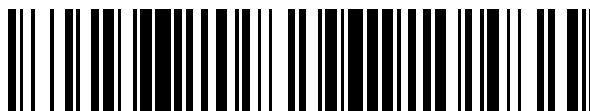


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 566 508**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.08.2009 E 09819622 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.01.2016 EP 2331141**

54 Título: **Oligonucleótidos antisentido dirigidos contra el factor de crecimiento de tejido conjuntivo y usos de los mismos**

30 Prioridad:

25.08.2008 US 190121 P

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

13.04.2016

73 Titular/es:

EXCALIARD PHARMACEUTICALS, INC. (50.0%)
2141 Palomar Airport Rd. Suite 300
Carlsbad, CA 92011, US y
IONIS PHARMACEUTICALS, INC. (50.0%)

72 Inventor/es:

DEAN, NICHOLAS M.;
FOULKES, J. GORDON;
O'DONNELL, NIALL;
BENNETT, C. FRANK y
FREIER, SUSAN M.

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 566 508 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

Oligonucleótidos antisentido dirigidos contra el factor de crecimiento de tejido conjuntivo y usos de los mismos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a oligonucleótidos antisentido (ASO) novedosos útiles para tratar trastornos de hiperproliferación y enfermedades fibróticas, y para reducir la cicatrización que resulta de la curación de heridas.

10 **Antecedentes de la invención**

La tecnología antisentido está surgiendo como un medio eficaz para reducir la expresión de productos génicos específicos y, por tanto, puede demostrarse ser útil de manera única en varias aplicaciones terapéuticas, de diagnóstico e investigación para la modulación de la expresión del factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF).
15 (Véase la patente estadounidense n.º 6.965.025B2 a nombre de Gaarde *et al.*)

Un compuesto antisentido es un compuesto oligomérico que puede someterse a hibridación con un ácido nucleico diana (por ejemplo una molécula de ARNm diana).

20 Los compuestos antisentido, composiciones y métodos para modular la expresión de CTGF y para tratar la enfermedad asociada con la expresión de CTGF se dan a conocer en la patente estadounidense n.º 6.965.025B2, la solicitud de patente estadounidense US 2008/108583 y las solicitudes de patente internacional WO 01/15729 y WO 2006/069037.

25 Sin embargo, sigue habiendo la necesidad de compuestos de este tipo adicionales que puedan proporcionar una inhibición potenciada de la expresión y las funciones de CTGF así como otras propiedades ventajosas.

En una realización, esta invención proporciona específicamente oligonucleótidos antisentido modificados preferidos para inhibir la expresión de CTGF. Estos han demostrado ser significativamente, y de manera inesperada, más
30 potentes que los ASO descritos previamente que seleccionan como diana CTGF.

El factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF; también conocido como ctgfact, proteína secretada inducible por fibroblastos, fisp-12, NOV2, proteína 2 relacionada con la proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina, IGFBP-rP2, IGFBP-8, HBGF-0,8, Hcs24 y ecogenina) es un miembro de la familia de CCN
35 (CTGF/CYR61/NOV) de proteínas modulares, denominado para los primeros miembros de la familia identificados, factor de crecimiento de tejido conjuntivo, rico en cisteína (CYR61) y sobreexpresado en nefroblastoma (NOV), pero la familia también incluye las proteínas ELM-1 (expresadas en células con bajo potencial metastásico), WISP-3 (proteína secretada inducida por Wnt-1) y COP-1 (WISP-2). Se ha encontrado que las proteínas CCN son proteínas de la matriz extracelular, secretadas que regulan procesos celulares tales como adhesión, migración, mitogénesis,
40 diferenciación, supervivencia, angiogénesis, aterosclerosis, condrogénesis, curación de heridas, tumorigénesis y enfermedades vasculares y fibróticas como esclerodermia (Lau y Lam, Exp. Cell Res., 1999, 248, 44-57). Se mostró que la proteína de factor de crecimiento de tejido conjuntivo estimulaba la síntesis de ADN y fomentaba la quimiotaxia de los fibroblastos (Bradham *et al.*, J. Cell Biol., 1991, 114, 1285-1294).

45 En la mayoría de los casos, se ha notificado un único transcrito de CTGF de 2,4 kilobases en estudios de expresión, aunque se han notificado transcritos de 3,5 y 7 kilobases en células de glioblastoma. El factor de crecimiento de tejido conjuntivo se expresa en fibroblastos durante procesos de diferenciación normal que implican la producción y remodelación de la matriz extracelular (ECM), tal como embriogénesis y decidualización uterina tras implantación. El factor de crecimiento de tejido conjuntivo también se sobreexpresa frecuentemente en trastornos fibróticos de la piel
50 tales como esclerosis sistémica, esclerosis localizada de la piel, queloides, tejido cicatricial, fascitis eosinófila, fascitis nodular y contractura de Dupuytren. Los niveles de proteína o ARNm de factor de crecimiento de tejido conjuntivo están elevados en lesiones fibróticas de órganos y tejidos principales incluyendo el hígado, riñón, pulmón, sistema cardiovascular, páncreas, intestino, ojo y encías. En tumores de mama, de páncreas y fibrohistiocíticos caracterizados por una afectación significativa del tejido conjuntivo, el factor de crecimiento de tejido conjuntivo se
55 sobreexpresa en el compartimento estromal. En muchos casos, la expresión del factor de crecimiento de tejido conjuntivo está relacionada espacial y temporalmente con el factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta) de citocinas profibrogénicas (Moussad y Brigstock, Mol. Genet. Metab., 2000, 71, 276-292).

60 Se ha mapeado el factor de crecimiento de tejido conjuntivo en la región cromosómica humana 6q23,1, proximal al gen *cmyb*, y las anomalías cromosómicas que afectan a esta región se han asociado con tumores humanos, tales como el tumor de Wilms (Martinerie *et al.*, Oncogene, 1992, 7, 2529-2534).

Los tumores con componentes fibróticos y vasculares significativos presentan una expresión aumentada de CTGF, y CTGF puede estar implicado en la patogenia de tumores miofibroblásticos pediátricos. De 12 tumores pediátricos
65 examinados, todos mostraron una expresión de moderada a intensa de CTGF en células tumorales y/o células endoteliales de la vasculatura asociada (Kasaragod *et al.*, Pediatr. Dev. Pathol., 2001, 4, 37-45).

El ARNm del factor de crecimiento de tejido conjuntivo también está específicamente regulado por incremento en linfoblastos de leucemia humana maligna de niños con leucemia linfoblástica aguda (ALL) (Vorwerk *et al.*, Br. J. Cancer, 2000, 83, 756-760), y los niveles tanto de ARNm como de proteína están regulados por incremento por TGF-beta en células de cáncer de mama humano Hs578T de manera dependiente de la dosis, indicando que CTGF es un importante factor neuroendocrino y un efector posterior crítico de TGF-beta (Yang *et al.*, J. Clin. Endocrinol. Metab., 1998, 83, 2593-2596).

En un modelo de fibrosis pulmonar murina, también se induce un aumento de la expresión de ARNm del factor de crecimiento de tejido conjuntivo por bleomicina, un agente fibrogénico pulmonar conocido (Lasky *et al.*, Am. J. Physiol., 1998, 275, L365-371), así como en células de lavado broncoalveolar de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática y sarcoidosis pulmonar, en comparación con sujetos de control no fumadores sanos, indicando que el factor de crecimiento de tejido conjuntivo está implicado en la respuesta fibroproliferativa a la lesión (Allen *et al.*, Am. J. Respir. Cell Moll. Biol., 1999, 21, 693-700). De manera similar, en un modelo experimental de glomerulonefritis proliferativa, la expresión de ARNm del factor de crecimiento de tejido conjuntivo estaba fuertemente aumentada en lesiones proliferativas mesangiales extracapilares y en áreas de fibrosis periglomerular. La sobreexpresión temprana del factor de crecimiento de tejido conjuntivo glomerular coincidió con una sorprendente regulación por incremento de proteínas de TGF-beta, y la cinética de la expresión del factor de crecimiento de tejido conjuntivo sugiere fuertemente un papel en la reparación glomerular, posiblemente de manera posterior a TGF-beta en este modelo de lesión renal transitoria (Ito *et al.*, J. Am. Soc. Nephrol., 2001, 12, 472-484).

Se da a conocer y se reivindica en la patente estadounidense n.º 5.876.730 un polipéptido sustancialmente puro o aislado caracterizado como que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a los aminoácidos carboxilo-terminales de una proteína de factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF), en el que el polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos que comienza en el residuo del aminoácido 247 ó 248 del extremo N-terminal del factor de crecimiento de tejido conjuntivo, una secuencia aislada de polinucleótido que codifica para el polipéptido de factor de crecimiento de tejido conjuntivo, un vector de expresión recombinante que contiene dicho polinucleótido, una célula huésped que contiene dicho vector de expresión, y una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido de factor de crecimiento de tejido conjuntivo en un portador farmacéuticamente aceptable. Se dan a conocer de manera general oligonucleótidos antisentido (Brigstock y Harding, 1999).

Se dan a conocer y se reivindican en las patentes estadounidenses n.ºs 5.783.187; 5.585.270; 6.232.064; 6.150.101; 6.069.006 y la publicación PCT WO 00/35936 un polinucleótido aislado que codifica para el polipéptido de factor de crecimiento de tejido conjuntivo, vectores de expresión, células huésped transformadas de manera estable o transfectadas con dichos vectores; un polipéptido aislado que comprende secuencias de nucleótidos reguladoras no traducidas en 5' aisladas de manera anterior al factor de crecimiento de tejido conjuntivo, en el que dichas secuencias de nucleótidos reguladoras no traducidas comprenden una región de iniciación de la transcripción y la traducción y en el que dicha secuencia es un elemento de respuesta a TGF-beta; un constructo de ácido nucleico aislado que comprende una secuencia reguladora no codificante aislada de manera anterior a un gen de factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF), en el que dicha secuencia reguladora no codificante está asociada operativamente con una secuencia de ácido nucleico que expresa una proteína de interés o ARN antisentido, en el que dicha secuencia de ácido nucleico es heteróloga con respecto a dicha secuencia no codificante; y un fragmento del polipéptido de factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) que tiene la capacidad para inducir la síntesis de ECM, la síntesis de colágeno y/o la diferenciación de miofibroblastos, que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por al menos el exón 2 o el exón 3 de dicho polipéptido. Se reivindica además un método para identificar una composición que afecta a la expresión del factor de crecimiento de tejido conjuntivo inducida por TGF-beta, y un método de diagnóstico de un estado patológico en un sujeto que se sospecha que tiene una patología seleccionada del grupo que consiste en enfermedad fibrótica y aterosclerosis, comprendiendo el método obtener una muestra que se sospecha que contiene factor de crecimiento de tejido conjuntivo, mediante lo cual detectar una diferencia en el nivel de factor de crecimiento de tejido conjuntivo en la muestra del sujeto en comparación con el nivel de factor de crecimiento de tejido conjuntivo en la muestra convencional normal es un diagnóstico de una patología caracterizada por un trastorno de proliferación celular asociado con el factor de crecimiento de tejido conjuntivo en el sujeto. Se reivindica además un método para la mejora de un trastorno de proliferación celular asociado con el factor de crecimiento de tejido conjuntivo, que comprende administrar a un sujeto que tiene dicho trastorno, en el sitio del trastorno, una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o fragmento del mismo que se une al factor de crecimiento de tejido conjuntivo, en el que dicho anticuerpo o fragmento del mismo no se une a PDGF. Se dan a conocer de manera general oligonucleótidos antisentido (Grotendorst, 2000; Grotendorst y Bradham, 2001; Grotendorst y Bradham, 2000; Grotendorst y Bradham, 1996; Grotendorst y Bradham, 1998; Grotendorst y Bradham, 2000).

