido monocatenarios que son "similares a ADN" provocan la activación de la ARNasa H. La activación de la ARNasa H, por tanto, da como resultado la escisión del ARN diana, potenciando de ese modo enormemente la eficacia de la inhibición mediada por oligonucleótidos de la expresión génica. Se han propuesto papeles similares para otras ribonucleasas tales como las de la familia de enzimas de ARNasa III y ribonucleasa L.

La presente invención proporciona un oligonucleótido antisentido que comprende de 8 a 80 nucleobases de longitud que es complementario en al menos un 90% a la SEQ ID NO: 160 y que se dirige a una molécula de ácido nucleico que codifica para el receptor del factor de crecimiento similar a insulina humano (SEQ ID NO: 97), hibridándose específicamente dicho oligonucleótido con dicha molécula de ácido nucleico e inhibiendo la expresión de IGF-IR.

Aunque la forma preferida de oligonucleótido antisentido es un oligonucleótido antisentido monocatenario, en muchas especies se ha demostrado que la introducción de estructuras bicatenarias, tales como moléculas de ARN bicatenario (ARNbc), induce la reducción mediada por antisentido potente y específica de la función de un gen o sus productos génicos asociados. Este fenómeno se produce tanto en plantas como en animales y se cree que tiene una relación evolutiva con la defensa frente a virus y el silenciamiento de transposones.

La primera evidencia de que el ARNbc podría conducir a silenciamiento génico en animales se produjo en 1995 a partir de un trabajo en el nematodo, *Caenorhabditis elegans* (Guo y Kempheus, Cell 81: 611-620, 1995). Montgomery *et al.* han demostrado que los principales efectos de interferencia del ARNbc son post-transcripcionales (Montgomery *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95: 15502-15507, 1998). El mecanismo antisentido post-transcripcional definido en *Caenorhabditis elegans* que resulta de la exposición a ARN bicatenario (ARNbc) se ha denominado interferencia de ARN (iARN). Este término se ha generalizado para significar silenciamiento génico mediado por antisentido que implica la introducción de ARNbc que conduce a la reducción específica de secuencia de niveles de ARNm seleccionados como diana endógenos (Fire *et al.*, Nature 391: 806-811, 1998). Recientemente, se ha demostrado que, en efecto, los oligómeros de ARN monocatenarios de polaridad antisentido de los ARNbc son los potentes inductores de iARN (Tijsterman *et al.*, Science, 295: 694-697, 2002).

En el contexto de esta descripción, el término "compuesto oligomérico" se refiere a un polímero u oligómero que comprende una pluralidad de unidades monoméricas. En el contexto de esta invención, el término "oligonucleótido" se refiere a un oligómero o polímero de ácido ribonucleico (ARN) o ácido desoxirribonucleico (ADN) o miméticos, quimeras, análogos y homólogos de los mismos. Este término incluye oligonucleótidos compuestos de nucleobases, azúcares y enlaces internucleosídicos covalentes (esqueleto principal) que se producen de manera natural, así como oligonucleótidos que tienen partes que no se producen de manera natural que funcionan de manera similar. Tales oligonucleótidos modificados o sustituidos se prefieren a menudo con respecto a las formas nativas debido a propiedades deseables tales como, por ejemplo, captación celular potenciada, afinidad potenciada por un ácido nucleico diana y estabilidad aumentada en presencia de nucleasas.

Los oligonucleótidos tal como se definieron anteriormente son los compuestos proporcionados por esta invención.

Los oligonucleótidos según esta invención comprenden de 8 a 80 nucleobases (es decir desde 8 hasta 80 nucleósidos unidos). Un experto habitual en la técnica apreciará que la invención incorpora oligonucleótidos de 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 nucleobases de longitud.

En una realización preferida, los oligonucleótidos de la invención tienen de 12 a 50 nucleobases de longitud. Un experto habitual en la técnica apreciará que esto incorpora oligonucleótidos de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 nucleobases de longitud.

En otra realización preferida, los oligonucleótidos de la invención tienen de 15 a 40 nucleobases de longitud. Un experto habitual en la técnica apreciará que esto incorpora oligonucleótidos de 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleobases de longitud.

Particularmente preferidos son oligonucleótidos de desde 12 hasta 50 nucleobases, incluso más preferiblemente los que comprenden desde 15 hasta 30 nucleobases.

Los oligonucleótidos antisentido de 8-80 nucleobases de longitud que comprenden un tramo de al menos ocho (8)

nucleobases consecutivas seleccionadas de entre los compuestos antisentido ilustrativos se consideran oligonucleótidos antisentido adecuados según la presente descripción.

5 Los oligonucleótidos antisentido preferidos a modo de ejemplo de la presente descripción incluyen secuencias de oligonucleótido que comprenden al menos las 8 nucleobases consecutivas del extremo 5'-terminal de uno de los oligonucleótidos antisentido preferidos ilustrativos (siendo las nucleobases restantes un tramo consecutivo del mismo oligonucleótido que comienza inmediatamente antes del extremo 5'-terminal del oligonucleótido antisentido que puede hibridarse específicamente al ácido nucleico diana y que continúa hasta el oligonucleótido que contiene de aproximadamente 8 a aproximadamente 80 nucleobases). Oligonucleótidos antisentido preferidos de manera similar se representan mediante secuencias de oligonucleótido que comprenden al menos las 8 nucleobases consecutivas del extremo 3'-terminal de uno de los oligonucleótidos antisentido preferidos ilustrativos (siendo las nucleobases restantes un tramo consecutivo del mismo oligonucleótido que comienza inmediatamente después del extremo 3'-terminal del oligonucleótido antisentido que puede hibridarse específicamente al ácido nucleico diana y que continúa hasta el oligonucleótido que contiene de aproximadamente 8 a aproximadamente 80 nucleobases). Un experto en la técnica provisto del oligonucleótido antisentido preferido ilustrado en el presente documento podrá identificar, sin experimentación excesiva, oligonucleótidos antisentido preferidos adicionales.

20 El compuesto candidato dado a conocer en el presente documento se denomina mediante el número ISIS o SEQ ID NO. (Tabla 1).

Los compuestos candidatos también se denominan en el presente documento compuestos "de partida".

25 Los ASO incluyen los ISIS 175308 (SEQ ID NO: 116), ISIS 175302 (SEQ ID NO: 110), ISIS 175314 (SEQ ID NO: 122), ISIS 175307 (SEQ ID NO: 115) e ISIS 175323 (SEQ ID NO: 131).

Otro grupo de ASO incluyen los ISIS 323744 (SEQ ID NO: 50), ISIS 323747 (SEQ ID NO: 53), ISIS 323767 (SEQ ID NO: 73), ISIS 323762 (SEQ ID NO: 68) e ISIS 323737 (SEQ ID NO: 43).

30 El ASO preferido es de ISIS 175317 (SEQ ID NO: 125).

C. Dianas de la invención

35 "Dirigir" un compuesto antisentido a una molécula de ácido nucleico particular, en el contexto de esta descripción, puede ser un procedimiento de múltiples etapas. El procedimiento habitualmente comienza con la identificación de un ácido nucleico diana cuya función ha de modularse. Este ácido nucleico diana puede ser, por ejemplo, un gen celular (o ARNm transcrito a partir del gen) cuya expresión está asociada con un trastorno o estado patológico particular, o una molécula de ácido nucleico a partir de un agente infeccioso. En la presente invención, el ácido nucleico diana codifica para IGF-IR.

40 El procedimiento de direccionamiento habitualmente también incluye la determinación de al menos una región, segmento o sitio diana dentro del ácido nucleico diana para que se produzca la interacción antisentido de manera que resulte el efecto deseado, por ejemplo, modulación de la expresión. Dentro del contexto de la presente invención, el término "región" se define como una parte del ácido nucleico diana que tiene al menos una estructura, función o característica identificable. Dentro de las regiones de ácido nucleico diana hay segmentos. Los "segmentos" se definen como partes más pequeñas o subpartes de regiones dentro de un ácido nucleico diana. Los "sitios," tal como se usa en la presente invención, se definen como posiciones dentro de un ácido nucleico diana.

50 Puesto que, tal como se conoce en la técnica, el codón de iniciación de la traducción normalmente es 5'-AUG (en moléculas de ARNm transcritas; 5'-ATG en la molécula de ADN correspondiente), el codón de inicio de la traducción también se denomina "codón AUG", el "codón de inicio" o el "codón de inicio AUG". Una minoría de genes tienen un codón de inicio de la traducción que tiene una secuencia de ARN 5'-GUG, 5'-UUG o 5'-CUG, y se ha demostrado que 5'-AUA, 5'-ACG y 5'-CUG funcionan *in vivo*. Por tanto, los términos "codón de inicio de la traducción" y "codón de inicio" pueden englobar muchas secuencias de codón, aun cuando el aminoácido iniciador en cada caso normalmente sea metionina (en eucariotas) o formilmetionina (en procariotas). También se conoce en la técnica que los genes eucariotas y procariotas pueden tener dos o más codones de inicio alternativos, pudiendo utilizarse uno cualquiera de ellos preferiblemente para el inicio de la traducción en un tipo de célula particular o tejido, o en un conjunto particular de condiciones. En el contexto de la invención, "codón de inicio" y "codón de inicio de la traducción" se refieren al codón o codones que se usan *in vivo* para iniciar la traducción de un ARNm transcrito a partir de un gen que codifica para IGF-IR, independientemente 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 terminación") de un gen puede tener una de tres secuencias, es decir, 5'-UAA, 5'-UAG y 5'-UGA (siendo las secuencias de ADN correspondientes 5'-TAA, 5'-TAG y 5'-TGA, respectivamente).

65 Los términos "región de codón de inicio" y "región de codón de iniciación de la traducción" se refieren a una parte de un ARNm o gen de este tipo que engloba desde aproximadamente 25 hasta aproximadamente 50 nucleótidos contiguos en cualquier dirección (es decir, 5' o 3') desde un codón de inicio de la traducción. De manera similar, los

términos “región de codón de terminación” y “región de codón de terminación de la traducción” se refieren a una parte de un ARNm o gen de este tipo que engloba desde aproximadamente 25 hasta aproximadamente 50 nucleótidos contiguos en cualquier dirección (es decir, 5' o 3') desde un codón de terminación de la traducción. Por consiguiente, la “región de codón de inicio” (o “región de codón de iniciación de la traducción”) y la “región de codón de terminación” (o “región de codón de terminación de la traducción”) son todas las regiones que pueden seleccionarse como diana de manera eficaz con los oligonucleótidos antisentido de la presente invención.

El marco de lectura abierto (ORF) o “región codificante,” que se conoce en la técnica que se refiere a la región entre el codón de inicio de la traducción y el codón de terminación de la traducción, es también una región que puede seleccionarse como diana de manera eficaz. Dentro del contexto de la presente invención, una región preferida es la región intragénica que engloba el codón de iniciación o terminación de la traducción del marco de lectura abierto (ORF) de un gen.

Otras regiones diana incluyen la región no traducida en 5' (5'UTR), que se conoce en la técnica que se refiere a la parte de un ARNm en la dirección de 5' desde el codón de inicio de la traducción, y por tanto que incluye los nucleótidos entre el sitio de caperuza en 5' y el codón de inicio de la traducción de un ARNm (o nucleótidos correspondientes en el gen), y la región no traducida en 3' (3'UTR), que se conoce en la técnica que se refiere a la parte de un ARNm en la dirección de 3' desde el codón de terminación de la traducción, y por tanto que incluye los nucleótidos entre el codón de terminación de la traducción y el extremo 3' de un ARNm (o nucleótidos correspondientes en el gen). El sitio de caperuza en 5' de un ARNm comprende un residuo de guanosina metilado en N7 unido al residuo más en 5' del ARNm a través de un enlace trifosfato 5'-5'. Se considera que la región de caperuza en 5' de un ARNm incluye la propia estructura de caperuza en 5' así como los primeros 50 nucleótidos adyacentes al sitio de caperuza. También se prefiere seleccionar como diana la región de caperuza en 5'.

Aunque algunos transcritos de ARNm eucariotas se traducen directamente, muchos contienen una o más regiones, conocidas como “intrones”, que se escinden del transcrito antes de traducirse. Las regiones restantes (y por tanto traducidas) se conocen como “exones” y se someten a corte y empalme juntos para formar una secuencia de ARNm continua. Seleccionar como diana sitios de corte y empalme, es decir, uniones intrón-exón o uniones exón-intrón, también puede ser particularmente útil en situaciones en las que un corte y empalme aberrante está implicado en una enfermedad, o cuando la sobreproducción de un producto de corte y empalme particular está implicada en una enfermedad. Las uniones de fusión aberrante debidas a reorganizaciones o deleciones, también son sitios diana preferidos. Los transcritos de ARNm producidos a través del proceso de corte y empalme de dos (o más) ARNm de diferentes fuentes de genes se conocen como “transcritos de fusión”. También se sabe que los intrones pueden seleccionarse como diana de manera eficaz usando compuestos antisentido dirigidos a, por ejemplo, ADN o pre-ARNm.

También se conoce en la técnica que pueden producirse transcritos de ARN alternativos a partir de las mismas regiones genómicas de ADN. Estos transcritos alternativos se conocen generalmente como “variantes”. Más específicamente, las “variantes de pre-ARNm” son transcritos producidos a partir del mismo ADN genómico que difieren de otros transcritos producidos a partir del mismo ADN genómico o bien en su posición de inicio o bien en la de terminación y contienen tanto secuencias intrónicas como exónicas.

Con la escisión de una o más regiones de exones o intrones, o partes de las mismas durante el corte y empalme, las variantes de pre-ARNm producen “variantes de ARNm” más pequeñas. Por consiguiente, las variantes de ARNm son variantes de pre-ARNm procesadas y cada variante de pre-ARNm única siempre debe producir una variante de ARNm única como resultado del corte y empalme. Estas variantes de ARNm también se conocen como “variantes de corte y empalme alternativas”. Si no se produce el corte y empalme de la variante de pre-ARNm, entonces la variante de pre-ARNm es idéntica a la variante de ARNm.

También se conoce en la técnica que pueden producirse variantes a través del uso de señales alternativas para iniciar o terminar la transcripción y que los pre-ARNm y ARNm pueden poseer más de un codón de inicio o codón de terminación. Las variantes que se originan a partir de un pre-ARNm o ARNm que usan codones de inicio alternativos se conocen como “variantes de inicio alternativas” de ese pre-ARNm o ARNm. Estos transcritos que usan un codón de terminación alternativo se conocen como “variantes de terminación alternativas” de ese pre-ARNm o ARNm. Un tipo específico de variante de terminación alternativa es la “variante de poliA” en la que los múltiples transcritos producidos resultan de la selección alternativa de una de las “señales de terminación de poliA” mediante la maquinaria de transcripción, produciendo de ese modo transcritos que terminan en sitios de poliA únicos. Dentro del contexto de la invención, los tipos de variantes descritos en el presente documento también son ácidos nucleicos diana preferidos.

Las ubicaciones en el ácido nucleico diana con las que se hibridan los compuestos antisentido dados a conocer se denominan más adelante en el presente documento “segmentos diana preferidos.” Tal como se usa en el presente documento, el término “segmento diana preferido” se define como al menos una parte de 8 nucleobases de una región diana a la que se dirige un compuesto antisentido activo. Aunque sin querer restringirse a la teoría, se cree actualmente que estos segmentos diana representan partes del ácido nucleico diana que son accesibles para hibridación.

Aunque en el presente documento se exponen las secuencias específicas de ciertos segmentos diana preferidos, un experto en la técnica reconocerá que éstas sirven para ilustrar y describir realizaciones particulares dentro del alcance de la presente invención. Un experto habitual puede identificar segmentos diana preferidos adicionales.

5 Los segmentos diana de 8-80 nucleobases de longitud que comprenden a tramo de al menos ocho (8) nucleobases consecutivas seleccionadas de entre los segmentos diana preferidos ilustrativos también se consideran adecuados para seleccionarse como diana.

10 Los segmentos diana pueden incluir secuencias de ADN o ARN que comprenden al menos las 8 nucleobases consecutivas del extremo 5'-terminal de uno de los segmentos diana preferidos ilustrativos (siendo las nucleobases restantes un tramo consecutivo del mismo ADN o ARN que comienza inmediatamente antes del extremo 5'-terminal del segmento diana y que continúa hasta el ADN o ARN que contiene de aproximadamente 8 a aproximadamente 80 nucleobases). De manera similar, los segmentos diana preferidos se representan por secuencias de ADN o ARN que comprenden al menos las 8 nucleobases consecutivas del extremo 3'-terminal de uno de los segmentos diana preferidos ilustrativos (siendo las nucleobases restantes un tramo consecutivo del mismo ADN o ARN que comienza inmediatamente después del extremo 3'-terminal del segmento diana y que continúa hasta el ADN o ARN que contiene de aproximadamente 8 a aproximadamente 80 nucleobases). Un experto en la técnica provisto de los segmentos diana preferidos ilustrados en el presente documento podrá identificar, sin experimentación excesiva, segmentos diana preferidos adicionales.

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

25 D. Examen y validación de dianas

En una realización adicional de la presente descripción, los "segmentos diana preferidos" identificados en el presente documento pueden emplearse en un examen de compuestos adicionales que modulan la expresión del gen del IGF-IR. Los "moduladores" son aquellos compuestos que disminuyen o aumentan la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica para IGF-IR y que comprenden al menos una parte de 8-nucleobases que es complementaria a un segmento diana preferido. El método de examen comprende las etapas de poner en contacto un segmento diana preferido de una molécula de ácido nucleico que codifica para IGF-IR con uno o más moduladores candidatos, y selecciona uno o más moduladores candidatos que disminuyen o aumentan la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica para IGF-IR. Una vez que se muestra que el modulador o moduladores candidato(s) pueden modular (por ejemplo o bien disminuir o bien aumentar) la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica para IGF-IR, el modulador puede emplearse entonces en estudios de investigación adicionales de la función de IGF-IR, o para su uso como agente de investigación, diagnóstico o terapéutico según la presente descripción.

40 Los segmentos diana preferidos dados a conocer en el presente documento también pueden combinarse con sus compuestos antisentido complementarios respectivos para formar oligonucleótidos bicatenarios estabilizados (dúplex).

45 Se ha demostrado en la técnica que tales restos de oligonucleótido bicatenarios modulan la expresión de la diana y también regulan la traducción así como el procesamiento de ARN a través de un mecanismo antisentido. Además, los restos bicatenarios pueden someterse a modificaciones químicas (Fire *et al.*, Nature 391: 806-811, 1998; Timmons y Fire, Nature 395: 854, 1998; Timmons *et al.*, Gen 263: 103-112, 2001; Tabara *et al.*, Science 282: 430-431, 1998; Montgomery *et al.*, 1998, citado anteriormente; Tuschl *et al.*, Genes Dev. 13: 3191-3197, 1999; Elbashir *et al.*, Nature, 411: 494-498, 2001; Elbashir *et al.*, Genes Dev. 15: 188-200, 2001). Por ejemplo, se ha demostrado que tales restos bicatenarios inhiben la diana mediante la hibridación clásica de la cadena antisentido del dúplex con la diana, desencadenando de ese modo la degradación enzimática de la diana (Tijsterman *et al.*, 2002, citado anteriormente).

55 Los compuestos dados a conocer en el presente documento también pueden aplicarse en las áreas de descubrimiento de fármacos y validación de dianas. La presente descripción da a conocer el uso de los compuestos y segmentos diana preferidos identificados en el presente documento en esfuerzos de descubrimiento de fármacos para elucidar relaciones que existen entre IGF-I, IGF-IR o la interacción IGF-I/IGF-IR y un estado patológico, fenotipo o afección. Estos métodos incluyen detectar o modular IGF-IR que comprende poner en contacto una muestra, tejido, célula u organismo con los compuestos dados a conocer en el presente documento, medir el nivel de ácido o proteína de IGF-IR y/o un criterio de valoración fenotípico o químico en algún momento tras el tratamiento, y opcionalmente comparar el valor medido con una muestra no tratada o muestra tratada con un compuesto adicional como el dado a conocer en el presente documento. Estos métodos también pueden realizarse en paralelo o en combinación con otros experimentos para determinar la función de genes desconocidos durante el procedimiento de validación de dianas o para determinar la validez de un producto génico particular como diana para el tratamiento o la prevención de una enfermedad, estado o fenotipo particulares.

E. Kits, reactivos de investigación, diagnóstico y terapéutica

5 Los compuestos de la presente descripción en el presente documento utilizados para diagnóstico, terapéutica, profilaxis y como reactivos de investigación y kits. Además, los expertos en la técnica a menudo usan oligonucleótidos antisentido, que pueden inhibir la expresión génica con especificidad exquisita, para elucidar la función de genes particulares o para distinguir entre funciones de diversos miembros de una ruta biológica.

10 Para el uso en kits y diagnóstico, los compuestos dados a conocer en el presente documento, o bien solos o bien en combinación con otros compuestos o terapéutica, pueden usarse como herramientas en análisis diferenciales y/o combinatorios para elucidar patrones de expresión de una parte o del complemento entero de genes expresados dentro de células y tejidos.

15 Como ejemplo no limitativo, se comparan patrones de expresión dentro de células o tejidos tratados con uno o más compuestos antisentido para controlar células o tejidos no tratados con compuestos antisentido y se analizan los patrones producidos para determinar niveles diferenciales de expresión génica ya que guardan relación, por ejemplo, con asociación de enfermedades, rutas de señalización, ubicación celular, nivel de expresión, tamaño, estructura o función de los genes examinados. Estos análisis pueden realizarse en células estimuladas o no estimuladas y en presencia o ausencia de otros compuestos que afectan a los patrones de expresión.

20 Los ejemplos de métodos de análisis de expresión génica conocidos en la técnica incluyen matrices o micromatrices de ADN (Brazma y Vilo, FEBS Lett. 480: 17-24, 2000; Celis *et al.*, FEBS Lett. 480: 2-16, 2000), SAGE (análisis en serie de expresión génica) (Madden *et al.*, Drug Discov. Today 5: 415-425, 2000), READS (amplificación con enzimas de restricción de ADNc digeridos) (Prashar y Weissman, Methods Enzymol. 303: 258-272, 1999), TOGA (análisis de expresión génica total) (Sutcliffe *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 1976-1981, 2000), matrices de proteínas y proteómica (Celis *et al.* 2000, citado anteriormente; Jungblut *et al.*, Electrophoresis 20: 2100-2110, 1999), secuenciación de marcador de secuencia expresada (EST) (Celis *et al.*, 2000, citado anteriormente; Larsson *et al.*, J. Biotechnol. 80: 143-157, 2000), huella genética de ARN sustractiva (SuRF) (Fuchs *et al.*, Anal. Biochem. 286: 91-98, 2000; Larson *et al.*, Cytometry 41: 203-208, 2000), clonación sustractiva, presentación diferencial (DD) (Jurecic y Belmont, Curr. Opin. Microbiol. 3: 316-321, 2000), hibridación genómica comparativa (Carulli *et al.*, J. Cell Biochem. Suppl. 31: 286-296, 1998), técnicas de FISH (hibridación fluorescente *in situ*) (Going y Gusterson, Eur. J. Cancer, 35: 1895-1904, 1999) y métodos de espectrometría de masas (To, Comb. Chem. High Throughput Screen, 3: 235-241, 2000).

35 Los compuestos dados a conocer en el presente documento son útiles para investigación y diagnóstico, porque estos compuestos se hibridan con ácidos nucleicos que codifican para IGF-IR. Por ejemplo, los oligonucleótidos que se muestra que se hibridan con una eficacia tal y en condiciones tales como las dadas a conocer en el presente documento como para ser inhibidores de IGF-IR o inhibidores de la expresión génica de IGF-IR eficaces, también serán cebadores o sondas eficaces en condiciones que favorecen la amplificación o detección génica, respectivamente. Estos cebadores y sondas son útiles en métodos que requieren la detección específica de moléculas de ácido nucleico que codifica para IGF-IR y en la amplificación de dichas moléculas de ácido nucleico para detección o para su uso en estudios adicionales de IGF-IR o su gen. La hibridación de los oligonucleótidos antisentido, particularmente los cebadores y las sondas, de la invención con un ácido nucleico que codifica para IGFIR puede detectarse mediante medios conocidos en la técnica. Tales medios pueden incluir la conjugación de una enzima con el oligonucleótido, el radiomarcaje del oligonucleótido o cualquier otro medio de detección adecuado. También pueden prepararse kits que usan tal medio de detección para detectar el nivel de IGF-IR en una muestra.

50 Los expertos en la técnica también aprovechan la especificidad y la sensibilidad de los compuestos antisentido para usos terapéuticos. Los compuestos antisentido se han empleado como restos terapéuticos en el tratamiento de estados patológicos en animales, incluyendo seres humanos. Se han administrado fármacos de oligonucleótidos antisentido, incluyendo ribozimas, de manera segura y eficaz a seres humanos y en la actualidad están en marcha numerosos ensayos clínicos. Por tanto, se establece que los compuestos antisentido pueden ser útiles en modalidades terapéuticas que pueden configurarse para ser útiles en regímenes de tratamiento para el tratamiento de células, tejidos y animales, especialmente seres humanos.

60 Para la terapéutica, puede tratarse un animal, preferiblemente un ser humano, que se sospecha que tiene una enfermedad o trastorno que puede tratarse modulando la expresión del gen del IGF-IR mediante la administración de compuestos antisentido según esta descripción. Por ejemplo, en un ejemplo no limitativo, los métodos comprenden la etapa de administrar al animal que necesita tratamiento, una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la expresión génica de IGF-IR. Los inhibidores de la expresión génica de IGF-IR dados a conocer en el presente documento inhiben de manera eficaz la actividad de la proteína IGF-IR o inhiben la expresión del gen del IGF-IR. La actividad o expresión de IGF-IR o su gen en un animal puede inhibirse en aproximadamente el 10%. Preferiblemente, la actividad o expresión de IGF-IR o su gen en un animal se inhibe en aproximadamente el 30%.
65 Más preferiblemente, la actividad o expresión de IGF-IR o su gen en un animal se inhibe en el 50% o más.

Por ejemplo, la reducción de la expresión del gen del IGF-IR puede medirse en suero, tejido adiposo, células cutáneas, hígado o cualquier otro fluido corporal, tejido u órgano del animal. Preferiblemente, las células contenidas dentro de dichos fluidos, tejidos u órganos que se están analizando contienen una molécula de ácido nucleico que codifica para una proteína IGF-IR.

5 Los oligonucleótidos de la invención pueden utilizarse en composiciones farmacéuticas añadiendo una cantidad eficaz de un compuesto a un diluyente o portador adecuado farmacéuticamente aceptable. El uso de los oligonucleótidos y métodos de la invención también puede ser útil profilácticamente.

10 F. Modificaciones

Tal como se conoce en la técnica, un nucleósido es una combinación de base-azúcar. La parte de base del nucleósido normalmente es una base heterocíclica. Las dos clases más comunes de tales bases heterocíclicas son las purinas y las pirimidinas. Los nucleótidos son nucleósidos que incluyen adicionalmente un grupo fosfato unido covalentemente a la parte de azúcar del nucleósido. Para aquellos nucleósidos que incluyen un azúcar de pentofuranosilo, el grupo fosfato puede unirse o bien al resto hidroxilo en 2', 3' o 5' del azúcar. En la formación de los oligonucleótidos, los grupos fosfato unen covalentemente nucleósidos adyacentes entre sí para formar un compuesto polimérico lineal. A su vez, los extremos respectivos de este compuesto polimérico lineal pueden unirse adicionalmente para formar un compuesto circular, sin embargo, generalmente se prefieren los compuestos lineales. Además, los compuestos lineales pueden tener complementariedad de nucleobases interna y por tanto pueden plegarse de manera que produzcan un compuesto completa o parcialmente bicatenario. Dentro de los oligonucleótidos, los grupos fosfato se denominan comúnmente como elementos de formación del esqueleto principal internucleosídico del oligonucleótido. El enlace normal o esqueleto principal del ARN y ADN es un enlace fosfodiéster de 3' a 5'.

25 *Enlaces internucleosídicos modificados (esqueletos principales)*

Ejemplos específicos de oligonucleótidos antisentido preferidos útiles en esta invención incluyen oligonucleótidos que contienen esqueletos principales modificados o enlaces internucleosídicos no naturales. Tal como se define en esta memoria descriptiva, los oligonucleótidos que tienen esqueletos principales modificados incluyen aquellos que conservan un átomo de fósforo en el esqueleto principal y los que no tienen un átomo de fósforo en el esqueleto principal. Para los fines de esta memoria descriptiva, y tal como se denomina en ocasiones en la técnica, los oligonucleótidos modificados que no tienen un átomo de fósforo en su esqueleto principal nucleosídico también pueden considerarse oligonucleósidos.

35 Esqueletos principales de oligonucleótidos modificados preferidos que contienen un átomo de fósforo en ellos incluyen, por ejemplo, de fosforotioatos, fosforotioatos quirales, fosforoditioatos, fosfortriésteres, aminoalquilfosfortriésteres, metil y otros alquil fosfonatos incluyendo 3'-alquilenfosfonatos, 5'-alquilenfosfonato y fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidatos incluyendo 3'-amino fosforamidato y aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionalquilfosfonatos, tionalquilfosfortriésteres, selenofosfatos y boranofosfatos que tienen enlaces 3'-5' normales, análogos unidos en 2'-5' de éstos y los que tienen polaridad invertida en la que uno o más enlaces internucleotídicos es un enlace de 3' a 3', de 5' a 5' o de 2' a 2'. Oligonucleótidos preferidos que tienen polaridad invertida comprenden un único enlace de 3' a 3' en el enlace internucleotídico más en 3', es decir un único residuo nucleosídico invertido que puede ser abásico (la nucleobase desaparece o tiene un grupo hidroxilo en lugar de la misma). También se incluyen diversas sales, sales mixtas y formas de ácido libre.

Las patentes de EE.UU. representativas que enseñan la preparación de los enlaces que contienen fósforo anteriores incluyen, pero no se limitan a, los documentos US: 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 las cuales son de titularidad común con esta solicitud.

55 Esqueletos principales de oligonucleótidos modificados preferidos que no incluyen un átomo de fósforo en los mismos tienen esqueletos principales que se forman mediante enlaces internucleosídicos de alquilo o cicloalquilo de cadena corta, enlaces internucleosídicos de alquilo o cicloalquilo de heteroátomos mixtos, o uno o más enlaces internucleosídicos heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta. Estos incluyen los que tienen enlaces morfolino (formados en parte a partir de la parte de azúcar de un nucleósido); esqueletos principales de siloxano; esqueletos principales de sulfuro, sulfóxido y sulfona; esqueletos principales de formacetilo y tioformacetilo; esqueletos principales de metilformacetilo y tioformacetilo; esqueletos principales de riboacetilo; esqueletos principales que contienen alqueno; esqueletos principales de sulfamato; esqueletos principales de metilnimino y metilhidrazino; esqueletos principales de sulfonato y sulfonamida; esqueletos principales de amida; y otros que tienen partes componentes de N, O, S y CH₂ mixtas.

65 Las patentes de EE.UU. representativas que enseñan la preparación de los oligonucleósidos anteriores incluyen, pero no se limitan a, los documentos US: 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 las cuales son de titularidad común con esta solicitud.

5 *Miméticos de enlaces internucleosídicos y azúcar modificado*

En otros miméticos de oligonucleótido preferidos, tanto el azúcar como el enlace internucleosídico (es decir el esqueleto principal), de las unidades de nucleótido se sustituyen por grupos novedosos. Las unidades de nucleobases se mantienen para hibridación con un ácido nucleico diana apropiado. Un compuesto de este tipo, un mimético de oligonucleótido que se ha demostrado que tiene propiedades de hibridación excelentes, se denomina ácido nucleico peptídico (PNA). En compuestos de PNA, el esqueleto principal de azúcar de un oligonucleótido se sustituye por un esqueleto principal que contiene amida, en particular un esqueleto principal de aminoetilglicina. Las nucleobases están conservadas y se unen directa o indirectamente a átomos de nitrógeno aza de la parte de amida del esqueleto principal. Las patentes de EE.UU. representativas que enseñan la preparación de compuestos de PNA incluyen, pero no se limitan a, los documentos US: 5.539.082; 5.714.331 y 5.719.262. Enseñanzas adicionales de compuestos de PNA pueden encontrarse en Nielsen *et al.*, Science 254: 1497-1500, 1991.

Las realizaciones preferidas de la invención son oligonucleótidos con esqueletos principales de fosforotioato y oligonucleósidos con esqueletos principales de heteroátomos, y en particular $-\text{CH}_2\text{-NH-O-CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{-N}(\text{CH}_3)\text{-O-CH}_2-$ [conocidos como metileno (metilimino) o esqueleto principal de MMI], $-\text{CH}_2\text{-O-N}(\text{CH}_3)\text{-CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{-N}(\text{CH}_3)\text{-N}(\text{CH}_3)\text{-CH}_2-$ y $-\text{O-N}(\text{CH}_3)\text{-CH}_2\text{-CH}_2-$ [en los que el esqueleto principal de fosfodiéster nativo se representa como $-\text{O-P-O-CH}_2-$] de la patente de EE.UU. 5.489.677 nombrada anteriormente y los esqueletos principales de amida de la patente EE.UU. 5.602.240 nombrada anteriormente. También se prefieren oligonucleótidos que tienen estructuras de esqueleto principal de morfolino de la patente EE.UU. 5.034.506 nombrada anteriormente.

25 *Azúcares modificados*

Los oligonucleótidos modificados también pueden contener uno o más restos de azúcar sustituidos. Los oligonucleótidos preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': OH; F; O-, S-, o N-alquilo; O-, S-, o N-alqueno; O-, S- o N-alquino; u O-alquil-O-alquilo, en los que el alquilo, alqueno y alquino pueden ser alquilo C_1 a C_{10} o alqueno y alquino C_2 a C_{10} sustituidos o no sustituidos. Particularmente preferidos son $\text{O}[(\text{CH}_2)_n\text{O}]_m\text{CH}_3$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{OCH}_3$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{ONH}_2$ y $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{ON}[(\text{CH}_2)_m\text{CH}_3]_2$, en los que n y m son de desde 1 hasta aproximadamente 10. Otros oligonucleótidos preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': alquilo inferior C_1 a C_{10} , alquilo inferior sustituido, alqueno, alquino, 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, aminoalquilamino, polialquilamino, sililo sustituido, un grupo de escisión de ARN, un grupo indicador, un intercalador, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido, o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un oligonucleótido, y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. Una modificación preferida incluye 2'-metoxietoxilo (2'-O- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$) también conocido como 2'-O-(2-metoxietilo) o 2'-MOE) (Martin *et al.*, Helv. Chim. Acta, 78: 486-504, 1995) es decir, un grupo alcoxicoxilo. Una modificación preferida incluye 2'-dimetilaminoetoxilo, es decir, un grupo $\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{ON}(\text{CH}_3)_2$, también conocido como 2'-DMAOE, tal como se describe en ejemplos más adelante en el presente documento, y 2'-dimetilaminoetoxietoxilo (también conocido en la técnica como 2'-O-dimetil-amino-etoxi-etilo o 2'-DMAEOE), es decir, 2'-O- $\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-N}(\text{CH}_3)_2$, también descrito en ejemplos más adelante en el presente documento.

Otras modificaciones preferidas incluyen 2'-metoxilo (2'-O- CH_3), 2'-aminopropoxilo (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). La modificación en 2' puede ser en la posición arabino (arriba) o en la posición ribo (abajo). Una modificación 2'-arabino preferida es 2'-F. También pueden obtenerse modificaciones similares en otras posiciones en el oligonucleótido, particularmente en la posición 3' del azúcar en el nucleótido 3' terminal o en los oligonucleótidos unidos en 2'-5' y en la posición 5' del nucleótido 5' terminal. Los oligonucleótidos también pueden tener miméticos de azúcar tales como restos de ciclobutilo en lugar del azúcar de pentofuranosilo. Las patentes EE.UU. representativas que enseñan la preparación de tales estructuras de azúcar modificadas incluyen, pero no se limitan a los documentos US: 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 titularidad común con esta solicitud.

Una modificación preferida adicional del azúcar incluye ácidos nucleicos bloqueados (LNA) en los que el grupo 2'-hidroxilo está unido al átomo de carbono en 3' o 4' del anillo de azúcar, formando de ese modo un resto de azúcar bicíclico. El enlace es preferiblemente un grupo metileno ($-\text{CH}_2-$)_n que se une al átomo de oxígeno en 2' y el átomo de carbono en 4' en el que n es 1 ó 2. Los LNA y su preparación se describen en los documentos WO 98/39352 y WO 99/14226.