Se da a conocer y se reivindica en la publicación PCT WO 00/27868 un polipéptido sustancialmente puro del factor de crecimiento de tejido conjuntivo o fragmentos funcionales del mismo, una secuencia aislada de polinucleótido que codifica para dicho polipéptido, dicha secuencia de polinucleótido en la que T también puede ser U, una secuencia de ácido nucleico complementaria a dicha secuencia de polinucleótido, y fragmentos de dichas secuencias que tienen al menos 15 bases de longitud y que se hibridarán con ADN que codifica para la secuencia de aminoácidos

de la proteína de factor de crecimiento de tejido conjuntivo en condiciones de moderadas a altamente rigurosas. Se reivindica además un vector de expresión que incluye dicho polinucleótido, una célula huésped transformada de manera estable con dicho vector, un anticuerpo que se une a dicho polipéptido, y un método para producir dicho polipéptido. Se reivindica además un método para inhibir la expresión del factor de crecimiento de tejido conjuntivo en una célula que comprende poner en contacto la célula con un polinucleótido que se une a un ácido nucleico diana en la célula, en el que el polinucleótido inhibe la expresión del factor de crecimiento de tejido conjuntivo en la célula, en el que el polinucleótido es un polinucleótido antisentido, así como un kit para la detección de expresión del factor de crecimiento de tejido conjuntivo que comprende un medio portador que está compartimentalizado para recibir uno o más recipientes, que comprende al menos un recipiente que contiene al menos un oligonucleótido antisentido que se une al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (Schmidt *et al.*, 2000).

Se da a conocer y se reivindica en la publicación PCT WO 00/13706 un método para tratar o prevenir la fibrosis, comprendiendo el método administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de un agente que modula, regula o inhibe la expresión o actividad del factor de crecimiento de tejido conjuntivo o fragmentos del mismo, y en el que el agente es un anticuerpo, un oligonucleótido antisentido o una molécula pequeña. El método se dirige al tratamiento de fibrosis renal y trastornos renales asociados, en particular, complicaciones asociadas con diabetes e hipertensión (Riser y Denichili, 2000).

Se da a conocer y se reivindica en la publicación PCT WO 01/29217 una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de un grupo que comprende NOV1, NOV2 (factor de crecimiento de tejido conjuntivo) y NOV3, una forma madura o variante de una secuencia de aminoácidos seleccionada de dicho grupo, así como una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de dicho grupo así como formas maduras y variantes o fragmentos de dichos polipéptidos, y el complemento de dicha molécula de ácido nucleico. Se dan a conocer de manera general oligonucleótidos antisentido (Prayaga *et al.*, 2001).

La formación de cicatrices hipertróficas, en particular, es un problema clínico importante en la resolución de quemaduras graves y puede dar lugar a una cicatrización exuberante que da como resultado la pérdida funcional permanente y el estigma de la desfiguración. Anualmente, más de 1 millón de personas requieren tratamiento para quemaduras en los Estados Unidos. La incidencia de cicatrización hipertrófica tras quemaduras es un resultado común que crea un problema de enorme magnitud. Por tanto, un inhibidor de CTGF tal como un oligonucleótido antisentido (ASO) debe ser altamente eficaz en la prevención de la intensidad de cicatrices hipertróficas formadas de manera posterior a quemaduras. Esta actividad pudo evaluarse aplicando de forma tópica ASO formulados y monitorizando la intensidad de la cicatriz desarrollada de manera posterior a producirse la quemadura.

CTGF puede ser una diana atractiva para modular la cicatrización hipertrófica por varios motivos. Como cofactor y mediador posterior de TGF- β 1 o TGF- β 2, CTGF puede representar una diana más específica que TGF- β 1 o TGF- β 2 para terapias moleculares dirigidas a genes destinadas a la cicatrización, particularmente puesto que TGF- β 1 o TGF- β 2 tiene efectos pluripotentes no relacionados con la formación de cicatrices. Además, CTGF puede tener funciones independientes de TGF- β 1 o TGF- β 2 en el mantenimiento de un fenotipo fibrótico que se anularía por terapias anti-TGF- β 1 o TGF- β 2. A pesar de los avances en la comprensión de los papeles desempeñados por CTGF en el aumento de la fibrosis en sistemas multiorgánicos y en enfermedades dérmicas crónicas tales como esclerodermia, los papeles desempeñados por CTGF en la cicatrización aguda y la curación de heridas siguen siendo ampliamente deducidos por observación.

Actualmente, no existen agentes terapéuticos conocidos que inhiban eficazmente la síntesis del factor de crecimiento de tejido conjuntivo y hasta la fecha, las estrategias de investigación destinadas a modular la función del factor de crecimiento de tejido conjuntivo han implicado el uso de butirato de sodio (NaB), anticuerpos de bloqueo de función y oligonucleótidos antisentido.

Se cree que factores de la dieta desempeñan un importante papel tanto en el desarrollo como en la prevención de cánceres humanos, incluyendo carcinoma de mama. El micronutriente NaB de la dieta es un producto final principal de la digestión de fibra y almidón de la dieta, y es un potente inhibidor del crecimiento que inicia la diferenciación celular de muchos tipos de células *in vitro*. NaB ejerce sus efectos biológicos, en parte, como inhibidor de histona desacetilasas en células epiteliales de mama, induce muerte celular apoptótica en células de cáncer de mama humano que no responden a estrógenos Hs578T, y puede activar diferentes genes implicados en la detención del ciclo celular dependiendo del tipo de célula. NaB regula por incremento específicamente la expresión del factor de crecimiento de tejido conjuntivo de manera dependiente de la dosis, estimulando un aumento en los niveles tanto de ARNm como de proteína en células de mama tanto cancerosas como no cancerosas (Tsubaki *et al.*, J. Endocrinol., 2001, 169, 97-110).

TGF-beta tiene la capacidad única de estimular el crecimiento de fibroblastos normales en agar blando, una propiedad de las células transformadas. El factor de crecimiento de tejido conjuntivo no puede inducir estos fibroblastos de riñón de rata normales (NRK) de crecimiento independiente del anclaje, pero la síntesis y la acción

del factor de crecimiento de tejido conjuntivo son esenciales para la independencia del anclaje inducida por TGF-beta. Anticuerpos frente al factor de crecimiento de tejido conjuntivo bloquearon específicamente el crecimiento independiente del anclaje inducido por TGF-beta, y los fibroblastos NRK transformados con un constructo que expresa el gen de factor de crecimiento de tejido conjuntivo en la orientación antisentido no respondían a TGF-beta en el ensayo de crecimiento independiente del anclaje (Kothapalli *et al.*, Cell Growth. Differ., 1997, 8, 61-68). Estas células NRK que expresan CTGF-antisentido también se usaron para mostrar que la síntesis de colágeno estimulada por TGF-beta está mediada por el factor de crecimiento de tejido conjuntivo, indicando que el factor de crecimiento de tejido conjuntivo puede ser una diana útil para terapias antifibróticas (Duncan *et al.*, Faseb J., 1999, 13, 1774-1786).

La región no traducida en 3' (UTR) del ADNc de factor de crecimiento de tejido conjuntivo humano porta varias secuencias consenso para elementos reguladores. Cuando se fusionó la 3'-UTR en el sentido de 3' de un gen indicador, se encontró que actuaba como elemento represor de acción en cis fuerte, y la 3'-UTR antisentido tenía un efecto similar, pero más fuerte. (Kubota *et al.*, FEBS Lett., 1999, 450, 84-88). La comparación de las 3'-UTR de factor de crecimiento de tejido conjuntivo humano y de ratón reveló un pequeño segmento conservado de 91 bases. Se amplificó esta región mediante RT-PCR a partir de fibroblastos de ratón NIH3T3 y se usó para producir un constructo de fusión quimérico para el análisis de sus efectos represores. La 3'-UTR de factor de crecimiento de tejido conjuntivo de ratón en la orientación o bien sentido o bien antisentido tuvo un fuerte efecto represor sobre la transcripción del gen indicador, indicando una independencia de la orientación de este elemento regulador (Kondo *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 2000, 278, 119-124).

Se usó un oligonucleótido antisentido de fosforotioato, de 16 nucleótidos de longitud y dirigido al sitio de inicio de la traducción, para inhibir la expresión del factor de crecimiento de tejido conjuntivo y suprimir la proliferación y migración de células endoteliales vasculares de aorta de bovino en cultivo (Shimo *et al.*, J. Biochem. (Tokyo), 1998, 124, 130-140). También se usó este oligonucleótido antisentido para mostrar que el factor de crecimiento de tejido conjuntivo induce apoptosis en células de cáncer de mama humano MCF-7 y que la apoptosis inducida por TGF-beta está mediada, en parte, por el factor de crecimiento de tejido conjuntivo (Hishikawa *et al.*, J. Biol. Chem., 1999, 274, 37461-37466). También se encontró que el mismo oligonucleótido antisentido inhibía la activación de caspasa 3 mediada por TGF-beta y, por tanto, que inhibía la inducción de la apoptosis mediada por TGF-beta en células de músculo liso aórtico humano (HASC) (Hishikawa *et al.*, Eur. J. Pharmacol., 1999, 385, 287-290). También se usó este oligonucleótido antisentido para bloquear la expresión del factor de crecimiento de tejido conjuntivo y demostrar que la tensión arterial elevada regula por incremento la expresión del factor de crecimiento de tejido conjuntivo en células mesangiales, lo que potencia a su vez la producción de proteínas de la ECM e induce apoptosis, contribuyendo a la remodelación del mesangio y, en última instancia, a glomeruloesclerosis (Hishikawa *et al.*, J. Biol. Chem., 2001, 276, 16797-16803).

Por consiguiente, sigue habiendo la necesidad sentida desde hace mucho tiempo de agentes adicionales que puedan inhibir eficazmente la función del factor de crecimiento de tejido conjuntivo.

Sumario de la invención

Esta invención proporciona compuestos que comprenden oligonucleótidos modificados que comprenden 12-30 nucleósidos unidos, preferiblemente que comprenden 20 o al menos 12 nucleósidos unidos, más preferiblemente al menos 14 nucleósidos unidos, de los que pueden producir la expresión inhibitoria del factor de tejido conjuntivo. También se proporcionan composiciones farmacéuticas y otras que comprenden los compuestos antisentido de la invención.

También se proporcionan métodos de tratamiento de un animal, particularmente un ser humano, que tiene una enfermedad o un estado asociado con CTGF administrando una cantidad de tales compuestos eficaz para inhibir la expresión de CTGF, en los que la enfermedad o el estado es un trastorno de hiperproliferación, tal como cáncer y enfermedades fibróticas. Se proporciona además un método de reducción de la cicatrización que resulta de la curación de heridas administrando una cantidad de tales compuestos eficaces para inhibir la expresión de CTGF.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra los segmentos o las regiones seleccionados como diana en la secuencia genómica de CTGF, principalmente segmentos seleccionados como diana de exón, contra los que se produjeron oligonucleótidos antisentido con respecto a CTGF.

La figura 2 muestra los segmentos o las regiones seleccionados como diana en la secuencia de ARNm de CTGF secuencia contra los que se produjeron oligonucleótidos antisentido con respecto a CTGF.

La figura 3 proporciona una representación gráfica de las pruebas de oligonucleótidos antisentido que seleccionan como diana secuencias de exón en la secuencia de ARNm de CTGF para la inhibición de la expresión de CTGF.

La figura 4 muestra los segmentos o las regiones diana en la secuencia genómica de CTGF, principalmente

segmentos seleccionados como diana de intrón, contra los que se produjeron oligonucleótido antisentido con respecto a CTGF.

5 La figura 5 muestra los segmentos o las regiones diana en la secuencia de ARNm de CTGF contra los que se produjeron oligonucleótido antisentido con respecto a CTGF.

La figura 6 proporciona una representación gráfica del resultado de las pruebas de oligonucleótidos antisentido que seleccionan como diana principalmente secuencias de intrón en la secuencia de ARNm de CTGF para la inhibición contra la expresión de CTGF.

10 La figura 7 muestra los oligonucleótidos antisentido altamente activos contra CTGF y compara su actividad frente a la de dos oligonucleótidos antisentido diseñados previamente (ISIS 124238 y ISIS 124212) dados a conocer en la patente estadounidense n.º 6.965.025 B2.

15 La figura 7A identifica los oligonucleótidos antisentido que seleccionan como diana el exón 8 y la figura 7B proporciona secuencias preferidas de los oligonucleótidos antisentido.

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

20 La figura 9 proporciona una representación gráfica de los niveles en plasma de alanina aminotransferasa (ALT) (figura 9A) y aspartato aminotransferasa (AST) (figura 9B) en ratones tras cuatro semanas de tratamiento con 25 mg/kg o 50 mg/kg de oligonucleótido antisentido ISIS 412294 (SEQ ID NO: 39), ISIS 412295 (SEQ ID NO: 40) o ISIS 418899 (SEQ ID NO: 166). Los resultados muestran que los niveles en plasma de ALT y AST en los ratones a los que se les dosificaron 25 mg/kg o 50 mg/kg de ISIS 412294 (SEQ ID NO: 39) o ISIS 412295 (SEQ ID NO: 40), o a los que se les dosificaron 25 mg/kg de ISIS 418899 (SEQ ID NO: 166) fueron similares a los niveles en el grupo control de solución salina (vehículo); sin embargo, los ratones a los que se les dosificaron 50 mg/kg de ISIS 418899 (SEQ ID NO: 166) muestran niveles de ALT y AST aumentados significativamente, por encima de los valores observados en el grupo control.

La figura 10 proporciona una representación gráfica del resultado tras cuatro semanas de tratamiento con oligonucleótidos antisentido que muestra que el aumento de peso para el grupo tratado con 50 mg/kg de 412295 fue significativamente menor que el aumento de peso en el grupo control.

La figura 11 muestra que el tratamiento intradérmico de heridas en la piel en ratas con 3,0, 1,0, 0,3 ó 0,1 mg de oligonucleótido antisentido de CTGF dio como resultado una reducción estadísticamente significativa en la expresión de ARNm tanto de CTGF como de Col1A2 para todas las dosis. Estos resultados demuestran claramente que la inhibición de la expresión de CTGF con un oligonucleótido antisentido modificado con 2'MOE disminuirá la deposición de colágeno en la piel.

La figura 12 proporciona una representación gráfica que muestra niveles significativos del oligonucleótido antisentido de CTGF presentes durante hasta al menos día 14 tras la dosificación intradérmica de 50 mg/ml (5 mg de dosis total) en conejos.

Descripción detallada de la invención

Esta invención proporciona un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que consiste en 12-30 nucleósidos unidos, del que al menos una parte de secuencia de 12 nucleobases es complementaria a los nucleótidos presentes dentro de la región seleccionada de los nucleótidos 1388-1423, 1394-1423 y 1399-1423 de SEQ ID NO: 9, en el que el oligonucleótido modificado comprende:

- 55 (a) un segmento de separación ("*gap*") que consiste en desoxinucleósidos unidos;
- (b) un segmento de ala ("*wing*") en 5' que consiste en nucleósidos modificados unidos; y
- (c) un segmento de ala en 3' que consiste en nucleósidos modificados unidos;

60 en el que el segmento de separación está situado entre el segmento de ala en 5' y el segmento de ala en 3' y en el que cada nucleósido modificado dentro de cada segmento de ala comprende un azúcar modificado.

En una realización, esta invención proporciona un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que comprende 12-30 nucleósidos unidos, del que al menos una parte de secuencia de 12 nucleobases está presente dentro de las secuencias de nucleobases expuestas en SEQ ID NO: 39, 40 y 166.

En una realización preferida de la invención, el compuesto comprende 20 o al menos 12 nucleósidos unidos, más preferiblemente al menos 14 nucleósidos unidos, de los que está presente dentro de las secuencias de nucleobases expuestas en SEQ ID NO: 39, 40 y 166.

5 La selección de estas secuencias se determinó examinando los resultados presentados en las figuras 1 a 7, así como los resultados de un estudio de respuesta a la dosis en células endoteliales de vena umbilical humana (HuVEC) (figura 8). Se proporcionan detalles del experimento y datos en el ejemplo 8 en la sección de ejemplos más adelante.

10 Las secuencias diana presentadas en las figuras 1 a 6 incluyen secuencias de selección como diana tanto de intrón como de exón. Una región diana es una región definida estructuralmente del ácido nucleico. Por ejemplo, una región diana puede englobar una 3' UTR, una 5' UTR, un exón, un intrón, una región codificante, una región de iniciación de la traducción, región de terminación de la traducción, u otra región de ácido nucleico definida. Seleccionar como diana incluye determinar al menos un segmento diana con el que se hibrida un compuesto antisentido, de manera que se produzca un efecto deseado. En esta realización, el efecto deseado es una reducción en los niveles de ácido nucleico diana de ARNm.

15 Se identificaron múltiples secuencias con aparente actividad mayor que secuencias diseñadas previamente tales como SEQ ID 15 (Lis 124238), en secuencias tanto exónicas como intrónicas. Parece que varios oligonucleótidos intrónicos (SEQ NO. 125) y exónicos (SEQ NO. 28, 30, 40, 45, 52, 50 y 78) nuevos son significativamente más activos que otras secuencias.

20 Se mostró que SEQ ID NO. 39 y 40 eran inhibidores altamente eficaces de la expresión de CTGF en el examen de ASO original para detectar actividad (datos mostrados en el presente documento). Para examinar adicionalmente si este área en el ARNm de CTGF representa un "punto caliente" para la selección como diana con los ASO, se diseñó una secuencia de ASO adicional (SEQ ID NO 166), que se diseñó para que hibridara con la secuencia justo en el sentido de 5' de las seleccionadas como diana por SEQ NO. 39 y 40. También se encontró que este ASO (SEQ ID NO. 166) era un inhibidor altamente potente de la expresión de ARNm de CTGF, demostrando que esta sección del ARNm de CTGF es una región atractiva para la selección como diana con inhibidores de ASO.

25 En una determinada realización, el compuesto antisentido es complementario a una parte de la región de CTGF seleccionada como diana por oligonucleótidos activos que abarca desde los sitios diana 1396 a 1424. Esto es el espacio de secuencia seleccionado como diana por Isis 418899, 412295 y 412294 (SEQ ID NO: 166, 40 y 39, respectivamente).

30 Esta invención también proporciona un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que comprende al menos 12, preferiblemente al menos 14, nucleósidos unidos, cuya secuencia de nucleobases es una parte de una de las secuencias de nucleobases expuestas en SEQ ID NO: 39, 40 y 166.

35 Los compuestos antisentido descritos en el presente documento pueden comprender un oligonucleótido que tiene de 12 a 30, de 12 a 20, y preferiblemente de 14 a 20 nucleósidos unidos.

En una realización de la invención, el oligonucleótido modificado es un oligonucleótido monocatenario o bicatenario.

40 La presente invención emplea compuestos oligoméricos, particularmente oligonucleótidos antisentido, para su uso en la modulación de la función de moléculas de ácido nucleico que codifican para el factor de crecimiento de tejido conjuntivo, modulando en última instancia la cantidad del factor de crecimiento de tejido conjuntivo producido. Esto se logra proporcionando los compuestos antisentido que se hibridan específicamente con uno o más ácidos nucleicos que codifican para el factor de crecimiento de tejido conjuntivo. Tal como se usa en el presente documento, los términos "ácido nucleico diana" y "ácido nucleico que codifica para el factor de crecimiento de tejido conjuntivo" engloban ADN que codifica para el factor de crecimiento de tejido conjuntivo, ARN (incluyendo pre-ARNm y ARNm) transcrito a partir de tal ADN, y también ADNc derivado de tal ARN. La hibridación específica de un compuesto oligomérico con su ácido nucleico diana interfiere en la función normal del ácido nucleico. Esta modulación de la función de un ácido nucleico diana por compuestos que se hibridan específicamente con el mismo se denomina generalmente "antisentido". Las funciones de ADN que van a interferirse incluyen replicación y transcripción. Las funciones de ARN que van a interferirse incluyen todas las funciones vitales tales como, por ejemplo, translocación del ARN al sitio de traducción de proteína, traducción de proteína a partir del ARN, corte y empalme del ARN para producir una o más especies de ARNm, y actividad catalítica que puede verse comprometida o facilitada por el ARN. El efecto global de tal interferencia con la función del ácido nucleico diana es la modulación de la expresión del factor de crecimiento de tejido conjuntivo. En el contexto de la presente invención, "modulación" significa o bien un aumento (estimulación) o bien una disminución (inhibición) en la expresión de un gen. En el contexto de la presente invención, la inhibición es la forma preferida de modulación de la expresión génica y el ARNm es una diana preferida.

65 Ácidos nucleicos diana, regiones diana y secuencias de nucleótidos

Se prefiere seleccionar como diana ácidos nucleicos específicos para antisentido. "Seleccionar como diana" un compuesto antisentido con respecto a un ácido nucleico particular, en el contexto de esta invención, es un proceso de múltiples etapas.

5 Se entiende que la secuencia expuesta en cada SEQ ID NO en los ejemplos contenidos en el presente documento es independiente de cualquier modificación a un resto de azúcar, una unión internucleosídica o una nucleobase. Como tal, los compuestos antisentido definidos por una SEQ ID NO pueden comprender, independientemente, una o más modificaciones a un resto de azúcar, una unión internucleosídica o una nucleobase. Los compuestos antisentido descritos mediante el número Isis (n.º Isis) indican una combinación de secuencia de nucleobases y
10 motivo.

En una realización, una región diana es una región definida estructuralmente del ácido nucleico. Por ejemplo, una región diana puede englobar una 3' UTR, una 5' UTR, un exón, un intrón, una región codificante, una región de
15 iniciación de la traducción, región de terminación de la traducción, u otra región de ácido nucleico definida. Las regiones definidas estructuralmente para el ácido nucleico pueden obtenerse mediante el número de registro de bases de datos de secuencias tales como NCBI. En otras realizaciones, una región diana puede englobar la secuencia desde un sitio diana en 5' diana de un segmento diana dentro de la región diana hasta un sitio diana en 3' de otro segmento diana dentro de la región diana.

20 Seleccionar como diana incluye determinar al menos un segmento diana con el que se hibrida un compuesto antisentido, de manera que se produzca un efecto deseado. En determinadas realizaciones, el efecto deseado es una reducción en los niveles de de ácido nucleico diana de ARNm. En otras realizaciones, el efecto deseado es la reducción de los niveles de proteína codificada por el ácido nucleico diana o un cambio fenotípico asociado con el ácido nucleico diana.

25 Una región diana puede contener uno o más segmentos diana. Múltiples segmentos diana dentro de una región diana pueden ser solapantes. Alternativamente, pueden ser no solapantes. En una realización, los segmentos diana dentro de una región diana están separados por no más de aproximadamente 300 nucleótidos. En otras realizaciones, los segmentos diana dentro de una región diana están separados por no más de aproximadamente,
30 250, 200, 150, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 ó 10 nucleótidos en el ácido nucleico diana. En otra realización, los segmentos diana dentro de una región diana están separados por no más de aproximadamente 5 nucleótidos en el ácido nucleico diana. En realizaciones adicionales, los segmentos diana son contiguos.

Pueden encontrarse segmentos diana adecuados dentro de una 5' UTR, una región codificante, una 3' UTR, un
35 intrón o un exón. Los segmentos diana que contienen un codón de iniciación o un codón de terminación también son segmentos diana adecuados. Un segmento diana adecuado puede excluir específicamente una determinada región definida estructuralmente tal como el codón de iniciación o el codón de terminación.

40 La determinación de segmentos diana adecuados puede incluir una comparación de la secuencia de un ácido nucleico diana con otras secuencias en la totalidad del genoma. Por ejemplo, puede usarse el algoritmo BLAST para identificar regiones de similitud entre diferentes ácidos nucleicos. Esta comparación puede impedir la selección de secuencias de compuesto antisentido que pueden hibridarse de manera no específica con secuencias distintas de un ácido nucleico diana seleccionado (es decir, secuencias no diana o fuera de la diana).

45 Puede haber variación en la actividad (por ejemplo, tal como se define mediante el porcentaje de reducción de los niveles de ácido nucleico diana) de los compuestos antisentido dentro de una región diana activa. En una realización, reducciones en los niveles de ARNm de CTGF son indicativas de inhibición de la expresión de CTGF. Reducciones en los niveles de una proteína de CTGF también son indicativas de inhibición de la expresión de ARNm diana. Además, los cambios fenotípicos son indicativos de inhibición de la expresión de CTGF. Por ejemplo,
50 un aumento en las medidas de CTGF es indicativo de inhibición de la expresión de CTGF.