65 *Nucleobases naturales y modificadas*

Los oligonucleótidos también pueden incluir modificaciones y sustituciones en la nucleobase (a menudo denominada

en la técnica simplemente "base"). Tal como se usa en el presente documento, las nucleobases "no modificadas" o "naturales" incluyen las bases de purina adenina (A) y guanina (G), y las bases de pirimidina timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Las nucleobases modificadas incluyen otras nucleobases sintéticas y naturales tales como 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetilcitosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metil y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-propil y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracilo y citosina, 5-propinil (-C≡C-CH₃) uracilo y citosina y otros derivados de alquilo de bases de pirimidina, 6-azo-uracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 8-halo-, 8-amino-, 8-tiol-, 8-tioalquil-, 8-hidroxil- y otras adeninas y guaninas sustituidas en la posición 8, 5-halo- particularmente 5-bromo-, 5-trifluorometil- y otros uracilos y citosinas sustituidos en la posición 5, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 2-F-adenina, 2-aminoadenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-desazaguanina y 7-desazaadenina y 3-desazaguanina y 3-desazaadenina. Las nucleobases modificadas adicionales incluyen pirimidinas tricíclicas tales como fenoxazincitidina (1H-pirrido[5,4-b][1,4]benzoxazin-2(3H)-ona), fenotiazincitidina (1H-pirrido[5,4-b][1,4]benzotiazin-2(3H)-ona), *G-clamps* (análogos de citosina) tales como una fenoxazincitidina sustituida (por ejemplo 9-(2-aminoetoxi)-H-pirrido[5,4-b][1,4]benzoxazin-2(3H)-ona), carbazol-citidina (2H-pirrido[4,5-b]indol-2-ona), piridoindol-citidina (H-pirido[3',2':4,5]pirrolo[2,3-d]pirimidin-2-ona). Las nucleobases modificadas también pueden incluir aquellas en las que la base de purina o pirimidina está sustituida por otros heterociclos, por ejemplo 7-desaza-adenina, 7-desazaguanosina, 2-aminopiridina y 2-piridona. Las nucleobases adicionales incluyen las descritas en la patente EE.UU. n.º 3.687.808, las descritas en *The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering*, páginas 858-859, Kroschwitz, J.I., ed. John Wiley & Sons, 1990, las descritas por Englisch *et al.*, *Angewandte Chemie, International Edition*, 30: 613, 1991, y las descritas por Sanghvi, Y.S., capítulo 15, *Antisense Research and Applications*, páginas 289-302, Crooke, S.T. y Lebleu, B., ed., CRC Press, 1993. Algunas de estas nucleobases son particularmente útiles para aumentar la afinidad de unión de los compuestos de la invención. Estas incluyen pirimidinas sustituidas en la posición 5, 6-azapirimidinas y purinas sustituidas en N-2, N-6 y O-6, incluyendo 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. Se ha demostrado que las sustituciones de 5-metilcitosina aumentan la estabilidad del dúplex de ácido nucleico a 0,6-1,2°C y son sustituciones de bases preferidas actualmente, incluso más particularmente cuando se combinan con modificaciones de azúcar con 2'-O-metoxietilo.

Las patentes EE.UU. representativas que enseñan la preparación de algunas de las nucleobases modificadas nombradas anteriormente así como otras nucleobases modificadas incluyen, pero no se limitan a, los documentos nombrados anteriormente US 3.687.808, así como US: 4.845.205; 5.130.302; 5.134.066; 5.175.273; 5.367.066; 5.432.272; 5.457.187; 5.459.255; 5.484.908; 5.502.177; 5.525.711; 5.552.540; 5.587.469; 5.594.121; 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 titularidad común con esta solicitud, y la patente EE.UU. 5.750.692, de titularidad común con la presente solicitud.

35 *Conjugados*

Otra modificación de los oligonucleótidos de la invención implica la unión química a los oligonucleótido de uno o más restos o conjugados que potencian la actividad, la distribución celular o la captación celular del oligonucleótido. Estos restos o conjugados pueden incluir grupos conjugados unidos covalentemente a grupos funcionales tales como grupos hidroxilo primarios o secundarios. Los grupos conjugados de la invención incluyen intercaladores, moléculas indicadoras, poliaminas, poliamidas, polietilenglicoles, poliéteres, grupos que potencian las propiedades farmacodinámicas de los oligómeros y grupos que potencian las propiedades farmacocinéticas de los oligómeros. Los grupos conjugados típicos incluyen colesteroles, lípidos, fosfolípidos, biotina, fenazina, folato, fenantridina, antraquinona, acridina, fluoresceínas, rodaminas, cumarinas y colorantes. Los grupos que potencian las propiedades farmacodinámicas, en el contexto de esta invención, incluyen grupos que mejoran la captación, potencian la resistencia a la degradación y/o refuerzan la hibridación específica de secuencia con el ácido nucleico diana. Los grupos que potencian las propiedades farmacocinéticas, en el contexto de esta invención, incluyen grupos que mejoran la captación, la distribución, el metabolismo o la excreción de los compuestos de la presente invención. Los grupos conjugados representativos se dan a conocer en la solicitud de patente internacional PCT/US92/09196, presentada el 23 de octubre de 1992 y la patente estadounidense 6.287.860. Los restos conjugados incluyen pero no se limitan a restos de lípidos tales como un resto de colesterol, ácido cólico, un tioéter, por ejemplo, hexil-S-tritilol, un tiocolesterol, una cadena alifática, por ejemplo, residuos de dodecandiol o undecilo, un fosfolípido, por ejemplo, di-hexadecil-rac-glicerol o trietilamonio 1-,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato, una poliamina o una cadena de polietilenglicol, o ácido acético de adamantano, un resto de palmitilo, o un resto de octadecilamina o hexilamino-carbonil-oxicolesterol. Los oligonucleótidos de la invención también pueden conjugarse a sustancias farmacológicas activas, por ejemplo, aspirina, warfarina, fenilbutazona, ibuprofeno, suprofeno, fenbufeno, ketoprofeno, (S)-(+)-pranoprofeno, carprofeno, dansilsarcosina, ácido 2,3,5-triyodobenzoico, ácido flufenámico, ácido folínico, una benzotiazida, clorotiazida, una diazepina, indometicina, un barbiturato, una cefalosporina, un fármaco sulfa, un antidiabético, un agente antibacteriano o un antibiótico. Los conjugados de oligonucleótido-fármaco y su preparación se describen en la solicitud de patente estadounidense 09/334.130 (presentada el 15 de junio de 1999):

Las patentes estadounidenses representativas que enseñan la preparación de tales conjugados de oligonucleótido incluyen, pero no se limitan a, los documentos US: 4.828.979; 4.948.882; 5.218.105; 5.525.465; 5.541.313; 5.545.730; 5.552.538; 5.578.717; 5.580.731; 5.580.731; 5.591.584; 5.109.124; 5.118.802; 5.138.045; 5.414.077; 5.486.603; 5.512.439; 5.578.718; 5.608.046; 4.587.044; 4.605.735; 4.667.025; 4.762.779; 4.789.737; 4.824.941; 4.835.263; 4.876.335; 4.904.582; 4.958.013; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136;

5.245.022; 5.254.469; 5.258.506; 5.262.536; 5.272.250; 5.292.873; 5.317.098; 5.371.241, 5.391.723; 5.416.203, 5.451.463; 5.510.475; 5.512.667; 5.514.785; 5.565.552; 5.567.810; 5.574.142; 5.585.481; 5.587.371; 5.595.726; 5.597.696; 5.599.923; 5.599.928 y 5.688.941, algunas de las cuales son de titularidad común con esta solicitud.

5 *Compuestos quiméricos*

No es necesario que todas las posiciones en un compuesto dado estén modificadas de manera uniforme, y de hecho más de una de las modificaciones mencionadas anteriormente puede incorporarse en un único compuesto o incluso un único nucleósido dentro de un oligonucleótido.

La presente invención también incluye oligonucleótidos antisentido que son oligonucleótidos quiméricos. Oligonucleótidos antisentido "quiméricos" o "quimeras," en el contexto de esta invención, son oligonucleótidos antisentido que contienen dos o más regiones químicamente distintas, constituidas cada una por al menos una unidad monomérica, es decir, un nucleótido.

Estos oligonucleótidos normalmente contienen al menos una región en la que el oligonucleótido está modificado de modo que se confiera al oligonucleótido resistencia aumentada a degradación por nucleasa, captación celular aumentada, estabilidad aumentada y/o afinidad de unión aumentada para el ácido nucleico diana. Una región adicional del oligonucleótido puede servir como sustrato para enzimas que pueden escindir híbridos ARN:ADN o ARN:ARN. A modo de ejemplo, la ARNasa H es una endonucleasa celular que escinde la cadena de ARN de un dúplex ARN:ADN. La activación de la ARNasa H, por tanto, da como resultado la escisión de la diana de ARN, potenciando de ese modo enormemente la eficacia de la inhibición de la expresión génica mediada por oligonucleótidos. La escisión de los híbridos ARN:ARN puede llevarse a cabo, de manera similar, a través de las acciones de endorribonucleasas, tales como ARNasa L que escinde tanto ARN celular como viral. La escisión de la diana de ARN puede detectarse de manera rutinaria mediante electroforesis en gel y, si es necesario, técnicas de hibridación de ácidos nucleicos asociadas conocidas en la técnica.

Los oligonucleótidos antisentido quiméricos de la invención pueden formarse como estructuras compuestas de dos o más oligonucleótidos, oligonucleótidos modificados, oligonucleósidos y/o miméticos de oligonucleótido tal como se describió anteriormente. Tales compuestos también se han denominado en la técnica híbridos o gapmeros. Las patentes estadounidenses representativas que enseñan la preparación de tales estructuras híbridas incluyen, pero no se limitan a, los documentos US: 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 titularidad común con esta solicitud.

G. Formulaciones

Los oligonucleótidos de la invención también pueden mezclarse, encapsularse, conjugarse o asociarse de otro modo con otras moléculas, estructuras de moléculas o mezclas de compuestos, como por ejemplo, liposomas, moléculas dirigidas a receptor, formulaciones orales, rectales, tópicas u otras, para ayudar en la captación, distribución y/o absorción. Las patentes estadounidenses representativas que enseñan la preparación de tales formulaciones que ayudan a la captación, distribución y/o absorción formulaciones incluyen, pero no se limitan a, los documentos US: 5.108.921; 5.354.844; 5.416.016; 5.459.127; 5.521.291; 5.543.158; 5.547.932; 5.583.020; 5.591.721; 4.426.330; 4.534.899; 5.013.556; 5.108.921; 5.213.804; 5.227.170; 5.264.221; 5.356.633; 5.395.619; 5.416.016; 5.417.978; 5.462.854; 5.469.854; 5.512.295; 5.527.528; 5.534.259; 5.543.152; 5.556.948; 5.580.575 y 5.595.756,

Las composiciones que comprenden los oligonucleótidos antisentido de la invención engloban cualquier sal, éster, o sale de tal éster, o cualquier otro compuesto, farmacéuticamente aceptable, que con la administración a un animal, incluyendo un ser humano, puede proporcionar (directa o indirectamente) el residuo o metabolito biológicamente activo del mismo. Por consiguiente, por ejemplo, la descripción también establece profármacos y sales farmacéuticamente aceptables de los oligonucleótidos de la invención, sales farmacéuticamente aceptables de tales profármacos y otros bioequivalentes.

El término "profármaco" indica un agente terapéutico que se prepara en una forma inactiva que se convierte en una forma activa (es decir, fármaco) dentro del organismo o las células del mismo mediante la acción de enzimas endógenas u otros compuestos químicos y/o condiciones. En particular, las versiones de profármaco de los oligonucleótidos de la invención se preparan como derivados de SATE [(S-acetil-2-tioetil)fosfato] según los métodos dados a conocer en el documento WO 93/24510 concedido a Gosselin *et al.*, publicado el 9 de diciembre de 1993 o en los documentos WO 94/26764 y US 5.770.713 concedidos a Imbach *et al.*

El término "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales fisiológica y farmacéuticamente aceptables de los oligonucleótidos de la invención: es decir, sales que conservan la actividad biológica deseada del compuesto original y que no confieren efectos toxicológicos no deseados al mismo. Para los oligonucleótidos, los ejemplos preferidos de sales farmacéuticamente aceptables y sus usos se describen adicionalmente en la patente estadounidense 6.287.860.

La presente invención también incluye composiciones y formulaciones farmacéuticas que incluyen los oligonucleótidos antisentido de la invención. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse en un número de formas que depende de si se desea tratamiento local o sistémico y de la zona que va a tratarse. La administración puede ser tópica (incluyendo por vía oftálmica y a membranas mucosas incluyendo suministro vaginal y rectal), pulmonar, por ejemplo, mediante inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, incluyendo mediante nebulizador; intratraqueal, intranasal, epidérmica y transdérmica), oral o parenteral. La administración parenteral incluye inyección o infusión intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular; o administración intracraneal, por ejemplo, intratecal o intraventricular. Se cree que los oligonucleótidos con al menos una modificación de 2'-O-metoxietilo son particularmente útiles para la administración oral. Las composiciones y formulaciones farmacéuticas para administración tópica pueden incluir parches transdérmicos, pomadas, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, pulverizadores, líquidos y polvos. Pueden ser necesarios o deseables portadores, bases acuosas, en polvo u oleosas, espesantes y similares farmacéuticos convencionales. También pueden ser útiles preservativos, guantes y similares recubiertos.

Las formulaciones farmacéuticas contempladas por la presente descripción, que pueden presentarse convenientemente en una forma farmacéutica unitaria, pueden prepararse según técnicas convencionales bien conocidas en la industria farmacéutica. Tales técnicas incluyen la etapa de asociar los principios activos con el/los portador(es) o excipiente(es) farmacéutico(s). En general, las formulaciones se preparan asociando de manera uniforme o estrecha los principios activos con portadores líquidos o portadores sólidos finamente divididos o ambos, y luego, si es necesario, conformar el producto.

Las composiciones de la presente invención pueden formularse en cualquiera de muchas formas farmacéuticas posibles tales como, pero sin limitarse a, comprimidos, cápsulas, cápsulas de gel, jarabes líquidos, geles blandos, supositorios y enemas. Las composiciones de la presente invención también pueden formularse como suspensiones en medios acuosos, no acuosos o mixtos. Las suspensiones acuosas pueden contener adicionalmente sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión incluyendo, por ejemplo, carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol y/o dextrano. La suspensión también puede contener estabilizadores.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, disoluciones, emulsiones, espumas y formulaciones que contienen liposomas. Las composiciones y formulaciones farmacéuticas de la presente invención pueden comprender uno o más potenciadores de la penetración, portadores, excipientes u otros principios activos o inactivos.

Las emulsiones normalmente son sistemas heterogéneos de un líquido disperso en otro en forma de gotitas que superan habitualmente 0,1 μm de diámetro. Las emulsiones pueden contener componentes adicionales además de las fases dispersas, y el fármaco activo que puede estar presente como disolución o bien en la fase acuosa, la fase oleosa o por sí mismo como una fase separada. Las microemulsiones se incluyen como una realización de la presente invención. Las emulsiones y sus usos se conocen bien en la técnica y se describen adicionalmente en la patente de EE.UU. 6.287.860.

Formulaciones de la presente invención incluyen formulaciones liposómicas. Tal como se usa en la presente invención, el término "liposoma" significa una vesícula compuesta por lípidos anfífilos dispuestos en una bicapa o bicapas esférica(s). Los liposomas son vesículas unilamelares o multilamelares que tienen una membrana formada de material lipófilo y un interior acuoso que contiene la composición que va a suministrarse. Los liposomas catiónicos son liposomas cargados positivamente que se cree que interactúan con moléculas de ADN cargadas negativamente para formar un complejo estable. Se cree que los liposomas que son sensibles al pH o están cargados negativamente atrapan ADN en lugar de formar complejos con él. Tanto los liposomas catiónicos como los no catiónicos se han usado para suministrar ADN a las células.

Los liposomas también incluyen liposomas "estabilizados estéricamente", un término que, tal como se usa en el presente documento, se refiere a liposomas que comprenden uno o más lípidos especializados que, cuando se incorporan en liposomas, dan como resultado vidas de circulación potenciadas en relación con los liposomas que carecen de tales lípidos especializados. Ejemplos de liposomas estabilizados estéricamente son aquellos en los que parte de la porción lipídica que forma la vesícula del liposoma comprende uno o más glicolípidos o está derivatizada con uno o más polímeros hidrófilos, tales como un resto de polietilenglicol (PEG). Los liposomas y sus usos se describen adicionalmente en la patente estadounidense 6.287.860,

Las formulaciones y composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden incluir tensioactivos. El uso de tensioactivos en productos farmacológicos, formulaciones y en emulsiones se conoce bien en la técnica. Los tensioactivos y sus usos se describen adicionalmente en la patente estadounidense 6.287.860.

En una realización, la presente invención emplea diversos potenciadores de la penetración para efectuar el suministro eficaz de ácido nucleico, particularmente oligonucleótidos. Además de ayudar a la difusión de fármacos no lipófilos a través de las membranas celulares, los potenciadores de la penetración también potencian la permeabilidad de fármacos lipófilos: Los potenciadores de la penetración pueden clasificarse según pertenezcan a una de cinco amplias categorías, es decir, tensioactivos, ácidos grasos, sales biliares, agentes quelantes y no

tensioactivos no quelantes. Los potenciadores de la penetración y sus usos se describen adicionalmente en la patente estadounidense 6.287.860.

5 Un experto en la técnica reconocerá que las formulaciones se diseñan de manera rutinaria según su uso pretendido, es decir la vía de administración.

10 Las formulaciones preferidas para administración tópica incluyen aquellas en las que los oligonucleótidos de la invención están en mezcla con un agente de suministro tópico tal como lípidos, liposomas, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, esteroides, agentes quelantes y tensioactivos. Los lípidos y liposomas preferidos incluyen neutros (por ejemplo dioleoilfosfatidil-etanolamina DOPE, dimiristoilfosfatidil-colina DMPC, diestearoilfosfatidil-colina) negativos (por ejemplo dimiristoilfosfatidil-glicerol DMPG) y catiónicos (por ejemplo dioleiltetrametilaminopropilo DOTAP y dioleoilfosfatidil-etanolamina DOTMA).

15 Para la administración tópica u otra, los oligonucleótidos de la invención pueden encapsularse dentro de liposomas o pueden formar complejos con los mismos, en particular con liposomas catiónicos. Alternativamente, los oligonucleótidos pueden complejarse con lípidos, en particular con lípidos catiónicos. Los ácidos grasos y ésteres preferidos, las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos y sus usos se describen adicionalmente en la patente estadounidense 6.287.860.

20 Las composiciones y formulaciones para administración oral incluyen polvos o gránulos, materiales microparticulados, materiales nanoparticulados, suspensiones o disoluciones en agua o medios no acuosos, cápsulas, cápsulas de gel, sobres, comprimidos o minicomprimidos. Pueden ser deseables espesantes, agentes aromatizantes, diluyentes, emulsionantes, agentes de dispersión o adyuvantes. Las formulaciones orales preferidas son aquellas en las que los oligonucleótidos de la invención se administran conjuntamente con uno o más quelantes
25 y tensioactivos potenciadores de la penetración. Los tensioactivos preferidos incluyen ácidos grasos y/o ésteres o sales de los mismos, ácidos biliares y/o sales de los mismos. Los ácidos/sales biliares y ácidos grasos preferidos y sus usos se describen adicionalmente en la patente estadounidense 6.287.860.

30 También se prefieren combinaciones de potenciadores de la penetración, por ejemplo, ácidos/sales grasos en combinación con ácidos/sales biliares. Una combinación particularmente preferida es la sal sódica de ácido láurico, ácido cáprico y UDCA. Los potenciadores de la penetración adicionales incluyen polioxietilen-9-lauril éter, polioxietilen-20-cetil éter. Los oligonucleótidos de la invención pueden suministrarse por vía oral, en forma granular incluyendo partículas secas pulverizadas, o complejados para formar micro o nanopartículas. Los agentes de complejación de oligonucleótidos y sus usos se describen adicionalmente en la patente estadounidense 6.287.860.

35 Las formulaciones orales para los oligonucleótidos y su preparación se describen en detalle en las solicitudes estadounidenses 09/108.673 (presentada el 1 de julio de 1998), 09/315.298 (presentada el 20 de mayo de 1999) y 10/071.822, presentada el 8 de febrero de 2002.

40 Las composiciones y formulaciones para administración parenteral, intratecal o intraventricular pueden incluir disoluciones acuosas estériles que también pueden contener tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados tales como, pero sin limitarse a, potenciadores de la penetración, compuestos portadores y otros portadores o excipientes farmacéuticamente aceptables.

45 Determinadas realizaciones de la invención proporcionan composiciones farmacéuticas que contienen uno o más oligonucleótidos antisentido y uno o más de otros agentes quimioterápicos que funcionan mediante un mecanismo no antisentido. Los ejemplos de tales agentes quimioterápicos incluyen pero no se limitan a fármacos quimioterápicos contra el cáncer tales como daunorubicina, daunomicina, dactinomomicina, doxorubicina, epirubicina, idarubicina, esorubicina; bleomicina, mafosfamida, ifosfamida, citosina arabinósido, bis-cloroetilnitrosurea, busulfano, mitomicina C, actinomomicina. D, mitramicina, prednisona, hidroxiprogesterona, testosterona, tamoxifeno, dacarbazina, procarbazona, hexametilmelamina, pentametilmelamina, mitoxantrona, amsacrina, clorambucilo, metilciclohexilnitrosurea, mostazas nitrogenadas, melfalán, ciclofosfamida, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-azacitidina, hidroxiaurea, desoxicoformicina, 4-hidroxiperoxiciclofosforamida, 5-fluorouracilo (5-FU), 5-fluorodesoxiuridina (5-FUdR), metotrexato (MTX), colchicina, taxol, vincristina, vinblastina, etopósido (VP-16),
55 trimetrexato, irinotecán, topotecán, gemcitabina, tenipósido, cisplatino y dietilestilbestrol (DES). Cuando se usan con los oligonucleótidos de la invención, tales agentes quimioterápicos pueden usarse individualmente (por ejemplo, 5-FU y oligonucleótido), secuencialmente (por ejemplo, 5-FU y oligonucleótido durante un periodo de tiempo seguido por MTX y oligonucleótido), o en combinación con uno o más de tales agentes quimioterápicos (por ejemplo, 5-FU, MTX y oligonucleótido, o 5-FU, radioterapia y oligonucleótido). También pueden combinarse en las composiciones
60 de la invención fármacos antiinflamatorios, incluyendo pero sin limitarse a fármacos antiinflamatorios no esteroideos y corticosteroides, y fármacos antivirales, incluyendo pero sin limitarse a ribivirina, vidarabina, aciclovir y ganciclovir. Las combinaciones de oligonucleótidos antisentido y otros fármacos no antisentido también están dentro del alcance de esta invención. Dos o más compuestos combinados pueden usarse juntos o secuencialmente.

65 En otra realización relacionada, las composiciones de la invención pueden contener uno o más oligonucleótidos antisentido, dirigidos a un primer ácido nucleico y uno o más compuestos antisentido adicionales dirigidos a una

segunda diana de ácido nucleico. Alternativamente, las composiciones de la invención pueden contener dos o más oligonucleótidos antisentido dirigidos a diferentes regiones de la misma diana de ácido nucleico. Se conocen en la técnica numerosos ejemplos de oligonucleótidos antisentido. Pueden usarse dos o más oligonucleótidos combinados juntos o secuencialmente.

5

H. Dosificación

Se cree que la formulación de las composiciones terapéuticas y su administración posterior (dosificación) están dentro de los conocimientos de los expertos en la técnica. La dosificación depende de la gravedad y la capacidad de respuesta del estado patológico que va a tratarse, durante el curso de tratamiento que dura desde varios días hasta varios meses, o hasta que se logra la cura o una disminución del estado patológico. Pueden calcularse calendarios de dosificación óptimos a partir de mediciones de acumulación de fármaco en el organismo del paciente. Los expertos habituales pueden determinar fácilmente las dosificaciones óptimas, metodologías de dosificación y tasas de repetición. Las dosificaciones óptimas pueden variar dependiendo de la potencia relativa de los oligonucleótidos individuales y generalmente pueden estimarse basándose en las CE₅₀ que se ha encontrado que son eficaces en modelos animales *in vitro* e *in vivo*. En general, la dosificación es de desde 0,01 ug hasta 100 g por kg de peso corporal y puede administrarse una vez o más al día, semanal, mensual o anualmente, o incluso una vez cada 2 a 20 años. Los expertos habituales en la técnica pueden estimar fácilmente tasas de repetición para dosificación basadas en tiempos de residencia y concentraciones del fármaco medidos en tejidos o fluidos corporales. Tras el tratamiento satisfactorio, puede ser deseable hacer que el paciente se someta a terapia de mantenimiento para prevenir la recaída del estado patológico, administrándose el oligonucleótido en dosis de mantenimiento, que oscilan entre 0,01 ug y 100 g por kg de peso corporal, de una o más veces al día, a una vez cada 20 años.

Aunque la presente invención se ha descrito con especificidad según determinadas de sus realizaciones preferidas, los siguientes ejemplos sirven sólo para ilustrar la invención y no se pretende que limiten la misma. Los ejemplos se refieren a ISIS de ASO 175317 que es un oligonucleótido de la invención así como a los resultados de los ASO relacionados.

Ejemplos

30

Ejemplo 1

Síntesis de fosforamiditas de nucleósido

Los siguientes compuestos, incluyendo amiditas y sus productos intermedios, se prepararon tal como se describe en la patente estadounidense 6.426.220 y el documento publicado PCT WO 02/36743; producto intermedio de 5'-O-dimetoxitritil-timidina para 5-metil-dC amidita, producto intermedio de 5'-O-dimetoxitritil-2'-desoxi-5-metilcitidina para 5-metil-dC amidita, penúltimo producto intermedio de 5'-O-dimetoxitritil-2'-desoxi-N⁴-benzoil-5-metilcitidina para 5-metil-dC amidita, [5'-O-(4,4'-dimetoxitrietil)-2'-desoxi-N⁴-benzoil-5-metilcitidin-3'-O-il]-2'-cianoetil-N,N-diisopropilfosforamidita (5-metil-dC amidita), 2'-fluorodesoxiadenosina, 2'-fluorodesoxiguanosina, 2'-fluorouridina, 2'-fluorodesoxicitidina, amiditas modificadas con 2'-O-(2-metoxietilo), producto intermedio de 2'-O-(2-metoxietil)-5-metiluridina, penúltimo producto intermedio de 5'-O-DMT-2'-O-(2-metoxietil)-5-metiluridina, [5'-O-(4,4'-dimetoxitrietil)-2'-O-(2-metoxietil)-5-metiluridin-3'-O-il]-2'-cianoetil-N,N-diisopropilfosforamidita (MOE T amidita), producto intermedio de 5'-O-dimetoxitritil-2'-O-(2-metoxietil)-5-metiluridina, penúltimo producto intermedio de 5'-O-dimetoxitritil-2'-O-(2-metoxietil)-N⁴-benzoil-5-metil-citidina, [5'-O-(4,4'-dimetoxitrietil)-2'-O-(2-metoxietil)-N⁴-benzoil-5-metilcitidin-3'-O-il]-2'-cianoetil-N,N-diisopropilfosforamidita (MOE 5-Me-C amidita), [5'-O-(4,4'-dimetoxitrietil)-2'-O-(2-metoxietil)-N⁶-benzoiladenosin-3'-O-il]-2'-cianoetil-N,N-diisopropilfosforamidita (MOE A amidita), [5'-O-(4,4'-dimetoxitrietil)-2'-O-(2-metoxietil)-N⁴-isobutirilguanosa-3'-O-il]-2'-cianoetil-N,N-diisopropilfosforamidita (MOE G amidita), amiditas de nucleósido de 2'-O-(aminooxietilo) y amiditas de nucleósido de 2'-O-(dimetilaminooxietilo), amiditas de nucleósido de 2'-O-(dimetilaminooxietoxilo), 5'-O-terc-butildifenilsilil-O²-anhidro-5-metiluridina, 5'-O-terc-butildifenilsilil-2'-O-(2-hidroxietil)-5-metiluridina, 2'-O-[(2-ftalimidoxi)etil]-5'-t-butildifenilsilil-5-metiluridina, 5'-O-terc-butildifenilsilil-2'-O-[(2-formadroximinoxi)etil]-5-metiluridina, 5'-O-terc-butildifenilsilil-2'-O-[N,N-dimetilaminooxietil]-5-metiluridina, 2'-O-(dimetilaminooxietil)-5-metiluridina, 5'-O-DMT-2'-O-(dimetilaminooxietil)-5-metiluridina, 5'-O-DMT-2'-O-(2-N,N-dimetilaminooxietil)-5-metiluridina-3'-[(2-cianoetil)-N,N-diisopropilfosforamidita], amiditas de nucleósido de 2'-(aminooxietoxilo), N²-isobutiril-6-O-difenilcarbamoil-2'-O-(2-etilacetil)-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)guanosa-3'-[(2-cianoetil)-N,N-diisopropilfosforamidita], amiditas de nucleósido de 2'-dimetilaminoetoxietoxilo (2'-DMAEOE), 2'-O-[2(2-N,N-dimetilaminoetoxi)etil]-5-metiluridina, 5'-O-dimetoxitritil-2'-O-[2(2-N,N-dimetilaminoetoxi)-etil]-5-metiluridina y 5'-O-dimetoxitritil-2'-O-[2(2-N,N-dimetilaminoetoxi)-etil]-5-metiluridina-3'-O-(cianoetil-N,N-diisopropil)fosforamidita.

60

Ejemplo 2

Síntesis de oligonucleótidos y oligonucleósidos

Los oligonucleótidos antisentido usados según esta invención pueden prepararse de manera conveniente y rutinaria a través de la técnica bien conocida de síntesis en fase sólida. El equipo para tal síntesis lo comercializan varios

proveedores incluyendo, por ejemplo, Applied Biosystems (Foster City, CA). Puede emplearse adicional o alternativamente cualquier otro medio para tal síntesis conocido en la técnica. Se conoce bien usar técnicas similares para preparar oligonucleótidos tales como los fosforotioatos y derivados alquilados.

5 Oligonucleótidos: Se sintetizan oligonucleótidos fosfodiéster (P=O) sustituidos y no sustituidos en un sintetizador de ADN automatizado (modelo 394 de Applied Biosystems) usando química de fosforamidita convencional con oxidación mediante yodo.

10 Se sintetizan fosforotioatos (P=S) de manera similar a oligonucleótidos fosfodiéster con las siguientes excepciones: se efectuó la tianción utilizando una disolución al 10% p/v de 1,1-dióxido de 3,H-1,2-benzoditiol-3-ona en acetonitrilo para la oxidación de los enlaces fosfita. Se aumentó el tiempo de la etapa de reacción de tianción hasta 180 s y le precedió la etapa de ocupación de extremos normal. Tras la escisión de la columna de CPG y el desbloqueo en hidróxido de amonio concentrado a 55°C (12-16 h), se recuperaron los oligonucleótidos mediante precipitación con >3 volúmenes de etanol a partir de una disolución de NH₄OAc 1 M. Se preparan oligonucleótidos de fosfinato tal como se describe en la patente estadounidense 5.508.270.

Se preparan oligonucleótidos de fosfonato de alquilo tal como se describe en la patente estadounidense 4.469.863.

20 Se preparan oligonucleótidos de 3'-desoxi-3'-metilfosfonato tal como se describe en las patentes estadounidenses 5.610.289 ó 5.625.050.

Se preparan oligonucleótidos de fosforamidita tal como se describe en la patente estadounidense 5.256.775 o la patente estadounidense 5.366.878.

25 Se preparan oligonucleótidos de fosfonotioato de alquilo tal como se describe en las solicitudes PCT publicadas PCT/US94/00902 y PCT/US93/06976 (publicadas como documentos WO 94/17093 y WO 94/02499, respectivamente).

30 Se preparan oligonucleótidos de 3'-desoxi-3'-aminofosforamidato tal como se describe en la patente estadounidense 5.476.925.

Se preparan oligonucleótidos de fosfotriéster tal como se describe en la patente estadounidense 5.023.243.

35 Se preparan oligonucleótidos de boranofosfato tal como se describe en las patentes estadounidenses 5.130.302 y 5.177.198,

40 Oligonucleósidos: Se preparan oligonucleósidos unidos con metilendimetilimino, también identificados como oligonucleósidos unidos con MMI, oligonucleósidos unidos con metilendimetilhidrazo, también identificados como oligonucleósidos unidos con MDH, y oligonucleósidos unidos con metilencarbonilamino, también identificados como oligonucleósidos unidos con amida-3, y oligonucleósidos unidos con metilaminocarbonilo, también identificados como oligonucleósidos unidos con amida-4, así como compuestos de estructura principal mixta que tienen, por ejemplo, enlaces MMI y P=O o P=S alternos tal como se describe en las patentes estadounidenses 5.378.825, 5.386.023, 5.489.677, 5.602.240 y 5.610.289.

45 Se preparan oligonucleósidos unidos con formacetal y tioformacetal tal como se describe en las patentes estadounidenses 5.264.562 y 5.264.564.

50 Se preparan oligonucleósidos unidos con óxido de etileno tal como se describe en la patente estadounidense 5.223.618.

Ejemplo 3

Síntesis de ARN

55 En general, la química de síntesis de ARN se basa en la incorporación selectiva de diversos grupos protectores en reacciones intermedias estratégicas. Aunque un experto habitual en la técnica entenderá el uso de grupos protectores en la síntesis orgánica, una clase útil de grupos protectores incluye silil éteres. En particular, se usan silil éteres voluminosos para proteger el 5'-hidroxilo en combinación con un grupo protector de ortoéster lábil a ácidos en el 2'-hidroxilo. Este conjunto de grupos protectores se usa entonces con la tecnología de síntesis en fase sólida convencional. Es importante eliminar por último el grupo protector de ortoéster lábil a ácidos tras todas las otras etapas sintéticas. Además, el uso temprano de los grupos protectores de sililo durante la síntesis garantiza una fácil eliminación cuando se desee, sin desprotección no deseada del 2' hidroxilo.

65 Tras este procedimiento para la protección secuencial del 5'-hidroxilo en combinación con la protección del 2'-hidroxilo mediante grupos protectores que se eliminan de manera diferencial y que son químicamente lábiles de manera diferencial, se sintetizaron oligonucleótidos de ARN.

Se sintetizan oligonucleótidos de ARN de un modo por etapas. Se añade cada nucleótido secuencialmente (dirección de 3' a 5') a un oligonucleótido unido a un soporte sólido. El primer nucleósido en el extremo 3' de la cadena se une covalentemente a un soporte sólido. Se añaden el precursor de nucleótido, una fosforamida de ribonucleósido, y el activador, acoplado la segunda base sobre el extremo 5' del primer nucleósido. Se lava el soporte y se ocupa cualquier grupo 5'-hidroxilo sin reaccionar con anhídrido acético para producir restos 5'-acetilo. Se oxida entonces el enlace para dar el enlace P(V) más estable y deseado en última instancia. Al final del ciclo de adición de nucleótido, se escinde el grupo 5'-sililo con fluoruro. Se repite el ciclo para cada nucleótido posterior.

Tras la síntesis, se escinden los grupos protectores de metilo en los fosfatos en 30 minutos utilizando 2-carbamoil-2-cianoetilen-1,1-ditiolato de disodio trihidratado 1 M (S₂Na₂) en DMF. Se lava la disolución de desprotección del oligonucleótido unido al soporte sólido usando agua. Se trata entonces el soporte con metilamina al 40% en agua durante 10 minutos a 55°C. Esto libera los oligonucleótidos de ARN en la disolución, desprotege las aminas exocíclicas y modifica los grupos 2'. Los oligonucleótidos pueden analizarse mediante HPLC de intercambio aniónico en esta fase.

Los grupos 2'-ortoéster son los últimos grupos protectores en eliminarse. El grupo protector de ortoéster de monoacetato de etilenglicol desarrollado por Dharmacon Research, Inc. (Lafayette, CO) es un ejemplo de un grupo protector de ortoéster útil que tiene las siguientes propiedades importantes. Es estable en las condiciones de síntesis de fosforamiditas de nucleósido y síntesis de oligonucleótidos. Sin embargo, tras la síntesis de oligonucleótidos, el oligonucleótido se trata con metilamina que no sólo escinde el oligonucleótido del soporte sólido sino que también elimina los grupos acetilo de los ortoésteres. Los sustituyentes de 2-etil-hidroxilo resultantes en el ortoéster son menos secuestrantes de electrones que el precursor acetilado. Como resultado, el ortoéster modificado se hace más lábil a la hidrólisis catalizada por ácido. Específicamente, la velocidad de escisión es aproximadamente 10 veces más rápida tras eliminarse los grupos acetilo. Por tanto, este ortoéster presenta suficiente estabilidad con el fin de ser compatible con la síntesis de oligonucleótidos y aún, cuando se modifica posteriormente, permite que la desprotección se lleve a cabo en condiciones acuosas relativamente suaves compatibles con el producto de oligonucleótido de ARN final.

Adicionalmente, se conocen bien en la técnica métodos de síntesis de ARN (Scaringe, Ph.D. Thesis, University of Colorado, 1996; Scaringe *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 120: 11820-11821; 1998; Matteucci y Caruthers, J. Am. Chem. Soc. 103: 3185-3191, 1981; Beaucage y Caruthers, Tetrahedron Lett. 22: 1859-1862, 1981; Dahl *et al.*, Acta Chem. Scand. 44: 639-641; 1990; Reddy *et al.*, Tetrahedron Lett. 25: 4311-4314, 1994; Wincott *et al.*, Nucleic Acids Res. 23: 2677-2684, 1995; Griffin *et al.*, Tetrahedron 23: 2301-2313, 1967a; Griffin *et al.*, Tetrahedron 23: 2315-2331, 1967b).

Pueden sintetizarse compuestos antisentido de ARN (oligonucleótidos de ARN) de la presente invención mediante los métodos en el presente documento o adquirirse de Dharmacon Research, Inc (Lafayette, CO). Una vez sintetizados, pueden aparearse entonces compuestos antisentido de ARN complementarios mediante métodos conocidos en la técnica para formar compuestos antisentido bicatenarios (en dúplex). Por ejemplo, pueden formarse dúplex combinando 30 µl de cada una de las hebras complementarias de oligonucleótidos de ARN (disolución de oligonucleótidos de ARN 50 µM) y 15 µl de tampón de apareamiento 5X (acetato de potasio 100 mM, HEPES-KOH 30 mM pH 7,4, acetato de magnesio 2 mM) seguido por calentamiento durante 1 minuto a 90°C, luego 1 hora a 37°C. Los compuestos antisentido en dúplex resultantes pueden usarse en kits, ensayos, selecciones u otros métodos para investigar el papel de un ácido nucleico diana.

Ejemplo 4

Síntesis de oligonucleótidos quiméricos

Los oligonucleósidos, oligonucleótidos quiméricos u oligonucleótidos/oligonucleósidos mixtos de la invención pueden ser de varios tipos diferentes. Éstos incluyen un primer tipo en el que el segmento "gap" de nucleósidos unidos está situado entre segmentos "wing" 5' y 3' de nucleósidos unidos y un segundo tipo de "extremos abiertos" en el que el segmento "gap" está ubicado en el extremo o bien 3' o bien 5' terminal del compuesto oligomérico. Los oligonucleótidos del primer tipo se conocen también en la técnica como "gapmeros" ("gapmers") u oligonucleótidos incompletos. Los oligonucleótidos del segundo tipo se conocen también en la técnica como "hemímeros" o "wingmeros" ("wingmers").