En detalle, el proceso de selección como diana comienza habitualmente con la identificación de una secuencia de ácido nucleico cuya función va a modularse. Esta puede ser, por ejemplo, un gen celular (o ARNm transcrito a partir del gen) cuya expresión está asociada con un trastorno o estado de enfermedad particular, o una molécula de ácido
55 nucleico de un agente infeccioso. En la presente invención, la diana es una molécula de ácido nucleico que codifica para el factor de crecimiento de tejido conjuntivo. El proceso de selección como diana también incluye la determinación de un sitio o sitios dentro de este gen para que se produzca la interacción antisentido de manera que resulte el efecto deseado, por ejemplo, detección o modulación de la expresión de la proteína. Dentro del contexto de la presente invención, un sitio intragénico preferido es la región que engloba el codón de iniciación o terminación de la traducción del marco de lectura abierto (ORF) del gen. Puesto que, tal como se conoce en la técnica, el codón de iniciación de la traducción es normalmente 5'-AUG (en moléculas de ARNm transcrito; 5'-ATG en la molécula de ADN correspondiente), el codón de iniciación de la traducción también se denomina el "codón AUG", el "codón de iniciación" o el "codón de iniciación AUG". Una minoría de genes tienen un codón de iniciación de la traducción que tiene la secuencia de ARN 5'-GUG, 5'-UUG o 5'-CUG, y 5'-AUA, 5'-ACG y 5'-CUG han mostrado que funcionan *in vivo*. Por tanto, los términos "codón de iniciación de la traducción" y "codón de iniciación" pueden englobar muchas secuencias de codón, aunque el aminoácido iniciador en cada caso es normalmente metionina (en eucariotas) o
65

formilmetionina (en procariotas). También se sabe en la técnica que los genes eucariotas y procariotas pueden tener dos o más codones de iniciación alternativos, de los que puede utilizarse preferentemente uno cualquiera para la iniciación de la traducción en un tipo de célula o tejido particular, o en un conjunto particular de condiciones. En el contexto de la invención, “codón de iniciación” y “codón de iniciación de la traducción” se refieren al codón o codones que se usan *in vivo* para iniciar la traducción de una molécula de ARNm transcrita a partir de un gen que codifica para el factor de crecimiento de tejido conjuntivo, 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 (las secuencias de ADN correspondientes son 5'-TAA, 5'-TAG y 5'-TGA, respectivamente). Los términos “región de codón de iniciación” 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 sentido (es decir, 5' o 3') desde un codón de iniciación 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 sentido (es decir, 5' o 3') desde un codón de terminación de la traducción.

El marco de lectura abierto (ORF) o “región codificante”, que se sabe en la técnica que se refiere a la región entre el codón de iniciación de la traducción y el codón de terminación de la traducción, también es una región que puede seleccionarse como diana de manera eficaz. Otras regiones diana incluyen la región no traducida en 5' (5' UTR), que se sabe en la técnica que se refiere a la parte de un ARNm en el sentido 5' desde el codón de iniciación de la traducción, y que incluye por tanto nucleótidos entre el sitio de caperuza en 5' y el codón de iniciación de la traducción de un ARNm o nucleótidos correspondientes en el gen, y la región no traducida en 3' (3' UTR), que se sabe en la técnica que se refiere a la parte de un ARNm en el sentido 3' desde el codón de terminación de la traducción, y que incluye por tanto nucleótidos entre el codón de terminación de la traducción y el extremo 3' de un ARNm o nucleótidos correspondientes en el gen. La 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 una unión 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 a la caperuza. La región de caperuza en 5' también puede ser una región diana preferida.

Aunque algunos transcritos de ARNm eucariotas se traducen directamente, muchos contienen una o más regiones, conocidas como “intrones”, que se escinden de un transcrito antes de traducirse. Las regiones restantes (y por tanto traducidas) se conocen como “exones” y se someten a corte y empalme juntas para formar una secuencia de ARNm continua. Los sitios de corte y empalme de ARNm, es decir, uniones intrón-exón, también pueden ser regiones diana preferidas, y son particularmente útiles en situaciones en las que un corte y empalme aberrante está implicado en una enfermedad, o en las que una sobreproducción de un producto de corte y empalme de ARNm particular está implicada en una enfermedad. Las uniones de fusión aberrantes debidas a reordenamientos o deleciones también son dianas preferidas. También se ha encontrado que los intrones también pueden ser regiones diana eficaces, y por tanto preferidas, para compuestos antisentido dirigidos, por ejemplo, a ADN o pre-ARNm.

También se conoce en la técnica que pueden producirse transcritos de ARN alternativos a partir de la misma región genómica 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 se diferencian de otros transcritos producidos a partir del mismo ADN genómico en su posición o bien de inicio o bien de terminación y contienen regiones tanto intrónicas como exónicas.

Tras la escisión de una o más regiones de exón o intrón 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 debe producir siempre una variante de ARNm única como resultado del de corte y empalme. Estas variantes de ARNm también se conocen como “variantes de corte y empalme alternativo”. Si no se produce corte y empalme de la variante de pre-ARNm entonces la variante de pre-ARNm es idéntica al ARNm.

También se conoce en la técnica que pueden producirse variantes mediante el uso de señales alternativas para iniciar o terminar la transcripción y que los pre-ARNm y ARNm pueden presentar más de un codón de iniciación o codón de terminación. Las variantes que se originan a partir de un pre-ARNm o ARNm que usan codones de iniciación alternativos se conocen como “variantes de iniciación alternativa” de ese pre-ARNm o ARNm. Los transcritos que usa un codón de terminación alternativo se conocen como “variantes de terminación alternativa” 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” por la maquinaria de transcripción, produciendo así transcritos que terminan en sitios de poliA únicos.

Los compuestos antisentido se usan comúnmente como reactivos de investigación y compuestos de diagnóstico. Por ejemplo, con frecuencia se usan oligonucleótidos antisentido, que pueden inhibir la expresión génica con gran especificidad, por el experto habitual en la técnica para esclarecer la función de genes particulares. Los compuestos

antisentido también se usan, por ejemplo, para distinguir entre funciones de diversos miembros de una ruta biológica. Por tanto, se ha empleado la modulación antisentido para su uso en investigación.

Para su uso en kits y compuestos de diagnóstico, los compuestos antisentido de la presente invención, o bien solos o bien en combinación con otros compuestos antisentido o compuestos terapéuticos, pueden usarse como herramientas en análisis diferenciales y/o combinatorios para esclarecer patrones de expresión de una parte o la totalidad del complemento de genes expresados dentro de células y tejidos.

Se comparan patrones de expresión dentro de células o tejidos tratados con uno o más los compuestos antisentido con células o tejidos control no tratados con los compuestos antisentido y se analizan los patrones producidos para determinar niveles diferenciales de expresión génica en lo que se refiere, por ejemplo, a la asociación con enfermedad, ruta de señalización, localización 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.

Los ejemplos de métodos de análisis de la expresión génica conocidos en la técnica incluyen alineamientos o microalineamientos de ADN (Brazma y Vilo, *FEDS Lett.*, 2000, 480, 17-24; Celis, *et al.*, *FEBS Lett.*, 2000, 480, 2-16), SAGE (análisis en serie de la expresión génica) (Madden, *et al.*, *Drug Discov. Today*, 2000, 5, 415-425), READS (amplificación por enzimas de restricción de ADN digeridos) (Prashar y Weissman, *Methods Enzymol.*, 1999, 303, 258-72), TOGA (análisis de la expresión génica total) (Sutcliffe, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2000, 97, 1976-81), alineamientos de proteínas y proteómica (Celis, *et al.*, *FEBS Lett.*, 2000, 480, 2-16; Jungblut, *et al.*, *Electrophoresis*, 1999, 20, 2100-10), secuenciación de etiqueta de secuencia expresada (EST) (Celis, *et al.*, *FEBS Lett.*, 2000, 480, 2-16; Larsson, *et al.*, *J. Biotechnol.*, 2000, 80, 143-57), determinación de huellas de ARN sustractivas (SuRF) (Fuchs, *et al.*, *Anal. Biochem.*, 2000, 286, 91-98; Larson, *et al.*, *Cytometry*, 2000, 41, 203-208), clonación sustractiva, visualización diferencial (DD) (Jurecic y Belmont, *Curr. Opin. Microbiol.*, 2000, 3, 316-21), hibridación genómica comparativa (Carulli, *et al.*, *J. Cell Biochem. Sup.*, 1998, 31, 286-96), técnicas de FISH (hibridación fluorescente *in situ*) (Going y Gusterson, *Eur. J. Cancer*, 1999, 35, 1895-904) y métodos de espectrometría de masas (revisado en (To, *Comb. Chem. High Throughput Screen*, 2000, 3, 235-41).

Compuestos antisentido

En el contexto de esta invención, el término "oligonucleótido" se refiere a un oligómero o polímero de ácido ribonucleico (ARN) o ácido desoxirribonucleico (ADN) o compuestos miméticos de los mismos. Este término incluye oligonucleótidos compuestos por nucleobases que se producen de manera natural, azúcares y uniones internucleosídicas covalentes (estructura principal) 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 con frecuencia con respecto a formas nativas debido a propiedades deseables tales como, por ejemplo, captación celular potenciada, afinidad potenciada para diana de ácido nucleico y estabilidad aumentada en presencia de nucleasas.

Aunque los oligonucleótidos antisentido son una forma preferida de compuesto antisentido, la presente invención comprende otros compuestos antisentido oligoméricos, incluyendo, pero sin limitarse a, compuestos miméticos de oligonucleótidos.

Compuesto antisentido significa un compuesto oligomérico que puede someterse a hibridación con un ácido nucleico diana mediante enlaces de hidrógeno. Los compuestos antisentido incluyen, pero no se limitan a, oligonucleótidos, oligonucleósidos, análogos de oligonucleótidos, compuestos miméticos de oligonucleótidos, oligonucleótidos antisentido, ARNip, iARN, ribozimas, oligonucleótidos de secuencia guía externa (EGS) (oligozimas), y otros oligonucleótidos que se hibridan con el ácido nucleico diana y modulan su expresión.

En determinadas realizaciones, un compuesto antisentido tiene una secuencia de nucleobases que, cuando se escribe en el sentido de 5' a 3', comprende el complemento inverso del segmento diana de un ácido nucleico diana al que se dirige. En determinadas de tales realizaciones, un oligonucleótido antisentido tiene una secuencia de nucleobases que, cuando se escribe en el sentido de 5' a 3', comprende el complemento inverso del segmento diana de un ácido nucleico diana al que se dirige.

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

En una realización preferida de la invención, el compuesto comprende 20 o al menos 14 nucleósidos unidos, en el que el oligonucleótido modificado tiene una secuencia que es idéntica al 100% a una de las secuencias expuestas en SEQ ID NO: 39, 40 y 166. En otra realización preferida, el compuesto líder de interés tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 39 (ISIS 412294).

En determinadas realizaciones, un compuesto antisentido acortado o truncado dirigido a un ácido nucleico tiene una única subunidad delecionada del extremo 5' (truncamiento en 5'), o alternativamente del extremo 3' (truncamiento en 3'). Un compuesto antisentido acortado o truncado dirigido a un ácido nucleico puede tener dos subunidades delecionadas del extremo 5', o alternativamente puede tener dos subunidades delecionadas del extremo 3', del compuesto antisentido. Alternativamente, los nucleósidos delecionados pueden estar dispersados a lo largo del compuesto antisentido, por ejemplo, en un compuesto antisentido que tiene un nucleósido delecionado del extremo 5' y un nucleósido delecionado del extremo 3'.

Cuando una única subunidad adicional está presente en un compuesto antisentido alargado, la subunidad adicional puede estar ubicada en el extremo 5' o 3' del compuesto antisentido. Cuando dos o más subunidades adicionales están presentes, las subunidades añadidas pueden estar adyacentes unas a otras, por ejemplo, en un compuesto antisentido que tiene dos subunidades añadidas al extremo 5' (adición en 5'), o alternativamente al extremo 3' (adición en 3'), del compuesto antisentido. Alternativamente, las subunidades añadidas pueden estar dispersadas a lo largo del compuesto antisentido, por ejemplo, en un compuesto antisentido que tiene una subunidad añadida al extremo 5' y una subunidad añadida al extremo 3'.

Es posible aumentar o disminuir la longitud de un compuesto antisentido, tal como un oligonucleótido antisentido, y/o introducir bases de apareamiento erróneo sin eliminar la actividad. Por ejemplo, en Woolf *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7305-7309, 1992), se sometió a prueba una serie de oligonucleótidos antisentido de 13-25 nucleobases de longitud para determinar su capacidad para inducir la escisión de un ARN diana en un modelo de inyección de ovocitos. Oligonucleótidos antisentido de 25 nucleobases de longitud con 8 u 11 bases de apareamiento erróneo cerca de los extremos de los oligonucleótidos antisentido pudieron dirigir la escisión específica del ARNm diana, aunque en menor medida que los oligonucleótidos antisentido que no contenían apareamientos erróneos. De manera similar, se logró una escisión específica de diana usando oligonucleótidos antisentido de 13 nucleobases, incluyendo aquellos con 1 ó 3 apareamientos erróneos.