Oligonucleótidos de fosforotioato quiméricos de [2'-O-Me]-[2'-desoxi]-[2'-O-Me]

Se sintetizan oligonucleótidos quiméricos que tienen segmentos de oligonucleótidos de 2'-fosforotioato de O-alquilo y 2'-desoxifosforotioato usando un sintetizador de ADN automatizado de Applied Biosystems modelo 394, tal como anteriormente. Se sintetizan oligonucleótidos usando el sintetizador automatizado y 2'-desoxi-5'-dimetoxitritil-3'-O-fosforamida para la parte de ADN y 5'-dimetoxitritil-2'-O-metil-3'-O-fosforamida para los segmentos "wing" 5' y 3'. El ciclo de síntesis convencional se modifica incorporando etapas de acoplamiento con tiempos de reacción aumentados para la 5'-dimetoxitritil-2'-O-metil-3'-O-fosforamida. Se escinde el oligonucleótido completamente

protegido del soporte y se desprotege en amoniaco concentrado (NH₄OH) durante 12-16 h a 55°C. Se recupera entonces el oligo desprotegido mediante un método apropiado (precipitación, cromatografía en columna, volumen reducido a vacío) y se analiza espectrofotométricamente para determinar el rendimiento y la pureza mediante electroforesis capilar y mediante espectrometría de masas.

5 *Oligonucleótidos de fosforotioato quiméricos de [2'-O-(2-metoxietil)]-[2'-desoxi]-[2'-O-(metoxietilo)]*

10 Se prepararon oligonucleótidos de fosforotioato quiméricos de [2'-O-(2-metoxietil)]-[2'-desoxi]-[2'-O-(metoxietilo)] según el procedimiento anterior para el oligonucleótido quimérico de 2'-O-metilo, con la sustitución de las 2'-O-metil-amiditas por las 2'-O-(metoxietil)-amiditas.

Oligonucleótidos quiméricos de [2'-O-(2-metoxietil)fosfodiéster]-[2'-desoxifosforotioato]-[2'-O-(2-metoxietil)fosfodiéster]

15 Se preparan oligonucleótidos quiméricos de [2'-O-(2-metoxietilfosfodiéster)]-[2'-desoxifosforotioato]-[2'-O-(metoxietil)fosfodiéster] según el procedimiento anterior para el oligonucleótido quimérico de 2'-O-metilo con la sustitución de las 2'-O-metil amiditas por 2'-O-(metoxietil)-amiditas, oxidación con yodo para generar los enlaces internucleotídicos de fosfodiéster con las partes de segmento "wing" de las estructuras quiméricas y sulfurización utilizando 1,1 dióxido de 3,4-dihidro-1,2-benzoditiol-3-ona (reactivo de Beaucage) para generar los enlaces internucleotídicos de fosforotioato para el segmento gap del centro.

20

Se sintetizan otros oligonucleótidos quiméricos, oligonucleósidos quiméricos y oligonucleótidos/oligonucleósidos mixtos según la patente estadounidense 5.623.065.

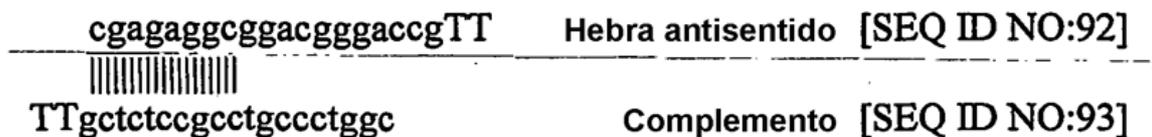
25 Ejemplo 5

Diseño y selección de compuestos antisentido en dúplex que seleccionan como diana ARNm de IGF-1R

30 Puede diseñarse una serie de dúplex de ácido nucleico que comprenden los compuestos antisentido tales como oligonucleótidos antisentido de la presente invención y sus complementos para que seleccionen como diana ARNm de IGF-IR. La secuencia de nucleobases de la hebra antisentido del dúplex comprende al menos una parte de un oligonucleótido seleccionado SEQ ID NO: 1 hasta 76 y SEQ ID NO: 100 hasta 136 mostradas en la tabla 1 incluyendo ISIS de ASO 175308, 175302, 175314, 175307, 175317, 175323, 232744, 323747, 323767, 323762 y 323737. Los extremos de las hebras pueden modificarse mediante la adición de una o más nucleobases naturales o modificadas para formar una proyección. Se diseña entonces la hebra sentido del ARNbc y se sintetiza como el complemento de la hebra antisentido y también puede contener modificaciones o adiciones en cualquier extremo terminal. Por ejemplo, en una realización, ambas hebras del dúplex de ARNbc serían complementarias a lo largo de las nucleobases centrales, teniendo cada una proyecciones en unos o ambos extremos terminales.

35

40 Por ejemplo, un dúplex que comprende una hebra antisentido que tiene la secuencia CGAGAGGCGGACGGGACCG y que tiene una proyección de dos nucleobases de desoxitimidina (dT) tendría la siguiente estructura:



45 Pueden sintetizarse las hebras de ARN del dúplex mediante métodos dados a conocer en el presente documento o adquirirse de Dharmacon Research Inc., (Lafayette, CO). Una vez sintetizadas, se aparean las hebras complementarias. Se toman alícuotas de hebras individuales y se diluyen hasta una concentración de 50 uM. Una vez diluidas, se combinan 30 ul de cada hebra con 15 ul de una disolución 5X de tampón de apareamiento. La concentración final de dicho tampón es acetato de potasio 100 mM, HEPES-KOH 30 mM pH 7,4 y acetato de magnesio 2 mM. El volumen final es de 75 ul. Se incuba esta disolución durante 1 minuto a 90°C y luego se centrifuga durante 15 segundos. Se deja reposar el tubo durante 1 hora a 37°C, momento en el que se usan los dúplex de ARNbc en la experimentación. La concentración final del dúplex de ARNbc es de 20 uM. Puede almacenarse esta disolución congelada (-20°C) y congelarse-descongelarse hasta 5 veces.

50

55 Una vez preparados, se evalúan los compuestos antisentido en dúplex para determinar su capacidad para modular la expresión génica de IGF-IR.

60 Cuando las células alcanzan el 80% de confluencia, se tratan con los compuestos antisentido en dúplex de la invención. Para células hechas crecer en placas de 96 pocillos, se lavan los pocillos una vez con 200 µl de medio reducido en suero OPTI-MEM-1 (Gibco BRL) y entonces se tratan con 130 µl de OPTI-MEM-1 que contiene LIPOFECTIN 12 µg/ml (Gibco BRL) y el compuesto antisentido de dúplex deseado a una concentración final de 200 nM. Tras 5 horas de tratamiento, se reemplaza el medio por medio nuevo. Se recogen las células 16 horas tras

el tratamiento, momento en el que se aísla el ARN y se mide la reducción de la diana mediante RT-PCR.

Ejemplo 6

5 *Aislamiento de oligonucleótidos*

Tras la escisión del soporte sólido de vidrio de poro controlado y el desbloqueo en hidróxido de amonio concentrado 55°C durante 12-16 horas, se recuperan los oligonucleótidos o oligonucleósidos mediante precipitación en NH₄OAc 1 M con >3 volúmenes de etanol. Se analizan los oligonucleótidos sintetizados mediante espectroscopía de masas por electrospray (determinación del peso molecular) y mediante electroforesis en gel capilar y se determina que son material de longitud completa al menos al 70%. Se determinaron las cantidades relativas de enlaces fosforotioato y fosfodiéster obtenidas en la síntesis mediante la razón de peso molecular correcto en relación con el producto de -16 amu (+/-32 +/-48). Para algunos estudios, se purificaron oligonucleótidos mediante HPLC, tal como se describe por Chiang *et al.*, J. Biol. Chem. 266: 18162-18171, 1991. Los resultados obtenidos con el material purificado mediante HPLC fueron similares a los obtenidos con el material no purificado mediante HPLC.

Ejemplo 7

20 *Síntesis de oligonucleótidos – Formato de placa de 96 pocillos*

Se sintetizaron oligonucleótidos mediante química de fosforamidita de fase sólida P(III) en un sintetizador automatizado de que puede ensamblar 96 secuencias simultáneamente en un formato de 96 pocillos. Se produjeron enlaces internucleotídicos fosfodiéster mediante oxidación con yodo acuoso. Se generaron enlaces internucleotídicos de fosforotioato mediante sulfurización utilizando 1,1-dióxido de 3,4-dihidro-1,2,4-benzoditiol-3-ona (reactivo de Beaucage) en acetonitrilo anhidro. Se adquirieron beta-cianoetil-diiso-propilfosforamiditas protegidas con bases convencionales de proveedores comerciales (por ejemplo PE-Applied Biosystems, Foster City, CA, o Pharmacia, Piscataway, NJ). Se sintetizan nucleósidos no convencionales según métodos patentados o convencionales. Se utilizan como beta-cianoetildisopropilfosforamiditas protegidas con bases.

30 Se escindieron los oligonucleótidos del soporte y se desprotegeron con NH₄OH concentrado a temperatura elevada (55-60°C) durante 12-16 horas y entonces se secó el producto liberado a vacío. Entonces se resuspendió el producto secado en agua estéril para proporcionar una placa madre a partir de la cual se diluyen entonces todas las muestras de placa de prueba y analíticas utilizando pipetas robóticas.

35 Ejemplo 8

Análisis de oligonucleótidos – Formato de placa de 96 pocillos

Se evaluó la concentración de oligonucleótido en cada pocillo mediante dilución de muestras y espectroscopía de absorción UV. Se evaluó la integridad de la longitud completa de los productos individuales mediante electroforesis capilar (EC) en o bien el formato de 96 pocillos (Beckman P/ACE (marca comercial) MDQ) o bien, para muestras preparadas individualmente, en un aparato de EC comercial (por ejemplo, Beckman P/ACE (marca comercial) 5000, ABI 270). Se confirmó la composición de la estructura principal y las bases mediante análisis de masas de los compuestos utilizando espectroscopía de masas por electrospray. Se diluyeron todas las placas de prueba del ensayo a partir de la placa madre usando pipetas robóticas de un único canal y de múltiples canales. Se determinó que las placas eran aceptables si al menos el 85% de los compuestos en la placa eran de longitud completa al menos al 85%.

Ejemplo 9

50 *Cultivo celular y tratamiento de oligonucleótidos*

Puede someterse a prueba el efecto de los compuestos antisentido sobre la expresión de ácido nucleico diana en cualquiera de una variedad de tipos celulares siempre que el ácido nucleico diana esté presente a niveles medibles. Esto puede determinarse de manera rutinaria usando, por ejemplo análisis de transferencia de tipo Northern o PCR. Se proporcionan los siguientes tipos celulares para fines ilustrativos, aunque pueden usarse de manera rutinaria otros tipos celulares, siempre que la diana se exprese en el tipo celular elegido. Esto puede determinarse fácilmente mediante métodos de rutina en la técnica, por ejemplo, análisis de transferencia de tipo Northern, ensayos de protección de ribonucleasa o RT-PCR.

60 *Células T-24:*

Se obtuvo la línea celular de carcinoma de células transicionales de vejiga humano T-24 de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) (Manassas, VA). Se cultivaron de manera rutinaria células T-24 en medio basal 5A de McCoy completo (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) complementado con suero de ternero fetal al 10% p/v (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA), penicilina 100 unidades por ml y estreptomina 100 microgramos por ml

(Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA). Se realizaron pases de las células de manera rutinaria mediante tripsinización y dilución cuando alcanzaron el 90% de confluencia. Se sembraron las células en placas de 96 pocillos (Falcon-Primaria n.º 353872) a una densidad de 7000 células/pocillo para su uso en análisis de RT-PCR.

- 5 Para la transferencia de tipo Northern u otro análisis, pueden sembrarse las células sobre placas de 100 mm u otras placas de cultivo de tejido y convencionales tratarse de manera similar, usando volúmenes apropiados de medio y oligonucleótido.

Células A549:

- 10 Se obtuvo la línea celular de carcinoma de pulmón humano A549 de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) (Manassas, VA). Se cultivaron de manera rutinaria células A549 en medio basal DMEM (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) complementado con suero de ternero fetal al 10% (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA), penicilina 100 unidades por ml y estreptomina 100 microgramos por ml (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA). Se realizaron pases de las células de manera rutinaria mediante tripsinización y dilución cuando alcanzaron el 90% de confluencia.

Células NHDF:

- 20 Se obtuvieron fibroblastos dérmicos neonatales humanos (NHDF) de Clonetics Corporation (Walkersville, MD). Se mantuvieron los NHDF de manera rutinaria en medio de crecimiento de fibroblastos (Clonetics Corporation, Walkersville, MD) complementado tal como recomienda el proveedor. Se mantuvieron las células durante hasta 10 pases tal como recomienda el proveedor.

25 Células HEK:

- Se obtuvieron queratinocitos embrionarios humanos (HEK) de Clonetics Corporation (Walkersville, MD). Se mantuvieron los HEK de manera rutinaria en medio de crecimiento de queratinocitos (Clonetics Corporation, Walkersville, MD) formulado tal como recomienda el proveedor. Se mantuvieron las células de manera rutinaria durante hasta 10 pases tal como recomienda el proveedor.

Tratamiento con compuestos antisentido:

- 35 Cuando las células alcanzaron el 65-75% de confluencia, se trataron con oligonucleótido. Para células hechas crecer en placas de 96 pocillos, se lavaron los pocillos una vez con 100 µl de medio reducido en suero OPTI-MEM (marca comercial)-1 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) y entonces se trataron con 130 µl de OPTI-MEM (marca comercial)-1 que contenía 3,75 µg/ml de LIPOFECTIN (marca comercial) (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) y la concentración deseada de oligonucleótido. Se tratan las células y se obtienen los datos por triplicado. Tras 4-7 horas de tratamiento a 37°C, se reemplazó el medio por medio nuevo. Se recogieron las células 16-24 horas tras el tratamiento con oligonucleótido.

La concentración de oligonucleótido usada varía de línea celular a línea celular. Para determinar la concentración de oligonucleótido óptima para una línea celular particular, se tratan las células con un oligonucleótido control positivo a una gama de concentraciones.

- 45 Para células humanas, el oligonucleótido control positivo se selecciona de o bien ISIS 13920 (**TCGTCATCGCTCCTCAGGG**, SEQ ID NO: 79) que se dirige a H-ras humano, o bien ISIS 18078, (**GTGCGCGAGCCCCGAAATC**, SEQ ID NO: 80) que se dirige a Jun-N-terminal cinasa-2 humano (JNK2). Ambos controles son gapmeros de 2'-O-metoxietilo (2'-O-metoxietilos mostrados en negrita) con una estructura principal de fosforotioato. Para células de ratón o rata, el oligonucleótido control positivo es ISIS 15770, **ATGCATTCTGCCCCCAAGGA**, SEQ ID NO: 81, un gapmero de 2'-O-metoxietilo (2'-O-metoxietilos mostrados en negrita) con una estructura principal de fosforotioato que se dirige a c-raf tanto de ratón como de rata. La concentración de oligonucleótido control positivo que da como resultado el 80% de inhibición del ARNm de c-H-ras (para ISIS 13920), JNK2 (para ISIS 18078) o c-raf (para ISIS 15770) se utiliza entonces como concentración de selección para nuevos oligonucleótidos en experimentos posteriores para esa línea celular. Si no se logra el 80% de inhibición, la concentración más baja de oligonucleótido control positivo que da como resultado el 60% de inhibición del ARNm de c-H-ras, JNK2 o c-raf ARNm se utiliza entonces como concentración de selección de oligonucleótidos en experimentos posteriores para esa línea celular. Si no se logra el 60% de inhibición, se considera que esa línea celular particular no es adecuada para experimentos de transfección de oligonucleótidos. Las concentraciones de oligonucleótidos antisentido usadas en el presente documento son de desde 50 nM hasta 300 nM.

Ejemplo 10

Análisis de la inhibición por oligonucleótidos de la expresión génica de IGF-1R

- 65 Puede someterse a ensayo la modulación antisentido de la expresión génica de IGF-1R de una variedad de modos

conocidos en la técnica. Por ejemplo, pueden cuantificarse los niveles de ARNm de IGF-IR mediante, por ejemplo, análisis de transferencia de tipo Northern, reacción en cadena de la polimerasa competitiva (PCR) o PCR en tiempo real (RT-PCR). Se prefiere actualmente la PCR cuantitativa en tiempo real. El análisis del ARN puede realizarse sobre ARN celular total o ARN poli(A)+. El método preferido de análisis de ARN de la presente invención es el uso de ARN celular total tal como se describe en otros ejemplos en el presente documento. Se conocen bien en la técnica métodos de aislamiento de ARN. El análisis de transferencia de tipo Northern también es de rutina en la técnica. La (PCR) cuantitativa en tiempo real puede lograrse convenientemente usando el sistema de detección de secuencias ABI PRISM (marca comercial) 7600, 7700 ó 7900 disponible comercialmente, disponible de PE-Applied Biosystems, Foster City, CA y usado según las instrucciones del fabricante.

Pueden cuantificarse los niveles de proteína de IGF-IR de una variedad de modos bien conocidos en la técnica, tales como inmunoprecipitación, análisis de inmunotransferencia de tipo Western (inmunotransferencia), ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) o clasificación celular activada por fluorescencia (FACS). Pueden identificarse anticuerpos dirigidos contra IGF-IR y obtenerse de una variedad de fuentes, tales como el catálogo de de anticuerpos de MSRS (Aerie Corporation, Birmingham, MI), o pueden prepararse mediante métodos de generación de anticuerpos monoclonales o policlonales convencionales bien conocidos en la técnica.

Ejemplo 11

Diseño de ensayos fenotípicos y estudios in vivo para el uso de inhibidores de la expresión génica de IGF-1R

Ensayos fenotípicos

Una vez que se han identificado inhibidores de la expresión génica de IGF-IR mediante los métodos dados a conocer en el presente documento, se investigan los compuestos adicionalmente en uno o más ensayos fenotípicos, teniendo cada uno criterios de valoración medibles predictivos de la eficacia en el tratamiento de una afección o estado patológico particular.

Los expertos en la técnica conocen bien ensayos fenotípicos, kits y reactivos para su uso y se usan en el presente documento para investigar el papel y/o la asociación de IGF-IR en salud y enfermedad. Los ensayos fenotípicos representativos, que pueden adquirirse de uno cualquiera de varios proveedores comerciales, incluyen aquéllos para determinar la viabilidad celular, citotoxicidad, proliferación o supervivencia celular (Molecular Probes, Eugene, OR; PerkinElmer, Boston, MA), ensayos basados en proteínas incluyendo ensayos enzimáticos (Panvera, LLC, Madison, WI; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ; Oncogene Research Products, San Diego, CA), regulación celular, transducción de señales, inflamación, procesos oxidativos y apoptosis (Assay Designs Inc., Ann Arbor, MI), acumulación de triglicéridos (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), ensayos de angiogénesis, ensayos de formación de tubos, ensayos de citocinas y hormonas y ensayos metabólicos (Chemicon International Inc., Temecula, CA; Amersham Biosciences, Piscataway, NJ).

En un ejemplo no limitativo, se tratan células que se determina que son apropiadas para un ensayo fenotípico particular (es decir, células MCF-7 seleccionadas de estudios de cáncer de mama; adipocitos para estudios de obesidad) con inhibidores de la expresión génica de IGF-IR identificados a partir de estudios *in vitro* así como compuestos de control a concentraciones óptimas que se determinan mediante los métodos descritos anteriormente. Al final del periodo de tratamiento, se analizan las células tratadas y no tratadas mediante uno o más métodos específicos para el ensayo para determinar los criterios de valoración y desenlaces fenotípicos.

Los criterios de valoración fenotípicos incluyen cambios en la morfología celular a lo largo del tiempo o la dosis de tratamiento así como cambios en los niveles de componentes celulares tales como proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, hormonas, sacáridos o metales. Mediciones del estado celular que incluyen pH, estadio del ciclo celular, ingesta o excreción de indicadores biológicos por la célula, son también criterios de valoración de interés.

También se usa el análisis del genotipo de la célula (medición de la expresión de uno o más de los genes de la célula) tras el tratamiento como indicador de la eficacia o potencia de los inhibidores de la expresión génica de IGF-IR. Se miden genes distintivos, o los genes que se sospecha que están asociados con un estado patológico, afección o fenotipo específico, tanto en células tratadas como no tratadas.

Estudios in vivo

Los sujetos individuales de los estudios *in vivo* descritos el presente documento son animales vertebrados de sangre caliente, que incluyen a seres humanos.

El ensayo clínico se somete a rigurosos controles para garantizar que los individuos no se ponen en riesgo innecesariamente y que se les informa completamente sobre su papel en el estudio. Para explicar los efectos psicológicos de los tratamientos que se reciben, se les administra a los voluntarios aleatoriamente placebo o inhibidor de la expresión génica de IGF-IR. Además, para evitar que los médicos tengan un sesgo en los tratamientos, no se les informa de si la medicación que están administrando es un inhibidor de la expresión génica

de IGF-IR o un placebo. Usando este enfoque de aleatorización, cada voluntario tiene la misma posibilidad de que se le administre o bien el nuevo tratamiento o bien el placebo.

5 Los voluntarios reciben o bien el inhibidor de la expresión génica de IGF-IR o bien placebo durante un periodo de ocho semanas midiéndose parámetros biológicos asociados con la afección o el estado patológico que está
 10 midiéndose al comienzo (mediciones iniciales antes de cualquier tratamiento), al final (tras el tratamiento final) y a intervalos regulares durante el periodo de estudio. Tales mediciones incluyen los niveles de moléculas de ácido nucleico que codifican para IGF-IR o los niveles de proteína de IGF-IR en fluidos corporales, tejidos u órganos en comparación con los niveles antes del tratamiento. Otras mediciones incluyen, pero no se limitan a, índices de la afección o el estado patológico que está tratándose, el peso corporal, la tensión arterial, los títulos séricos de indicadores farmacológicos de enfermedad o toxicidad así como mediciones de ADME (absorción, distribución, metabolismo y excreción).

15 La información registrada para cada paciente incluye la edad (años), el género, la altura (cm), la historia familiar de afección o estado patológico (sí/no), clasificación de motivación (algo/moderada/grande) y el número y tipo de regímenes de tratamiento previos para la afección o enfermedad indicada.

20 Los voluntarios que toman parte en este estudio son adultos sanos (edad de 18 a 65 años) y aproximadamente un número igual de sujetos masculinos y femeninos participan en el estudio. Los voluntarios con determinadas características se distribuyen por igual para el tratamiento con placebo e inhibidor de la expresión génica de IGF-IR. En general, los voluntarios tratados con placebo tienen poca o ninguna respuesta al tratamiento, mientras que los voluntarios tratados con el inhibidor de la expresión génica de IGF-IR muestran tendencias positivas en su índice de afección o estado patológico al final del estudio.

25 Ejemplo 12

Aislamiento de ARN

Aislamiento de ARNm poli(A)+

30 Se aisló ARNm poli(A)+ según Miura *et al.* (Clin. Chem. 42: 1758-1764, 1996). Otros métodos para el aislamiento de ARNm poli(A)+ son de rutina en la técnica. En resumen, para células hechas crecer en placas de 96 pocillos, se eliminó el medio de crecimiento de las células y se lavó cada pocillo con 200 µl de PBS frío. Se añadieron 60 µl de tampón de lisis (Tris-HCl 10 mM, pH 7,6, EDTA 1 mM, NaCl 0,5 M, NP-40 al 0,5%, complejo de vanadil-
 35 ribonucleósido 20 mM) a cada pocillo, se agitó la placa suavemente y entonces se incubó a temperatura ambiente durante cinco minutos. Se transfirieron 55 µl de lisado a placas de 96 pocillos recubiertas con Oligo d(T) (AGCT Inc., Irvine CA). Se incubaron las placas durante 60 minutos a temperatura ambiente, se lavaron 3 veces con 200 µl de tampón de lavado (Tris-HCl 10 mM pH 7,6, EDTA 1 mM, NaCl 0,3 M). Tras el lavado final, se secaron las placas sobre servilletas de papel para eliminar el tampón de lavado en exceso y entonces se secaron al aire durante
 40 5 minutos. Se añadieron a cada pocillo 60 µl de tampón de elución (Tris-HCl 5 mM pH 7,6), precalentado hasta 70°C, se incubó la placa sobre una placa caliente a 90°C durante 5 minutos y entonces se transfirió el eluato a una placa de 96 pocillos nueva.

45 Las células hechas crecer en placas de 100 mm u otras placas convencionales pueden tratarse de manera similar, usando volúmenes apropiados de todas las disoluciones.

Aislamiento de ARN total

50 Se aisló el ARN total usando un kit RNEASY 96 (marca comercial) y tampones adquiridos de Qiagen Inc. (Valencia, CA) siguiendo los procedimientos recomendados por el fabricante. En resumen, para células hechas crecer en placas de 96 pocillos, se eliminó el medio de crecimiento de las células y se lavó cada pocillo con 200 µl de PBS frío. Se añadieron a cada pocillo 150 µl de tampón RLT y se agitó la placa vigorosamente durante 20 segundos. Entonces se añadieron a cada pocillo 150 µl de etanol al 70% y se mezcló el contenido pipeteando tres veces arriba y abajo. Se transfirieron entonces las muestras a la placa de pocillos RNEASY 96 (marca comercial) conectada a un
 55 colector QIAVAC (marca comercial) equipado con una bandeja de recogida de desechos y conectado a una fuente de vacío. Se aplicó vacío durante 1 minuto. Se añadieron 500 µl de tampón RW1 a cada pocillo de la placa RNEASY 96 (marca comercial) y se incubó durante 15 minutos y se aplicó de nuevo el vacío durante 1 minuto. Se añadieron 500 µl adicionales de tampón RW1 a cada pocillo de la placa RNEASY 96™ y se aplicó el vacío durante 2 minutos. Se añadió entonces 1 ml de tampón RPE a cada pocillo de la placa RNEASY 96 (marca comercial) y se aplicó el vacío durante un periodo de 90 segundos. Se repitió entonces el lavado con tampón RPE y se aplicó el vacío durante 3 minutos adicionales. Se retiró entonces la placa del colector QIAVAC (marca comercial) y se secó sobre servilletas de papel. Entonces volvió a conectarse la placa al colector QIAVAC (marca comercial) equipado con una gradilla de tubos de recogida que contenía tubos de recogida de 1,2 ml. Se eluyó entonces el ARN pipeteando
 60 140 µl de agua libre de ARNasa a cada pocillo, incubando 1 minuto y aplicando entonces el vacío durante 3 minutos.

65

Las etapas de elución y pipeteo repetitivas pueden automatizarse usando un instrumento Bio-Robot 9604 de QIAGEN (Qiagen, Inc., Valencia CA). Esencialmente, tras la lisis de las células en la placa de cultivo, se transfiere la placa a la plataforma del robot donde se llevan a cabo las etapas de pipeteo, tratamiento con ADNasa y elución.

5 Ejemplo 13

Análisis de PCR cuantitativa en tiempo real de los niveles de ARNm de IGF-1R

Se logró la cuantificación de los niveles ARNm de IGF-1R mediante PCR cuantitativa en tiempo real usando el sistema de detección de secuencias ABI PRISM (marca comercial) 7600, 7700 ó 7900 (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA) según las instrucciones del fabricante. Éste es un sistema de detección de fluorescencia de tubo cerrado, no basado en gel que permite la cuantificación de alto rendimiento de productos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real. En contraposición a la PCR convencional en la que los productos de amplificación se cuantifican tras completarse la PCR, los productos en la PCR cuantitativa en tiempo real se cuantifican a medida que se acumulan. Esto se logra incluyendo en la reacción PCR una sonda de oligonucleótido que se aparea específicamente entre los cebadores de PCR directo e inverso, y contiene dos colorantes fluorescentes. Se une un colorante indicador (por ejemplo, FAM o JOE, obtenido de o bien PE-Applied Biosystems, Foster City, CA, Operon Technologies Inc., Alameda, CA o bien Integrated DNA Technologies Inc., Coralville, IA) al extremo 5' de la sonda y se une un colorante extintor (por ejemplo, TAMRA, obtenido de o bien PE-Applied Biosystems, Foster City, CA, Operon Technologies Inc., Alameda, CA o bien Integrated DNA Technologies Inc., Coralville, IA) al extremo 3' de la sonda. Cuando la sonda y los colorantes están intactos, la emisión del colorante indicador se extingue por la proximidad del colorante extintor en 3'. Durante la amplificación, el apareamiento de la sonda a la secuencia diana crea un sustrato que puede escindirse mediante la actividad exonucleasa 5' de Taq polimerasa. Durante la fase de extensión del ciclo de amplificación por PCR, la escisión de la sonda mediante la Taq polimerasa libera el colorante indicador del resto de la sonda (y por tanto del resto extintor) y se genera una señal fluorescente específica de secuencia. Con cada ciclo, se escinden moléculas de colorante indicador adicionales de sus respectivas sondas, y se monitoriza la intensidad de fluorescencia a intervalos regulares mediante la óptica de láser incorporada en el sistema de detección de secuencias ABI PRISM (marca comercial). En cada ensayo, una serie de reacciones en paralelo que contienen diluciones en serie de ARNm de muestras control no tratadas genera una curva patrón que se usa para cuantificar el porcentaje de inhibición tras el tratamiento con oligonucleótidos antisentido de muestras de prueba.

Antes del análisis de PCR cuantitativa, se evalúan conjuntos de cebador-sonda específicos para el gen diana que está midiéndose para evaluar su capacidad para "multiplexarse" con una reacción de amplificación de GAPDH. En la multiplexación, tanto el gen diana como el gen patrón interno GAPDH se amplifican simultáneamente en una única muestra. En este análisis, se diluye en serie ARNm aislado de células no tratadas. Cada dilución se amplifica en presencia de conjuntos de cebador-sonda específicos para GAPDH sólo, gen diana sólo ("uniplexación") o ambos (multiplexación). Tras la amplificación por PCR, se generan curvas patrón de ARNm de la diana y GAPDH como función de la dilución a partir de las muestras tanto uniplexadas como multiplexadas. Si tanto la pendiente como el coeficiente de correlación de las señales de la diana y GAPDH generadas a partir de las muestras multiplexadas se encuentran dentro del 10% de sus valores correspondientes generados a partir de las muestras uniplexadas, el conjunto de cebador-sonda específico para esa diana se considera multiplexable. También se conocen en la técnica otros métodos de PCR.

Se obtuvieron reactivos de PCR de Invitrogen Corporation, (Carlsbad, CA). Se llevaron a cabo las reacciones de RT-PCR añadiendo 20 µl de cóctel de PCR (tampón de PCR 2,5x menos MgCl₂, MgCl₂ 6,6 mM, 375 µM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP, 375 nM de cada uno de cebador directo y cebador inverso, 125 nM de sonda, 4 unidades de inhibidor de ARNasa, 1,25 unidades de Taq PLATINUM (marca comercial registrada), 5 unidades de transcriptasa inversa de MuLV y colorante ROX 2,5x) a placas de 96 pocillos que contenían 30 µl de disolución de ARN total (20-200 ng). Se llevó a cabo la reacción de RT mediante incubación durante 30 minutos a 48°C. Tras una incubación de 10 minutos a 95°C para activar la Taq PLATINUM (marca comercial registrada), se llevaron a cabo 40 ciclos de un protocolo de PCR de dos etapas: 95°C durante 15 segundos (desnaturalización) seguido por 60°C durante 1,5 minutos (apareamiento/extensión).

Se normalizan las cantidades de diana génica obtenidas mediante RT-PCR en tiempo real usando o bien el nivel de expresión de GAPDH, un gen cuya expresión es constante, o bien cuantificando el ARN total usando RiboGreen (marca comercial) (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR). Se cuantifica la expresión de GAPDH mediante RT-PCR en tiempo real, ejecutándose simultáneamente con la diana, multiplexando o por separado. Se cuantifica el ARN total usando el reactivo de cuantificación de ARN RiboGreen (marca comercial) (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR). Se enseñan métodos de cuantificación de ARN mediante RiboGreen (marca comercial) en Jones *et al.* (Analytical Biochemistry 265: 368-374, 1998).

En este ensayo, se pipetea 170 µl de reactivo de trabajo RiboGreen (marca comercial) (reactivo RiboGreen (marca comercial) diluido 1:350 en Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5) en una placa de 96 pocillos que contiene 30 µl de ARN celular, purificado. Se lee la placa en un instrumento CytoFluor 4000 (PE Applied Biosystems) con excitación a 485 nm y emisión a 530 nm.

ES 2 400 033 T3

Se diseñaron sondas y cebadores para IGF-IR humano para que se hibridasen con la secuencia de nucleótidos de IGF-IR, usando información de secuencia publicada (número de registro de GenBank NM000875 (figuras 2A y 2B), incorporada en el presente documento como SEQ ID NO: 76 o M69229 (SEQ ID NO: 77) que es la región no traducida en 5' de la secuencia génica de IGF-IR). Para IGF-IR humano, los cebadores de PCR eran:

cebador directo: CCCTTTCTTTGCAGTTTTCCC (SEQ ID NO: 82 - ISIS 161212);

cebador inverso: CGTCGTCGGCCTCCATT (SEQ ID NO: 83 - 161214); y

la sonda de PCR era: FAM-CCTTCCTGCCTCTCCGGTTTGA-TAMRA (SEQ ID NO: 84 - ISIS 161215)

en la que FAM es el colorante fluorescente y TAMRA es el colorante extintor. Para GAPDH humano, los cebadores de PCR eran:

cebador directo: GAAGGTGAAGGTCGGAGTC (SEQ ID NO: 94)

cebador inverso: GAAGATGGTGATGGGATTC (SEQ ID NO: 95) y

la sonda de PCR era: 5' JOE-CAAGCTTCCCGTTCTCAGCC-TAMRA 3' (SEQ ID NO: 95 en la que JOE es el colorante indicador fluorescente y TAMRA es el colorante extintor).

Ejemplo 14

Análisis de transferencia de tipo Northern de los niveles de ARNm de IGF-1R

Dieciocho horas tras el tratamiento antisentido, se lavaron las monocapas celulares con PBS frío y se lisaron en 1 ml de RNAZOL (marca comercial) (TEL-TEST "B" Inc., Friendswood, TX). Se preparó ARN total siguiendo los protocolos recomendados por el fabricante. Se fraccionaron veinte microgramos de ARN total mediante electroforesis a través de geles de agarosa al 1,2% p/v que contenían formaldehído al 1,1% v/v usando un sistema de tampón MOPS (AMRESCO, Inc. Solon, OH). Se transfirió el ARN del gel a membranas de nailon HYBOND (marca comercial)-N+ (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) mediante transferencia capilar durante la noche usando un sistema de tampón de transferencia de tipo Northern/Southern (TEL-TEST "B" Inc., Friendswood, TX). Se confirmó la transferencia del ARN mediante visualización por UV. Se fijaron las membranas mediante reticulación con UV usando un reticulador UV STRATALINKER (marca comercial) 2400 (Stratagene, Inc, La Jolla, CA) y luego se estudiaron con sonda usando disolución de hibridación QUICKHYB (marca comercial) (Stratagene, La Jolla, CA) usando las recomendaciones del fabricante para condiciones rigurosas.

Para detectar IGF-IR humano, se preparó una sonda específica de IGF-IR mediante PCR usando el cebador directo para IGF-IR humano CCCTTTCTTTGCAGTTTTCCC (SEQ ID NO: 82 - ISIS 161212) y el cebador inverso para IGF-IR humano, secuencia de cebador inverso CGTCGTCGGCCTCCATT (SEQ ID NO: 83 - ISIS 161214). Para normalizar variaciones en la eficacia de carga y transferencia, se separaron las membranas y se estudiaron con sonda para detectar ARN de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa humano (GAPDH) (Clontech, Palo Alto, CA).

Se visualizaron las membranas hibridadas y se cuantificaron usando un instrumento PHOSPHORIMAGER (marca comercial) y software IMAGEQUANT (marca comercial) V3.3 (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA). Se normalizaron los datos con respecto a los niveles de GAPDH en controles no tratados.

Ejemplo 15

Inhibición antisentido de la expresión de IGF-IR humano

Se diseñaron una serie de compuestos antisentido para seleccionar como diana diferentes regiones del ARNm de IGF-IR humano o la región no traducida en 5', usando secuencias publicadas expuestas en los n.ºs de registro NM000875 (SEQ ID NO: 77) y M69229 (SEQ ID NO: 76). Los compuestos se muestran en la tabla 1. "Sitio diana" indica el primer número de nucleótido (el más próximo al extremo 5') en la secuencia diana particular a la que se une el compuesto. Todos los compuestos en la tabla 1 son ASO de o bien la región no traducida en 5' o bien la región codificante del IGF-IR. Se analizaron los compuestos para determinar su efecto sobre los niveles de ARNm de IGF-IR humano mediante PCR en tiempo real cuantitativa tal como se describió en otros ejemplos en el presente documento (véanse la figura 3 y la tabla 1). Los datos son promedios de tres experimentos. El control positivo para cada punto de datos se identifica en la tabla 1 mediante el número de ID de secuencia. Si está presente, "S.D." indica "sin datos".

Tal como se muestra en la tabla 1, algunos compuestos de partida demostraron al menos algo de inhibición de la expresión de IGF-IR en este ensayo y por tanto se prefieren. Los ejemplos de ASO preferidos incluyen ISIS de ASO 175308, 175302, 175314, 175307, 175317, 175323, 323744, 323747, 323767, 323762 y 323737. Las regiones diana

a las que estas secuencias preferidas son complementarias se denominan en el presente documento “segmentos diana preferidos” y por tanto se prefieren para la selección como diana por compuestos dados a conocer en el presente documento. SEQ ID n.ºs 137 hasta 171 representan segmentos diana preferidos identificados en IGF-1R. El “sitio diana” en la tabla 1 indica el primer número de nucleótido (el más próximo al extremo 5’) en el ácido nucleico diana particular al que se une el oligonucleótido.

Puesto que se ha hallado mediante experimentación que estos “segmentos diana preferidos” están abiertos a, y están accesibles para la hibridación con los compuestos antisentido dados a conocer en el presente documento, un experto en la técnica reconocerá o podrá determinar, usando nada más que experimentación de rutina, realizaciones adicionales que abarcan otros compuestos que se hibridan específicamente con estos segmentos diana preferidos y en consecuencia inhiben la expresión de IGF-1R.

Según la presente descripción, los compuestos antisentido incluyen compuestos oligoméricos antisentido, ASO, ribozimas, oligonucleótidos de secuencia de guía externa (EGS), secuencias de corte y empalme alternativo, cebadores, sondas y otros compuestos oligoméricos cortos que se hibridan a al menos una parte del ácido nucleico diana.

El fin de este ejemplo es investigar la localización epidérmica de ASO con química de dU,dC-fosforotioato de C5-propinilo (C5-propino) o gapmero de 2’-O-(2-metoxi)etilo (gapmero de 2’ MOE) de fosforotioato completo tras la aplicación tópica a piel psoriásica. Se realizaron estudios en explantes de piel psoriásica *ex vivo* tal como se muestra en la figura 1, con microscopía confocal, fluorescencia directa e inmunohistoquímica usados para detectar la localización de ASO. En estudios previos, se ha mostrado que un ASO de C5-propino conjugado con FITC alcanza la capa basal de la epidermis tras la aplicación tópica a piel psoriásica (White *et al.*, Journal of Investigative Dermatology 118: 1003-1007, 2002). En este ejemplo, se encontró que tanto gapmero de 2’ MOE como ASO de C5-propino penetraban en la epidermis de biopsias de piel psoriásica cuando se formulaban en o bien crema o bien metilcelulosa al 5% p/v. Parecía acumularse ASO de ambas químicas en las capas basales de la epidermis tal como se evaluó mediante tanto microscopía de fluorescencia directa como detección inmunohistoquímica de ASO. La localización de FITC-ASO no era obviamente diferente de la de ASO sin FITC.

Aplicación tópica de ASO

Se ha mostrado que ASO de C5-propino se acumula en queratinocitos basales de piel psoriásica humana (pero no normal) tras la aplicación tópica (White *et al.*, 2002, citado anteriormente), presumiblemente debido a la función de barrera comprometida del estrato córneo en la psoriasis. Además, se mostró que se acumulaba un ASO de fosforotioato en los queratinocitos basales de piel humana normal cuando se formulaba en una crema (Mehta *et al.*, J. Invest. Dermatol. 115: 805-812, 2000). Un ASO híbrido de fosforotioato-fosfodiéster en agua destilada no pudo acumularse en queratinocitos basales tras la aplicación tópica a piel humana a pesar de que parecía cruzar el estrato córneo y acumularse en el citoplasma de queratinocitos en las capas superiores de la epidermis (Wingens *et al.*, Lab Invest. 79: 1415-1424, 1999).

El presente ejemplo investigó la localización de ASO de gapmero de 2’ MOE en piel psoriásica humana tras la aplicación tópica.

Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos empleados se enumeran en la tabla 4.

Tabla 4: Lista de los cuatro oligonucleótidos usados en estudios de aplicación tópica. Las secciones subrayadas llevan química de 2’ MOE

| Química | Identificación | Secuencia | Detectado por Ac 2E1 |
|------------|----------------|--|----------------------|
| C5 propino | R451 | UAACACGACGCGAAU-FITC [SEQ ID NO: 53] | Desconocido |
| 2’MOE | ASO 251741 | <u>FITC-TCGTCATCGCTCCTCAGGG</u> [SEQ ID NO: 54] | Sí |
| 2’ MOE | ASO 13920 | <u>TCGTCATCGCTCCTCAGGG</u> [SEQ ID NO: 55] | Sí |
| 2’ MOE | ASO 147979 | <u>FITC-TCCGCGCTGTGACATGCATT</u> [SEQ ID NO: 56] | No |

Recogida de biopsias de piel humana

Se recogieron biopsias de piel psoriásica de voluntarios. Se recogieron hasta 3 biopsias con sacabocados de 8 mm, de grosor completo de cada voluntario por un dermatólogo. La zona de la que se toma la biopsia no se limpió ni se desinfectó antes de la recogida de las biopsias. Se colocaron inmediatamente las biopsias sobre una gasa (humedecida con PBS) y se almacenaron sobre hielo hasta que se usaron (~2 h).

En el momento de la recogida, se puntuó la gravedad de la psoriasis en las biopsias usando el componente PRS

(escala de clasificación de parámetros, “*parameter rating scale*”) de la puntuación PASI (índice de gravedad del área de psoriasis, “*psoriasis area severity index*”) (Fredriksson *et al.*, Dermatologica 157: 238-244, 1978). En resumen, se puntuaron cada uno de eritema (enrojecimiento), induración (hinchazón) y descamación (exfoliación) de desde 0 (ausente) hasta 4 (grave) para proporcionar una puntuación de PRS de 0 a 12.

5 *Microscopía confocal en vivo*

24 h tras la aplicación de FITC-ASO, se retiraron las biopsias de las placas de cultivo y se colocaron en cubreobjetos, con el estrato córneo hacia abajo, y se colocó una gota de PBS sobre la dermis expuesta para mantenerla húmeda. Se realizó entonces microscopía confocal en vivo tal como se describió previamente (White *et al.*, J. Invest. Dermatol. 112: 887-892, 1999; White *et al.*, 2002, citado anteriormente). En resumen, se evaluó la aplicación tópica de FITC-ASO con excitación a 488 nm (láser de ion argón) y detección a 515 nm. El instrumento usado era un microscopio invertido IX70 (Olympus Australia, Melbourne, Australia) conectado a un sistema confocal Optiscan f900e (Optiscan Pty, Melbourne, Australia).

15 La microscopía confocal da como resultado secciones frontales con respecto a la superficie de la piel y para cada biopsia se tomaron una serie de imágenes a profundidad creciente dentro de la epidermis. El trabajo previo indica que puede detectarse fluorescencia hasta 100 µm bajo la superficie usando este método.

20 Con el fin de determinar la ubicación epidérmica de queratinocitos que contienen FITC-ASO, se usaron los criterios de White *et al.*, (1999, citado anteriormente) como guía. Estos criterios eran:

- morfología celular
- 25 • presencia y tamaño de núcleos:
 - corneocitos anucleares
 - núcleos en queratinocitos del estrato granuloso >15 µm
 - 30 ➤ núcleos de queratinocitos basales <10 µm
- profundidad de células (queratinocitos basales al menos 50 µm por debajo de la superficie).

35 *Procesamiento de muestras de tejido*

Tras la microscopía confocal, se fijaron todas las biopsias durante 24 h en paraformaldehído al 4% (4°C) seguido por 48 h en sacarosa 0,5 M (4°C). Se sumergieron entonces las biopsias en etanol graduado (al 70%, 80%, 90% y 2 x 100% cada uno durante 90 min.) seguido por 2 x 90 min. en limoneno y 2 x 90 min en cera de parafina (65°C) usando un procesador de tejido (Shandon Citadel 1000, Shandon Inc, Pittsburgh, EE.UU.). Tras el procesamiento, se incrustaron las biopsias en parafina (Shandon Histocentre 2, Shandon Inc) y se almacenaron a temperatura ambiente hasta que se requirió.

45 Se cortaron secciones de 5 µm de grosor transversales a la epidermis (micrótomo Leica RM2035, Leica Instruments, Wetzlar, Alemania), se transfirieron a portaobjetos de vidrio recubiertos con silano y se secaron a 37°C durante la noche. Se almacenaron las secciones en un recipiente sellado a temperatura ambiente hasta que se procesaron para la evaluación histológica de la psoriasis, fluorescencia directa o inmunohistoquímica.

50 *Evaluación histológica de la psoriasis*

Se desecaron secciones (5 µm) de cada biopsia de piel psoriásica mediante inmersión en limoneno durante 2 x 5 min. seguido por lavados de 5 min. consecutivos en etanol graduado (al 100%, 90%, 80%, 70% y 50%) y 5 min. en agua. Se tiñeron entonces las secciones con hematoxilina de Harris (tiñe los núcleos celulares de color azul) y eosina (tiñe el citoplasma y otras estructuras tisulares de color rosa) antes de lavarse en etanol (2 x 15 s) y limoneno (2 x 15 s). Se cubrieron con el cubreobjetos entonces las secciones con medio de montaje DPX (BDH Laboratory Supplies, Poole, Inglaterra).

Detección de ASO mediante fluorescencia directa

60 Se desecaron secciones y se lavaron tal como se describió anteriormente antes de cubrirse con el cubreobjetos con medio de montaje MOWIOL (Biosciences inc, La Jolla, EE.UU.) que contenía reactivo anti-desvanecimiento DABCO al 2,5% (Sigma, St Louis, EE.UU.). Se ajustó el brillo de la imagen para corregir la autofluorescencia. Se definió la autofluorescencia como la fluorescencia producida a partir de muestra tratada con vehículo (crema o metilcelulosa al 5% p/v).

Detección de ASO mediante inmunohistoquímica (2E1 Ab)

Se descargaron secciones tal como se describió anteriormente y se detectaron ASO usando el anticuerpo 2E1-B5 purificado por afinidad (Berkeley Antibody Company, Berkeley, EE.UU.) suministrado por Isis Pharmaceuticals. El anticuerpo 2E1-B5 es una IgG1 de ratón que reconoce motivos de TGC y GC en oligonucleótidos de fosforotioato (Mehta *et al.*, 2000, citado anteriormente).

Se incubaron las secciones en H₂O₂ al 1% v/v en metanol durante 30 min. para extinguir la actividad peroxidasa endógena, se lavaron con PBS y se incubaron durante 10 min. en proteinasa K lista para usar DAKO (marca comercial registrada) (DAKO corporation, Carpintería, EE.UU.). Se bloquearon las secciones con BSA al 1% p/v/IgG de oveja 20 ug/ml en PBS durante 20 min. antes de una incubación de 45 min. con el anticuerpo primario 2E1 (dilución 1/4000). Se lavaron de nuevo las secciones con PBS y se detectó el anticuerpo primario usando el kit ABC de ratón Vectastain (marca comercial registrada) Elite (Vector Laboratories, Burlingame, EE.UU.). El kit ABC de ratón Vectastain (marca comercial registrada) Elite usa un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón biotinilado que se detecta luego con un complejo de avidina y peroxidasa del rábano biotinilado. Se usó DAB como sustrato de manera que la localización del anticuerpo se indicaba mediante una coloración marrón.

Captura de imágenes

Con la excepción de imágenes confocales (véase “microscopía confocal en vivo” en esta sección), se capturaron todas las imágenes usando una cámara digital de color Sony DXC-950P (Sony, Tokyo, Japón) conectada a un microscopio Nikon E600 (Nikon Corporation, Tokyo, Japón) y controlada mediante un sistema de obtención de imágenes MCID M4 (Imaging Research Inc, St Catharines, Canadá). La excitación de fluorescencia la proporcionó una fuente de energía de lámpara de mercurio de alta presión Nikon HB-10103AF (Nikon Corporation) y se observó a través de un filtro de barrera apropiado.

Evaluación de biopsias de piel psoriásicas

Se recogió piel psoriásica del abdomen, los muslos, la espalda, las nalgas, la espinilla, el codo o las caderas de voluntarios. Se tomaron hasta tres biopsias de cada individuo y se asignaron las biopsias de cada individuo a grupos experimentales separados.

La gravedad de la psoriasis, tal como se determina usando la PRS, era de $6,8 \pm 1,7$ (media \pm DE, n=42) con un intervalo de desde 3 hasta 9. La PRS no era significativamente diferente a través de grupos experimentales ($p=0,9609$, ANOVA no paramétrico de Kruskal-Wallis).

Bajo examen histológico, todas las biopsias parecían psoriásicas aunque había una considerable variación en la morfología entre biopsias. Además de las variaciones en la gravedad de la psoriasis, la variación observada puede deberse a las diferentes ubicaciones corporales de las que se tomaron las biopsias. Era visible una capa de queratinocitos basales engrosada en todas las biopsias, y en muchas (pero no en todas las biopsias), eran evidentes crestas interpapilares alargadas y núcleos celulares en el estrato córneo (paraqueratosis). Se observaron células que se asemejaban a leucocitos invasores en la dermis de la mayoría de las biopsias.

Ejemplo 16

Aplicación tópica de ASO

Para confirmar los resultados de White *et al.*, (2002, citado anteriormente), que demostraban la localización de ASO de C5-propino en queratinocitos basales de biopsias de piel psoriásica, y para investigar la distribución de ASO de 2' MOE tras la aplicación tópica en crema o metilcelulosa al 5% p/v, se aplicaron los siguientes ASO conjugados con FITC a biopsias de piel psoriásica separadas:

- R451 al 0,1% p/p (C5-propino) en metilcelulosa al 5% p/v;
- ISIS 251741 (2' MOE) al 0,1% p/p en metilcelulosa al 5% p/v;
- ISIS 251741 (2' MOE) al 0,1% p/p en crema.

La microscopía de fluorescencia directa mostró tanto el ASO de gapmero de 2' MOE como el ASO de C5-propino en la epidermis de lesiones de piel psoriásica, con fluorescencia claramente presente en núcleos de queratinocitos basales. También puede observarse fluorescencia en núcleos de células que parecen ser leucocitos invasores ubicados en la dermis. No había diferencias aparentes en el patrón de fluorescencia producido por los ASO de C5-propino y de gapmero de 2' MOE tras la aplicación tópica.

Además, ASO de gapmero de 2' MOE en crema mostraron una distribución epidérmica comparable a la observada para ASO de gápmero de 2' MOE formulados en metilcelulosa al 5% p/v, sin diferencias aparentes en la localización

epidérmica de la fluorescencia.

Se confirmaron estos resultados mediante microscopía confocal en vivo que también demostró la localización nuclear de FITC-AON en células que se ajustan a los criterios para queratinocitos basales; núcleos celulares <10 µm y menos de 50 µm por debajo de la superficie). De manera interesante, los ASO parecen estar en los núcleos de corneocitos paraqueratóticos. Las células parecen intermediar entre queratinocitos del estrato granuloso y corneocitos, aunque están presentes en la superficie de la epidermis. En algunos casos, estos queratinocitos parecen excluir los ASO de sus núcleos. Se observaban claramente características consecuentes con la psoriasis que mostraban o bien queratinocitos del estrato granuloso con núcleos mucho más pequeños que lo que se esperaría en piel normal y/o bien queratinocitos basales mucho más próximos a la superficie que lo que se esperaría en piel normal.

Ejemplo 17

15 *Detección de un ASO al 5%, que contiene una adición conocida de FITC-ASO al 0,1%, formulado en crema.*

Pueden emplearse concentraciones de ASO superiores. Por tanto, es útil determinar si un FITC-ASO contenido como una adición conocida al 0,1% en una formulación de ASO total al 5% puede detectarse mediante microscopía de fluorescencia directa y/o microscopía confocal. Se aplicó 2' MOE FITC-ASO ISIS 251741 (al 0,1% p/p) con el 2' MOE ISIS 13920 sin FITC (al 4,9% p/p) en crema a biopsias de piel psoriásica para este fin.

Las imágenes de microscopía confocal y de fluorescencia directa de muestras tratadas con un 2' MOE al 5% que contenía una adición conocida de FITC-ASO al 0,1% mostraron fluorescencia en queratinocitos basales. El aumento de la concentración de ASO no pareció alterar la localización epidérmica de la fluorescencia producida por el FITC-ASO, con una localización similar a la observada tras la aplicación de FITC-ASO al 0,1% solo.

Ejemplo 18

30 *Evaluación comparativa de oligonucleótidos antisentido (ASO)*

Se propone que oligonucleótidos antisentido (ASO) que seleccionan como diana ARNm de IGF-IR son nuevos agentes terapéuticos eficaces para reducir trastornos inflamatorios y/o proliferativos. El fin de este ejemplo es evaluar comparativamente tres ASO de IGF-IR preferidos con química de gapmero de 2' MOE, "5-10-5," de fosforotioato completo contra DT1064 (SEQ ID NO: 78), un ASO de dU,dC-fosforotioato de C5-propinilo de 15 meros. Todas las C y las U en DT1064 se someten a propinilación en C5. Se realizaron estudios en un sistema de transfección de queratinocitos humanos, con los niveles de proteína y de ARNm de IGF-IR la proliferación celular como criterios de valoración. En estudios previos DT1064 inhibió satisfactoriamente la expresión de IGF-IR en este sistema (Wraight *et al.*, 2000, citado anteriormente; Fogarty *et al.*, Antisense Nucleic Acid Drug Development 12: 369-377, 2002).

40 Los resultados muestran que los tres ASO de IGF-IR reducían el ARNm de IGF-IR con la misma potencia que DT1064. También se redujeron los niveles de proteína de IGF-IR y las tasas de proliferación mediante los ASO.

45 Estos hallazgos apoyan el uso de la química de gapmero de 2' MOE para la inactivación del ARNm de IGF-IR. Basándose en su rendimiento en los estudios presentados en este ejemplo, ASO 175317 es un ASO de gapmero de 2' MOE particularmente útil para ensayos terapéuticos.

Gapmeros de 2' MOE

50 Los tres gapmeros de 2' MOE, "5-10-5", compuestos de partida de fosforotioato mostraron inhibición dependiente de la concentración del ARNm de IGF-IR en células A549 (células epiteliales de pulmón humanas) tal como se evalúa mediante PCR en tiempo real, figura 3. Se evaluaron los tres compuestos de partida para determinar su actividad en un sistema de transfección de células cutáneas de queratinocitos humanos.

55 *Evaluación comparativa in vitro de gapmeros de 2' MOE*

Los tres ASO de partida se han "evaluado comparativamente" *in vitro* contra DT1064 con los siguientes criterios de valoración:

- 60 1. ARNm de IGF-IR total evaluado mediante PCR en tiempo real;
2. Proteína de IGF-IR celular total determinada mediante inmunotransferencia;
- 65 3. Tasa de crecimiento de células de queratinocitos HaCaT sometida a ensayo mediante unión de colorante negro de amido.

Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos usados en este estudio se muestran en la tabla 2.

5 Tabla 2: Lista de los siete oligonucleótidos usados para pruebas *in vitro*. Las secuencias de nucleótidos de los ASO se presentan en la figura 3.

| | Química | Identificación | Antisentido/control |
|---|--|----------------|--------------------------|
| 1 | dU,dC-fosforotioato de C5-propynilo | DT1064 | A |
| 2 | (Abreviatura: C5-propino) | DT6416 | C (apareamiento erróneo) |
| 3 | | R451 | C (al azar) |
| 4 | gapmero de 2'-O-(2-metoxi)etilo, 5,10,5, | ISIS 175314 | A |
| 5 | fosforotioato en todas partes | ISIS 175317 | A |
| 6 | (Abreviatura: gapmero de 2' MOE) | ISIS 175323 | A |
| 7 | | ISIS 129691 | C (al azar) |

Cultivo celular

10 Se usó en este estudio la línea celular de queratinocitos humanos inmortalizados espontáneamente, HaCaT (Boukamp *et al.*, 1988, citado anteriormente). Se mantuvieron las células como cultivos en monocapa en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con suero de ternero fetal (FCS) al 10% p/v a 37°C en una atmósfera del 5% v/v de CO₂.

15 *Transfección de queratinocitos con oligonucleótidos antisentido*

Se sembraron queratinocitos HaCaT (número de pase de 44 a 47) en los pocillos de placas de 96 pocillos (PCR en tiempo real), 24 pocillos (proliferación celular) o 12 pocillos (inmunotransferencia o apoptosis). Se trataron células confluentes al 85-95% con la preparación de liposomas, Cytofectin GSV (GSV; Glen Research, Sterling Virginia, EE.UU.) sola, o complejada con oligonucleótidos antisentido o control. También se estudiaron células no tratadas (control no tratado). Se diluyó cada oligonucleótido antisentido o control en DMEM libre de suero hasta 20X la concentración final deseada y se mezcló con un volumen igual de GSV (40 µg/ml). Se dejó que las mezclas de lípido/oligonucleótido se complejaran a temperatura ambiente durante 10 min., luego se diluyeron diez veces con DMEM que contenía FCS al 10% p/v. Se transfectaron las células con concentraciones finales de oligonucleótido 6,25, 25, 100 ó 400 nM y GSV 2 µg/ml. Se realizaron las transfecciones en pocillos duplicados, mientras que se procesaron células no tratadas y tratadas con GSV en cuatro pocillos repetidos.

Niveles de ARNm de IGF-1R

30 Se extrajo el ARN total usando un kit RNEASY (marca comercial registrada) Mini (Qiagen Inc., Valencia, CA, EE.UU.) y de 0,5 a 1 µg se transcribieron de manera inversa usando el kit de PCR para ARN GeneAmp (marca comercial registrada) (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.), según las instrucciones del fabricante. Se usó PCR en tiempo real semicuantitativa para determinar la cantidad de ARNm de receptor de IGF-I en la muestra en relación con células tratadas con GSV solo. Se usaron reactivos desarrollados previamente para el receptor de IGF-I humano (Applied Biosystems, n.º de producto 4319442F) y 18S (n.º de producto 4319413E) que contenían cebadores y sondas fluorescentes TaqMan (marca comercial registrada) en una reacción PCR múltiple para amplificar simultáneamente ambos productos en cada muestra. Se usó un detector de secuencias ABI Prism (marca comercial) 7700 (Applied Biosystems) para el análisis. Se normalizaron entonces los niveles de ARNm de IGF-1R con respecto a 18S. Se usaron dos protocolos de transfección, se transfectaron las células (1) una vez, 18 h antes de la extracción del ARN, o (2) un total de dos veces, a las 24 y 48 h antes de la extracción del ARN.

Niveles de proteína de IGF-1R

45 Tras las transfecciones con oligonucleótidos cada 24 h durante tres días, se lavaron las monocapas celulares con PBS, luego se lisaron en un tampón que contenía HEPES 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, MgCl₂ 1,5 mM, glicerol al 10% v/v, Triton X-100 al 1% v/v, aprotinina 100 µg/ml. Se sometió a ensayo la concentración de proteína total de los lisados con el kit de ensayo de proteína BCA (Pierce; Rockford, Illinois, EE.UU.) que usa BSA como patrón de proteína. Se resolvieron 25 ó 30 µg de cada lisado mediante SDS-PAGE (acilamida al 7% p/v), entonces se transfirieron a membrana Immobilon-P (Millipore, Bedford, Massachusetts). Se bloquearon los sitios de unión no específica con leche en polvo desnatada al 5% p/v, luego se estudió con sonda el filtro con IgG policlonal de conejo que reconoce la subunidad α de la proteína de IGF-1R (C-20; Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EE.UU.). Se reveló la señal específica de IGF-1R usando el kit de inmunotransferencia de tipo Western ECF (Amersham, Buckinghamshire, Inglaterra, RU) y se detectó mediante exploración con Posphorimager y

quimiofluorescencia seguido por cuantificación con el software ImageQuant (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, EE.UU.). Se controló la variación entre filtros mediante normalización de las intensidades de señal con respecto a la señal media para células tratadas con GSV solo.

5 *Ensayo de proliferación celular*

Se hicieron crecer células hasta el 40% de confluencia en placas de 24 pocillos y se transfectaron cada 24 h durante hasta 3 días. Se determinó el número de células a las 0, 24, 48 y 72 h usando un protocolo de unión de negro de amido en el que la unión de negro de amido a proteína celular (cuantificada espectrofotométricamente) se correlaciona con el número de células (Schultz *et al.*, J. Immunol. Methods 167: 1-13, 1994). En resumen, se fijaron las monocapas celulares con glutaraldehído al 1% v/v en PBS, luego se tiñeron con negro de amido al 0,1% p/v en acetato de Na a pH 3,5 durante 30 min. Tras un único lavado en H₂O ácida, se eluyó el colorante unido a proteína con NaOH (50 mM) y se monitorizó la absorbancia del eluato a 620 nm. Los datos se expresan en relación con la señal determinada para células tratadas con GSV a 0 h.

15 *ARNm de IGF-1R*

La figura 4 muestra los datos de PCR en tiempo real de IGF-1R para queratinocitos HaCaT tratados con gapmeros de 2' MOE o C5-propino. Los resultados eran similares si las células se transfectaron una vez (figura 4A), o dos veces (figura 4B). Los niveles de ARNm de IGF-1R eran inferiores en células transfectadas con DT1064, en consonancia con los niveles notificados anteriormente usando ensayos de protección de ARNasa [Fogarty *et al.*, 2002, citado anteriormente]. Los tres ASO de partida también provocaron la inactivación del ARNm de IGF-1R. Además, la inactivación del ARNm de IGF-1R era similar para los tres ASO de partida y DT1064. Por ejemplo, en la figura 4A, a ASO 100 nM, la reducción promedio en el ARNm era del 68%, 77%, 75% y 78% para ASO 175314, ASO 175317, ASO 175323 y DT1064, respectivamente.

Proteína de IGF-1R

La figura 5A muestra una inmunotransferencia de tipo Western de receptor de IGF-I representativa de células HaCaT transfectadas con gapmero de 2' MOE o C5 propino. La proteína de IGF-1R (cadena α) aparece como una única banda de peso molecular de 110 kD.

Se combinan las intensidades de bandas (expresadas en relación con células tratadas con GSV solo) a partir de tres experimentos separados y se presentan en la figura 5B. Los datos muestran que DT1064 suprimió de manera potente los niveles de proteína de IGF-1R tal como se mostró previamente (Fogarty *et al.*, 2002, citado anteriormente). En relación con células tratadas con GSV solo, los tres ASO de partida redujeron significativamente la proteína de IGF-1R a 25 nM y 100 nM (P<0,01). ISIS 175317 e ISIS 175323, pero no ISIS 175314, inactivaron la proteína de IGF-1R a la concentración de 400 nM (P<0,01). No hubo inactivación significativa de la proteína de IGF-1R con ISIS 175317 o ISIS 175323 a la concentración más baja, 6,25 nM.

En relación con el control de GSV, la transfección de células HaCaT con DT1064 proporcionó una reducción máxima aparente del 75% cuando se trataron las células a una concentración de 100 nM, mientras que los niveles de proteína de IGF-1R con ISIS 175317 eran aproximadamente del 60%. La inactivación de la proteína de IGF-1R asociada con cada uno de los ASO se expresa como un porcentaje de su control apropiado. Esto muestra que la capacidad de los ASO para inactivar la proteína diana es comparable a la de DT1064 (véase la tabla 3).

Tabla 3: Inactivación de la proteína de IGF-1R con ASO expresados como un porcentaje de los oligonucleótidos control de la misma química a la misma concentración

| | 6,25 nM | 25 nM | 100 nM | 400 nM |
|-------------------------------|---------|-------|--------|--------|
| DT1064 (en relación con 6416) | 34 | 48 | 59 | 41 |
| DT1064 (en relación con R451) | 36 | 53 | 64 | 35 |
| ISIS 175314 | 35 | 57** | 51** | 30 |
| ISIS 175317 | 28 | 60*** | 65*** | 50** |
| ISIS 175323 | 19 | 50*** | 58*** | 44** |

50 * P<0,5, **P<0,01, ***P<0,001 frente a proteína de IGF-1R en células HaCaT transfectadas con oligonucleótido de la misma química y dosis; prueba de Tukey.

Proliferación celular

55 El efecto ASO específicos de IGF-1R y oligonucleótidos control sobre la proliferación de HaCaT se muestra en la figura 6. En células no tratadas, los números de células de queratinocitos aumentaron más de cuatro veces a lo

largo de tres días. Las células tratadas con GSV también aumentaron en número aunque no en el mismo grado que las células no tratadas (el 64% de las no tratadas a las 72 h) lo que sugiere algún efecto del lípido sobre las tasas de proliferación. En relación con células no tratadas y tratadas con GSV, todas las células tratadas con oligonucleótidos mostraron tasas inferiores de proliferación celular a lo largo de los 3 días, teniendo las células tratadas con DT1064 las tasas más bajas de proliferación celular en todos los puntos de tiempo y a todas las concentraciones de oligonucleótido. De los ASO sometidos a prueba, había una tendencia de que ISIS 175317 estuviese asociado con las tasas más baja de proliferación celular lo más notablemente a la concentración de 400 nM.

Se han sometido a prueba tres ASO de partida de IGF-IR en el sistema de transfección de queratinocitos HaCaT en MCRI. Los hallazgos principales son:

Los tres ASO de partida redujeron los niveles de ARNm de IGF-IR en comparación con el control de GSV y el oligonucleótido al azar de gapmero de 2' MOE. En relación con DT1064, los ASO de partida proporcionaron una reducción similar en el ARNm de IGF-IR.

- Los tres ASO de partida redujeron significativamente la proteína de IGF-IR en relación con el control de GSV y el oligonucleótido al azar de 2' MOE. Los ASO de partida redujeron los niveles de proteína de IGF-IR. Sin embargo, cuando se expresaba como un porcentaje de inactivación en relación con oligonucleótidos de control de la misma química, el efecto de los ASO de partida era similar al de DT1064.

- Los tres ASO de partida redujeron las tasas de proliferación celular en relación con el control de GSV.

Mantenimiento ex vivo de biopsias de piel psoriásica

Se mantuvieron biopsias durante 24 h tal como se describió anteriormente (Russo *et al.*, Endocrinology 135: 1437-1446, 1994; White *et al.*, 2002, citado anteriormente). En resumen, se eliminó la grasa subcutánea de las biopsias antes de que se colocaran, con la dermis hacia abajo, sobre un tapón de agar BACTO (marca comercial) (Becton Dickinson, Franklin Lakes, EE.UU.) formado en el medio de una malla de acero inoxidable triangular. Se diseñó la malla de acero para que se ajustara al pocillo central de una placa de cultivo de órganos de pocillo central FALCON (marca comercial registrada) de 60 mm (Becton Dickinson) de modo que el tapón de agar estaba suspendido sobre el pocillo central. Se llenó el pocillo central con medio de Eagle modificado por Dulbecco (que contenía suero de ternero fetal al 10% p/v, penicilina 50 UI/ml, estreptomycin 50 ug/ml) hasta el nivel del tapón de agar y el pocillo exterior se llenó con PBS para mantener la humedad. Se incubaron las biopsias a 37°C en una atmósfera del 5% v/v de CO₂. La figura 1 muestra la disposición del aparato de tejido.

Ejemplo 19

Comparación de la microscopía de fluorescencia directa y la inmunohistoquímica para la detección de ASO.

Se formuló el 2' MOE FITC-ASO ISIS 251741 al 0,1% p/p en metilcelulosa al 5% p/v y se aplicó por vía tópica a biopsias de piel psoriásica. Tanto fluorescencia directa como inmunohistoquímica con el anticuerpo 2E1 pueden detectar ISIS 251741. Esta característica permitió el uso de secciones adyacentes para comparar directamente la localización de ASO tal como se determina mediante las dos tecnologías de detección.

Ambos métodos de detección muestran una distribución notablemente similar de ASO. Ambos métodos muestran acumulación de ASO en queratinocitos basales, exclusión de ASO de los núcleos de la mayoría de los queratinocitos del estrato granuloso y ASO en los núcleos de células que parecen ser leucocitos invasores ubicados en la dermis. La acumulación de ASO en el estrato córneo es evidente usando ambos métodos de detección.

Estos resultados indican que tanto fluorescencia directa como inmunohistoquímica son métodos viables para la detección de ASO en piel, sin embargo, ambas metodologías tienen sus puntos fuertes y debilidades. La digestión de secciones de piel con proteinasa K (requerida antes de la inmunohistoquímica) a menudo da como resultado la degradación de la morfología del tejido. La detección inmunohistoquímica de ASO también está limitada a ASO de química (fosforotioato) y secuencia de nucleótidos (motivos TGC o GC) específicas mientras que cualquier ASO puede conjugarse con FITC. Además, la detección inmunohistoquímica de ASO parece ser más variable que la detección de ASO mediante fluorescencia directa. Sin embargo, las secciones teñidas de manera inmunohistoquímica pueden almacenarse y utilizarse también durante un periodo de tiempo más largo que las secciones fluorescentes, que se desvanecen con el tiempo. Además, hay una falta de datos referentes a los efectos de la conjugación con FITC sobre las propiedades fisicoquímicas de ASO.

Ejemplo 20

Efecto de la conjugación con FITC sobre la localización epidérmica de ASO tras la aplicación tópica

Con el fin de determinar si una etiqueta de FITC unida a un ASO altera la localización epidérmica del ASO tras la aplicación tópica, se trataron las biopsias con una mezcla de ASO que contenía el ASO sin FITC ISIS 13920

(detectable mediante inmunohistoquímica pero no fluorescencia directa) y el FITC-ASO ISIS 147979 (detectable mediante fluorescencia directa pero no inmunohistoquímica). La comparación de secciones en serie de tejidos tratados con esta mezcla no mostró diferencias aparentes entre la localización de los dos ASO. Estos datos indican que en biopsias de piel psoriásica, una etiqueta de FITC sobre un ASO no altera la localización epidérmica.

5 Con el fin de controlar la posibilidad de que el FITC-ASO pueda afectar a la localización epidérmica de ISIS 13920, se trataron las biopsias con ISIS 13920 al 0,1% p/v solo. Tal como puede observarse, la detección inmunohistoquímica de ISIS 13920 demuestra un patrón de distribución de ASO aparentemente no diferente del observado para ASO 13920 mezclado con ISIS 147979.

10 Se investigó la localización de ASO de 2' MOE aplicados por vía tópica en la epidermis de lesiones de piel psoriásica y se comparó con ASO de C5-propino. Los cinco hallazgos principales son:

15 • ASO de gapmero de 2' MOE aplicados por vía tópica en o bien metilcelulosa al 5% p/v o bien crema podían cruzar el estrato córneo de lesiones de piel psoriásica. ASO localizados en los núcleos de queratinocitos basales en la epidermis y leucocitos invasores en la dermis.

20 • La localización epidérmica tras la aplicación tópica no parece diferir entre ASO de C5-propino y gapmero de 2' MOE.

• Tras la aplicación tópica, pueden detectarse ASO de gapmero de 2' MOE en los núcleos de queratinocitos basales tanto mediante microscopía de fluorescencia directa (ASO conjugado con FITC sólo) como mediante inmunohistoquímica con el Ac 2E1.

25 • La conjugación con FITC de ASO no parece alterar su capacidad para alcanzar queratinocitos basales o su localización epidérmica tras la aplicación tópica.

Ejemplo 21

Formulación del fármaco

Se resuspendieron ASO liofilizados en agua destilada, estéril y se determinó la concentración de ASO mediante su densidad óptica a 260 nm antes de su formulación en o bien un gel de metilcelulosa al 5% p/v o bien en una crema (Isis Pharmaceuticals). La crema contenía:

35 • miristato de isopropilo (10% p/p)

• monoestearato de glicerilo (10% p/p)

40 • estearato de polioxilo 40 (15% p/p)

• hidroxipropilmetilcelulosa (0,5% p/p)

45 • fosfato de sodio monobásico monohidratado (0,3% p/p)

• fosfato de sodio dibásico heptahidratado (0,9% p/p)

• fenoxietanol (2,5% p/p)

50 • metilparabeno (0,5% p/p)

• propilparabeno (0,5% p/p)

• agua purificada (59,8% p/p)

55 Para la formulación en metilcelulosa al 5% p/v, se diluyó metilcelulosa al 10% p/v (en PBS) dos veces con PBS que contenía ASO a dos veces la concentración final deseada.

60 Para la formulación en crema, se secaron ASO (secadora de vacío DNA Mini, Medos company, Melbourne, Australia) y luego se disolvieron en una cantidad apropiada de crema para dar la concentración final deseada.

Ejemplo 22

Aplicación del fármaco

65 Aproximadamente 30 min. tras transferirse las biopsias a 37°C, se pesaron ASO o vehículo (30 mg) y se aplicaron

directamente a una región central de aproximadamente 4 mm de diámetro de las biopsias con una espátula pequeña. Un anillo delgado alrededor del borde de la biopsia se mantuvo libre de ASO o vehículo con el fin de evitar la aplicación de ASO al borde expuesto de la muestra. A pesar de estas precauciones, en aproximadamente el 20% de las biopsias los ASO parecían haber estado en contacto con los bordes de la biopsia tal como se evaluó mediante microscopia de fluorescencia directa.

Ejemplo 23

Grupos experimentales

De acuerdo con los objetivos de este ejemplo, se aplicaron formulaciones de ASO a al menos cuatro biopsias de diferentes individuos. Las formulaciones de ASO y los controles usados fueron:

- R451 al 0,1% p/p en metilcelulosa al 5%
- ISIS 251741 al 0,1% p/p en metilcelulosa al 5% p/v
- ISIS 251741 al 0,1% p/p en crema
- ISIS 251741 al 0,1% p/p mezclado con ASO 13920 al 4,9% p/2 en crema
- ISIS 13920 al 0,1% p/p en metilcelulosa al 5% p/v
- ISIS 147979 al 0,1% p/p mezclado con ASO 13920 al 0,1% p/p en metilcelulosa al 5% v/v
- ISIS 147979 al 0,1% p/p en metilcelulosa al 5% p/v
- metilcelulosa al 5% p/v sola.
- Crema sola.

Ejemplo 24

Evaluación comparativa para ISIS 175317 y DT1064

Este ejemplo muestra la evaluación comparativa de IGF-IR humano identificado en una selección primaria contra ASO de IGF-IR (ISIS 175317) y DT1064 en queratinocitos HaCaT.

Se midieron los niveles de ARNm de IGF-IR mediante PCR en tiempo real tras la transfección durante la noche transfección de queratinocitos HaCaT con ASO de IGF-IR y oligonucleótidos control. Los resultados muestran que los cuatro nuevos compuestos de partida, así como ISIS 175317 y DT1064, inhibían de manera potente los niveles de ARNm de IGF-IR de una manera dependiente de la concentración y específica de secuencia. En relación con células HaCaT tratadas con el reactivo de transfección solo, ninguno de los cuatro ASO de IGF-IR recientemente identificados suprimió los niveles de ARNm de IGF-IR con eficacia o potencia superior a ISIS 175317.