Gautschi *et al.* (J. Natl. Cancer Inst. 93:463-471, marzo de 2001) demostraron la capacidad de un oligonucleótido que tenía una complementariedad del 100% con el ARNm de bcl-2 y que tenía 3 apareamientos erróneos con el ARNm de bcl-xL para reducir la expresión tanto de bcl-2 como de bcl-xL *in vitro* e *in vivo*. Además, este oligonucleótido demostró una potente actividad antitumoral *in vivo*.

Maher y Dolnick (Nuc. Acid. Res. 16:3341-3358, 1988) sometieron a prueba una serie de oligonucleótidos antisentido de 14 nucleobases en tándem, y oligonucleótidos antisentido de 28 y 42 nucleobases compuestos por la secuencia de dos o tres de los oligonucleótidos antisentido en tándem, respectivamente, para determinar su capacidad para detener la traducción de DHFR humano en un ensayo de reticulocitos de conejo. Cada uno de los tres oligonucleótidos antisentido de 14 nucleobases solo pudo inhibir la traducción, aunque a un nivel más moderado que los oligonucleótidos antisentido de 28 ó 42 nucleobases.

Bhanot *et al.* (documento PCT/US2007/068401) proporcionaron compuestos antisentido cortos, incluyendo compuestos que comprendían monómeros de alta afinidad químicamente modificados de 8 a 16 monómeros de longitud. Se mostró que estos compuestos antisentido cortos eran útiles para reducir ácidos nucleicos y/o proteínas diana en células, tejidos y animales con potencia aumentada e índice terapéutico mejorado. Los compuestos antisentido cortos fueron eficaces a dosis inferiores a compuestos antisentido descritos anteriormente, permitiendo una reducción de la toxicidad y del coste del tratamiento. Además, los compuestos antisentido cortos descritos tienen mayor potencial para dosificación oral.

Hibridaciones

Una vez identificados uno o más sitios diana, se eligen oligonucleótidos que son suficientemente complementarios a la diana, es decir, se hibridan suficientemente bien y con suficiente especificidad, para dar el efecto deseado.

En el contexto de esta invención, "hibridación" significa formación de enlaces de hidrógeno, que pueden ser enlaces de hidrógeno de Watson-Crick, de Hoogsteen o de Hoogsteen inversos, entre bases de nucleósidos o nucleótidos complementarias. Por ejemplo, adenina y timina son nucleobases complementarias que se aparean mediante la formación de enlaces de hidrógeno.

En algunas realizaciones, se produce hibridación entre un compuesto antisentido dado a conocer en el presente documento y un ácido nucleico. El mecanismo más común de hibridación implica formación de enlaces de hidrógeno entre nucleobases complementarias de las moléculas de ácido nucleico.

Puede producirse hibridación en diversas condiciones. Las condiciones rigurosas dependen de la secuencia y se

determinan mediante la naturaleza y composición de las moléculas de ácido nucleico que van a hibridarse.

En la técnica se conocen bien métodos para determinar si una secuencia puede hibridarse específicamente con un ácido nucleico diana. En una realización, los compuestos antisentido proporcionados en el presente documento pueden hibridarse específicamente con un ácido nucleico.

Complementariedad

La "complementariedad", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad para el apareamiento preciso entre dos nucleótidos. Por ejemplo, si un nucleótido en una determinada posición de un oligonucleótido puede formar enlaces de hidrógeno con un nucleótido en la misma posición de una molécula de ADN o ARN, entonces se considera que el oligonucleótido y el ADN o ARN son complementarios entre sí en esa posición. El oligonucleótido y el ADN o ARN son complementarios entre sí cuando un número suficiente de posiciones correspondientes en cada molécula están ocupadas por nucleótidos que pueden formar enlaces de hidrógeno entre sí. Por tanto, "puede hibridarse específicamente" y "complementario" son términos que se usan para indicar un grado suficiente de complementariedad o apareamiento preciso de manera que se produce una unión estable y específica entre el oligonucleótido y la diana de ADN o ARN. En la técnica se entiende que no es necesario que la secuencia de un compuesto antisentido sea complementaria al 100% a la de su ácido nucleico diana para poder hibridarse específicamente. Un compuesto antisentido puede hibridarse específicamente cuando la unión del compuesto a la molécula de ADN o ARN diana interfiere en la función normal del ADN o ARN diana para provocar una pérdida de utilidad, y hay un grado suficiente de complementariedad para evitar la unión no específica del compuesto antisentido a secuencias no diana en condiciones en las que se desea la unión específica, es decir, en condiciones fisiológicas en el caso de ensayos *in vivo* o tratamiento terapéutico, y en el caso de ensayos *in vitro*, en condiciones en las que se realizan los ensayos.

Los compuestos antisentido y otros compuestos de la invención que se hibridan con la diana e inhiben la expresión de la diana se identifican mediante experimentación, y las secuencias de estos compuestos se identifican a continuación en el presente documento como realizaciones preferidas de la invención. Los sitios diana a los que son complementarias estas secuencias preferidas se denominan "sitios activos" a continuación en el presente documento y por tanto son sitios preferidos para la selección como diana. Por tanto, otra realización de la invención engloba compuestos que se hibridan con estos sitios activos.

Un compuesto antisentido y un ácido nucleico diana son complementarios entre sí cuando un número suficiente de nucleobases del compuesto antisentido pueden formar enlaces de hidrógeno con las nucleobases correspondientes del ácido nucleico diana, de manera que se producirá un efecto deseado (por ejemplo, la inhibición antisentido de un ácido nucleico diana, tal como un ácido nucleico de CTGF).

Pueden tolerarse nucleobases no complementarias entre un compuesto antisentido y un ácido nucleico de CTGF siempre que el compuesto antisentido siga pudiendo hibridarse específicamente con un ácido nucleico diana. Además, un compuesto antisentido puede hibridarse a lo largo de uno o más segmentos de un ácido nucleico de CTGF de manera que segmentos intermedios o adyacentes no están implicados en el acontecimiento de hibridación (por ejemplo, una estructura de bucle, apareamiento erróneo o estructura de horquilla).

En algunas realizaciones, los compuestos antisentido proporcionados en el presente documento son complementarios en al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98% o al menos el 99% a un ácido nucleico de CTGF. El porcentaje de complementariedad de un compuesto antisentido con un ácido nucleico diana puede determinarse usando métodos rutinarios.

Por ejemplo, un compuesto antisentido en el que 18 de las 20 nucleobases del compuesto antisentido son complementarias a una región diana, y que por tanto se hibridará específicamente, representará una complementariedad del 90 por ciento. En este ejemplo, las nucleobases no complementarias restantes pueden estar agrupadas o entremezcladas con nucleobases complementarias y no se necesita 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 tendrá una complementariedad global del 77,8% con el ácido nucleico diana y por tanto se encontrará dentro del alcance de la presente invención. El porcentaje de complementariedad de un compuesto antisentido con una región de un ácido nucleico diana puede determinarse de manera rutinaria usando programas de BLAST (herramientas de búsqueda de alineación local básicas) y programas de PowerBLAST conocidos en la técnica (Altschul *et al.*, J. Mol. Biol., 1990, 215, 403-410; Zhang y Madden, Genome Res., 1997, 7, 649-656). El porcentaje de homología, identidad de secuencia o complementariedad, puede determinarse, por ejemplo, mediante el programa Gap (paquete de análisis de secuencias de Wisconsin, versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison Wis.), usando la configuración por defecto, que usa el algoritmo de Smith y Waterman (Adv. Appl. Math., 1981, 2, 482-489).

En otras realizaciones, los compuestos antisentido proporcionados en el presente documento son completamente

complementarios (es decir complementariedad del 100%) a un ácido nucleico diana. Por ejemplo, un compuesto antisentido puede ser completamente complementario a un ácido nucleico de CTGF, o una región diana, o un segmento diana o secuencia diana del mismo. Tal como se usa en el presente documento, "completamente complementario" significa que cada nucleobase de un compuesto antisentido puede formar pares de bases de manera precisa con las nucleobases correspondientes de un ácido nucleico diana.

La ubicación de una nucleobase no complementaria puede estar en el extremo 5' o el extremo 3' del compuesto antisentido. Alternativamente, la nucleobase o nucleobases no complementarias pueden estar en una posición interna del compuesto antisentido. Cuando están presentes dos o más nucleobases no complementarias, pueden ser contiguas (es decir estar unidas) o no contiguas. En una realización, una nucleobase no complementaria está ubicada en el segmento de ala de un oligonucleótido antisentido gámpero.

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

En otra realización, compuestos antisentido de hasta 30 nucleobases de longitud comprenden no más de 6, no más de 5, no más de 4, no más de 3, no más de 2 o no más de 1 nucleobase(s) no complementaria(s) con respecto a un ácido nucleico diana, tal como un ácido nucleico de CTGF.

Los compuestos antisentido proporcionados en el presente documento también incluyen aquellos que son complementarios a una parte de un ácido nucleico diana. Tal como se usa en el presente documento, "parte" se refiere a un número definido de nucleobases contiguas (es decir, unidas) dentro de una región o segmento de un ácido nucleico diana. Una "parte" también puede referirse a un número definido de nucleobases contiguas de un compuesto antisentido. En una realización, los compuestos antisentido son complementarios a una parte de al menos 8 nucleobases de un segmento diana. En otra realización, los compuestos antisentido son complementarios a una parte de al menos 12 nucleobases de un segmento diana. En aún otra realización, los compuestos antisentido son complementarios a una parte de al menos 15 nucleobases de un segmento diana. También se contemplan compuestos antisentido que son complementarios a una parte de al menos 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más nucleobases de un segmento diana, o un intervalo definido por dos cualesquiera de esos valores.

Identidad

Los compuestos antisentido proporcionados en el presente documento también pueden tener un porcentaje de identidad definido con respecto a una secuencia de nucleótidos particular, SEQ ID NO, o compuesto representado por un número Isis específico. Tal como se usa en el presente documento, un compuesto antisentido es idéntico a la secuencia dada a conocer en el presente documento si tiene la misma capacidad de formación de pares de nucleobases. Por ejemplo, se considerará que un ARN que contiene uracilo en lugar de timidina en una secuencia de ADN dada a conocer es idéntico a la secuencia de ADN ya que tanto el uracilo como la timidina forman pares con la adenina. También se contemplan versiones acortadas y alargadas de los compuestos antisentido descritos en el presente documento así como compuestos que tienen bases no idénticas con respecto a los compuestos antisentido proporcionados en el presente documento. Las bases no idénticas pueden estar adyacentes unas a otras o dispersadas por todo el compuesto antisentido. El porcentaje de identidad de un compuesto antisentido se calcula según el número de bases que tienen una formación de pares de bases idéntica con respecto a la secuencia con la que está comparándose.

En una realización, los compuestos antisentido son idénticos en al menos el 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% a uno o más de los compuestos antisentido o SEQ ID NO, o una parte de los mismos, dados a conocer en el presente documento.

Modificaciones

En una determinada realización de la invención, las modificaciones a los compuestos antisentido engloban sustituciones o cambios en uniones internucleosídicas, restos de azúcar o nucleobases.

La solicitud de patente internacional WO 2005/049582A1 da a conocer modificaciones químicas que pueden aplicarse a los compuestos antisentido.

En una realización de la invención el compuesto comprende al menos una modificación seleccionada del grupo que consiste en una unión internucleosídica modificada, un azúcar modificado y una nucleobase modificada.

Aunque pueden emplearse oligonucleótidos antisentido que contienen una variedad de uniones internucleosídicas modificadas, la unión internucleosídica modificada actualmente preferida es una unión fosforotioato entre uno o más de los nucleósidos o en la que todas las uniones internucleosídicas son uniones internucleosídicas fosforotioato. En general, también se prefiere que el oligonucleótido antisentido contenga al menos uno y normalmente más de un azúcar modificado, en el que el azúcar es un azúcar bicíclico. Aunque pueden emplearse diversos azúcares

modificados actualmente se prefiere emplear un 2'-O-metoxietil-azúcar.

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

5 Un nucleósido es una combinación de base-azúcar. La parte de nucleobase (también conocida como base) del nucleósido es normalmente un resto de base heterocíclica. Los nucleótidos son nucleósidos que incluyen además un grupo fosfato unido covalentemente a la parte de azúcar del nucleósido. Para aquellos nucleósidos que incluyen un pentofuranosil-azúcar, el grupo fosfato puede unirse al resto 2', 3' o 5'-hidroxilo del azúcar. Los oligonucleótidos se forman mediante la unión covalente de los nucleósidos adyacentes entre sí, para formar un oligonucleótido polimérico lineal. Dentro de la estructura de oligonucleótido, se menciona comúnmente que los grupos fosfato forman las uniones internucleosídicas del oligonucleótido.