Oligonucleótidos

Tabla 5: Lista de los oligonucleótidos usados para pruebas *in vitro*

| | Química | Identificación | Antisentido/control |
|---|---|-----------------------|--|
| 1 | gapmero de 2'-O-(2-metoxi)etilo, 5,10,5, fosforotioato en todas partes Todas las bases de citosina metiladas (Abreviatura: gapmero de 2' MOE) | ISIS 175317 | A |
| 2 | | ISIS 323737 | A |
| 3 | | ISIS 323744 | A |
| 4 | | ISIS 323762 | A |
| 5 | | ISIS 323767 | A |
| 6 | | ISIS 306064 | C (apareamiento erróneo de 8 nucleótidos para ISIS 175317) |
| 7 | | ISIS 129691 | C (al azar) |
| 8 | dU,dC-fosforotioato de C5-propinilo (Abreviatura: C5-propino) | DT1064 | A |
| 9 | | DT6416 | C (apareamiento erróneo de 15 nucleótidos para DT1064) |

Se confirmó la concentración de cada oligonucleótido mediante su absorbancia UV a 260 nm antes de su uso.

Transfección de queratinocitos con oligonucleótidos antisentido

5 Se mantuvieron queratinocitos HaCaT como cultivos en monocapa en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con suero de ternero fetal (FCS) al 10% v/v a 37°C en una atmósfera del 5% v/v de CO₂/95% v/v de O₂.

10 Se sembraron queratinocitos HaCaT [número de pases 62 y 63 (figura 8) y 45 (figura 10)] en los pocillos de placas de 96 pocillos. Se trataron células confluentes al 85-95% con la preparación de liposomas, Cytofectin GSV sola, o complejada con oligonucleótidos antisentido o control durante 20 h. También se estudiaron células no tratadas (control no tratado). Se mezcló cada oligonucleótido antisentido o control (concentración final de 20X) en DMEM libre de suero con un volumen igual de GSV (concentración final de 20X; 40 µg/ml). Se dejó que las mezclas de
15 lípido/oligonucleótido se complejaran a temperatura ambiente durante 10-15 min., luego se diluyeron diez veces con DMEM que contenía FCS al 10% v/v. Se transfectaron las células con oligonucleótido (intervalo de concentración final de 0,4 a 200 nM) y GSV 2 µg/ml. Se realizaron las transfecciones en pocillos duplicados, mientras que se procesaron células no tratadas y tratadas con GSV en cuatro y seis pocillos repetidos, respectivamente.

20 Niveles de ARNm de receptor de IGF-I

Se extrajo el ARN total usando un kit RNeasy® Mini (Qiagen Inc., Valencia, California, EE.UU.) y aproximadamente de 0,1 a 0,2 µg se transcribieron de manera inversa usando el kit de PCR para ARN GeneAmp® (Applied Biosystems, Foster City, California, EE.UU.), según las instrucciones del fabricante. Se usó PCR en tiempo real
25 semicuantitativa para determinar la cantidad de ARNm de receptor de IGF-I en la muestra en relación con células tratadas con Cytofectin GSV solo. Se usaron reactivos desarrollados previamente para el receptor de IGF-I humano (Applied Biosystems, n.º de producto 4319442F) y ARN ribosómico 18S (n.º de producto 4319413E) que contenían cebadores y sondas fluorescentes TaqMan (marca comercial registrada) en una reacción PCR múltiple para amplificar simultáneamente ambos productos en cada muestra. Se usó un detector de secuencias ABI Prism™ 7700
30 (Applied Biosystems) para el análisis. Se normalizaron entonces los niveles de ARNm de receptor de IGF-1 con respecto a ARN ribosómico 18S.

Efectos biológicos

35 Se estudió inicialmente el efecto de oligonucleótidos antisentido y control oligonucleótidos sobre los niveles de ARNm de IGF-IR a concentraciones de 6, 13, 25, 50, 100 y 200 nM. Se eligieron estas concentraciones porque cubrían un intervalo que permitiría una comparación de datos con experimentos de evaluación comparativa *in vitro* previos usando gapmeros de 2'MOE en queratinocitos HaCaT.

40 La figura 8 muestra los niveles de ARNm de receptor de IGF-I para dos experimentos en los que se transfectaron queratinocitos HaCaT con oligonucleótidos de gapmeros de 2' MOE (ISIS 175317, ISIS 323737, ISIS 323744, ISIS 323762, ISIS 323767, ISIS 129691 o ISIS 306064) o de C5-propino (DT1064 o 6416). En relación con células tratadas con GSV, los cinco ASO de gapmero de 2'MOE suprimieron de manera potente los niveles de ARNm de IGF-IR (figura 9). La inactivación máxima de la diana era similar para cada ASO de 2'MOE (intervalo del 71-77%). La
45 tabla 6 muestra la eficacia máxima de los ASO de partida de IGF-IR.

Tabla 6: Eficacia máxima de ASO de partida de IGF-IR de ISIS

| ASO de IGF-1R de gapmero de 2' MOE | Niveles de ARNm de IGF-IR (% de células tratadas con cytofectin GSV) |
|------------------------------------|---|
| ISIS 323762 | 23,1 |
| ISIS 323767 | 24,3 |
| ISIS 175317 | 26,8 |
| ISIS 323737 | 27,5 |
| ISIS 323744 | 29,5 |

Calculada a partir de la eficacia máxima de los niveles de ARNm de IGF-IR (% de células tratadas con GSV citofectina) notificada en la figura 2

50 En contraposición, los niveles de ARNm de IGF-IR para los dos oligonucleótidos de control de gapmero de 2'MOE (ISIS 129691 y ISIS 306064) eran similares a los niveles de las células tratadas con GSV, lo que indica que el efecto del ASO de gapmero de 2'MOE sobre los niveles de ARNm de IGF-IR era específico de secuencia (figura 8). El efecto de DT1064 sobre la supresión de IGF-IR era máximo al 77% a 100 nM. Sin embargo, la transfección de células HaCaT con el oligonucleótido de control de apareamiento erróneo de C-5 propino (6416) también suprimía

los niveles de ARNm de IGF-IR hasta el 46% a la misma concentración. Esto concordaba con los datos previos.

5 Puesto que se observó supresión máxima o casi máxima de los niveles de ARNm de IGF-IR con los ASO en el intervalo de concentración de desde 25 hasta 200 nM, era difícil diferenciar entre la eficacia de los cinco ASO de 2'MOE. Por tanto, se decidió someter a prueba su efecto a concentraciones inferiores. La figura 10 muestra los niveles de ARNm de IGF-IR a partir de un único experimento en el que se trataron células HaCaT con oligonucleótidos a 0,4, 1,6, 3, 6, 25 ó 100 nM. Como en los experimentos anteriores a las concentraciones superiores, los cinco ASO de 2'MOE suprimieron específicamente los niveles de ARNm de IGF-IR, y lo hicieron con potencia similar. La inhibición máxima del ARNm de IGF-IR era del 87% para ISIS 175317, similar a la del ASO de gapmero de 2'MOE recientemente identificado (intervalo del 79-85% de GSV). La respuesta al tratamiento con ASO era dependiente de la concentración en este intervalo. El tratamiento de queratinocitos HaCaT con DT1064 25 nM suprimió los niveles de ARNm de IGF-IR en un 81%, similar al ASO de gapmero de 2'MOE.

15 La figura 11 muestra las curvas de concentración-respuesta para los ASO de 2'MOE dirigidos a IGF-IR (mismos datos que la figura 10). Con la posible excepción de ISIS 323767, estos datos indican potencias similares de ISIS 175317 y los gapmeros de 2'MOE. Esto se refleja en la CE₅₀ calculada a partir de las curvas de concentración-respuesta y enumerada en la tabla 7. La CE₅₀ para DT1064 era de 3,2 nM (I.C. 2,1 - 4,7). Es importante observar que los valores de CE₅₀ presentados en la tabla 7 se calcularon a partir de un único experimento y se facilitan como una estimación sólo. Se requerirían experimentos de concentración-respuesta adicionales para proporcionar una estimación más exacta de los valores de CE₅₀ para los ASO.

Tabla 7: CE₅₀ media (intervalos de confianza del 50%) para la supresión por ASO de gapmero de 2'MOE de los niveles de ARNm de IGF-IR en queratinocitos HaCaT

| ASO de gapmero de 2'MOE | CE ₅₀ [nM] |
|-------------------------|-----------------------|
| ISIS 175317 | 2,6 (1,8-3,6) |
| ISIS 323744 | 2,8 (2,2-3,6) |
| ISIS 323737 | 3,2 (0,4-25,8) |
| ISIS 323762 | 3,3 (2,4-4,3) |
| ISIS 323767 | 4,2 (2,4-7,4) |

25 Se realizaron los experimentos de concentración-respuesta notificados en el presente documento dos veces al intervalo de concentración superior y no mostraron diferencia en la eficacia máxima (tabla 6). Se realizó el experimento de concentración-respuesta una vez al intervalo de concentración inferior. En todas las concentraciones estudiadas (de 0,4 a 200 nM), ninguno de los cuatro compuestos de partida usados en este ejemplo parecían presentar una inactivación del ARNm de IGF-IR mayor que ISIS 175317 en queratinocitos HaCaT (figuras 9 y 11). El examen de las curvas de concentración-respuesta mostró una potencia similar entre ISIS 175317 y los cuatro compuestos de partida tal como se evalúa mediante la CE₅₀ (figura 11).

Oligonucleótido antisentido

35 Se proporcionan detalles de los ASO de IGF-IR usados en este ejemplo en la tabla 5. Los nucleótidos subrayados son modificaciones con 2'MOE. Todas las bases de citosina están metiladas.

Tabla 5: ASO de IGH-IR

| Química | Identificación | Secuencia |
|---|------------------------------|-----------------------------|
| Gapmero de 2'MOE, fosforotioato en todas partes | ISIS 175317 (SEQ ID NO: 125) | <u>CGAAGGAAACAATACTCCGA</u> |

40 Se fabricó ISIS 175317 (SEQ ID NO: 125) en calidad de grado de investigación por Isis Pharmaceuticals, California, EE.UU.

Recogida de biopsias de piel psoriásica

45 Se recogieron biopsias de piel psoriásica de once voluntarios en condiciones éticas (protocolo 22023A del Royal Children's Hospital Ethics in Human Research Committee, Melbourne, Australia). Se recogieron tres biopsias con sacabocados de 8 mm, de grosor completo de la misma lesión en cada voluntario por un dermatólogo. La zona de la que se tomaron las biopsias no se limpió ni se desinfectó antes de la recogida de la biopsia. Se colocaron inmediatamente las biopsias sobre una gasa (humedecida con PBS) y se almacenaron sobre hielo hasta que se usaron (~2 h). En el momento de la recogida, se puntuó la gravedad de la psoriasis en las biopsias usando el componente PRS (escala de clasificación de parámetros) de la puntuación PASI (índice de gravedad del área de psoriasis) (Fredriksson *et al.*, 1978 citado anteriormente). En resumen, se puntuaron cada uno de eritema (enrojecimiento), induración (hinchazón) y descamación (exfoliación) de desde 0 (ausente) hasta 4 (grave) para

proporcionar una puntuación de PRS de 0 a 12.

Mantenimiento *ex vivo* de biopsias de piel psoriásica

5 Se mantuvieron biopsias durante 24 h tal como se describió anteriormente (Russo *et al.*, 1994, citado anteriormente; White *et al.*, 2002, citado anteriormente). En resumen, se eliminó la grasa subcutánea de las biopsias antes de que se colocaran, con la dermis hacia abajo, sobre un tapón de agar BACTO™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, EE.UU.) formado en el medio de una malla de acero inoxidable triangular. Se diseñó la malla de acero para que se ajustara al pocillo central de una placa de cultivo de órganos de pocillo central FALCON (marca comercial registrada) de 60 mm (Becton Dickinson) de modo que el tapón de agar estaba suspendido sobre el pocillo central. Se llenó el pocillo central con medio de Eagle modificado por Dulbecco (que contenía suero de ternero fetal al 10% p/v, penicilina 50 UI/ml, estreptomycin 50 ug/ml) hasta el nivel del tapón de agar y el pocillo exterior se llenó con PBS para mantener la humedad. Se incubaron las biopsias a 37°C en una atmósfera del 5% v/v de CO₂. La disposición del aparato de tejido se muestra en la figura 1.

15

Formulación del fármaco

Se resuspendió ISIS 175317 (SEQ ID NO: 125) liofilizado en agua destilada estéril y se determinó la concentración de la disolución mediante su densidad óptica a 260 nm. Para su formulación en crema, se secaron ASO (secadora de vacío DNA Mini, Medos Company, Melbourne, Australia), luego se disolvieron en una cantidad apropiada de crema (Isis Pharmaceuticals, EE.UU.) para proporcionar una concentración final del 10% p/p. La crema contenía:

- miristato de isopropilo (10% p/p)
- 25 • fenoxietanol (2,5% p/p)
- monoestearato de glicerilo (10% p/p)
- metilparabeno (0,5% p/p)
- 30 • estearato de polioxilo 40 (15% p/p)
- propilparabeno (0,5% p/p)
- 35 • hidroxipropilmetilcelulosa (0,5% p/p)
- agua purificada (59,8% p/p)
- fosfato de sodio monobásico monohidratado (0,3% p/p)
- 40 • fosfato de sodio dibásico heptahidratado (0,9% p/p)

Aplicación del fármaco

45 Tras una incubación previa de 30 minutos de la biopsia a 37°C, se aplicaron directamente 30 mg de fármaco o vehículo pesados previamente a una región central de aproximadamente 4 mm de diámetro de cada biopsia con una espátula pequeña. Un anillo delgado alrededor del borde de la biopsia se mantuvo libre de ISIS 175317 (SEQ ID NO: 125) o vehículo con el fin de evitar que la crema tocara el borde expuesto de la muestra. Estudios previos en este laboratorio usando FITC-ASO aplicados de este modo han mostrado que en aproximadamente el 20% de los casos los ASO entran en contacto con los bordes de la biopsia.

50

Grupos experimentales

Se recogieron tres biopsias de cada voluntario. Una de las biopsias se trató con vehículo (crema de Isis) y las otras dos con ISIS 175317 al 10% (SEQ ID NO: 125) en la crema. Este régimen de tratamiento permite análisis apareado (biopsia tratada con vehículo apareada con el promedio de las dos biopsias tratadas con ISIS 175317 (SEQ ID NO: 125)) de los datos, y el control de posibles efectos de confusión provocados por variaciones entre sujetos en los niveles de ARNm de IGF-IR. Se trataron dos biopsias de cada paciente con ISIS 175317 (SEQ ID NO: 125) para aumentar la probabilidad de detectar cualquier efecto farmacológico.

60

Separación de la epidermis de la dermis

Al final del periodo de tratamiento (24 h), se incubaron muestras de tejido en EDTA 0,5 M (pH 7,4) a 60°C durante 90 s para romper la unión epidérmica-dérmica y permitir la separación de la epidermis y la dermis mediante disección roma (Dusserre *et al.*, 1992 citado anteriormente). Se congelaron inmediatamente la epidermis y la dermis separadas en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C hasta que se extrajo el ARN.

65

Medición de los niveles de ARNm de IGF-IR mediante PCR en tiempo real

5 Se trituraron mecánicamente los tejidos en un almirez y mano de almirez de acero inoxidable que se había enfriado con nitrógeno líquido. Se extrajo el ARN total usando un kit Rneasy (marca comercial registrada) Mini (Qiagen Inc., Valencia, California, EE.UU.). Se transcribió de manera inversa el ARN total (de 100 a 700 ng) usando el kit de PCR para ARN GeneAmp (Applied Biosystems, Foster City, California, EE.UU.), según las instrucciones del fabricante. La cantidad de ARN inicial se hizo coincidir tan estrechamente como fuese posible para cada conjunto de biopsias y se transcribieron de manera inversa todas las muestras en la misma reacción. Se usó PCR en tiempo real

10 semicuantitativa para determinar la cantidad de ARNm de IGF-IR en biopsias en relación con ARN 18S. Se usaron reactivos desarrollados previamente para IGF-I humano (Applied Biosystems, n.º de producto 4319442F) y 18S (n.º de producto 4319413E) que contenían cebadores y sondas fluorescentes TaqMan (marca comercial registrada) en una reacción PCR múltiple para amplificar simultáneamente ambos productos en cada muestra. Cada muestra se sometió a ensayo por duplicado. Se usó un detector de secuencias ABI Prism 7700 (Applied Biosystems) para el

15 análisis. Se normalizaron los niveles de ARNm de IGF-IR con respecto a 18S.

Análisis estadístico

20 Para el análisis estadístico, se aparearon las biopsias de cada individuo. Se apareó cada biopsia tratada con vehículo con el promedio de las dos biopsias tratadas con ISIS 175317 (SEQ ID NO: 125). Para la comparación de los niveles de ARNm de IGF-IR en biopsias tratadas con ISIS 175317 (SEQ ID NO: 125) y tratadas con vehículo, se usó una prueba de la t apareada paramétrica. Esta prueba supone que la población subyacente tiene una distribución gaussiana. Estos datos no diferían significativamente ($P > 0,1$) de lo esperado si la toma de muestras era a partir de una población con una distribución gaussiana tal como se evaluó mediante una prueba de Kolmogorov-Smirnov modificada (Dallal *et al.*, 1986 citado anteriormente). Además, los gráficos de puntos de las diferencias en

25 los niveles de ARNm de IGF-IR entre biopsias tratadas con vehículo e ISIS 175317 (SEQ ID NO: 125) parecían ser de una población con una distribución gaussiana. Para todas las otras comparaciones, se usó la prueba por parejas apareadas de Wilcoxon no paramétrica. Esta prueba no hace suposiciones sobre la distribución de la población subyacente. Se realizó el análisis estadístico usando GraphPad Prism versión 3.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, California EE.UU.). Todos los datos se presentan como media \pm una desviación estándar.

30

Medición de los niveles de ARNm de IGF-IR, GAPDH, HPRT, receptor de insulina (IR), caspasa 3 y Bax mediante PCR en tiempo real

35 Se trituraron mecánicamente los tejidos en un almirez y mano de almirez de acero inoxidable que se había enfriado con nitrógeno líquido. Se extrajo el ARN total usando un kit Rneasy (marca comercial registrada) Mini (Qiagen Inc., Valencia, California, EE.UU.). Se transcribió de manera inversa el ARN total (de 100 a 700 ng) usando el kit de PCR para ARN (marca comercial registrada) GeneAmp (Applied Biosystems, Foster City, California, EE.UU.), según las instrucciones del fabricante. La cantidad de ARN inicial se hizo coincidir tan estrechamente como fuese posible para cada conjunto de biopsias y se transcribieron de manera inversa todas las muestras en la misma reacción.

40

Se usó PCR en tiempo real semicuantitativa para determinar la cantidad de ARNm de IGF-IR, GAPDH, HPRT, receptor de insulina (IR), caspasa 3 y Bax en biopsias en relación con ARN 18S. Se usaron reactivos desarrollados previamente para los genes mencionados anteriormente (Applied Biosystems, n.º de producto 4319442F (IGF-IR), n.º 433764F (GAPDH), n.º 4333768F (HPRT), n.º 4318283F (Bax) y n.º de ID de ensayo Hs00263337_m1 de "ensayo a demanda" de Applied Biosystems (caspasa 3) y n.º Hs00169631ml (receptor de insulina)), cada uno individualmente, en una reacción PCR múltiple con un reactivo desarrollado previamente para 18S (Applied Biosystems, n.º de producto 4319413E). Estos reactivos desarrollados previamente contenían cebadores y sondas fluorescentes TaqMan (marca comercial registrada) y, cuando se usaron en una reacción PCR múltiple, amplificaron simultáneamente el gen diana (IGF-IR, GAPDH, HPRT, receptor de insulina (IR), caspasa 3 o Bax) y 18S en cada muestra. Se sometió a ensayo cada muestra por duplicado. Se usó un detector de secuencias ABI Prism™ 7700 (Applied Biosystems) para el análisis. Se normalizaron los niveles de ARNm de IGF-IR, GAPDH, HPRT, receptor de insulina (IR), caspasa 3 y Bax con respecto a 18S.

45

50

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico, se aparearon las biopsias de cada individuo. Se apareó cada biopsia tratada con vehículo con el promedio de las dos biopsias tratadas con ISIS 175317 (SEQ ID NO: 125).

60

Para la comparación de los niveles de ARNm del gen de interés en biopsias tratadas con ISIS 175317 (SEQ ID NO: 125) y tratadas con vehículo, se usó una prueba de la t apareada paramétrica. Esta prueba supone que la población subyacente tiene una distribución gaussiana. Estos datos no diferían significativamente ($P > 0,1$) de lo esperado si la toma de muestras era a partir de una población con una distribución gaussiana tal como se evaluó mediante una prueba de Kolmogorov-Smirnov modificada (Dallal *et al.*, 1986). Además, los gráficos de puntos de las diferencias en los niveles de ARNm del gen de interés entre biopsias tratadas con vehículo e ISIS 175317 (SEQ ID NO: 125) parecían ser de una población con una distribución gaussiana.

65

Se realizó el análisis estadístico usando GraphPad Prism versión 3.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, California EE.UU.). Todos los datos se presentan como media \pm una desviación estándar).

- 5 Los resultados se muestran en las figuras 12 a 14 y demuestran claramente la eficacia del ASO de ISIS 175317 (SEQ ID NO: 125) en la crema para reducir IGF-IR y ARN en epidermis normal, dermis y epidermis psoriásica. Los resultados en la figura 14 demuestran claramente la especificidad de este ASO para IGF-IR.

10 Los expertos en la técnica apreciarán que la invención descrita en el presente documento es susceptible de variaciones y modificaciones distintas de las descritas específicamente en los ejemplos. Debe entenderse que la invención incluye todas las variaciones y modificaciones de este tipo que están abarcadas por las reivindicaciones. La invención también incluye todas las etapas, características, composiciones y compuestos a los que se hace referencia o se indica en esta memoria descriptiva, individual o conjuntamente, y todas y cada una de las combinaciones de dos cualquiera o más de dichas etapas o características.

15 **Bibliografía**

- Boukamp *et al.*, J. Cell Biol. 106: 761-771, 1988;
- 20 Camacho-Hubner *et al.*, J. Biol. Chem. 267: 11949-11956, 1992;
- Clemmons, Growth Regn. 2:80, 1992;
- Flanagan y Wagner, Mol. Cell Biochem. 172: 213-225, 1997;
- 25 Flanagan *et al.*, Nat. Biotechnol. 14: 1139-1145, 1996b;
- Flanagan *et al.*, Nucleic Acids Res. 24: 2936-2941, 1996a;
- 30 Fogarty *et al.*, Antisense Nucleic Acid Drug Development 12: 369-377, 2002;
- Fredriksson *et al.*, Dermatologica 157: 238-244, 1978;
- Hodak *et al.*, J. Invest. Dermatol. 106: 564-570, 1996;
- 35 Jensen *et al.*, Br. J. Dermatol. 139: 984-991, 1998;
- Krane *et al.*, J. Exp. Med. 175: 1081-1090, 1992;
- 40 Krane *et al.*, J. Invest. Dermatol. 96: 419-424, 1991;
- LeRoith *et al.*, Endocr. Rev. 16: 143-163, 1995;
- Mehta *et al.*, J. Invest. Dermatol. 115: 805-812, 2000;
- 45 Neely *et al.*, J. Inv. Derm. 96: 104, 1991;
- Neely *et al.*, J. Invest. Dermatol. 96: 104-110, 1991;
- 50 Oakes *et al.*, J. Clin. Endocrinol. Metab. 73: 1368-1373, 1992
- Pietrkowski *et al.*, Mol. Cell Biol. 12: 3883-3889, 1992;
- Porcu *et al.*, Mol. Cell Biol. 12: 5069-5077, 1992;
- 55 Rechler y Brown, Growth Regulation 2: 55-68, 1992;
- Reiss *et al.*, Oncogene 7: 2243-2248, 1992;
- 60 Resnicoff *et al.*, Cancer Res. 54: 2218-2222, 1994;
- Ristow y Messmer, J. Cell Physiol. 137: 277-284, 1988;
- Ristow, Dermatology 195: 213-219, 1997;
- 65 Ristow, Growth Regul. 3: 129-137, 1993;

- Rubin y Baserga, *Laboratory Investigation* 73: 311-331, 1995;
- 5 Russo *et al.*, *Endocrinology* 135: 1437-1446, 1994;
- Sara, *Physiological Reviews* 70: 591-614, 1990;
- Schultz *et al.*, *J. Immunol. Methods* 167: 1-13, 1994;
- 10 Ullrich *et al.*, *EMBO J.* 5: 2503-2512, 1986;
- van de Kerkhof, *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 11: 2-10, 1998;
- White *et al.*, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 10: 195-203, 2000;
- 15 White *et al.*, *J. Invest. Dermatol.* 112: 887-892, 1999;
- White *et al.*, *Journal of Investigative Dermatology* 118: 1003-1007, 2002;
- 20 Wingens *et al.*, *Lab Invest.* 79: 1415-1424, 1999;
- Wraight *et al.*, *J. Invest. Dermatol.* 103: 627-631, 1994;
- Wraight *et al.*, *J. Invest. Dermatol.* 108: 452-456, 1997;
- 25 Wraight *et al.*, *Nat. Biotechnol.* 18: 521-526, 2000;
- Xu *et al.*, *J. Invest. Dermatol.* 106: 109-112, 1996;
- 30 Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215: 403-410, 1990;
- Zhang y Madden, *Genome Res.* 7: 649-656, 1997;
- Guo y Kempheus, *Cell* 81: 611-620, 1995;
- 35 Montgomery *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 15502-15507, 1998;
- Fire *et al.*, *Nature* 391: 806-811, 1998;
- 40 Tijsterman *et al.*, *Science*, 295: 694-697, 2002;
- Timmons y Fire, *Nature* 395: 854, 1998;
- Timmons *et al.*, *Gene* 263: 103-112, 2001;
- 45 Tabara *et al.*, *Science* 282: 430-431, 1998;
- Montgomery *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 1998;
- 50 Tuschl *et al.*, *Genes Dev.* 13: 3191-3197, 1999;
- Elbashir *et al.*, *Nature*, 411: 494-498, 2001;
- Elbashir *et al.*, *Genes Dev.* 15: 188-200, 2001;
- 55 Brazma y Vilo, *FEBS Lett.* 480: 17-24, 2000;
- Celis *et al.*, *FEBS Lett.* 480: 2-16, 2000;
- 60 Madden *et al.*, *Drug Discov. Today* 5: 415-425, 2000;
- Prashar y Weissman, *Methods Enzymol.* 303: 258-272, 1999;
- Sutcliffe *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 1976-1981, 2000;
- 65 Jungblut *et al.*, *Electrophoresis* 20: 2100-2110, 1999;

- Fuchs *et al.*, *Anal. Biochem.* 286: 91-98, 2000;
- 5 Larson *et al.*, *Cytometry* 41: 203-208, 2000;
- Jurecic y Belmont, *Curr. Opin. Microbiol.* 3: 316-321, 2000;
- Carulli *et al.*, *J. Cell Biochem. Suppl.* 31: 286-296, 1998;
- 10 Going y Gusterson, *Eur. J. Cancer* 35: 1895-1904, 1999;
- To, *Comb. Chem. High Throughput Screen* 3: 235-241, 2000;
- Nielsen *et al.*, *Science* 254: 1497-1500, 1991;
- 15 Martin *et al.*, *Helv. Chim. Acta*, 78: 486-504, 1995;
- The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, páginas 858-859, Kroschwitz, J.I., ed. John Wiley & Sons, 1990;
- 20 Englisch *et al.*, *Angewandte Chemie*, edición internacional, 30: 613, 1991;
- Sanghvi, Y.S., capítulo 15, *Antisense Research and Applications*, páginas 289-302, Crooke, S.T. and Lebleu, B., ed., CRC Press, 1993;
- 25 Scaringe, Ph.D. Thesis, University of Colorado, 1996;
- Scaringe *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 120: 11820-11821; 1998;
- 30 Matteucci y Caruthers, *J. Am. Chem. Soc.* 103: 3185-3191, 1981;
- Beaucage y Caruthers, *Tetrahedron Lett.* 22: 1859-1862, 1981;
- Dahl *et al.*, *Acta Chem. Scand.* 44: 639-641; 1990;
- 35 Reddy *et al.*, *Tetrahedron Lett.* 25: 4311-4314, 1994;
- Wincott *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 23: 2677-2684, 1995;
- 40 Griffin *et al.*, *Tetrahedron* 23: 2301-2313, 1967a;
- Griffin *et al.*, *Tetrahedron* 23: 2315-2331, 1967b;
- Chiang *et al.*, *J. Biol. Chem.* 266: 18162-18171, 1991;
- 45 Miura *et al.*, *Clin. Chem.* 42: 1758-1764, 1996.

Listado de secuencias

- 50 <110> Antisense Therapeutics Ltd
- <120> Modulación de la expresión del receptor del factor de crecimiento I de tipo insulina
- <130> 12310130/EJH
- 55 <150> Documento AU 2003900609/AU2003902610
- <151> 02-11-2003/05-27-2003
- <160> 171
- 60 <170> PatentIn versión 3.1
- <210> 1
- <211> 20
- 65 <212> ADN
- <213> secuencia artificial

ES 2 400 033 T3

| | | |
|----|--|----|
| | <220> <223> oligonucleótido antisentido | |
| 5 | <220> <221> misc_feature <222> (1)..(20) <223> N = cualquier base | |
| 10 | <400> 1 ccttttattt gggatgaaat | 20 |
| | <210> 2 <211> 20 <212> ADN <213> secuencia artificial | |
| 15 | <220> <223> oligonucleótido antisentido | |
| 20 | <400> 2 ccagactca ttcccttat | 20 |
| | <210> 3 <211> 20 <212> ADN <213> secuencia artificial | |
| 25 | <220> <223> oligonucleótido antisentido | |
| 30 | <400> 3 tgatagtcgt tgccgatgtc | 20 |
| | <210> 4 <211> 20 <212> ADN <213> secuencia artificial | |
| 35 | <220> <223> oligonucleótido antisentido | |
| 40 | <400> 4 gctgctgata gtcgtgicc | 20 |
| 45 | <210> 5 <211> 20 <212> ADN <213> secuencia artificial | |
| 50 | <220> <223> oligonucleótido antisentido | |
| 55 | <400> 5 cttcagctgc tgatagtcgt | 20 |
| | <210> 6 <211> 20 <212> ADN <213> secuencia artificial | |
| 60 | <220> <223> oligonucleótido antisentido | |
| 65 | <400> 6 ccctcgatca ccgtgcagtt | 20 |

| | | |
|----|------------------------------------|----|
| | <210> 7 | |
| | <211> 20 | |
| | <212> ADN | |
| 5 | <213> secuencia artificial | |
| | <220> | |
| | <223> oligonucleótido antisentido | |
| 10 | <400> 7 ttggagatga gcaggatgtg | 20 |
| | <210> 8 | |
| | <211> 20 | |
| 15 | <212> ADN | |
| | <213> secuencia artificial | |
| | <220> | |
| | <223> oligonucleótido antisentido | |
| 20 | <400> 8 cggccttgga gatgagcagg | 20 |
| | <210> 9 | |
| 25 | <211> 20 | |
| | <212> ADN | |
| | <213> secuencia artificial | |
| | <220> | |
| 30 | <223> oligonucleótido antisentido | |
| | <400> 9 gtcctcggcc ttggagatga | 20 |
| 35 | <210> 10 | |
| | <211> 20 | |
| | <212> ADN | |
| | <213> secuencia artificial | |
| 40 | <220> | |
| | <223> oligonucleótido antisentido | |
| | <400> 10 cggtagtctt cggccttgga | 20 |
| 45 | <210> 11 | |
| | <211> 20 | |
| | <212> ADN | |
| | <213> secuencia artificial | |
| 50 | <220> | |
| | <223> oligonucleótido antisentido | |
| | <400> 11. ttgtagaaga gttccagcc | 20 |
| 55 | <210> 12 | |
| | <211> 20 | |
| | <212> ADN | |
| 60 | <213> secuencia artificial | |
| | <220> | |
| | <223> oligonucleótido antisentido | |
| 65 | <400> 12 tggatcatctc gaagatgacc | 20 |

ES 2 400 033 T3

| | | |
|----|---|----|
| 5 | <210> 13 <211> 20 <212> ADN <213> secuencia artificial <220> <223> oligonucleótido antisentido | |
| 10 | <400> 13 gagattggtc atctcgaaga | 20 |
| 15 | <210> 14 <211> 20 <212> ADN <213> secuencia artificial <220> <223> oligonucleótido antisentido | |
| 20 | <400> 14 tccttgagat tggcatctc | 20 |
| 25 | <210> 15 <211> 20 <212> ADN <213> secuencia artificial <220> <223> oligonucleótido antisentido | |
| 30 | <400> 15 caatacctt gagattggtc | 20 |
| 35 | <210> 16 <211> 20 <212> ADN <213> secuencia artificial <220> <223> oligonucleótido antisentido | |
| 40 | <400> 16 aagccaata tccttgagat | 20 |
| 45 | <210> 17 <211> 20 <212> ADN <213> secuencia artificial <220> <223> oligonucleótido antisentido | |
| 50 | <400> 17 cccccgagta atgttctca | 20 |
| 55 | <210> 18 <211> 20 <212> ADN <213> secuencia artificial <220> <223> oligonucleótido antisentido | |
| 60 | <400> 18 tctcaatcct gatggcccc | 20 |

ES 2 400 033 T3

| | | |
|----|---|----|
| 5 | <210> 19 <211> 20 <212> ADN <213> secuencia artificial <220> <223> oligonucleótido antisentido | |
| 10 | <400> 19 gttattggac accgcatcca | 20 |
| 15 | <210> 20 <211> 20 <212> ADN <213> secuencia artificial <220> <223> oligonucleótido antisentido | |
| 20 | <400> 20 atgtagttat tggacaccgc | 20 |
| 25 | <210> 21 <211> 20 <212> ADN <213> secuencia artificial <220> <223> oligonucleótido antisentido | |
| 30 | <400> 21 ccacaatgta gttattggac | 20 |
| 35 | <210> 22 <211> 20 <212> ADN <213> secuencia artificial <220> <223> oligonucleótido antisentido | |
| 40 | <400> 22 cacaggtccc cacattcct | 20 |
| 45 | <210> 23 <211> 20 <212> ADN <213> secuencia artificial <220> <223> oligonucleótido antisentido | |
| 50 | <400> 23 ctggacacag gtccccacat | 20 |
| 55 | <210> 24 <211> 20 <212> ADN <213> secuencia artificial <220> <223> oligonucleótido antisentido | |
| 60 | <400> 24 atgggtgtct tctcacacat | 20 |
| 65 | <210> 25 <211> 20 <212> ADN <213> secuencia artificial <220> <223> oligonucleótido antisentido | |
| 70 | <400> 25 atgggtgtct tctcacacat | 20 |

ES 2 400 033 T3

| | | |
|----|---|----|
| 5 | <210> 25 <211> 20 <212> ADN <213> secuencia artificial <220> <223> oligonucleótido antisentido | |
| 10 | <400> 25 tgttgatggt ggtcttctca | 20 |
| 15 | <210> 26 <211> 20 <212> ADN <213> secuencia artificial <220> <223> oligonucleótido antisentido | |
| 20 | <400> 26 ctcatgttg atggtggtct | 20 |
| 25 | <210> 27 <211> 20 <212> ADN <213> secuencia artificial <220> <223> oligonucleótido antisentido | |
| 30 | <400> 27 gttgtactca ttgtgatgg | 20 |
| 35 | <210> 28 <211> 20 <212> ADN <213> secuencia artificial <220> <223> oligonucleótido antisentido | |
| 40 | <400> 28 cggtagtgt actcattgt | 20 |
| 45 | <210> 29 <211> 20 <212> ADN <213> secuencia artificial <220> <223> oligonucleótido antisentido | |
| 50 | <400> 29 agcagcggta gttgtactca | 20 |
| 55 | <210> 30 <211> 20 <212> ADN <213> secuencia artificial <220> <223> oligonucleótido antisentido | |
| 60 | <400> 30 ggtccagcag cggtagtgt | 20 |

| | | |
|----|---|----|
| 5 | <210> 31 <211> 20 <212> ADN <213> secuencia artificial <220> <223> oligonucleótido antisentido | |
| 10 | <400> 31 tttgtgtcc agcagcgta | 20 |
| 15 | <210> 32 <211> 20 <212> ADN <213> secuencia artificial <220> <223> oligonucleótido antisentido | |
| 20 | <400> 32 tgggcacatt tctggcagc | 20 |
| 25 | <210> 33 <211> 20 <212> ADN <213> secuencia artificial <220> <223> oligonucleótido antisentido | |
| 30 | <400> 33 ggagtaattc ccttctagct | 20 |
| 35 | <210> 34 <211> 20 <212> ADN <213> secuencia artificial <220> <223> oligonucleótido antisentido | |
| 40 | <400> 34 tcccacagtt gctgcaagtt | 20 |
| 45 | <210> 35 <211> 20 <212> ADN <213> secuencia artificial <220> <223> oligonucleótido antisentido | |
| 50 | <400> 35 atgttcagc tgttggagcc | 20 |
| 55 | <210> 36 <211> 20 <212> ADN <213> secuencia artificial <220> <223> oligonucleótido antisentido | |
| 60 | <400> 36 ccaccatggt ccagctgtg | 20 |

| | | |
|----|---|----|
| 5 | <210> 37 <211> 20 <212> ADN <213> secuencia artificial <220> <223> oligonucleótido antisentido | |
| 10 | <400> 37 gtccagggct tcagcccatg | 20 |
| 15 | <210> 38 <211> 20 <212> ADN <213> secuencia artificial <220> <223> oligonucleótido antisentido | |
| 20 | <400> 38 gtgagggtca cagccttgac | 20 |
| 25 | <210> 39 <211> 20 <212> ADN <213> secuencia artificial <220> <223> oligonucleótido antisentido | |
| 30 | <400> 39 ccatggtgag ggtcacagcc | 20 |
| 35 | <210> 40 <211> 20 <212> ADN <213> secuencia artificial <220> <223> oligonucleótido antisentido | |
| 40 | <400> 40 ttggtgcgaa tgtacaagat | 20 |
| 45 | <210> 41 <211> 20 <212> ADN <213> secuencia artificial <220> <223> oligonucleótido antisentido | |
| 50 | <400> 41 atttgtctt tggagcagta | 20 |
| 55 | <210> 42 <211> 20 <212> ADN <213> secuencia artificial <220> <223> oligonucleótido antisentido | |
| 60 | <400> 42 aggaaattct caaagacttt | 20 |
| 65 | | |