15 Las modificaciones en los compuestos antisentido engloban sustituciones o cambios en uniones internucleosídicas, restos de azúcar o nucleobases. Con frecuencia se prefieren compuestos antisentido modificados con respecto a formas nativas debido a propiedades deseables tales como, por ejemplo, captación celular potenciada, afinidad potenciada por diana de ácido nucleico, estabilidad aumentada en presencia de nucleasas o actividad inhibidora aumentada.

20 También pueden emplearse nucleósidos químicamente modificados para aumentar la afinidad de unión de un oligonucleótido antisentido acortado o truncado por su ácido nucleico diana. Por consiguiente, con frecuencia pueden obtenerse resultados comparables con compuestos antisentido más cortos que tienen tales nucleósidos químicamente modificados.

25 Uniones internucleotídicas modificadas

La unión internucleosídica que se produce de manera natural de ARN y ADN es una unión fosfodiéster de 3' a 5'. Los compuestos antisentido que tienen una o más uniones internucleosídicas modificadas, es decir que no se producen de manera natural, se seleccionan con frecuencia sobre los compuestos antisentido que tienen uniones internucleosídicas que se producen de manera natural debido a propiedades deseables tales como, por ejemplo, captación celular potenciada, afinidad potenciada por ácidos nucleicos diana y estabilidad aumentada en presencia de nucleasas.

35 Los oligonucleótidos que tienen uniones internucleosídicas modificadas incluyen uniones internucleosídicas que conservan un átomo de fósforo así como uniones internucleosídicas que no tienen un átomo de fósforo. Las uniones internucleosídicas que contienen fósforo representativas incluyen, pero no se limitan a, fosfodiésteres, fosfotriésteres, metilfosfonatos, fosforamidoato y fosforotioato. Se conocen bien métodos de preparación de uniones que contienen fósforo y que no contienen fósforo.

40 En una realización, los compuestos antisentido dirigidos a un ácido nucleico de CTGF comprenden una o más uniones internucleosídicas modificadas. En algunas realizaciones, las uniones internucleosídicas modificadas son uniones fosforotioato. En otras realizaciones, cada unión internucleosídica de un compuesto antisentido es una unión internucleosídica fosforotioato.

45 Tal como se conoce en la técnica, un nucleósido es una combinación de base-azúcar. La parte de base del nucleósido es normalmente una base heterocíclica. Las dos clases más comunes de tales bases heterocíclicas son las purinas y las pirimidinas. Los nucleótidos son nucleósidos que incluyen además un grupo fosfato unido covalentemente a la parte de azúcar del nucleósido. Para aquellos nucleósidos que incluyen un pentofuranosil-azúcar, el grupo fosfato puede unirse al resto 2', 3' o 5'-hidroxilo del azúcar. En la formación de oligonucleótidos, los grupos fosfato unen covalentemente nucleósidos adyacentes entre sí para formar un compuesto polimérico lineal. A su vez, los extremos respectivos de esta estructura polimérica lineal pueden unirse adicionalmente para formar una estructura circular, sin embargo, generalmente se prefieren estructuras lineales abiertas. Dentro de la estructura de oligonucleótido, se menciona comúnmente que los grupos fosfato forman la estructura principal internucleosídica del oligonucleótido. La unión normal o estructura principal de ARN y ADN es una unión fosfodiéster de 3' a 5'.

55 Los ejemplos específicos de compuestos antisentido preferidos útiles en esta invención incluyen oligonucleótidos que contienen estructuras principales modificadas o uniones internucleosídicas no naturales. Tal como se define en esta memoria descriptiva, los oligonucleótidos que tienen estructuras principales modificadas incluyen aquellos que conservan un átomo de fósforo en la estructura principal y aquellos que no tienen un átomo de fósforo en la estructura principal. Para los fines de esta memoria descriptiva, y tal como se menciona algunas veces en la técnica, también puede considerarse que los oligonucleótidos modificados que no tienen un átomo de fósforo en su estructura principal internucleosídica son oligonucleósidos.

65 Las estructuras principales de oligonucleótidos modificadas preferidas incluyen, por ejemplo, fosforotioatos, fosforotioatos quirales, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, metil y otros alquil-fosfonatos incluyendo 3'-alquilenfosfonatos, 5'-alquilenfosfonatos y fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidoatos incluyendo 3'-

aminofosforamidato y aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionoalquilfosfonatos, tionoalquilfosfotriésteres, selenofosfatos y boranofosfatos que tienen uniones 3'-5' normales, análogos con uniones 2'-5' de los mismos, y aquellos que tienen polaridad invertida en los que una o más uniones internucleotídicas son una unión de 3' a 3', de 5' a 5' o de 2' a 2'. Los oligonucleótidos preferidos que tienen polaridad invertida comprenden una única unión de 3' a 3' en la unión internucleotídica más en 3', es decir un único residuo de nucleósido invertido que puede ser abásico (falta la nucleobase o tiene un grupo hidroxilo en lugar de la misma). También se incluyen diversas sales, sales mixtas y formas de ácido libre.

Las patentes estadounidenses representativas que enseñan la preparación de las uniones que contienen fósforo anteriores incluyen, pero no se limitan a, las patentes estadounidenses n.^{os}: 3.687.808; 4.469.863; 4.476.301; 5.023.243; 5.177.196; 5.188.897; 5.264.423; 5.276.019; 5.278.302; 5.286.717; 5.321.131; 5.399.676; 5.405.939; 5.453.496; 5.455.233; 5.466.677; 5.476.925; 5.519.126; 5.536.821; 5.541.306; 5.550.111; 5.563.253; 5.571.799; 5.587.361; 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 conjunta con esta solicitud.

Las estructuras principales de oligonucleótido modificadas preferidas que no incluyen un átomo de fósforo en las mismas tienen estructuras principales que están formadas por uniones internucleosídicas de alquilo o cicloalquilo de cadena corta, uniones internucleosídicas de alquilo o cicloalquilo y heteroátomos mixtos, o una o más uniones internucleosídicas heteroaromáticas o heterocíclicas de cadena corta. Estas incluyen aquellas que tienen uniones morfolino (formadas en parte a partir de la parte de azúcar de un nucleósido); estructuras principales de siloxano; estructuras principales de sulfuro, sulfóxido y sulfona; estructuras principales de formaceto y tioformaceto; estructuras principales de metilformaceto y tioformaceto; estructuras principales de riboaceto; estructuras principales que contienen alqueno; estructuras principales de sulfamato; estructuras principales metilimino y metilhidrazino; estructuras principales de sulfonato y sulfonamida; estructuras principales de amida; y otras que tienen partes componentes de N, O, S y CH₂ mixtas.

Las patentes estadounidenses representativas que enseñan la preparación de los oligonucleósidos anteriores incluyen, pero no se limitan a, las patentes estadounidenses n.^{os}: 5.034.506; 5.166.315; 5.185.444; 5.214.134; 5.216.141; 5.235.033; 5.264.562; 5.264.564; 5.405.938; 5.434.257; 5.466.677; 5.470.967; 5.489.677; 5.541.307; 5.561.225; 5.596.086; 5.602.240; 5.610.289; 5.602.240; 5.608.046; 5.610.289; 5.618.704; 5.623.070; 5.663.312; 5.633.360; 5.677.437; 5.792.608; 5.646.269 y 5.677.439, algunas de las cuales son de titularidad conjunta con esta solicitud.

En otros compuestos miméticos de oligonucleótidos preferidos, tanto el azúcar como la unión internucleosídica, es decir, la estructura principal, de las unidades de nucleótido se sustituyen por grupos novedosos. Las unidades de base se mantienen para su hibridación con un compuesto diana de ácido nucleico apropiado. Un compuesto oligomérico de este tipo, un compuesto mimético de oligonucleótido que se ha mostrado que tiene excelentes propiedades de hibridación, se denomina ácido nucleico peptídico (PNA). En compuestos de PNA, se sustituye la estructura principal de azúcar de un oligonucleótido por una estructura principal que contiene amida, en particular una estructura principal de aminoetilglicina. Las nucleobases se conservan y se unen directa o indirectamente a átomos de nitrógeno aza de la parte de amida de la estructura principal. Las patentes estadounidenses representativas que enseñan la preparación de compuestos de PNA incluyen, pero no se limitan a, las patentes estadounidenses n.^{os}: 5.539.082; 5.714.331; y 5.719.262. Pueden encontrarse enseñanzas adicionales de compuestos de PNA en Nielsen *et al.*, Science, 1991, 254, 1497-1500.

Las realizaciones más preferidas de la invención son oligonucleótidos con estructuras principales de fosforotioato y oligonucleósidos con estructuras principales de heteroátomos, y en particular -CH₂-NH-O-CH₂-, -CH₂-N(CH₃)-O-CH₂- [conocido como estructura principal de metileno (metilimino) o MMI], -CH₂-O-N(CH₃)-CH₂-, -CH₂-N(CH₃)-N(CH₃)-CH₂- y -O-N(CH₃)-CH₂-CH₂- [en las que la estructura principal de fosfodiéster nativa se representa como -O-P-O-CH₂-] de la patente estadounidense n.^o 5.489.677 a la que se hizo referencia anteriormente, y las estructuras principales de amida de la patente estadounidense n.^o 5.602.240 a la que se hizo referencia anteriormente. También se prefieren oligonucleótidos que tienen estructuras principales de morfolino de la patente estadounidense n.^o 5.034.506 a la que se hizo referencia anteriormente.

Restos de azúcar modificados

Los oligonucleótidos modificados también pueden contener uno o más restos de azúcar sustituidos. Por ejemplo, el anillo de furanosil-azúcar puede modificarse de varias maneras incluyendo una sustitución con un grupo sustituyente, formación de puentes para formar un ácido nucleico bicíclico "BNA" y sustitución del 4'-O con un heteroátomo tal como S o N(R) tal como se describe en la patente estadounidense n.^o: 7.399.845 a nombre de Set *et al.*. Otros ejemplos de BNA se describen en la solicitud de patente internacional publicada n.^o WO 2007/146511.

Los compuestos antisentido de la invención pueden contener opcionalmente uno o más nucleótidos que tienen restos de azúcar modificados. Las modificaciones de azúcar pueden conferir estabilidad frente a nucleasas, afinidad de unión o alguna otra propiedad biológica beneficiosa a los compuestos antisentido. El anillo de furanosil-azúcar de un nucleósido puede modificarse de varias maneras incluyendo, pero sin limitarse a: adición de un grupo

sustituyente, particularmente en la posición 2'; formación de puente entre dos átomos de anillo no germinales para formar un ácido nucleico bicíclico (BNA); y sustitución del oxígeno de anillo en la posición 4' por un átomo o grupo tal como -S-, -N(R)- o -C(R1)(R2). Los azúcares modificados incluyen, pero no se limitan a: azúcares sustituidos, especialmente azúcares 2'-sustituidos que tienen un grupo sustituyente 2'-F, 2'-OCH₂ (2'-OMe) o un 2'-O(CH₂)₂-OCH₃ (2'-O-metoxietilo o 2'-MOE); y azúcares modificados bicíclicos (BNA), que tienen un puente 4'-(CH₂)_n-O-2', en los que n=1 o n=2. Los expertos en la técnica conocen bien métodos para las preparaciones de azúcares modificados.

En determinadas realizaciones, un nucleósido modificado en 2' tiene un resto de azúcar bicíclico. En determinadas de tales realizaciones, el resto de azúcar bicíclico es un D-azúcar en la configuración alfa. En determinadas de tales realizaciones, el resto de azúcar bicíclico es un D-azúcar en la configuración beta. En determinadas de tales realizaciones, el resto de azúcar bicíclico es un L-azúcar en la configuración alfa. En determinadas de tales realizaciones, el resto de azúcar bicíclico es un L-azúcar en la configuración beta.