ES 2 400 033 T3

| | | |
|----|-----------------------------------|----|
| | <210> 43 | |
| | <211> 20 | |
| | <212> ADN | |
| 5 | <213> secuencia artificial | |
| | <220> | |
| | <223> oligonucleótido antisentido | |
| 10 | <400> 43 | |
| | ctgctcggc tggacatggt | 20 |
| | <210> 44 | |
| | <211> 20 | |
| 15 | <212> ADN | |
| | <213> secuencia artificial | |
| | <220> | |
| | <223> oligonucleótido antisentido | |
| 20 | <400> 44 | |
| | tgttcctgct tcggctggac | 20 |
| | <210> 45 | |
| 25 | <211> 20 | |
| | <212> ADN | |
| | <213> secuencia artificial | |
| | <220> | |
| 30 | <223> oligonucleótido antisentido | |
| | <400> 45 | |
| | ctgctctcaa agaaaggta | 20 |
| 35 | <210> 46 | |
| | <211> 20 | |
| | <212> ADN | |
| | <213> secuencia artificial | |
| 40 | <220> | |
| | <223> oligonucleótido antisentido | |
| | <400> 46 | |
| 45 | ccactctgct ctcaaagaaa | 20 |
| | <210> 47 | |
| | <211> 20 | |
| | <212> ADN | |
| | <213> secuencia artificial | |
| 50 | <220> | |
| | <223> oligonucleótido antisentido | |
| | <400> 47 | |
| 55 | gttatccact ctgctctcaa | 20 |
| | <210> 48 | |
| | <211> 20 | |
| | <212> ADN | |
| 60 | <213> secuencia artificial | |
| | <220> | |
| | <223> oligonucleótido antisentido | |
| 65 | <400> 48 | |
| | tccttggtat ccactctgct | 20 |

ES 2 400 033 T3

| | | |
|----|---|----|
| 5 | <210> 49 <211> 20 <212> ADN <213> secuencia artificial <220> <223> oligonucleótido antisentido | |
| 10 | <400> 49 ttgcagctgt ggatatcgat | 20 |
| 15 | <210> 50 <211> 20 <212> ADN <213> secuencia artificial <220> <223> oligonucleótido antisentido | |
| 20 | <400> 50 cgtggtgca gctgtggata | 20 |
| 25 | <210> 51 <211> 20 <212> ADN <213> secuencia artificial <220> <223> oligonucleótido antisentido | |
| 30 | <400> 51 agcctcgtgg ttgcagctgt | 20 |
| 35 | <210> 52 <211> 20 <212> ADN <213> secuencia artificial <220> <223> oligonucleótido antisentido | |
| 40 | <400> tctcagcct cgtggtgca | 20 |
| 45 | <210> 53 <211> 20 <212> ADN <213> secuencia artificial <220> <223> oligonucleótido antisentido | |
| 50 | <400> 53 ccagcttctc agcctcgtgg | 20 |
| 55 | <210> 54 <211> 20 <212> ADN <213> secuencia artificial <220> <223> oligonucleótido antisentido | |
| 60 | <400> 54 gcagcccagc ttctcagcct | 20 |
| 65 | <210> 54 <211> 20 <212> ADN <213> secuencia artificial <220> <223> oligonucleótido antisentido | |
| 65 | <400> 54 gcagcccagc ttctcagcct | 20 |

ES 2 400 033 T3

| | | |
|----|---|----|
| 5 | <210> 55 <211> 20 <212> ADN <213> secuencia artificial <220> <223> oligonucleótido antisentido | |
| 10 | <400> 55 gcgctgcagc ccagcttctc | 20 |
| 15 | <210> 56 <211> 20 <212> ADN <213> secuencia artificial <220> <223> oligonucleótido antisentido | |
| 20 | <400> 56 ttataaaaga tggagtttc | 20 |
| 25 | <210> 57 <211> 20 <212> ADN <213> secuencia artificial <220> <223> oligonucleótido antisentido | |
| 30 | <400> 57 gccacttaa aaagatggag | 20 |
| 35 | <210> 58 <211> 20 <212> ADN <213> secuencia artificial <220> <223> oligonucleótido antisentido | |
| 40 | <400> 58 tcctgtctgg acacacattc | 20 |
| 45 | <210> 59 <211> 20 <212> ADN <213> secuencia artificial <220> <223> oligonucleótido antisentido | |
| 50 | <400> 59 aagaacacag gatctgtcca | 20 |
| 55 | <210> 60 <211> 20 <212> ADN <213> secuencia artificial <220> <223> oligonucleótido antisentido | |
| 60 | <400> 60 catagaagaa cacaggatct | 20 |

ES 2 400 033 T3

| | | |
|----|-----------------------------------|----|
| | <210> 61 | |
| | <211> 20 | |
| | <212> ADN | |
| 5 | <213> secuencia artificial | |
| | <220> | |
| | <223> oligonucleótido antisentido | |
| 10 | <400> 61 | |
| | ggaacgtaca catcagcagc | 20 |
| | <210> 62 | |
| | <211> 20 | |
| 15 | <212> ADN | |
| | <213> secuencia artificial | |
| | <220> | |
| | <223> oligonucleótido antisentido | |
| 20 | <400> 62 | |
| | actcctcat agaccatccc | 20 |
| | <210> 63 | |
| 25 | <211> 20 | |
| | <212> ADN | |
| | <213> secuencia artificial | |
| | <220> | |
| 30 | <223> oligonucleótido antisentido | |
| | <400> 63 | |
| | ggagataac tttgagatc | 20 |
| 35 | <210> 64 | |
| | <211> 20 | |
| | <212> ADN | |
| | <213> secuencia artificial | |
| 40 | <220> | |
| | <223> oligonucleótido antisentido | |
| | <400> 64 | |
| 45 | gagaccggag ataactttg | 20 |
| | <210> 65 | |
| | <211> 20 | |
| | <212> ADN | |
| 50 | <213> secuencia artificial | |
| | <220> | |
| | <223> oligonucleótido antisentido | |
| | <400> 65 | |
| 55 | atthgactg tgaatcttc | 20 |
| | <210> 66 | |
| | <211> 20 | |
| | <212> ADN | |
| 60 | <213> secuencia artificial | |
| | <220> | |
| | <223> oligonucleótido antisentido | |
| 65 | <400> 66 | |
| | gcgatctccc agaggacgac | 20 |

ES 2 400 033 T3

| | | |
|----|-----------------------------------|----|
| | <210> 67 | |
| | <211> 20 | |
| | <212> ADN | |
| 5 | <213> secuencia artificial | |
| | <220> | |
| | <223> oligonucleótido antisentido | |
| 10 | <400> 67 | |
| | tgtagtagaa ggagacctcc | 20 |
| | <210> 68 | |
| | <211> 20 | |
| 15 | <212> ADN | |
| | <213> secuencia artificial | |
| | <220> | |
| | <223> oligonucleótido antisentido | |
| 20 | <400> 68 | |
| | gcctgtgtc ctgagtgct | 20 |
| | <210> 69 | |
| 25 | <211> 20 | |
| | <212> ADN | |
| | <213> secuencia artificial | |
| | <220> | |
| 30 | <223> oligonucleótido antisentido | |
| | <400> 69 | |
| | atccaaggat cagcaggtcg | 20 |
| 35 | <210> 70 | |
| | <211> 20 | |
| | <212> ADN | |
| | <213> secuencia artificial | |
| 40 | <220> | |
| | <223> oligonucleótido antisentido | |
| | <400> 70 | |
| 45 | gctgcttga tattgaaaa | 20 |
| | <210> 71 | |
| | <211> 20 | |
| | <212> ADN | |
| 50 | <213> secuencia artificial | |
| | <220> | |
| | <223> oligonucleótido antisentido | |
| | <400> 71 | |
| 55 | aaaaagctgc ttgcatattg | 20 |
| | <210> 72 | |
| | <211> 20 | |
| | <212> ADN | |
| 60 | <213> secuencia artificial | |
| | <220> | |
| | <223> oligonucleótido antisentido | |
| 65 | <400> 72 | |
| | gccccatgtca gttaagggtt | 20 |

ES 2 400 033 T3

| | | |
|----|---|------------|
| | <210> 73 | |
| | <211> 20 | |
| | <212> ADN | |
| 5 | <213> secuencia artificial | |
| | <220> | |
| | <223> oligonucleótido antisentido | |
| 10 | <400> 73 | |
| | ccagcgtgtc tctcaaatgg | 20 |
| | <210> 74 | |
| | <211> 20 | |
| 15 | <212> ADN | |
| | <213> Artificial | |
| | <220> | |
| | <223> oligonucleótido antisentido | |
| 20 | <400> 74 | |
| | ggagttaaa ggacagtgcc | 20 |
| | <210> 75 | |
| 25 | <211> 20 | |
| | <212> ADN | |
| | <213> Artificial | |
| | <220> | |
| 30 | <223> oligonucleótido antisentido | |
| | <400> 75 | |
| | catcactgac ctcttctat | 20 |
| 35 | <210> 76 | |
| | <211> 1651 | |
| | <212> ADN | |
| | <213> <i>Homo sapiens</i> | |
| 40 | <400> 76 | |
| | aagcttttca agaaccgggg aaacgcgctt tccagccgcg ctgttggtgt tttcaatgaa | 60 |
| | cctctcccag ccccgcactc cccgccacc cctcccctct cctgcccacc ectcccctct | 120 |
| | cctgcccacc cctcccctgc ctagccttc cctggctacc caccctgcc ccgccgagac | 180 |
| | cggaccggcg gcgggggcat tgtttttgga gtcgggcggg aggggagggc gcgtgcgggg | 240 |
| | tggccggcgc agtgcggtgg gggcgggagc gggtgggcac gcgcgcgtgt ctctgtgtgc | 300 |
| | gcgcgggagg cgggtggggcg ggagatgggg gcggcgcctc gcagtctcgc gccccacgcc | 360 |
| | cgggctccgc tccgcacgtc ttggggaacc cgggctccgg ttttttgccg gcgccggcct | 420 |
| | gggcccgggc ctcggcgcgc cgctgctcgg cggtgggcgc tcgagtgtgc gagcgggcgc | 480 |
| | gtgtgcgcgg gccagggcgc cgcgcgcgcg agccccagt gtgtggcagc ggcggcggcg | 540 |
| | gcgcggcgag gctggggctc ttgtttacca gcattaactc gctgagcggg aaaaaaagg | 600 |
| | gaaaaaacc gaggaggagc gagcgacca ggcgaactcg agagaggcgg gagagcgaga | 660 |
| | gggacgccgc cagcagcct gcccacggcc ggcgctcgca gaccctcggc cccgctcccc | 720 |
| | ggatcccc cgcgccctca cggccctccc gcgcgggggc agctccacgg cgcgcctcgc | 780 |
| | ctcggctgtg accttcagc agccggagcc cccgcgcaga gcaggcggcg gcgggcgggg | 840 |

gcccgggcggg ggccggcgcg gggcgggcgg cggcgagag ccgggcggcg cggcgggagt 900
 gctgagcgcg gcgcgcccg cccgccgctt tgtgtgtgtc ctggatttgg gaaggagctc 960
 gccgccccgg cggcgctgag ggaggaggcg gcggcgagcg gagccaggag gaggaggagg 1020
 aggaggggga gccgctcatt cttttgact ccgctgttct gcccctcgcc ggcctcgctt 1080
 gtgaccgga cttcggggcg atcttgcaaa ctgctgctcg ccctcccgcg gcggaagctc 1140
 gggcgctccg ccgcctccc cgcgccagg cgggcttgt tttcctcgc ctaggcagat 1200
 ttgggctttg ccccctttct ttgcagttt ccccccttc tgctctccg ggtttgaaaa 1260
 tggaggccga cgacgccgac agccccccc ggcgagcctc gggttcccga ctccgccgag 1320
 ccctgggccg ctgctgccgg cgctgagggg ccgccccgcg ccgcccgcc cgtccgcgca 1380
 cccggagggc cccggcgcg gcccttcgga gtattgttct cttcgccctt gttttggag 1440
 ggggagcgaa gactgagttt gagactgtt tcctttcatt tcctttttt cttttctttt 1500
 cttttttttt tttttttttt tttttgagaa aggggaattt catcccaaat aaaaggaatg 1560
 aagtctggct ccggaggagg gtccccgacc tcgctgtggg ggctcctgtt tctctccgcc 1620
 gcgctctcgc tctggccgac gagtggagaa a 1651

<210> 77
 <211> 4989
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 77
 tttttttttt ttttgagaaa gggaatttca tcccaaataa aaggaatgaa gtctggctcc 60
 ggaggagggt ccccgacctc gctgtggggg ctctgtttc tctccgccg gctctcgtc 120
 tggccgacga gtggagaaat ctgccccca ggcacgaca tccgcaacga ctatcagcag 180
 ctgaagcgcc tggagaactg cacggtgatc gagggctacc tccacatcct gctcatctcc 240
 aaggccgagg actaccgag ctaccgctc cccaagctca cggtcattac cgagtacttg 300
 ctgctgttcc gagtggctgg cctcgagagc ctcgagacc tcttcccaa cctcacggtc 360
 atccgaggct ggaaactctt ctacaactac gccctggtca tcttcgagat gaccaatctc 420
 aaggatattg ggctttacaa cctgaggaac attactcggg gggccatcag gattgagaaa 480
 aatgctgacc tctgttacct ctccactgtg gactggtccc tgatcctgga tgcggtgtcc 540
 aataactaca ttgtggggaa taagcccca aaggaatgtg gggacctgtg tccagggacc 600
 atggaggaga agccgatgtg tgagaagacc accatcaaca atgagtacaa ctaccgctgc 660
 tggaccacaa accgctgcca gaaaatgtg ccaagcacgt gtgggaagcg ggcgtgcacc 720
 gagaacaatg agtgctgcca ccccgagtgc ctgggcagct gcagcgcgcc tgacaacgac 780
 acggcctgtg tagcttgccg ccaactactac tatgccggtg tctgtgtgcc tgcctgcccg 840
 cccaacacct acaggtttga gggctggcgc tgtgtggacc gtgacttctg cgccaacatc 900
 ctgagcggc agagcagcga ctccgagggg tttgtgatcc acgacggcga gtgcatgcag 960
 gagtggccct cgggcttcat ccgcaacggc agccagagca tgtactgcat cccttgtgaa 1020

ggtccttgcc cgaaggtctg tgaggaagaa aagaaaacaa agaccattga ttctgttact 1080
 tctgctcaga tgctccaagg atgcaccatc ttcaagggca atttgctcat taacatccga 1140
 cgggggaata acattgcttc agagctggag aacttcatgg ggctcatcga ggtggtgacg 1200
 ggctacgtga agatccgcca ttctcatgcc ttggtctcct tgtccttctt aaaaaacctt 1260
 cgctcatcc taggagagga gcagctagaa ggaattact ctttctacgt cctcgacaac 1320
 cagaacttgc agcaactgtg ggactgggac caccgcaacc tgaccatcaa agcagggaaa 1380
 atgtactttg ctttcaatcc caaattatgt gtttccgaaa tttaccgcat ggaggaagtg 1440
 acggggacta aagggcgcca aagcaaaggg gacataaaca ccaggaacaa cggggagaga 1500
 gcctcctgtg aaagtgacgt cctgcatttc acctccacca ccacgtcga gaatcgcac 1560
 atcataacct ggcaccggta cgggccccct gactacaggg atctcatcag cttcaccggt 1620
 tactacaagg aagcaccctt taagaatgtc acagagtatg atgggcagga tgcctgcggc 1680
 tccaacagct ggaacatggt ggacgtggac ctcccgcca acaaggacgt ggagcccggc 1740
 atcttactac atgggctgaa gccctggact cagtacgccg tttacgtcaa ggctgtgacc 1800
 ctccaccatg tggagaacga ccatatccgt ggggccaaga gtgagatctt gtacattcgc 1860
 accaatgctt cagttccttc cattcccttg gacgttctt cagcatcga ctcctcttct 1920
 cagttaatcg tgaagtggaa cctccctct ctgccaacg gcaacctgag ttactacatt 1980
 gtgctgctggc agcggcagcc tcaggacggc tacctttacc ggcacaatta ctgctccaaa 2040
 gacaaaatcc ccatcaggaa gtatgccgac ggcaccatcg acattgagga ggtcacagag 2100
 aacccaaga ctgaggtgtg tgggtggggag aaagggcctt gctgctcctg ccccaaaact 2160
 gaagccgaga agcaggccga gaaggaggag gctgaatacc gcaaagtctt tgagaatttc 2220
 ctgcacaact ccatcttctg gccagacct gaaaggaagc ggagagatgt catgcaagtg 2280
 gccaacacca ccatgtccag ccgaagcagg aacaccacgg ccgcagacac ctacaacatc 2340
 accgaccgg aagagctgga gacagagtac ctttctttg agagcagagt ggataacaag 2400
 gagagaactg tcatttctaa cttcggcct ttcacattgt accgcatcga tatccacagc 2460
 tgcaaccacg aggetgagaa gctgggctgc agcgcctcca acttcgtctt tgcaaggact 2520
 atgcccgcag aaggagcaga tgacattcct gggccagtga cctgggagcc aaggcctgaa 2580
 aactccatct ttttaaagtg gccggaacct gagaatcca atggattgat tctaattgat 2640
 gaaataaat acggatcaca agttgaggat cagcgagaat gtgtgtccag acaggaatac 2700
 aggaagtatg gaggggcca gctaaaccgg ctaaaccgg ggaactacac agcccggatt 2760
 caggccacat ctctctctgg gaatgggtcg tggacagatc ctgtgttctt ctatgtccag 2820
 gccaaaacag gatatgaaaa cttcatccat ctgatcatcg ctctgccgt cgctgtcctg 2880
 ttgatcgtgg gagggttggt gattatgctg tacgtcttcc atagaaagag aaataacagc 2940
 aggctgggga atggagtgt gtatgcctct gtgaaccgg agtacttcag cgctgctgat 3000
 gtgtacgttc ctgatgagt ggaggtggct cgggagaaga tcaccatgag ccgggaactt 3060

gggcaggggt cgtttgggat ggtctatgaa ggagttgcca aggggtgtggt gaaagatgaa 3120
 cctgaaacca gagtggccat taaaacagtg aacgaggccg caagcatgcg tgagaggatt 3180
 gagtttctca acgaagcttc tgtgatgaag gagttcaatt gtcactatgt ggtgcgattg 3240
 ctgggtgtggt tgtcccaagg ccagccaaca ctgggtcatca tggaactgat gacacggggc 3300
 gatctcaaaa gttatctccg gtctctgagg ccagaaatgg agaataatcc agtcctagca 3360
 cctccaagcc tgagcaagat gattcagatg gccggagaga ttgcagacgg catggcatac 3420
 ctcaacgccataa agttctgt ccacagagac cttgctgccc ggaattgcat ggtagccgaa 3480
 gatttcacag tcaaaatcgg agattttggt atgacgag atactctatga gacagactat 3540
 taccggaaag gaggcaaagg gctgctgccc gtgctgctgga tgtctcctga gtcctcaag 3600
 gatggagtct tcaccactta ctcggacgctc tggtccttcg gggtcgtcct ctgggagatc 3660
 gccacactgg ccgagcagcc ctaccagggc ttgtccaacg agcaagtcct tcgcttcgctc 3720
 atggagggcg gccttctgga caagccagac aactgtcctg acatgctggt tgaactgatg 3780
 cgcatgtgct ggcagtataa cccaagatg aggccttcct tcctggagat catcagcagc 3840
 atcaaagagg agatggagcc tggcttccgg gaggtctcct tctactacag cgaggagaac 3900
 aagctgcccg agccggagga gctggacctg gagccagaga acatggagag cgtccccctg 3960
 gaccctcgg cctcctcgtc ctccctgcca ctgcccgaca gacactcagg acacaaggcc 4020
 gagaacggcc ccggccctgg ggtgctggtc ctccgcccga gcttcgacga gagacagcct 4080
 tacgcccaca tgaacggggg ccgcaagaac gagcgggctc tgccgctgcc ccagtcttcg 4140
 acctgctgat ccttggatcc tgaatctgtg caaacagtaa cgtgtgagca cgcgagcgg 4200
 ggtggggggg gagagagagt ttaacaatc cattcacaag cctcctgtac ctcagtggat 4260
 cttcagttct gcccttctg cccgaggggag acagcttctc tgcagtaaaa cacatttggg 4320
 atgttccttt tttcaatatg caagcagctt tttatccct gcccaaacc ttaactgaca 4380
 tgggccttta agaaccttaa tgacaacact taatagcaac agagcacttg agaaccagtc 4440
 tcctcactct gtcctgtcc ttccctgtc tcccttctc tctcctctct gcttcataac 4500
 ggaaaaataa ttgccacaag tccagctggg aagccctttt tatcagtttg aggaagtggc 4560
 tgtccctgtg gccccatcca accactgtac acaccgctt gacaccgtgg gtcattacaa 4620
 aaaaacacgt ggagatggaa atttttacct ttatctttca ctttctagg gacatgaaat 4680
 ttacaaaggg ccacgttca tccaaggctg ttaccattt aacgctgcct aattttgcca 4740
 aaatcctgaa ctttctcct catcgccccg gcgctgattc ctcgtgtccg gaggcattgg 4800
 tgagcatggc agctggttgc tccatttgag agacacgctg gcgacacact ccgtccatcc 4860
 gactgcccct gctgtgctgc tcaaggccac aggcacacag gtctcattgc ttctgactag 4920
 attattattt gggggaactg gacacaatag gtcttctct cagtgaaggt ggggagaagc 4980
 tgaaccggc 4989

<210> 78
 <211> 15
 <212> ARN

ES 2 400 033 T3

| | | |
|----|--|----|
| | <213> Artificial | |
| | <220> | |
| 5 | <223> oligonucleótido antisentido que codifica para C5 propino de IGF-IR | |
| | <400> 78 | |
| | cacaguugcu gcaag | 15 |
| 10 | <210> 79 | |
| | <211> 20 | |
| | <212> ADN | |
| | <213> Artificial | |
| 15 | <220> | |
| | <223> oligonucleótido antisentido control para H-ras humana | |
| | <400> 79 | |
| | tccgcatcg ctctcaggg | 20 |
| 20 | <210> 80 | |
| | <211> 20 | |
| | <212> ADN | |
| | <213> Artificial | |
| 25 | <220> | |
| | <223> oligonucleótido antisentido control para JNK humana | |
| | <400> 80 | |
| 30 | gtgcgcgca gcccgaaatc | 20 |
| | <210> 81 | |
| | <211> 20 | |
| | <212> ADN | |
| | <213> Artificial | |
| 35 | <220> | |
| | <223> oligonucleótido antisentido control para c-raf de ratón y de rata | |
| | <400> 81 | |
| 40 | atgattctg ccccaagga | 20 |
| | <210> 82 | |
| | <211> 21 | |
| | <212> ADN | |
| 45 | <213> Artificial | |
| | <220> | |
| | <223> Cebador de PCR para hIGF-RI | |
| 50 | <400> 82 | |
| | ccctttctt gcagtttcc c | 21 |
| | <210> 83 | |
| | <211> 17 | |
| 55 | <212> ADN | |
| | <213> Artificial | |
| | <220> | |
| | <223> Cebador de PCR para hIGF-RI | |
| 60 | <400> 83 | |
| | cgtcgctggc ctccatt | 17 |
| | <210> 84 | |
| 65 | <211> 23 | |
| | <212> ADN | |

ES 2 400 033 T3

| | | |
|----|---|----|
| | <213> Artificial | |
| | <220> | |
| | <223> Cebador de PCR para hIGF-RI | |
| 5 | <400> 84 ccttcctgcc tctccgggtt tga | 23 |
| | <210> 85 | |
| 10 | <211> 20 <212> ADN <213> Artificial | |
| | <220> | |
| 15 | <223> Cebador de PCR para hIGF-RI | |
| | <400> 85 acatgggctgc gcgactaagt | 20 |
| 20 | <210> 86 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial | |
| 25 | <220> <223> oligonucleótido antisentido | |
| | <400> 86 atgcatacta cgaaaggccg | 20 |
| 30 | <210> 87 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial | |
| 35 | <220> <223> oligonucleótido antisentido | |
| | <400> 87 tattccacga acgtaggctg | 20 |
| 40 | <210> 88 <211> 15 <212> ARN <213> Artificial | |
| 45 | <220> <223> oligonucleótido antisentido | |
| 50 | <400> 88 uaacacgacg cgaau | 15 |
| | <210> 89 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial | |
| 55 | <220> <223> oligonucleótido antisentido | |
| 60 | <400> 89 tccgtcatcg ctctcagg | 20 |
| 65 | <210> 90 <211> 20 <212> ADN | |

ES 2 400 033 T3

| | | |
|----|---|----|
| | <213> Artificial | |
| | <220> | |
| | <223> oligonucleótido antisentido | |
| 5 | <400> 90 tccgcatcg ctctcaggg | 20 |
| | <210> 91 | |
| 10 | <211> 20 <212> ADN <213> Artificial | |
| | <220> | |
| 15 | <223> oligonucleótido antisentido | |
| | <400> 91 tcccgcctgt gacatgcatt | 20 |
| 20 | <210> 92 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial | |
| 25 | <220> | |
| | <223> hebra sentido a modo de ejemplo | |
| | <400> 92 cgagaggcgg acgggaccgt t | 21 |
| 30 | <210> 93 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial | |
| 35 | <220> | |
| | <223> hebra antisentido a modo de ejemplo | |
| | <400> 93 ttgctctccg cctgccctgg c | 21 |
| | <210> 94 <211> 19 <212> ADN <213> Artificial | |
| 45 | <220> | |
| | <223> Sonda de PCR para hGAPDH | |
| 50 | <400> 94 gaaggtgaag gtcggagtc | 19 |
| | <210> 95 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial | |
| | <220> | |
| | <223> Sonda de PCR para hGAPDH | |
| 60 | <400> 95 gaagatggtg atgggatttc | 20 |
| | <210> 96 <211> 20 <212> ADN | |
| 65 | | |

ES 2 400 033 T3

<213> Artificial

<220>

<223> Sonda de PCR para hGAPDH

5

<400> 96

caagctccc gttctcagcc

20

<210> 97

10

<211> 5983

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 97

agtgtgtggc agcggcggcg gcggcgcggc gaggctgggg ctcttgttta ccagcattaa 60
ctcgtgagc ggaaaaaaaa agggaaaaaaaa cccgaggagg agcgagcgca ccaggcgaac 120
tcgagagagg cgggagagcg agagggacgc cgccagcgag cctgcccacg gccggcgctc 180
gcagaccctc ggccccgctc cccggatccc cccgcgccct ccacgccctt cccgcgcggg 240
ggcagctcca cggcgcgcct cgcctcggct gtgacctca gcgagccgga gccccgcgc 300
agagcaggcg gcggcggcg ggggcccggc gggggccggc gcggggcggg cggcggcgca 360
gagccgggcg gcgcggcggg agtgctgagc gcggcgcggc cggcccgccg ctttgtgtgt 420
gtcctggatt tgggaaggag ctcgccgcgg cggcggcgct gaggaggag gcggcggcga 480
gcggagccag gaggaggagg aggaggagg ggagccgctc attcattttg actccgcgct 540
tctgccctc gccggcctcg cctgtgacc ggacttcggg gcgatcttgc gaactgcgct 600
gcgccctccc gcggcggaa ctcgggcgct cggccgcctc ccgcgcgcca gggccgggct 660
tgtttttctt cgcttaggca gatttgggct ttgccccctt tctttgcagt tttccccct 720
tcctgcctct ccgggtttga aatggaggc cgacgacgcc gacagcccgc cccggcgcgc 780
ctcgggttcc cgactccgcc gagccctggg ccgctgctgc cggcgtgag gggccgcccc 840
gcgccgccc ccccgctccgc gcacccggag ggccccggcg gcggccctt ggagtattgt 900
ttccttcgcc cttgtttttg gagggggagc gaagactgag tttgagactt gtttcctttc 960
atttcctttt tttcttttct tttctttttt tttttttttt ttttttttga gaaagggaa 1020
ttatcccaa ataaaaggaa tgaagtctgg ctccggagga gggccccga cctcgtgtg 1080
ggggctcctg tttctctccg ccgcgctctc gctctggccg acgagtggag aaatctgcgg 1140

15

gccaggcatc gacatccgca acgactatca gcagctgaag cgcctggaga actgcacggt 1200
 gatcgagggc tacctccaca tcctgctcat ctccaaggcc gaggactacc gcagctaccg 1260
 cttccccaag ctcacggtca ttaccgagta cttgctgctg ttccgagtgg ctggcctcga 1320
 gagcctcggg gacctcttcc ccaacctcac ggtcatccgc ggctggaaac tcttctacaa 1380
 ctacgccctg gtcattctcg agatgaccaa tctcaaggat attgggcttt acaacctgag 1440
 gaacattact cggggggcca tcaggattga gaaaaatgct gacctctggt acctctccac 1500
 tgtggactgg tcctgatcc tggatgcggt gtccaataac tacattgtgg ggaataagcc 1560
 cccaaggaa tgtggggacc tgtgtccagg gaccatggag gagaagccga tgtgtgagaa 1620
 gaccaccatc aacaatgagt acaactaccg ctgctggacc acaaaccgct gccagaaaat 1680
 gtgccaagc acgtgtggga agcgggcgtg caccgagaac aatgagtgtc gccaccccga 1740
 gtgcctgggc agctgcagcg cgcctgacaa cgacacggcc tgtgtagctt gccgccacta 1800
 ctactatgcc ggtgtctgtg tgcctgcctg cccgcccaac acctacaggt ttgagggctg 1860
 gcgctgtgtg gaccgtgact tctgcgcaa catcctcagc gccgagagca gcgactccga 1920
 ggggtttgtg atccacgacg gcgagtgcac gcaggagtgc ccctcgggct tcatccgcaa 1980
 cggcagccag agcatgtact gcatccctg tgaaggctct tccccgaagg tctgtgagga 2040
 agaaaagaaa acaaagacca ttgattctgt tacttctgct cagatgctcc aaggatgcac 2100
 catcttcaag ggcaatttgc tcattaacat ccgacggggg aataacattg cttcagagct 2160
 ggagaacttc atggggctca tcgaggtggt gacgggctac gtgaagatcc gccatttctca 2220
 tgccttggtc tccttgtcct tcctaaaaaa ccttcgcctc atcctaggag aggagcagct 2280
 agaagggaat tactccttct acgtcctcga caaccagaac ttgcagcaac tgtgggactg 2340
 ggaccaccgc aacctgacca tcaaagcagg gaaaatgtac tttgctttca atcccaaatt 2400
 atgtgtttcc gaaatttacc gcatggagga agtgacgggg actaaagggc gccaaagcaa 2460
 aggggacata aacaccagga acaacgggga gagagcctcc tgtgaaagtg acgtcctgca 2520
 tttcacctcc accaccagct cgaagaatcg catcatcata acctggcacc ggtaccggcc 2580
 ccctgactac agggatctca tcagcttcac cgtttactac aaggaagcac ctttaagaa 2640
 tgtcacagag tatgatgggc aggatgcctg cggctccaac agctggaaca tgggtggactg 2700
 ggacctccc cccaacaagg acgtggagcc cggcatctta ctacatgggc tgaagccctg 2760
 gactcagtac gccgtttacg tcaaggctgt gaccctcacc atggtggaga acgaccatat 2820
 ccgtggggcc aagagtgaga tcttgtacat tcgcaccaat gcttcagttc cttccattcc 2880
 cttggacgtt ctttcagcat cgaactcctc ttctcagtta atcgtgaagt ggaaccctcc 2940
 ctctctgccc aacggcaacc tgagttacta cattgtgctg tggcagcggc agcctcagga 3000
 cggctacctt taccggcaca attactgctc caaagacaaa atccccatca ggaagtatgc 3060
 cgacggcacc atcgacattg aggaggtcac agagaacccc aagactgagg tgtgtggtgg 3120
 ggagaaaggg ccttgctgcg cctgccccaa aactgaagcc gagaagcagg ccgagaagga 3180

ggaggctgaa taccgcaaag tctttgagaa tttcctgcac aactccatct tcgtgcccag 3240
 acctgaaagg aagcggagag atgtcatgca agtggccaac accaccatgt ccagccgaag 3300
 caggaacacc acggccgcag acacctacaa catcaccgac ccggaagagc tggagacaga 3360
 gtaccctttc tttgagagca gagtggataa caaggagaga actgtcattt ctaaccttcg 3420
 gcctttcaca ttgtaccgca tcgatatcca cagctgcaac cacgaggctg agaagctggg 3480
 ctgcagcgc tccaacttcg tctttgcaag gactatgcc gcagaaggag cagatgacat 3540
 tcctgggcca gtgacctggg agccaaggcc tgaaaactcc atctttttaa agtggccgga 3600
 acctgagaat cccaatggat tgattctaata gtatgaaata aaatacggat cacaagttga 3660
 ggatcagcga gaatgtgtgt ccagacagga atacaggaag tatggagggg ccaagctaaa 3720
 ccggctaaac ccggggaact acacagcccc gattcaggcc acatctctct ctgggaatgg 3780
 gtcgtggaca gatcctgtgt tcttctatgt ccaggccaaa acaggatatg aaaacttcat 3840
 ccatctgatc atcgtctgc ccgtcgtgt cctgttgatc gtgggagggt tgggtgattat 3900
 gctgtacgtc ttccatagaa agagaaataa cagcaggctg gggaatggag tgctgtatgc 3960
 ctctgtgaac ccggagtact tcagcgtgc tgatgtgtac gttcctgatg agtgggaggt 4020
 ggctcgggag aagatcacca tgagccggga acttgggagc gggctgttg ggatggtcta 4080
 tgaaggagtt gcccaagggtg tggtgaaaga tgaacctgaa accagagtgg ccattaaac 4140
 agtgaacgag gccgcaagca tgcgtgagag gattgagttt ctcaacgaag cttctgtgat 4200
 gaaggagttc aattgtcacc atgtggtgcg attgctgggt gtggtgtccc aaggccagcc 4260
 aacactggtc atcatggaac tgatgacacg gggcgatctc aaaagttatc tccggtctct 4320
 gaggccagaa atggagaata atccagtcct agcacctcca agcctgagca agatgattca 4380
 gatggccgga gagattgcag acggcatggc atacctcaac gccataaagt tcgtccacag 4440
 agaccttgct gcccggaatt gcatggtagc cgaagatttc acagtcaaaa tcggagattt 4500
 tggtatgacg cgagatatct atgagacaga ctattaccgg aaaggaggca aagggtgct 4560
 gcccgtgccc tggatgtctc ctgagtcct caaggatgga gtcttcacca cttactcgga 4620
 cgtctggtcc ttcggggtcg tcctctggga gatcgccaca ctggccgagc agccctacca 4680
 gggcttgtcc aacgagcaag tccttcgctt cgtcatggag ggcggccttc tggacaagcc 4740
 agacaactgt cctgacatgc tgtttgaact gatgcatg tgctggcagt ataaccctaa 4800
 gatgaggcct tccttcctgg agatcatcag cagcatcaaa gaggagatgg agcctggctt 4860
 ccgggaggtc tccttctact acagcgagga gaacaagctg cccgagccgg aggagctgga 4920
 cctggagcca gagaacatgg agagcgtccc cctggacccc tcggcctcct cgtcctccct 4980
 gccactgccc gacagacact caggacacaa ggccgagaac ggccccggcc ctgggggtgct 5040
 ggtcctccgc gccagcttcg acgagagaca gccttacgcc cacatgaacg ggggcccga 5100
 gaacgagcgg gccttgccgc tgccccagtc ttcgacctgc tgatccttgg atcctgaatc 5160
 tgtgcaaca gtaacgtgtg cgcacgcgca gcggggtgg gggggagaga gagttttaac 5220

aatccattca caagcctcct gtacctcagt ggatcttcag ttctgccctt gctgcccgcg 5280
 ggagacagct tctctgcagt aaaacacatt tgggatgttc cttttttcaa tatgcaagca 5340
 gctttttatt cctgcccac acccttaact gacatgggcc ttaagaacc ttaatgacaa 5400
 cacttaatag caacagagca cttgagaacc agtctcctca ctctgtccct gtccttcct 5460
 gttctccctt tctctctcct ctctgcttca taacggaaaa ataattgcca caagtccagc 5520
 tgggaagccc tttttatcag tttgaggaag tggctgtccc tgtggcccca tccaaccact 5580
 gtacacaccc gcctgacacc gtgggtcatt acaaaaaaac acgtggagat ggaaattttt 5640
 acctttatct ttcacctttc tagggacatg aaatttacia agggccatcg ttcattcaag 5700
 gctgttacca ttttaacgct gcctaatttt gccaaaatcc tgaactttct ccctcatcgg 5760
 cccggcgctg attcctcgtg tccggaggca tgggtgagca tggcagctgg ttgctccatt 5820
 tgagagacac gctggcgaca cactccgtcc atccgactgc ccctgctgtg ctgctcaagg 5880
 ccacaggcac acaggtctca ttgcttctga ctagattatt atttggggga actggacaca 5940
 ataggtcttt ctctcagtga aggtggggag aagctgaacc ggc 5983

<210> 98
 <211> 391
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 98

Asn Pro Glu Tyr Phe Ser Ala Ala Asp Val Tyr Val Pro Asp Glu Trp
 1 5 10 15
 Glu Val Ala Arg Glu Lys Ile Thr Met Ser Arg Glu Leu Gly Gln Gly
 20 25 30
 Ser Phe Gly Met Val Tyr Glu Gly Val Ala Lys Gly Val Val Lys Asp
 35 40 45
 Glu Pro Glu Thr Arg Val Ala Ile Lys Thr Val Asn Glu Ala Ala Ser
 50 55 60
 Met Arg Glu Arg Ile Glu Phe Leu Asn Glu Ala Ser Val Met Lys Glu
 65 70 75 80
 Phe Asn Cys His His Val Val Arg Leu Leu Gly Val Val Ser Gln Gly
 85 90 95
 Gln Pro Thr Leu Val Ile Met Glu Leu Met Thr Arg Gly Asp Leu Lys
 100 105 110
 Ser Tyr Leu Arg Ser Leu Arg Pro Glu Met Glu Asn Asn Pro Val Leu
 115 120 125
 Ala Pro Pro Ser Leu Ser Lys Met Ile Gln Met Ala Gly Glu Ile Ala
 130 135 140

Asp Gly Met Ala Tyr Leu Asn Ala Asn Lys Phe Val His Arg Asp Leu
145 150 155 160

Ala Ala Arg Asn Cys Met Val Ala Glu Asp Phe Thr Val Lys Ile Gly
165 170 175

Asp Phe Gly Met Thr Arg Asp Ile Tyr Glu Thr Asp Tyr Tyr Arg Lys
180 185 190

Gly Gly Lys Gly Leu Leu Pro Val Arg Trp Met Ser Pro Glu Ser Leu
195 200 205

Lys Asp Gly Val Phe Thr Thr Tyr Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val
210 215 220

Val Leu Trp Glu Ile Ala Thr Leu Ala Glu Gln Pro Tyr Gln Gly Leu
225 230 235 240

Ser Asn Glu Gln Val Leu Arg Phe Val Met Glu Gly Gly Leu Leu Asp
245 250 255

Lys Pro Asp Asn Cys Pro Asp Met Leu Phe Glu Leu Met Arg Met Cys
260 265 270

Trp Gln Tyr Asn Pro Lys Met Arg Pro Ser Phe Leu Glu Ile Ile Ser
275 280 285

Ser Ile Lys Glu Glu Met Glu Pro Gly Phe Arg Glu Val Ser Phe Tyr
290 295 300

Tyr Ser Glu Glu Asn Lys Leu Pro Glu Pro Glu Glu Leu Asp Leu Glu
305 310 315 320

Pro Glu Asn Met Glu Ser Val Pro Leu Asp Pro Ser Ala Ser Ser Ser
325 330 335

Ser Leu Pro Leu Pro Asp Arg His Ser Gly His Lys Ala Glu Asn Gly
340 345 350

Pro Gly Pro Gly Val Leu Val Leu Arg Ala Ser Phe Asp Glu Arg Gln
355 360 365

Pro Tyr Ala His Met Asn Gly Gly Arg Lys Asn Glu Arg Ala Leu Pro
370 375 380

Leu Pro Gln Ser Ser Thr Cys
385 390

<210> 99
<211> 20
5 <212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<220>

ES 2 400 033 T3

| | | |
|----|------------------------------------|----|
| | <221> misc_feature | |
| | <222> (1)..(20) | |
| | <223> N = cualquier base | |
| 5 | <400> 99 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn | 20 |
| | <210> 100 | |
| | <211> 20 | |
| 10 | <212> ADN | |
| | <213> <i>Homo sapiens</i> | |
| | <400> 100 agtctcaaac tcagtcttcg | 20 |
| 15 | <210> 101 | |
| | <211> 20 | |
| | <212> ADN | |
| | <213> <i>Homo sapiens</i> | |
| 20 | <400> 101 gtaaatgctg gtaaacaaga | 20 |
| | <210> 102 | |
| 25 | <211> 20 | |
| | <212> ADN | |
| | <213> <i>Homo sapiens</i> | |
| | <400> 102 gaagtccggg tcacaggcga | 20 |
| 30 | <210> 103 | |
| | <211> 20 | |
| | <212> ADN | |
| 35 | <213> <i>Homo sapiens</i> | |
| | <400> 103 aacaagagcc ccagcctcgc | 20 |
| 40 | <210> 104 | |
| | <211> 20 | |
| | <212> ADN | |
| | <213> <i>Homo sapiens</i> | |
| 45 | <400> 104 atgctggtaa acaagagccc | 20 |
| | <210> 105 | |
| | <211> 20 | |
| 50 | <212> ADN | |
| | <213> <i>Homo sapiens</i> | |
| | <400> 105 tgctggtaaa caagagcccc | 20 |
| 55 | <210> 106 | |
| | <211> 20 | |
| | <212> ADN | |
| | <213> <i>Homo sapiens</i> | |
| 60 | <400> 106 ggagtcaaaa tgaatgagcg | 20 |
| | <210> 107 | |
| 65 | <211> 20 | |
| | <212> ADN | |

ES 2 400 033 T3

| | | |
|----|---|----|
| | <213> <i>Homo sapiens</i> | |
| | <400> 107 aatctgccta ggcgaggaaa | 20 |
| 5 | <210> 108 <211> 20 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i> | |
| 10 | <400> 108 gctggtaaac aagagcccca | 20 |
| 15 | <210> 109 <211> 20 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i> | |
| 20 | <400> 109 agcccaaadc tgcttaggcg | 20 |
| 25 | <210> 110 <211> 20 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i> | |
| 30 | <400> 110 cctccatttt caaacccgga | 20 |
| 35 | <210> 111 <211> 20 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i> | |
| 40 | <400> 111 gaaggtcaca gccgaggcga | 20 |
| 45 | <210> 112 <211> 20 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i> | |
| 50 | <400> 112 tcgctgaagg tcacagccga | 20 |
| 55 | <210> 113 <211> 20 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i> | |
| 60 | <400> 113 atccaggaca cacacaaagc | 20 |
| 65 | <210> 114 <211> 20 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i> | |
| 70 | <400> 114 aagtccgggt cacaggcgag | 20 |
| 75 | <210> 115 <211> 20 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i> | |

ES 2 400 033 T3

| | | |
|----|---|----|
| | <400> 115 aagtctcaaa ctcagtcttc | 20 |
| 5 | <210> 116 <211> 20 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i> | |
| 10 | <400> 116 gtcgtcggcc tccatttca | 20 |
| 15 | <210> 117 <211> 20 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i> | |
| 20 | <400> 117 gcagaaacgc ggagtcaaaa | 20 |
| 25 | <210> 118 <211> 20 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i> | |
| 30 | <400> 118 gcggcgagct ccttcccaaa | 20 |
| 35 | <210> 119 <211> 20 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i> | |
| 40 | <400> 119 taatgctggt aaacaagagc | 20 |
| 45 | <210> 120 <211> 20 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i> | |
| 50 | <400> 120 tttcaaacc ggagaggcag | 20 |
| 55 | <210> 121 <211> 20 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i> | |
| 60 | <400> 121 taggcgagga aaaacaagcc | 20 |
| 65 | <210> 122 <211> 20 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i> | |
| | <400> 122 ctcgctgaag gtcacagccg | 20 |
| | <210> 123 <211> 20 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i> | |
| | <400> 123 gcagcggccc agggctcggc | 20 |

ES 2 400 033 T3

| | | |
|----|---------------------------|----|
| | <210> 124 | |
| | <211> 20 | |
| | <212> ADN | |
| 5 | <213> <i>Homo sapiens</i> | |
| | <400> 124 | |
| | gctcgctgaa ggtcacagcc | 20 |
| 10 | <210> 125 | |
| | <211> 20 | |
| | <212> ADN | |
| | <213> <i>Homo sapiens</i> | |
| 15 | <400> 125 | |
| | cgaaggaaac aatactccga | 20 |
| | <210> 126 | |
| | <211> 20 | |
| 20 | <212> ADN | |
| | <213> <i>Homo sapiens</i> | |
| | <400> 126 | |
| | gaaacgcgga gtcaaatga | 20 |
| 25 | <210> 127 | |
| | <211> 20 | |
| | <212> ADN | |
| | <213> <i>Homo sapiens</i> | |
| 30 | <400> 127 | |
| | gaaacaatac tccgaaggcc | 20 |
| | <210> 128 | |
| 35 | <211> 20 | |
| | <212> ADN | |
| | <213> <i>Homo sapiens</i> | |
| | <400> 128 | |
| 40 | ccaaatccag gacacacaca | 20 |
| | <210> 129 | |
| | <211> 20 | |
| | <212> ADN | |
| 45 | <213> <i>Homo sapiens</i> | |
| | <400> 129 | |
| | tccgcctcca tttcaaacc | 20 |
| 50 | <210> 130 | |
| | <211> 20 | |
| | <212> ADN | |
| | <213> <i>Homo sapiens</i> | |
| 55 | <400> 130 | |
| | tccgggtcac aggcgaggcc | 20 |
| | <210> 131 | |
| | <211> 20 | |
| 60 | <212> ADN | |
| | <213> <i>Homo sapiens</i> | |
| | <400> 131 | |
| | aatgaatgag cggctcccc | 20 |
| 65 | <210> 132 | |

ES 2 400 033 T3

| | | |
|----|---|----|
| | <211> 20 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i> | |
| 5 | <400> 132 tgaaggtcac agccgaggcg | 20 |
| | <210> 133 <211> 20 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i> | |
| 10 | | |
| | <400> 133 aaggtcacag ccgaggcgag | 20 |
| 15 | | |
| | <210> 134 <211> 20 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i> | |
| 20 | | |
| | <400> 134 cccaaatcca ggacacacac | 20 |
| 25 | | |
| | <210> 135 <211> 20 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i> | |
| 30 | | |
| | <400> 135 acaagtctca aactcagtct | 20 |
| 35 | | |
| | <210> 136 <211> 20 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i> | |
| 40 | | |
| | <400> 136 ggtaaacaag agccccagcc | 20 |
| 45 | | |
| | <210> 137 <211> 20 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i> | |
| 50 | | |
| | <400> 137 cgaagactga gtttgagact | 20 |
| 55 | | |
| | <210> 138 <211> 20 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i> | |
| 60 | | |
| | <400> 138 tcgcctgtga cccggacttc | 20 |
| 65 | | |
| | <210> 139 <211> 20 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i> | |
| 70 | | |
| | <400> 139 gcgaggctgg ggctctgtt | 20 |
| 75 | | |
| | <210> 140 <211> 20 <212> ADN | |

ES 2 400 033 T3

| | | |
|----|---|----|
| | <213> <i>Homo sapiens</i> | |
| 5 | <400> 140 gggctctgt ttaccagcat | 20 |
| | <210> 141 <211> 20 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i> | |
| 10 | <400> 141 ggggctctg ttaccagca | 20 |
| 15 | <210> 142 <211> 20 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i> | |
| 20 | <400> 142 cgctcattca tttgactcc | 20 |
| 25 | <210> 143 <211> 20 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i> | |
| 30 | <400> 143 ttcctcgcc taggcagatt | 20 |
| 35 | <210> 144 <211> 20 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i> | |
| 40 | <400> 144 tggggctctt gttaccagc | 20 |
| 45 | <210> 145 <211> 20 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i> | |
| 50 | <400> 145 cgcctaggca gattgggct | 20 |
| 55 | <210> 146 <211> 20 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i> | |
| 60 | <400> 146 tccgggttg aaaatggagg | 20 |
| 65 | <210> 147 <211> 20 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i> | |
| | <400> 147 tcgcctcggc tgtgacctc | 20 |
| | <210> 148 <211> 20 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i> | |

ES 2 400 033 T3

| | | |
|----|---|----|
| | <400> 148 tcggctgtga ccttcagcga | 20 |
| 5 | <210> 149 <211> 20 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i> | |
| 10 | <400> 149 gctttgtgtg tgcctggat | 20 |
| 15 | <210> 150 <211> 20 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i> | |
| 20 | <400> 150 ctcgctgtg acccggactt | 20 |
| 25 | <210> 151 <211> 20 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i> | |
| 30 | <400> 151 gaagactgag ttgagactt | 20 |
| 35 | <210> 152 <211> 20 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i> | |
| 40 | <400> 152 tgaaaatgga ggccgacgac | 20 |
| 45 | <210> 153 <211> 20 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i> | |
| 50 | <400> 153 tttgactcc gcgttctgc | 20 |
| 55 | <210> 154 <211> 20 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i> | |
| 60 | <400> 154 ttgggaagg agctgccgc | 20 |
| 65 | <210> 155 <211> 20 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i> | |
| 70 | <400> 155 gctctgttt accagcatta | 20 |
| 75 | <210> 156 <211> 20 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i> | |
| 80 | <400> 156 ggctgtttt tctcgccta | 20 |

ES 2 400 033 T3

| | | |
|----|---------------------------|----|
| | <210> 157 | |
| | <211> 20 | |
| | <212> ADN | |
| 5 | <213> <i>Homo sapiens</i> | |
| | <400> 157 | |
| | cggctgtgac cttcagcgag | 20 |
| 10 | <210> 158 | |
| | <211> 20 | |
| | <212> ADN | |
| | <213> <i>Homo sapiens</i> | |
| 15 | <400> 158 | |
| | gccgagccct gggccgctgc | 20 |
| | <210> 159 | |
| | <211> 20 | |
| 20 | <212> ADN | |
| | <213> <i>Homo sapiens</i> | |
| | <400> 159 | |
| | ggctgtgacc ttcagcgagc | 20 |
| 25 | <210> 160 | |
| | <211> 20 | |
| | <212> ADN | |
| | <213> <i>Homo sapiens</i> | |
| 30 | <400> 160 | |
| | tcgagattt gtttccttcg | 20 |
| | <210> 161 | |
| | <211> 20 | |
| | <212> ADN | |
| | <213> <i>Homo sapiens</i> | |
| 35 | <400> 161 | |
| | tcatttgac tccgcgttc | 20 |
| | <210> 162 | |
| | <211> 20 | |
| | <212> ADN | |
| | <213> <i>Homo sapiens</i> | |
| 45 | <400> 162 | |
| | gcccttcgga gtattgttc | 20 |
| | <210> 163 | |
| | <211> 20 | |
| | <212> ADN | |
| | <213> <i>Homo sapiens</i> | |
| 50 | <400> 163 | |
| | tgtgtgtgc ctggattgg | 20 |
| | <210> 164 | |
| | <211> 20 | |
| | <212> ADN | |
| | <213> <i>Homo sapiens</i> | |
| 60 | <400> 164 | |
| | ggttgaaaa tggaggccga | 20 |
| 65 | <210> 165 | |

ES 2 400 033 T3

| | | |
|----|---|----|
| | <211> 20 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i> | |
| 5 | <400> 165 ggcctcgcct gtgacccgga | 20 |
| | <210> 166 <211> 20 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i> | |
| 10 | | |
| | <400> 166 gggggagccg ctcatcatt | 20 |
| 15 | | |
| | <210> 167 <211> 20 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i> | |
| 20 | | |
| | <400> 167 cgctcggct gtgacctca | 20 |
| | <210> 168 <211> 20 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i> | |
| 25 | | |
| | <400> 168 ctcgcctcgg ctgtgacctt | 20 |
| 30 | | |
| | <210> 169 <211> 20 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i> | |
| 35 | | |
| | <400> 169 gtgtgtgtcc tggattggg | 20 |
| 40 | | |
| | <210> 170 <211> 20 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i> | |
| 45 | | |
| | <400> 170 agactgagtt tgagactgt | 20 |
| | <210> 171 <211> 20 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i> | |
| 50 | | |
| | <400> 171 ggctggggct cttgttacc | 20 |

REIVINDICACIONES

1. Oligonucleótido antisentido que comprende de 8 a 80 nucleobases de longitud, comprendiendo dicho oligonucleótido un tramo de al menos 8 nucleobases consecutivas que es complementario al menos en un 90% a la SEQ ID NO: 160 y que se dirige a una molécula de ácido nucleico que codifica para un receptor de factor de crecimiento similar a la insulina humano (SEQ ID NO: 97), hibridándose específicamente dicho oligonucleótido con dicha molécula de ácido nucleico e inhibiendo la expresión de IGF-IR.
2. Oligonucleótido según la reivindicación 1, que comprende de 12 a 50 nucleobases de longitud, comprendiendo dicho oligonucleótido un tramo de al menos 8 nucleobases consecutivas que es complementario en un 100% a la SEQ ID NO: 160.
3. Oligonucleótido según la reivindicación 1, que comprende de 15 a 30 nucleobases de longitud, comprendiendo dicho oligonucleótido un tramo de al menos 8 nucleobases consecutivas que es complementario en un 90% a la SEQ ID NO: 160.
4. Oligonucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que es un oligonucleótido de ADN, un oligonucleótido de ARN o un oligonucleótido quimérico.
5. Oligonucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, hibridándose al menos una porción de dicho oligonucleótido con ARN para formar un dúplex de oligonucleótido-ARN.
6. Oligonucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que tiene al menos un enlace internucleosídico, resto azúcar o nucleobase modificado.
7. Oligonucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que tiene al menos un resto 2'-O-metoxietil-azúcar.
8. Oligonucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que tiene al menos un enlace internucleosídico de fosforotioato.
9. Oligonucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que tiene al menos una 5-metilcitosina.
10. Oligonucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 4 a 9, comprendiendo dicho oligonucleótido un tramo de al menos 8 nucleobases consecutivas que es complementario en un 100% a la SEQ ID NO: 160.
11. Oligonucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 4 a 9, comprendiendo dicho oligonucleótido un tramo de al menos 8 nucleobases consecutivas que es complementario al menos en un 95% a la SEQ ID NO: 160.
12. Oligonucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 4 a 9, que comprende al menos 18 nucleobases que son idénticas al menos en un 90% a la SEQ ID NO: 125.
13. Oligonucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 4 a 9, que comprende al menos 15 nucleobases que son idénticas al menos en un 95% a la SEQ ID NO: 125.
14. Oligonucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 4 a 9, que comprende al menos 12 nucleobases que son idénticas en un 100% a la SEQ ID NO: 125.
15. Oligonucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 4 a 9, que consiste en la SEQ ID NO: 125.
16. Oligonucleótido que consiste en 20 nucleósidos unidos y que tiene una secuencia de nucleobases que consiste en la secuencia de nucleobases citada en SEQ ID NO: 125 en la que una región de diez desoxinucleótidos está flanqueada en ambos extremos 5' y 3' con cinco nucleótidos de 2'-O-(2-metoxietilo), siendo cada enlace internucleosídico un fosforotioato y cada citosina una 5-metilcitosina.
17. Composición que comprende el oligonucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 o una sal del mismo y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.
18. Método de diagnóstico *in vitro* para identificar un estado patológico que comprende identificar la presencia de IGF-IR en una muestra usando un oligonucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 y/o una composición según la reivindicación 17.
19. Kit o dispositivo de ensayo que comprende el oligonucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 y/o una composición según la reivindicación 17.
20. Uso de un oligonucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 y/o una composición según la

reivindicación 17 en la fabricación de un medicamento para tratar a un animal que tiene una enfermedad, estado o trastorno asociado a IGF-IR, en el que dicho oligonucleótido inhibe la expresión de IGF-IR y en el que el trastorno asociado a IGF-IR es un trastorno de la piel seleccionado de psoriasis, ictiosis, pitiriasis rubra pilaris, seborrea, queloides, queratosis, neoplasias, esclerodermia, verrugas, crecimientos benignos o cánceres de la piel.

- 5 21. Uso según la reivindicación 20, en el que el oligonucleótido inhibe la expresión de IGF-IR.
22. Uso según la reivindicación 20 o la reivindicación 21, en el que el animal o mamífero es un ser humano.
- 10 23. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 22, en el que el oligonucleótido es una molécula de ácido nucleico de fosforotioato.
- 15 24. Composición según la reivindicación 17, en la que dicho oligonucleótido puede inhibir o reducir de otra manera la proliferación celular u otro trastorno médico mediado por IGF-IR.
- 20 25. Composición según la reivindicación 24, en la que dicho oligonucleótido es una molécula de ácido nucleico de fosforotioato.
26. Oligonucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, o composición según la reivindicación 17 para su uso en el tratamiento de un animal que tiene una enfermedad, estado o trastorno asociado a IGF-IR, inhibiendo dicho oligonucleótido la expresión de IGF-IR.
27. Oligonucleótido o composición según la reivindicación 26, inhibiendo el oligonucleótido la expresión de IGF-IR.
- 25 28. Oligonucleótido o composición según la reivindicación 26 ó 27, en el que el trastorno asociado a IGF-IR es un trastorno de la piel seleccionado de psoriasis, ictiosis, pitiriasis rubra pilaris, seborrea, queloides, queratosis, neoplasias, esclerodermia, verrugas, crecimientos benignos o cánceres de la piel.
- 30 29. Oligonucleótido o composición según una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 28, siendo el animal o mamífero un ser humano.
30. Oligonucleótido o composición según una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 29, siendo el oligonucleótido una molécula de ácido nucleico de fosforotioato.

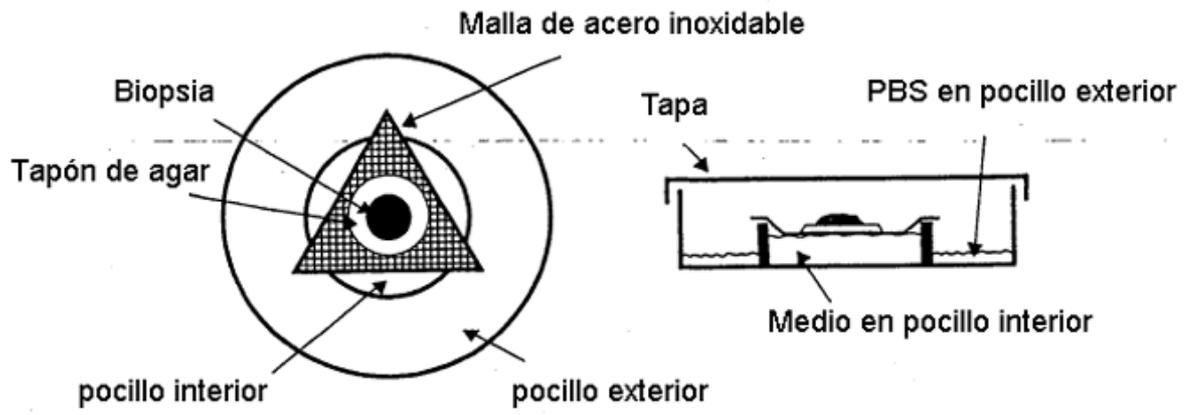


Figura 1

481 gtgtgctgagg gccaaggcgc cgcgcgcgcg agccccagt gtgtggcagc ggcggcggcg
 541 gcgcggcgcg gctggggctc ttgtttacca gcattaactc gctgagcggg aaaaaaaagg
 601 gaaaaaaccc gaggaggagc gaggcaccg ggcgaactcg agagagggcg gagagcgaga
 661 gggacgccc cagcagcct gcccacggcc ggcgctcgca gaccctcggc cccgctcccc
 721 ggatccccc gcgccctcca cgcctctccc gcgcgggggc agctccacgg cgcgcctcgc
 781 ct¹cggtgtg accttcagcg ag¹ccggagcc cccgcgaga gcaggcggcg gcgggcgggg
 841 gccgggcggg gcccggcgcg gggcggggcg ggcgcagag cgggcggcg cggcgggagt
 901 gctgagcgcg gcgcggccgg cccgccgctt tgtgtgtgct ctggatttgg gaaggagctc
 961 gccgcggcgg cggcgcctgag ggaggaggcg gcggcagcg gagccagag gaggaggagg
 1021 agga²gggga gccgctcatt catt²tgact cgcgcttct gccctcggc ggccctcgcct
 1081 gtgacccgga ctctggggcg atcttgcaa ctgctcgcg cctccccg cggaaagctc
 1141 gggcgtccgg ccgctcccg cgcgccagg cgggcttgt tttcctcgc ctaggcagat
 1201 ttgggctttg ccccttctc ttgcagt³ttt ccccttcc tgcctctccg gtttgaaaa
 1261 tggaggccga gacgcccac agcccgcgc cggcgcctc gggttcccga ctccgcgcg
 1321 ccttgggccc ctgctgcccg cgtgagggg cgcgcccg cgcgccccc cgtccgcgca
 1381 cccggagggc cccggcggcg gccct³tcgga g³tattgttcc ctteg³ccctt gttttggag
 1441 ggggagcga gactgagttt gagactgtt tccttccatt tcctttttt cttttctttt
 1501 cttttttttt tttttttttt tttttgaga aggggaattt catcccaaat aaaaaggATG

Código

- ¹ASO 175314
- ²ASO 175323
- ³ASO 175317

Figura 2A

agtgtgtggc agcggcgggcg gcggcgcgcc gaggtgggg ctctgttta ccagcattaa
 ctcgctgagc ggaaaaaaa agggaaaaa cccgaggagg agcgagcgca ccaggcgaac
 tcgagagagg cgggagagcg agagggacgc cccagcgag cctgcccacg gccggcgctc
 gcagaccctc ggccccgctc cccggatccc cccggccct ccacgcccct cccgcgcggg
 ggcagctcca cggcgcgccct cgcctcggt gtgacctca gcgagccgga gcccccgcg
 agagcaggcg gcggcgggcg gggccggggc gggggccggc gcggggcggg cggcgcgca
 gagccggggcg gcggcgggcg agtgctgagc gcggcgggcg cggcccggcg ctctgtgtgt
 gtcctggatt tgggaaggag ctgcccggc cggcgcgct gaggaggag gcggcgcgca
 gcggagccag gaggaggagg aggaggagg gtagccgctc attcatcttg actccgcgtt
 tctgcccctc gccggcctcg cctgtgacct ggacttcggg gcgactctgc gaactgcgctc
 gcgcccctcc gcggcggaag ctgggcgctc cggccgctc cgcgcgcca gggccgggct
 tgttttctc cgcctaggca gatttgggt ttgccccctt tcttgcagt ttccccct
 tccgctctc ccgggtttga aatggaggc cgacgagcc gacagcccgc cccggcgcg
 ctggttcc cgactccgc gaccctggc ccgtgctgc cggcgctgag gggccgcccc
 gcggcgccg cccgtccgc gcaccggag gccccggc gcggccctc ggagtattgt
 tccctcgcc ctgtttttg ggggggagc gaagactgag ttgagactt gttcccttc
 attcctttt ttcttttct ttctttttt ttctttttt ttcttttga gaaaggggat
 ttcaccccaa ataaaaagga atg aag tct ggc tcc gga gga ggg tcc ccg acc
 tcg ctg tgg ggg ctc ctg ttt ctc tcc gcc gcg ctc tcg ctc tgg ccg
 acg agt gga gaa atc tgc ggg cca ggc atc gac atc cgc aac gac tat
 cag cag ctg aag cgc ctg gag aac tgc acg gtg atc gag ggc tac ctc
 cac atc ctg ctc atc tcc aag gcc gag gac tac cgc agc tac cgc ttc
 ccc aag ctc acg gtc att acc gag tac ttg ctg ttc cga gtg gct
 ggc ctc gag agc ctc gga gac ctc ttc ccc aac ctc acg gtc atc cgc
 ggc tgg aaa ctc ttc tac aac tac gcc ctg gtc atc ttc gag atg acc
 aat ctc aag gat att ggg ctt tac aac ctg agg aac att act cgg ggg
 gcc atc agg att gag aaa aat gct gac ctc tgt tac ctc tcc act gtg
 gac tgg tcc ctg atc ctg gat gcg gtg tcc aat aac tac atc gtg ggg
 aat aag ccc cca aag gaa tgt ggt ggg gac ctg tgt cca ggg acc atg gag

Figura 2B

gag aag ccg atg tgt gag aag acc acc atc aac aat gag tac aac tac
 cgc tgc tgg acc aca aac cgc tgc cag aaa atg tgc cca agc acg tgt
 ggg aag cgg gcg tgc acc gag aac aat gag tgc tgc cac ccc gag tgc
 ctg ggc agc tgc agc gcg cct gag aac gac acg gcc tgt gta gct tgc
 cgc cac tac tac tat gcc ggt gtc tgt gtc cct gcc tgc ccg ccc aac
 acc tac agg ttt gag ggc tgg cgc tgt gtc gac cgt gac ttc tgc gcc
 aac atc ctc agc gcc gag agc agc tcc gag ggg ttt gtg atc cac
 gac ggc gag tgc atg cag gag tgc ccc tgc ggc ttc atc cgc aac ggc
 agc cag agc atg tac tgc atc cct tgt gaa ggt cct tgc ccg aag gtc
 tgt gag gaa gaa aag aaa aca aag acc att gat tct gtt act tct gct
 cag atg ctc caa gga tgc acc atc ttc aag ggc aat ttg ctc att aac
 atc cga cgg ggg aat aac att gct tca gag ctg gag aac ttc atg ggg
 ctc atc gag gtg tgc acg ggc tac gtg aag atc cgc cat tct cat gcc
 ttg gtc tcc ttg tcc cta aaa aac ctt cgc ctc atc cta gga gag
 gag cag cta gaa ggg aat tac tcc ttc tac gtc ctc gac aac cag aac
 ttg cag caa ctg tgg gac tgg gac cac cgc aac ctg acc atc aaa gca
 ggg aaa atg tac ttt gct ttc aat ccc aaa tta tgt gtt tcc gaa att
 tac cgc atg gag gaa gtg acg ggg act aaa ggg cgc caa agc aaa ggg
 gac ata aac acc agg aac aac ggg gag aga gcc tcc tgt gaa agt gac
 gtc ctg cat ttc acc tcc acc acc cgc tgc aag aat cgc atc atc ata
 acc tgg cac cgg tac cgg ccc cct gac tac agg gat ctc atc agc ttc
 acc gtt tac tac aag gaa gca ccc ttt aag aat gtc aca gag tat gat
 ggg cag gat gcc tgc ggc tcc aac agc tgg aac atg gtg gac gtg gac
 ctc cgg ccc aac aag gac gtg gag ccc ggc atc tta cta cat ggg ctg
 aag ccc tgg act cag tac gcc gtt tac gtc aag gct gtg acc ctc acc
 atg gtg gag aac gac cat atc cgt ggg gcc aag agt gag atc ttg tac
 att cgc acc aat gct tca gtt cct tcc att ccc ttg gac gtt ctt tca
 gca tgc aac tcc tct tct cag tta atc gtg aag tgg aac cct cct
 ctg ccc aac ggc aac ctg agt tac tac att gtg cgc tgg cag cgg cag
 cct cag gac ggc tac ctt tac cgg cac aat tac tgc tcc aaa gac aaa

Figura 2B (continuación)

atc ccc atc agg aag tat gcc gac ggc acc atc gac att gag gag gtc
 aca gag aac ccc aag act gag gtg tgt ggt ggc gag aaa ggg cct tgc
 tgc gcc tgc ccc aaa act gaa gcc gag aag cag gcc gag aag gag gag
 gct gaa tac cgc cct gaa aaa gtc ttt gag aat ttc ctg cac aac tcc atc ttc
 gtg ccc aga cct gaa agc cga agc agc agc agc gca gca gca acc tac
 acc acc atg tcc agc cga agc agc agc agc gca gca gca acc tac
 aac atc acc gac ccg gaa gag ctg gag aca gag tac cct ttc ttt gag
 agc aga gtg gat aac aag gag aga act gtc att tct aac ctt cgg cct
 ttc aca ttg tac cgc atc gat atc cac agc tgc aac cac gag gct gag
 aag ctg ggc tgc agc gcc tcc aac ttc gtc ttt gca agg act atg ccc
 gca gaa gga gca gat gac att cct ggg cca gtg acc tgg gag cca agg
 cct gaa aac tcc atc ttt tta aag tgg ccg gaa cct gag aat ccc aat
 gga ttg att cta atg tat gaa ata aaa tac gga tca caa gtt gag gat
 cag cga gaa tgt gtg tcc aga cag gaa tac agg aag tat gga ggg gcc
 aag cta aac cgg cta aac ccg ggg aac tac aca gcc cgg att cag gcc
 aca tct ctc tct ggg aat ggg tcg tgg aca gat cct gtg ttc ttc tat
 gtc cag gcc aaa aca gga tat gaa aac ttc atc cat ctg atc atc gct
 ctg ccc gtc gct gtc ctg ttg atc gtg gga ggg ttg gtg att atg ctg
 tac gtc ttc cat aga aag aga aat aac agc agc agc ggg aat gga gtg
 ctg tat gcc tct gtc aac ccg gag tac ttc agc gct gct gat gtg tac
 gtt cct gat gag tgg gag gtg gct cgg gag aag atc acc atg agc cgg
 gaa ctt ggg cag ggg tgg ttt ggg atg gtc tat gaa gga gtt gcc aag
 ggt gtg gtg aaa gat gaa cct gaa acc aga gtg gcc att aaa aca gtg
 aac gag gcc gca agc atg cgt gag agg att gag ttt ctc aac gaa gct
 tct gtg atg aag gag ttc aat tgt cac cat gtg ctg cga ttg ctg ggt
 gtg gtg tcc caa ggc cag cca aca ctg gtc atc atg gaa ctg atg aca
 cgg ggc gat ctc aaa agt tat ctc cgg tct ctg agg cca gaa atg gag
 aat aat cca gtc cta gca cct cca agc ctg agc aag atg att cag atg
 gcc gga gag att gca gac ggc atg gca tac ctc aac gcc aat aag ttc
 gtc cac aga gac ctt gct gcc cgg aat tgc atg gta gcc gaa gat ttc

Figura 2B (continuación)

aca gtc aaa atc gga gat ttt ggt atg acg cga gat atc tat gag aca
gac tat tac cgg aaa gga ggc aaa ggg ctg ctg ccc gtg cgc tgg atg
tct cct gag tcc ctc aag gat gga gtc ttc acc act tac tcg gac gtc
tgg tcc ttc ggg gtc gtc ctc tgg gag atc gcc aca ctg gcc gag cag
ccc tac cag ggc ttg tcc aac gag caa gtc ctt cgc ttc gtc atg gag
ggc ggc ctt ctg gac aag cca gac aac tgt cct gac atg ctg ttt gaa
ctg atg cgc atg tgc tgg cag tat aac ccc aag atg agg cct tcc ttc
ctg gag atc atc agc atc aaa gag gag atg gag cct ggc ttc cgg
gag gtc tcc ttc tac tac agc gag gag aac aag ctg ccc gag ccg gag
gag ctg gac ctg gag cca gag aac atg gag agc gtc ccc ctg gac ccc
tcg gcc tcc tcg tcc tcc ctg cca ctg ccc gag aga cac tca gga cac
aag gcc gag aac ggc ccc ggc cct ggg gtc ctg gtc ctc cgc gcc agc
ttc gac gag aga cag cct tac gcc cac atg aac ggg ggc cgc aag aac
gag cgg gcc ttg ccg ctg ccc cag tct tcg acc tgc tga tccttggatc
ctgaatctgt gcaaacagta acgtgtgctg acgcgacgc ggggtggggg ggagagagag
ttttaacaat ccattcaca gctcctctgta cctcagtgga tcttcagttc tgccttgct
gcccgggga gacagcttct ctgcagtata acacatttgg gatgttctt tttcaatat
gcaagcagct tttattccc tgcccaaac cttaactgac atgggcctt aagaacctta
atgacaacac ttaatagcaa cagagcactt gagaaccagt ctctcactc tgtccctgtc
cttccctgtt ctccctttct ctctcctctc tgcttcataa cggaaaaata attgccacaa
gtccagctgg gaagcccttt ttatcagttt gaggaagtgg ctgtccctgt gcccctatcc
aacactgta cacaccgcc tgacaccgtg ggtcattaca aaaaaacacg tggagatgga
aatcttacc ttatctttc acctttctag ggacatgaaa ttacaaaagg gccatcgttc
atccaaggct gttaccattt taacgctgcc taattttgcc aaatcctga actttctccc
tcacggccc ggcgctgatt cctcgtgtcc ggaggcatgg gtgagcatgg cagctggttg
ctccatttga gagacagct ggcgacacac tccgtccatc cgaactgccc tgctgtgctg
ctcaaggcca caggcacaca ggtctcattg ctctgacta gattattatt tgggggaact
ggacacaata ggtcttctctc tcagtgaagg tgggggagaag ctgaaccggc

Figura 2B (continuación)