En determinadas realizaciones, el resto de azúcar bicíclico comprende un grupo de puente entre los átomos de carbono en 2' y en 4'. En determinadas de tales realizaciones, el grupo de puente comprende desde 1 hasta 8 grupos birradicales unidos. En determinadas realizaciones, el resto de azúcar bicíclico comprende desde 1 hasta 4 grupos birradicales unidos. En determinadas realizaciones, el resto de azúcar bicíclico comprende 2 ó 3 grupos birradicales unidos. En determinadas realizaciones, el resto de azúcar bicíclico comprende 2 grupos birradicales unidos. En determinadas realizaciones, un grupo birradical unido se selecciona de -O-, -S-, -N(R1)-, -C(R1)(R2)-, -C(R1)=C(R1)-, -C(R1)=N-, -C(=NR1)-, -Si(R1)(R2)-, -S(=O)₂-, -S(=O)-, -C(=O)- y -C(=S)-; en los que cada R1 y R2 es, independientemente, H, hidroxilo, alquilo C₁-C₁₂, alquilo C₁-C₁₂ sustituido, alquenilo C₂-C₁₂, alquenilo C₂-C₁₂ sustituido, alquinilo C₂-C₁₂, alquinilo C₂-C₁₂ sustituido, arilo C₅-C₂₀, arilo C₅-C₂₀ sustituido, un radical heterociclo, un radical heterociclo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, radical alicíclico C₅-C₇, radical alicíclico C₅-C₇ sustituido, halógeno, oxilo sustituido (-O-), amino, amino sustituido, azido, carboxilo, carboxilo sustituido, acilo, acilo sustituido, CN, tiol, tiol sustituido, sulfonilo (S(=O)₂-H), sulfonilo sustituido, sulfoxilo (S(=O)-H) o sulfoxilo sustituido; y cada grupo sustituyente es, independientemente, halógeno, alquilo C₁-C₁₂, alquilo C₁-C₁₂ sustituido, alquenilo C₂-C₁₂, alquenilo C₂-C₁₂ sustituido, alquinilo C₂-C₁₂, alquinilo C₂-C₁₂ sustituido, amino, amino sustituido, acilo, acilo sustituido, aminoalquilo C₁-C₁₂, aminoalcoxilo C₁-C₁₂, aminoalquilo C₁-C₁₂ sustituido, aminoalcoxilo C₁-C₁₂ sustituido o un grupo protector.

En algunas realizaciones, el resto de azúcar bicíclico forma un puente entre los átomos de carbono en 2' y 4' con un grupo birradical seleccionado de -O-(CH₂)_p-, -O-CH₂-, -O-CH₂CH₂-, -O-CH(alquilo)-, -NH-(CH₂)_p-, -N(alquilo)-(CH₂)_p-, -O-CH(alquilo)-, -(CH(alquilo))-(CH₂)_p-, -NH-O-(CH₂)_p-, -N(alquilo)-O-(CH₂)_p- u -O-N(alquilo)-(CH₂)_p-, en los que p es 1, 2, 3, 4 ó 5 y cada grupo alquilo puede estar adicionalmente sustituido. En determinadas realizaciones, p es 1, 2 ó 3.

En un aspecto, cada uno de dichos puentes es, independientemente, -[C(R1)(R2)]_n-, -[C(R1)(R2)]_n-O-, -C(R1R2)-N(R1)-O- o -C(R1R2)-O-N(R1)-. En otro aspecto, cada uno de dichos puentes es, independientemente, 4'-(CH₂)₃-2', 4'-(CH₂)₂-2', 4'-CH₂-O-2', 4'-(CH₂)₂-O-2', 4'-CH₂-O-N(R1)-2' y 4'-CH₂-N(R1)-O-2'- en los que cada R1 es, independientemente, H, un grupo protector o alquilo C₁-C₁₂.

En nucleótidos que tienen restos de azúcar modificados, los restos de nucleobases (naturales, modificadas o una combinación de las mismas) se mantienen para su hibridación con una diana de ácido nucleico apropiada.

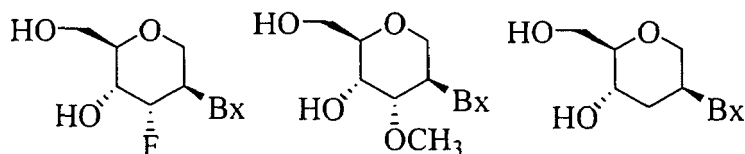
En una realización, los compuestos antisentido dirigidos a un ácido nucleico comprenden uno o más nucleótidos que tienen restos de azúcar modificados. En una realización preferida, el resto de azúcar modificado es 2'-MOE. En otras realizaciones, los nucleótidos modificados con 2'-MOE se disponen en un motivo de gámpero.

Los oligonucleótidos actualmente preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': OH; F; O-, S- o N-alquilo; O-, S- o N-alquenilo; O-, S- o N-alquinilo; u O-alquilo-O-alquilo, en los que el alquilo, alquenilo y alquinilo pueden ser alquilo C₁ a C₁₀ sustituido o no sustituido o alquenilo C₂ a C₁₀ y alquinilo. Se prefieren particularmente O[(CH₂)_nO]_mCH₃, O(CH₂)_nOCH₃, O(CH₂)_nNH₂, O(CH₂)_nCH₃, O(CH₂)_nONH₂ y O(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂, en los que n y m son desde 1 hasta aproximadamente 10. Otros oligonucleótidos preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': alquilo inferior C₁ a C₁₀, alquilo inferior sustituido, alquenilo, alquinilo, alcarilo, aralquilo, O-alcarilo u O-aralquilo, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, polialquilamino, sililo sustituido, un grupo de escisión de ARN, un grupo indicador, un intercaldor, 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-CH₂CH₂OCH₃, también conocido como 2'-O-(2-metoxietilo) o 2'-MOE) (Martin *et al.*, Helv. Chim. Acta, 1995, 78, 486-504) es decir, un grupo alcoxialcoxilo. Una modificación preferida adicional incluye 2'-dimetilaminoetoxietoxilo, es decir, un grupo O(CH₂)₂ON(CH₃)₂, también conocido como 2'-DMAOE, y 2'-dimetilaminoetoxietoxilo (también conocido en la técnica como 2'-O-dimetilaminoetoxietilo o 2'-DMAEOE), es decir, 2'-O-CH₂-O-CH₂-N(CH₃)₂. Una modificación preferida adicional incluye ácido nucleico bicíclico (también denominado ácidos nucleicos bloqueados (LNA)) en el que el grupo 2'-hidroxilo está unido al átomo de carbono en 3' o 4' del anillo de azúcar formando así un resto de azúcar bicíclico. La unión es preferiblemente un grupo metileno -(CH₂)_n que forma un puente entre el átomo de oxígeno en 2' y el átomo

de carbono en 4' en el que n es 1 ó 2, incluyendo α -L-metilenoxi (4'-CH₂-O-2')-BNA, β -D-metilenoxi (4'-CH₂-O-2')-BNA y etilenoxi (4'-(CH₂)₂-O-2')-BNA. Los azúcares modificados bicíclicos también incluyen (6'S)-6'metil-BNA, aminooxi (4'-CH₂-O-N(R)-2')-BNA, oxiamino (4'-CH₂-N(R)-O-2')-BNA en los que R es, independientemente, H, un grupo protector, o alquilo C₁-C₁₂. Los LNA también forman dúplex con ADN, ARN o LNA complementarios con altas afinidades térmicas. Los espectros de dicroísmo circular (CD) muestran que los dúplex que implican LNA completamente modificado (especialmente LNA:ARN) se parecen estructuralmente a un dúplex de ARN:ARN de forma A. El examen por resonancia magnética nuclear (RMN) de un dúplex de LNA:ADN confirmó la conformación 3'-endo de un monómero de LNA. También se ha demostrado el reconocimiento de ADN bicatenario lo que sugiere la invasión de cadena mediante LNA. Estudios de secuencias con apareamiento erróneo muestran que los LNA obedecen las reglas de formación de pares de bases de Watson-Crick con selectividad generalmente mejorada en comparación con las cadenas de referencia sin modificar correspondientes.

Los LNA en los que el grupo 2'-hidroxilo está unido al átomo de carbono en 4' del anillo de azúcar formando así una unión 2'-C,4'-C-oximetileno formando así un resto de azúcar bicíclico. La unión puede ser un grupo metileno (-CH₂-)_n que forma un puente entre el átomo de oxígeno en 2' y el átomo de carbono en 4' en el que n es 1 ó 2 (Singh *et al.*, Chem. Commun., 1998, 4, 455-456). LNA y análogos de LNA muestran estabilidades térmicas de dúplex muy altas con ADN y ARN complementarios (T_m de +3 a +10°C), estabilidad frente a degradación 3'-exonucleolítica y buenas propiedades de solubilidad. Otros grupos de puente preferidos incluyen el puente 2'-desoxi-2'-CH₂OCH₂-4'. Los LNA y la preparación de los mismos se describen en las solicitudes de patente internacional publicadas n.^{os} WO 98/39352 y WO 99/14226.

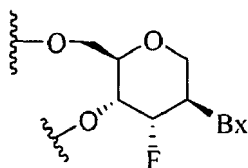
Otras modificaciones preferidas incluyen 2'-metoxilo (2'-O-CH₃), 2'-aminopropoxilo (2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂), 2'-alilo (2'-CH₂-CH=CH₂), 2'-O-alilo (2'-O-CH₂-CH=CH₂) y 2'-fluoro (2'-F). La modificación en 2' puede estar en la posición arabino (hacia arriba) o la posición ribo (hacia abajo). Una modificación arabino en 2' preferida es 2'-F. También pueden prepararse modificaciones similares en otras posiciones en el oligonucleótido, particularmente la posición 3' del azúcar en el nucleótido 3'-terminal o en oligonucleótidos con unión 2'-5' y la posición 5' del nucleótido 5'-terminal. Los oligonucleótidos también pueden tener sustitutos o compuestos miméticos de azúcar (algunas veces denominados análogos de ADN) tales como restos ciclobutilo en lugar del pentofuranosil-azúcar. Las patentes estadounidenses representativas que enseñan la preparación de tales estructuras de azúcar modificadas incluyen, pero no se limitan a, las patentes estadounidenses n.^{os}: 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 conjunta con la presente solicitud. En determinadas realizaciones, los nucleósidos se modifican mediante sustitución del anillo de ribosilo por un sistema cíclico sustituto tal como un anillo de morfolino, un anillo de ciclohexenilo, un anillo de ciclohexilo o un anillo de tetrahidropirano tal como uno que tiene una de las fórmulas:



En la técnica también se conocen muchos otros sistemas cíclicos sustitutos de azúcar biciclos y triciclos que pueden usarse para modificar nucleósidos para su incorporación en compuestos antisentido (véase por ejemplo el artículo de revisión: Leumann, Christian J.). Tales sistemas cíclicos pueden experimentar diversas sustituciones adicionales para potenciar la actividad.

En una realización de la invención, el compuesto que comprende al menos un nucleósido modificado con tetrahidropirano en el que un anillo de tetrahidropirano sustituye al anillo de furanosa.

En otra realización de la invención, en la que cada uno del al menos un nucleósido modificado con tetrahidropirano tiene la estructura:



en la que Bx es un resto de base heterocíclica opcionalmente protegida.

Nucleobases modificadas

Los oligonucleótidos también pueden incluir modificaciones o sustituciones de nucleobases (con frecuencia

denominadas en la técnica simplemente "bases"). Las modificaciones o sustituciones de nucleobases pueden distinguirse estructuralmente de, aunque son funcionalmente intercambiables con, nucleobases no modificadas sintéticas o que se producen de manera natural. Tanto las nucleobases naturales como las modificadas pueden participar en la formación de enlaces de hidrógeno. Tales modificaciones de nucleobases pueden conferir estabilidad a nucleasas, afinidad de unión o alguna otra propiedad biológica beneficiosa a compuestos antisentido. Las nucleobases modificadas incluyen nucleobases sintéticas y naturales tales como, por ejemplo, 5-metilcitosina (5-me-C). Algunas sustituciones de nucleobases, incluyendo sustituciones de 5-metilcitosina, son particularmente útiles para aumentar la afinidad de unión de un compuesto antisentido por un ácido nucleico diana. Por ejemplo, se ha mostrado que las sustituciones de 5-metilcitosina aumentan la estabilidad del dúplex de ácido nucleico en 0,6-1,2°C (Sanghvi, Y.S., Crooke, S.T. y Lebleu, B., eds., *Antisense Research and Applications*, CRC Press, Boca Raton, 1993, págs. 276-278).