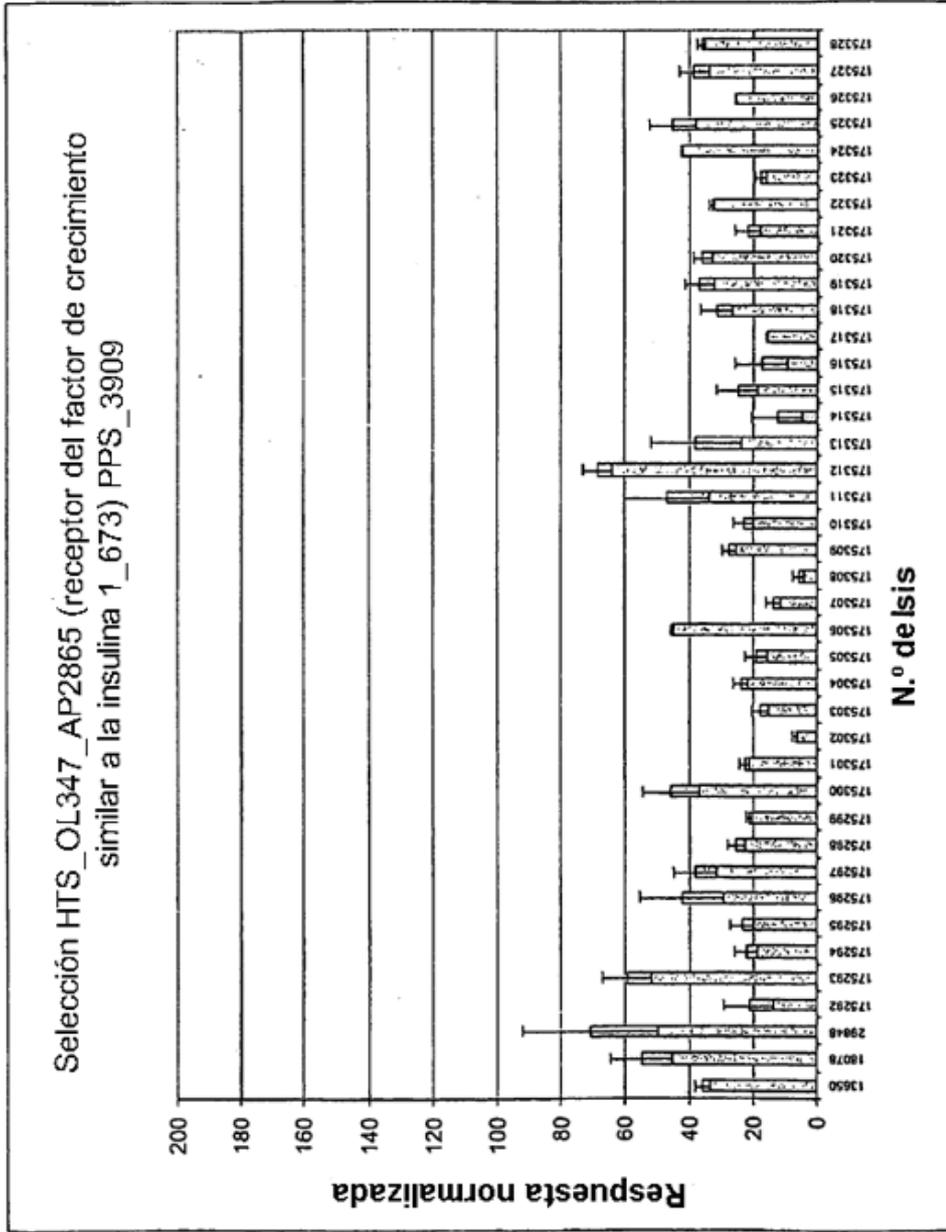


Figura 3A

Análisis de respuesta a la dosis de ASO de hIGF de partida en células A549

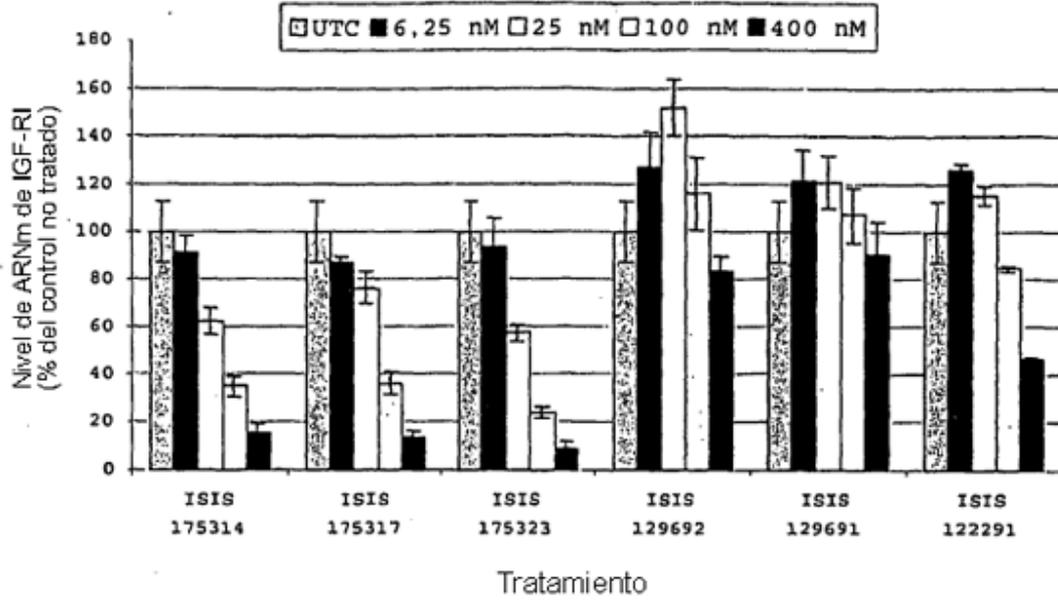


Figura 3B

| ASO de partida | Secuencia | Pos. de n.º de reg. | Región |
|---------------------------------|-----------------------------|---------------------|-----------------------|
| ISIS 175314 | 5' -CTCGTGAAGGTCACAGCCG-3' | M69229.0783 | 5' UTR [SEQ ID NO:26] |
| ISIS 175317 | 5' -CGAAGGAAACAATACTCCGA-3' | M69229.1406 | 5' UTR [SEQ ID NO:29] |
| ISIS 175323 | 5' -AATGAATGAGCGGCTCCCCC-3' | M69229.1025 | 5' UTR [SEQ ID NO:35] |
| Oligonucleótidos control | | | |
| ISIS 129692 | 5' ACATGGGCGCGGACTAAGT 3' | | [SEQ ID NO:50] |
| ISIS 129691 | 5' ATGCATACTACGAAAGGCCG 3' | | [SEQ ID NO:51] |
| ISIS 122291 | 5' TATTCCACGAACGTAGGCTG 3' | | [SEQ ID NO:52] |

*Las modificaciones con 2'MOE se indican mediante el subrayado

Figura 3C

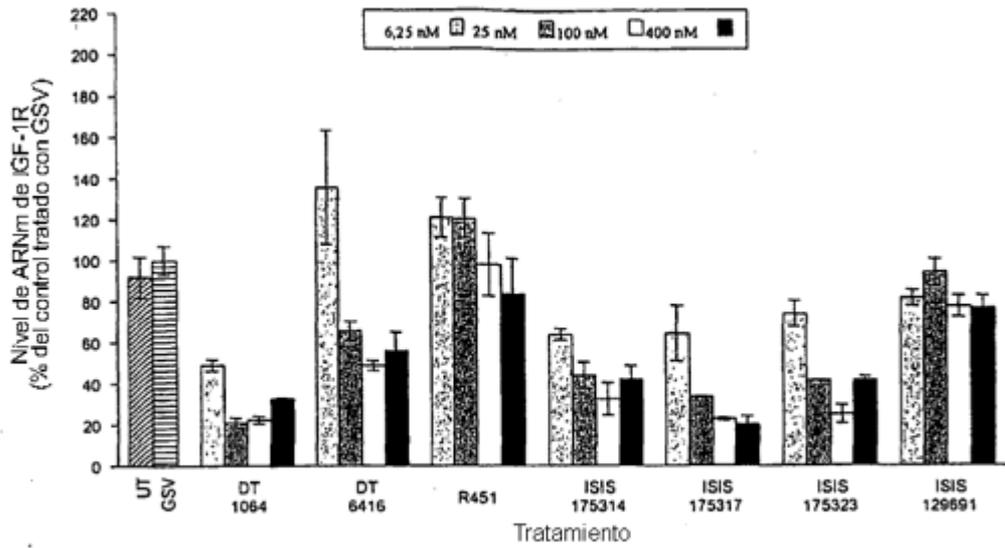


Figura 4A

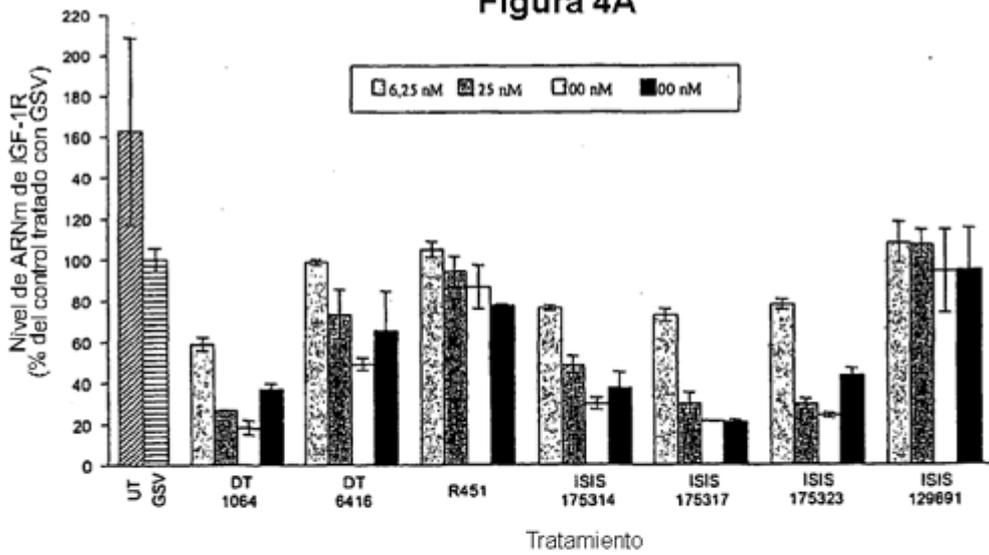


Figura 4B

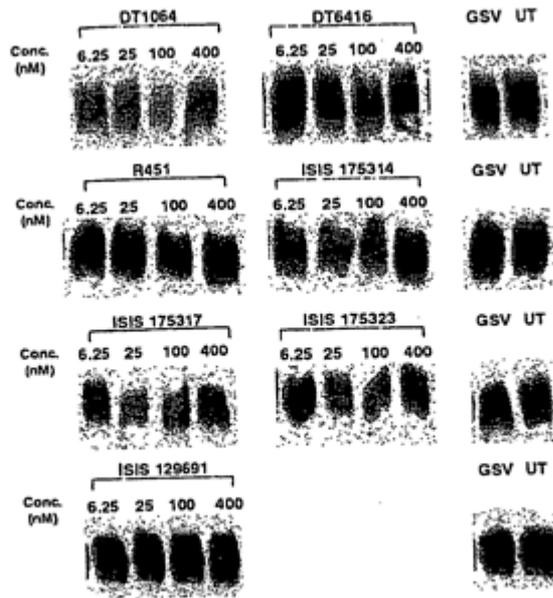


Figura 5A

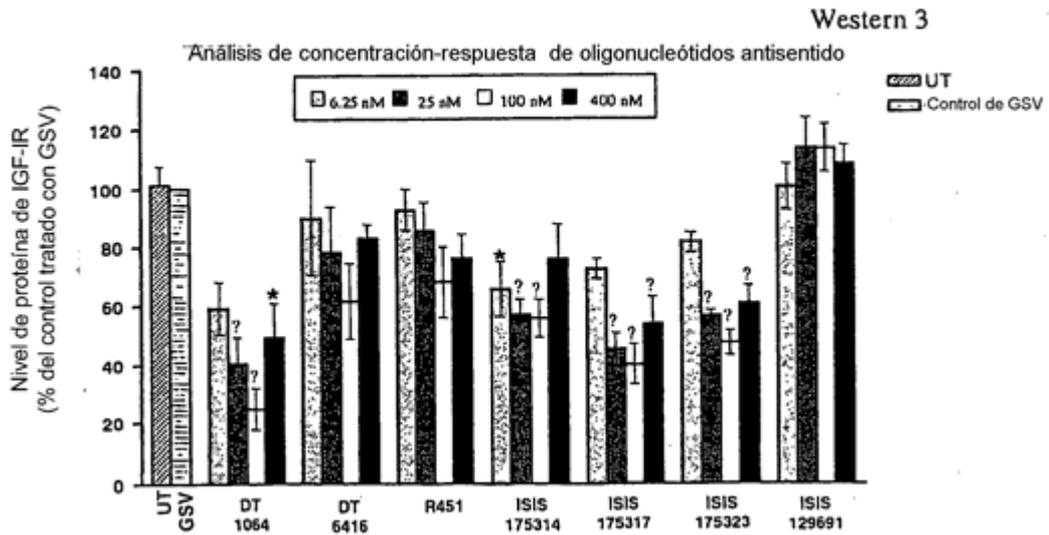


Figura 5B

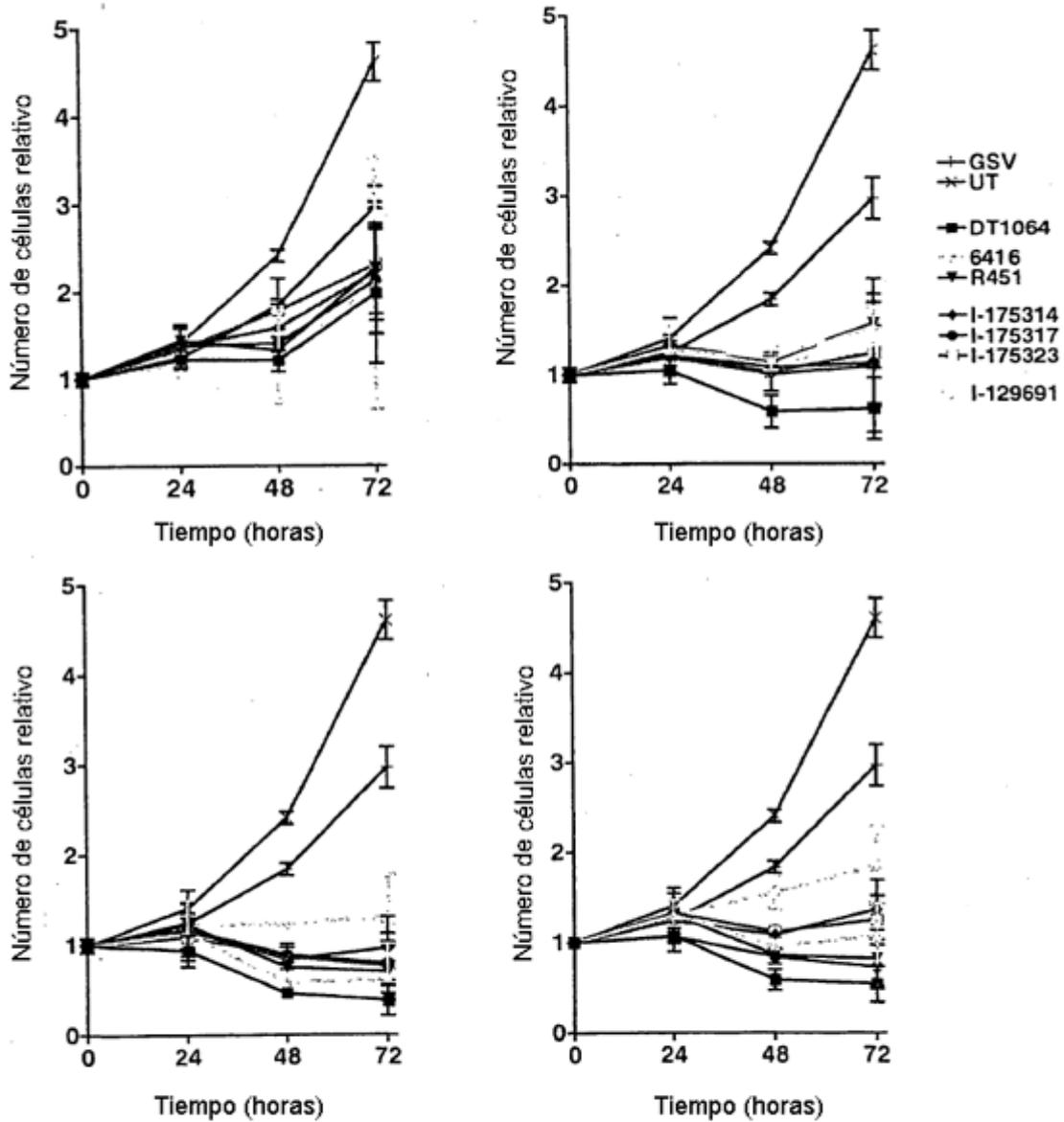


Figura 6

[SEQ ID NO:41]

```

1  tttttttttt ttttgagaaa ggaatttca tcccaataa aaggaatgaa gtctggctcc
61  ggaggagggt cccgacctc gctgtgggg gctcctgttc tctccgcgc gctctcgcctc
121  tggccgacga gtggagaaat ctgcgggcca ggcacgaca tccgcaatga ctatcagcag
181  ctgaagcgc tggagaactg cacggtgatc gagggtacc tccacatcct gctcatctcc
241  aaggccgagg actaccgcag ctaccgctc ccaagctca cggtcattac cgagtacttg
301  ctgctgttcc ggtggctgg ctcgagagc ctcggagacc tcttcccaa cctcacggtc
361  atccgcggct gaaactctt ctacaactac gccctggtca tcttcgagat gaccaatctc
421  aaggatatgt ggccttaca cctgaggaac attactcggg gggccatcag gattgagaaa
481  aatgctgacc tctgttacct ctccactgtg gactgggtccc tgatcctgga tgcggtgtcc
541  aataactaca ttgtgggaa taagccccc aaggaatgtg gggacctgtg tccaggggacc
601  atggaggaga agcagatgtg tgagaagacc accatcaaca atgagtaca ctaccgctgc
661  tggaccacaa accgtgcca gaaatgtgc ccaagcacgt gtggaaagcg ggcgtgcacc
721  gagaacaatg agtctgcca cccgagtg ccaactactac tatgcccgtg tctgtgtgcc
781  acggcctgtg tagcttgccg gggctggcg tgtgtggacc gtgacttctg cgccaacatc
841  cccaacacct acaggtttga agtgcagca ctcgagggg tttgtgatcc acgacggcga
901  ctacgcgcc agtgcacct cgggttctat cgcgaacggc agccagagca tgtactgcat
961  gactgcccct gaaaggtctg tgaggaagaa agaaaacaa agaccattga tctgtttact
1021  tctgctcaga tgcctcaagg atgcaccatc tcaagggca atttgcctcat taacatccga
1081  cgggggaaata acatgtcttc agagctggag aacttcatgg ggtcatcga ggtggtgacg
1141  ggctacgtga agatccgcca ttctcatgcc ttggtctcct tgtccttctt aaaaaacctt
1201  cgcctcatcc taggagagga gcagctagaa ggaattact ccttctcgt cctcgacaac
1261  cagaacttgc agcaactgtg ggaactggac caccgcaacc tgaccatcaa agcagggaaa
1321  atgtactttg ctccaatcc caaattatgt gtttccgaaa ttaccgcat ggaggaaagtg
1381  acggggacta aaggcgcca agcaaaaggg gacataaaca ccaggaaaca cggggagaga
1441  gcctcctgtg aaagtgcagt cctgcatctc acctccacca ccacgtcga gaatcgcatac
1501  atcataacct ggcaccggtg cggccccct gactacaggg atctcatcag cttcacccgtt
1561  tactacaagg aagcaccctt taagaatgtc acagagtatg atgggcagga tgcctgcggc
1621  tccaacagct ggaacatggt ggacgtggac ctcccgccca caaggagct ggagcccggc
1681  atcttactac atgggctgaa gcctggact cagtacgccc ttacgtcaa ggctgtgacc
1741  ctacccatgg tggagaacga ccataatcct ggggccaaga gtgagatctt gtacattcgc
1801

```

Figura 7

1861 accaatgctt cagttccctc cctcccttg gacgtttcttt cagcaticgaa ctccctctct
 1921 cagttaatcg tgaagtggaa cctccctct ctgcccacag gcaacctgag ttactacatt
 1981 gtgcgtggc agcggcagcc tcaggacggc tacctttacc ggcacaatta ctgctccaaa
 2041 gacaaaatcc ccatcaggaa gtatccgac ggcaccatcg acattgagga ggtcacagag
 2101 aaccccaaga ctgaggtgtg tggtagggag aaaggccctt gctgcgctg ccccaaaact
 2161 gaagccgaga agcaggccga gaaggaggag gctgaatacc gcaagctctt tgagaatttc
 2221 ctgcacaact ccatcttcgt gccagacct gaaaggaagc ggagagatgt catgcaagtg
 2281 gccaacacca ccatgtccag ccgaagcagg aacaccacgg ccgcagacac ctacaacatc
 2341 accgaccctg agagctgga gacaggtac cctttctttg agagcagagt ggataacaag
 2401 gagagaactg tcattttctaa ccttcggctt ttacatgtt accgcaticga tatccacagc
 2461 tgcaaccacg aggtgagaa gctgggctgc agcgcctcca actctgctt tgcaaggact
 2521 atgcccgcag aaggagcaga tgacattctt gggccagtga cctgggagcc aaggcctgaa
 2581 aactccatct ttttaaagtg gccggaacct gagaatcca atggattgat tctaattgat
 2641 gaaataaaat acggatcaca agttgaggat cagcagaaat gtgtgtccag acaggaatac
 2701 aggaagtatg gggggccaa gctaaaccgg ctaaacccgg gaaactaac agcccgatt
 2761 caggccacat ctctctctgg gaatgggtcg tggacagatc ctgtgttctt ctatgtccag
 2821 gccaaaacag gatatgaaa cttcatccat ctgaticatg cctgccccg cgtgtctctg
 2881 ttgatcgtgg gagggttggg gattatgctg tacgtcttcc atagaaagag aaataacagc
 2941 aggcctggga atggagtgtct gtatgctctt gtgaaccctg agtacttcag cgtgtctgat
 3001 gtgtacgttc ctgatgagtg gtaggtggct cgggagaga tcaccatgag ccgggaactt
 3061 gggcaggggt cgtttgggat ggtctatgaa ggaattgcca aggtgtggtt gaaagatgaa
 3121 cctgaaacca ggtggccat taaaacagtg aacgagggcc caagcatgcg tgagaggatt
 3181 ggtttctca acgaaagctt tgtgatgag ggttcaatt gtcaccatgt ggtscgattg
 3241 ctgggtgtgg tctcccaagg ccagccaaca ctggtcatca tggaaactgat gacacggggc
 3301 gatctcaaaa gtatctctcg gtctctgagg ccagaaatgg agaataatcc agtcttagca
 3361 cctccaagcc tgagcaagat gattcagatg gccggagaga ttgcagacgg catggcatic
 3421 ctcaacgcca ataatctct ccacagagac ctctgctgcc ggaattgcat ggtagccgaa
 3481 gatttcacag tcaaaatcgg agattttggt atgacgcgag atatctatga gacagactat
 3541 taccgaaaag gaggcaaaag gctgtgtccc gtgccttggg tgtctctga gtcctcaag
 3601 gatggagtct tcaccactta ctggacgtc tggctctctg gggctgtcct ctgggagatc
 3661 gccacactgg ccgagcagcc ctaccagggc ttgtcccaac agcaagtctt cgtctctgtc
 3721 atggagggcg gccttctgga caagccagac aactgtctg acatgctgtt tgaactgatg
 3781 cgcattgtct ggcagtataa ccccaagatg aggccttctt tcctggagat catcagcagc

Figura 7 (continuación)

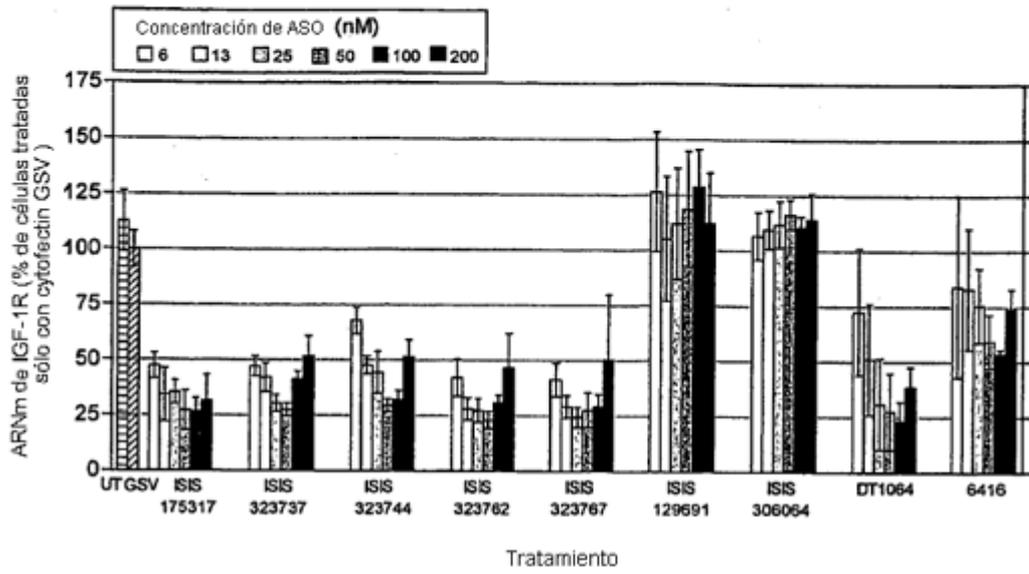


Figura 8

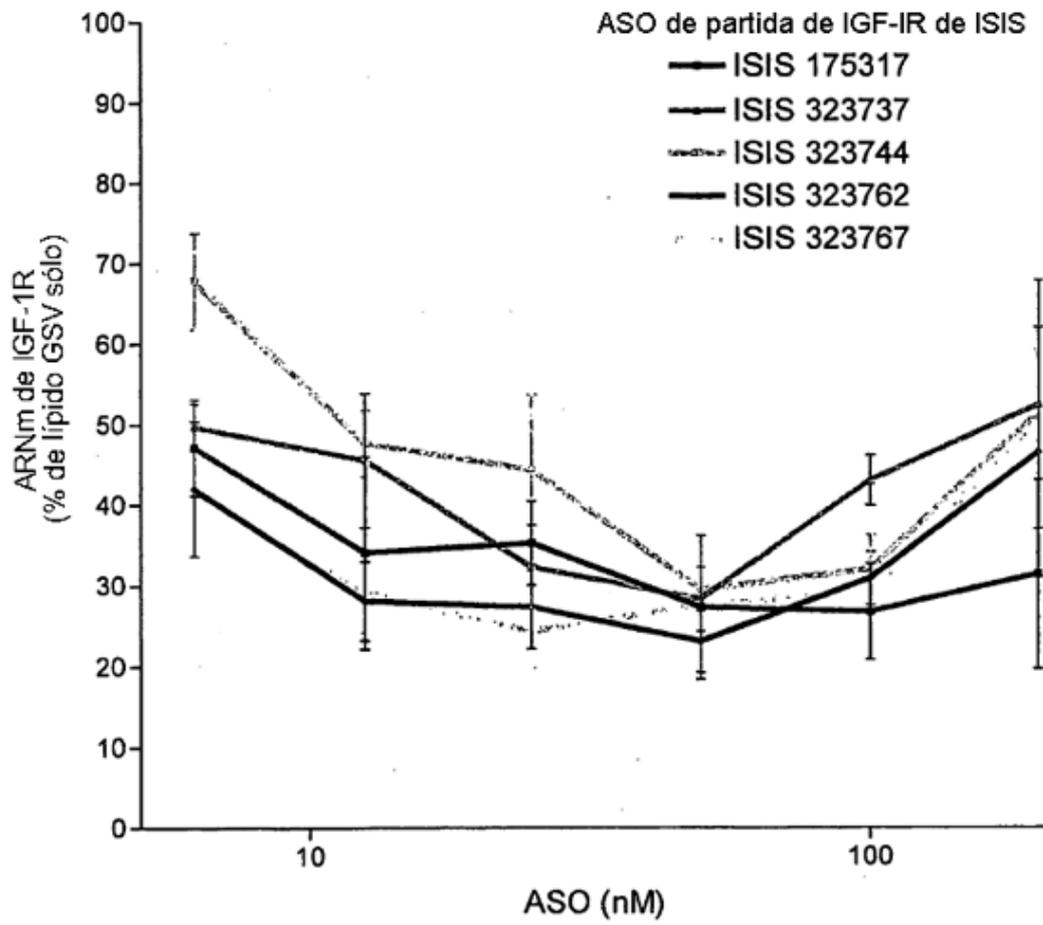


Figura 9

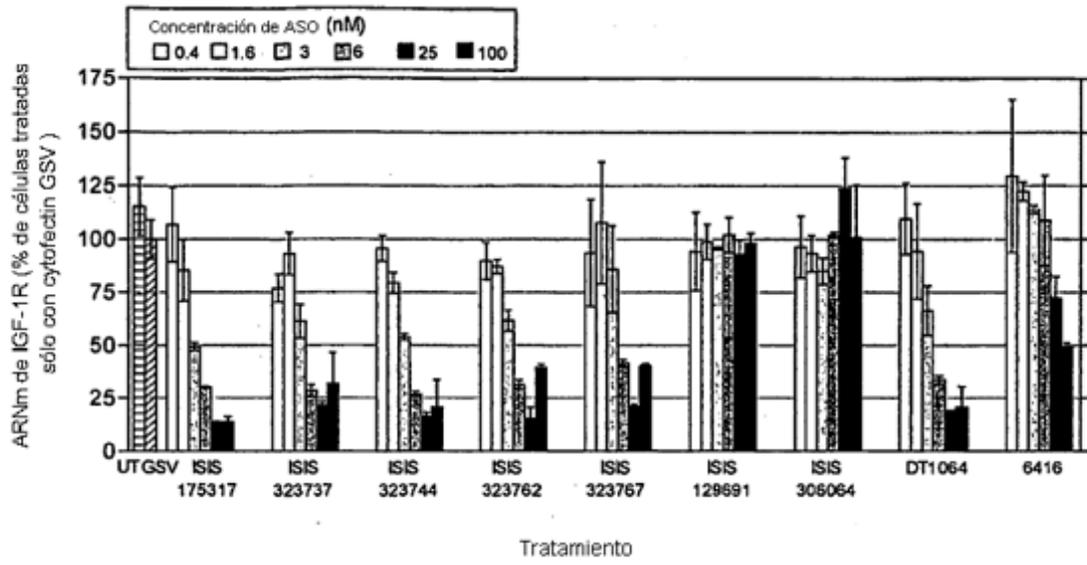


Figura 10

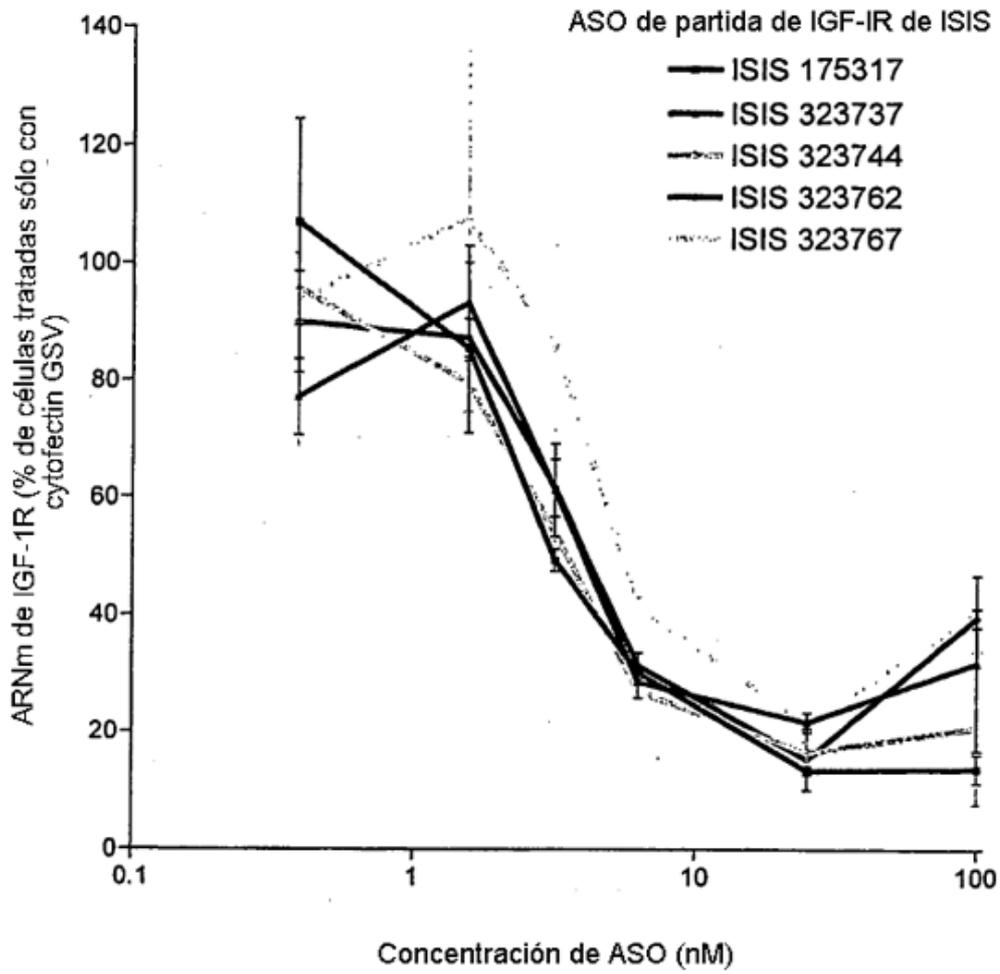


Figura 11

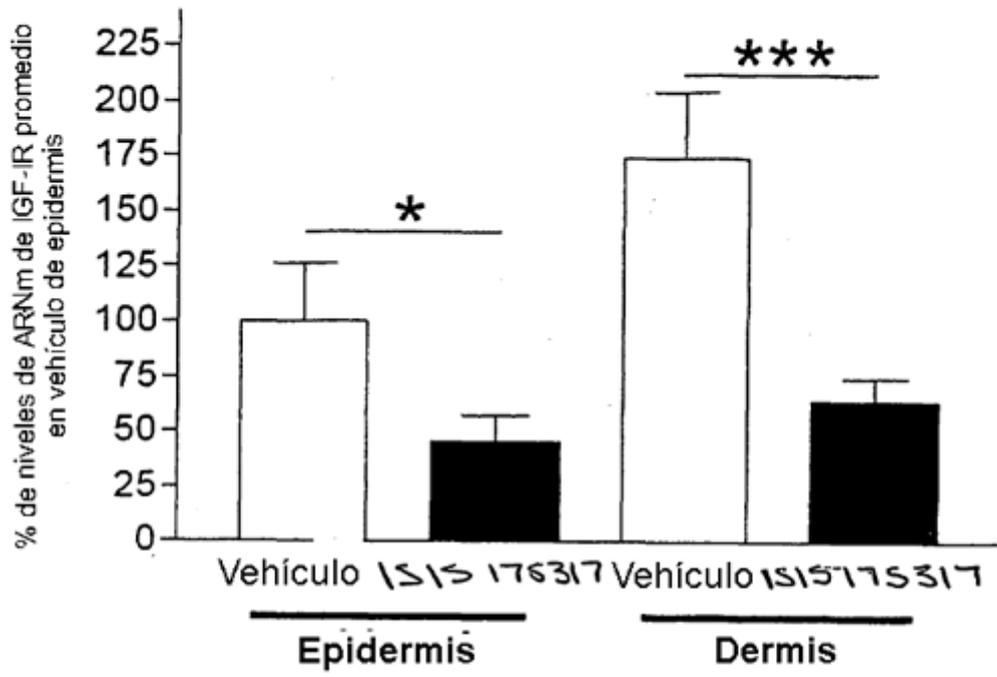


Figura 12

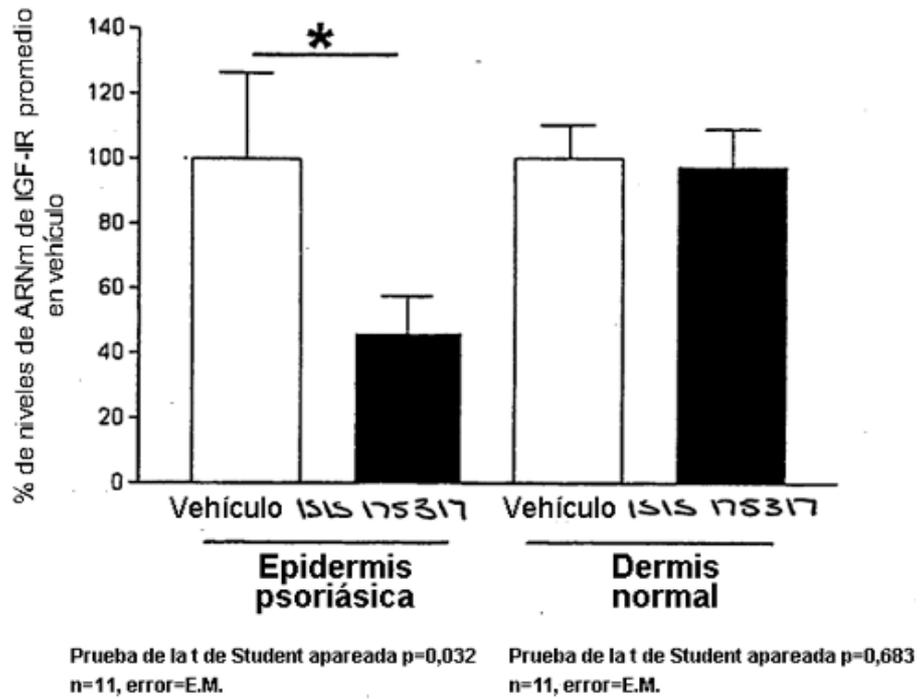


Figura 13

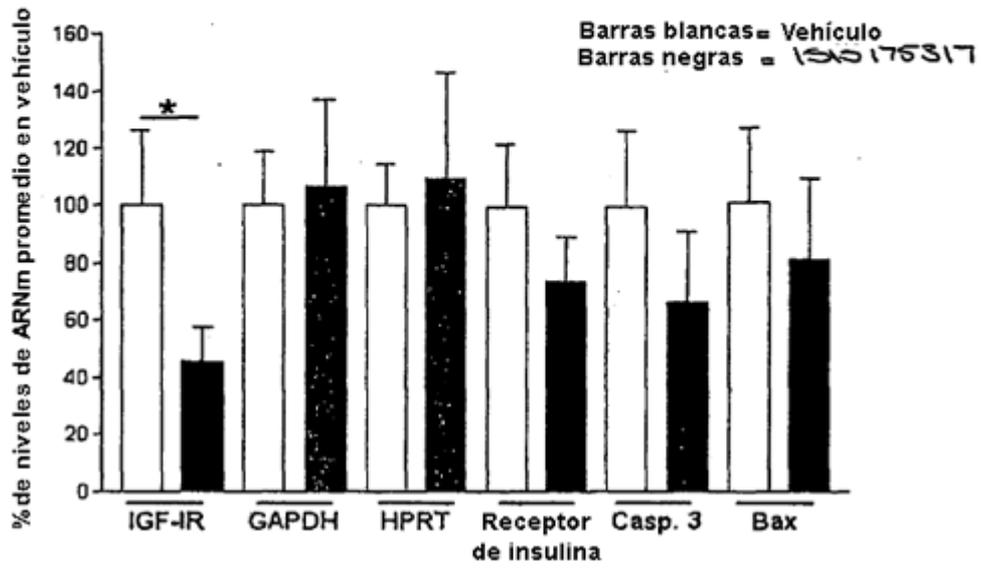


Figura 14