Las nucleobases no modificadas adicionales incluyen 5-hidroximetilcitosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, derivados de 6-metilo y otros alquilos de adenina y guanina, derivados de 2-propilo y otros alquilos 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 alquinilo de bases de pirimidina, 6-azouracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, adeninas y guaninas sustituidas con 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo y otras 8-sustituidas, uracilos y citosinas sustituidos con 5-halo particularmente 5-bromo, 5-trifluorometilo y otros 5-sustituidos, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 2-F-adenina, 2-amino-adenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-desazaguanina y 7-desazaadenina y 3-desazaguanina y 3-desazaadenina.

Los restos de bases heterocíclicas también pueden incluir aquellas en las que la base de purina o pirimidina se sustituye por otros heterociclos, por ejemplo 7-desaza-adenina, 7-desazaguanosina, 2-aminopiridina y 2-piridona. Las nucleobases que son particularmente útiles para aumentar la afinidad de unión de los compuestos antisentido incluyen pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y purinas N-2, N-6 y O-6-sustituidas, incluyendo 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina.

En una realización, los compuestos antisentido dirigidos a un ácido nucleico de CTGF comprenden una o más nucleobases modificadas. En una realización adicional, oligonucleótidos antisentido ensanchados por separación dirigidos a un ácido nucleico de CTGF comprenden una o más nucleobases modificadas. En algunas realizaciones, la nucleobase modificada es 5-metilcitosina. En realizaciones adicionales, cada citosina es una 5-metilcitosina.

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, derivados de 6-metilo y otros alquilos de adenina y guanina, derivados de 2-propilo y otros alquilos 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 alquinilo de bases de pirimidina, 6-azouracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, adeninas y guaninas sustituidas con 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo y otras 8-sustituidas, uracilos y citosinas sustituidos con 5-halo particularmente 5-bromo, 5-trifluorometilo y otros 5-sustituidos, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 2-F-adenina, 2-amino-adenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-desazaguanina y 7-desazaadenina y 3-desazaguanina y 3-desazaadenina. Las nucleobases modificadas adicionales incluyen pirimidinas tricíclicas tales como fenoxazina-citidina (1H-pirimido[5,4-b][1,4]benzoxazin-2(3H)-ona), fenotiazina-citidina (1H-pirimido[5,4-b][1,4]benzotiazin-2(3H)-ona), pinzas de G tales como una fenoxazina-citidina sustituida (por ejemplo 9-(2-aminoetoxi)-H-pirimido[5,4-b][1,4]benzoxazin-2(3H)-ona), carbazol-citidina (2H-pirimido[4,5-b]indol-2-ona), piridoindol-citidina (H-pirido[3',2':4,5]pirrolo[2,3-d]pirimidin-2-ona). Las nucleobases modificadas también pueden incluir aquellas en las que la base de purina o pirimidina se sustituye por otros heterociclos, por ejemplo 7-desaza-adenina, 7-desazaguanosina, 2-aminopiridina y 2-piridona. Las nucleobases adicionales incluyen aquellas dadas a conocer en la patente estadounidense n.º 3.687.808, aquellas dadas a conocer en *The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering*, páginas 858-859, Kroschwitz, J. I., ed. John Wiley & Sons, 1990, aquellas dadas a conocer por Englisch *et al.*, *Angewandte Chemie*, International Edition, 1991, 30, 613, y aquellas dadas a conocer 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 oligoméricos de la invención. Estas incluyen pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y purinas N-2, N-6 y O-6-sustituidas, incluyendo 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. Se ha mostrado que las sustituciones de 5-metilcitosina aumentan la estabilidad del dúplex de ácido nucleico en 0,6-1,2°C (Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. y Lebleu, B., eds., *Antisense Research and Applications*, CRC Press, Boca Raton, 1993, págs. 276-278) y actualmente son sustituciones de bases preferidas, incluso más particularmente cuando se combinan con modificaciones de 2'-O-metoxietil-azúcar.

Las patentes estadounidenses representativas que enseñan la preparación de algunas de las nucleobases modificadas indicadas anteriormente así como otras nucleobases modificadas incluyen, pero no se limitan a, la patente estadounidense indicada anteriormente n.º 3.687.808, así como las patentes estadounidenses n.ºs: 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 conjunta con la presente solicitud, y la patente estadounidense n.º 5.750.692, que tiene un titular en común con los titulares de la presente solicitud.

Motivos de compuestos antisentido

5 En la presente invención, el compuesto comprende un oligonucleótido modificado compuesto por (a) un segmento de separación que consiste en desoxinucleósidos unidos, preferiblemente consiste en trece desoxinucleósidos modificados unidos; (b) un segmento de ala en 5' que consiste en nucleósidos modificados unidos, preferiblemente consiste en dos nucleósidos modificados unidos; y (c) un segmento de ala en 3' que consiste en nucleósidos modificados unidos, preferiblemente consiste en cinco nucleósidos unidos; en el que el segmento de separación está situado entre el segmento de ala en 5' y el segmento de ala en 3', y en el que cada nucleósido modificado dentro de cada segmento de ala comprende un azúcar modificado, preferiblemente comprende un 2'-O-metoxietil-azúcar. En una realización, cada unión internucleosídica es una unión fosforotioato. Estos patrones de nucleótidos modificados en un compuesto antisentido se denominan motivo. Estos motivos confieren a los compuestos antisentido propiedades tales como potenciar la actividad inhibidora, aumentar la afinidad de unión por un ácido nucleico diana o aumentar la resistencia a la degradación mediante nucleasas *in vivo*.

20 En determinadas realizaciones, los compuestos antisentido dirigidos a un ácido nucleico de CTGF tienen subunidades químicamente modificadas dispuestas en patrones o motivos para conferir a los compuestos antisentido propiedades tales como actividad inhibidora potenciada, afinidad de unión aumentada por un ácido nucleico diana o resistencia a la degradación mediante nucleasas *in vivo*.

25 Los compuestos antisentido quiméricos contienen normalmente al menos una región modificada de modo que se confiere resistencia aumentada a la degradación por nucleasas, captación celular aumentada, afinidad de unión aumentada por el ácido nucleico diana y/o actividad inhibidora aumentada. Una segunda región de un compuesto antisentido quimérico puede servir opcionalmente como sustrato para la endonucleasa celular ARNasa H, que escinde la cadena de ARN de un dúplex de ARN:ADN.

30 Se considera que los compuestos antisentido que tienen un motivo de gápmero son compuestos antisentido quiméricos. En un gápmero una región interna que tiene una pluralidad de nucleótidos que soporta la escisión mediante ARNasa H está situada entre regiones externas que tienen una pluralidad de nucleótidos que son químicamente distintos de los nucleósidos de la región interna. En el caso de un oligonucleótido antisentido que tiene un motivo de gápmero, el segmento de separación sirve generalmente como sustrato para la escisión por endonucleasas, mientras que los segmentos de ala comprenden nucleósidos modificados. En una realización preferida, las regiones de un gápmero se diferencian por los tipos de restos de azúcar que comprenden cada región diferenciada. Los tipos de restos de azúcar que se usan para diferenciar las regiones de un gápmero pueden incluir en algunas realizaciones β -D-ribonucleósidos, β -D-desoxirribonucleósidos, nucleósidos modificados en 2' (tales nucleósidos modificados en 2' pueden incluir 2'-MOE y 2'-O-CH₃, entre otros), y nucleósidos modificados con azúcares bicíclicos (tales nucleósidos modificados con azúcares bicíclicos pueden incluir aquellos que tienen un puente de 4'-(CH₂)_n-O-2', en el que n=1 o n=2). Preferiblemente, cada región diferenciada comprende restos de azúcar uniformes. El motivo de ala-separación-ala se describe con frecuencia como "X-Y-Z", en el que "X" representa la longitud de la región de ala en 5', "Y" representa la longitud de la región de separación y "Z" representa la longitud de la región de ala en 3'. Cualquiera de los compuestos antisentido descritos en el presente documento puede tener un motivo de gápmero. En algunas realizaciones, X y Z son iguales, en otras realizaciones son diferentes. En una realización preferida, Y tiene entre 8 y 15 nucleótidos. X, Y o Z pueden tener cualquiera de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30 o más nucleótidos. Por tanto, los gápmeros de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo 2-13-5, 5-10-5, 4-8-4, 4-12-3, 4-12-4, 3-14-3, 2-16-2, 1-18-1, 3-10-3, 2-10-2, 1-10-1 ó 2-8-2.

50 En algunas realizaciones, el compuesto antisentido es un motivo "wíngmero", que tiene una configuración de ala-separación o separación-ala, es decir una configuración X-Y o Y-Z tal como se describió anteriormente para la configuración de gápmero. Por tanto, las configuraciones de wíngmero de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo 5-10, 8-4, 4-12, 12-4, 3-14, 16-2, 18-1, 10-3, 2-10, 1-10 u 8-2.

55 En una realización, los compuestos antisentido dirigidos a un ácido nucleico presentan un motivo de gápmero 5-10-5.

60 En algunas realizaciones, un compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico tiene un motivo ensanchado por separación. En otras realizaciones, un oligonucleótido antisentido dirigido a un ácido nucleico tiene un motivo ensanchado por separación.

65 En una realización, un oligonucleótido antisentido ensanchado por separación dirigido a un ácido nucleico tiene un segmento de separación de catorce 2'-desoxirribonucleótidos colocado entre segmentos de ala de tres nucleósidos químicamente modificados. En una realización, la modificación química comprende una modificación de 2'-azúcar. En otra realización, la modificación química comprende una modificación de 2'-MOE-azúcar.

Se considera que los compuestos antisentido que tienen un motivo de gápmero son compuestos antisentido "quiméricos" o "quimeras", que contienen dos o más regiones químicamente diferenciadas, constituidas cada una por al menos una unidad de monómero, es decir, un nucleótido en el caso de un compuesto de oligonucleótido. Estos oligonucleótidos contienen normalmente al menos una región modificada para conferir resistencia aumentada a degradación por nucleasas, captación celular aumentada, afinidad de unión aumentada por el ácido nucleico diana y/o actividad inhibidora aumentada. No es necesario que todas las posiciones en un compuesto dado se modifiquen de manera uniforme, y de hecho más de una de las modificaciones anteriormente mencionadas pueden incorporarse en un único compuesto o incluso en un único nucleósido dentro de un oligonucleótido.

Una región adicional del oligonucleótido puede servir como sustrato para enzimas que pueden escindir híbridos de ARN:ADN o ARN:ARN. A modo de ejemplo, ARNasa H es una endonucleasa celular que escinde la cadena de ARN de un dúplex de ARN:ADN. Por tanto, la activación de ARNasa H da como resultado la escisión de la diana de ARN, potenciando así enormemente la eficacia de la inhibición por oligonucleótido de la expresión génica. Por consiguiente, con frecuencia pueden obtenerse resultados comparables con oligonucleótidos más cortos cuando se usan oligonucleótidos quiméricos, en comparación con desoxioligonucleótidos de fosforotioato que se hibridan con la misma región diana. La escisión de la diana de ARN puede detectarse de manera rutinaria mediante electroforesis en gel y, si es necesario, técnicas de hibridación de ácido nucleico asociadas conocidas en la técnica.

Pueden formarse compuestos antisentido quiméricos de la invención como estructuras compuestas de dos o más oligonucleótidos, oligonucleótidos modificados, oligonucleósidos y/o compuestos miméticos de oligonucleótidos tal como se describió anteriormente. Tales compuestos también se han denominado en la técnica híbridos o gápmeros. Las patentes estadounidenses representativas que enseñan la preparación de tales estructuras híbridas incluyen, pero no se limitan a, las patentes estadounidenses n.^{os}: 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 conjunta con la presente solicitud.

En el caso de un oligonucleótido antisentido que tiene un motivo de gápmero, el segmento de separación sirve generalmente como sustrato para la escisión por endonucleasas, mientras que los segmentos de ala comprenden nucleósidos modificados. En una realización preferida, las regiones de un gápmero se diferencian por los tipos de restos de azúcar que comprende cada región diferenciada. Los tipos de restos de azúcar que se usan para diferenciar las regiones de un gápmero pueden incluir β -D-ribonucleósidos, β -D-desoxirribonucleósidos, nucleósidos modificados en 2' (tales nucleósidos modificados en 2' pueden incluir 2'-MOE), y nucleósidos modificados con azúcares bicíclicos.

Otra modificación de los oligonucleótidos de la invención implica unir químicamente al oligonucleótido uno o más restos o conjugados que potencian la actividad, distribución celular o captación celular del oligonucleótido. Los compuestos de la invención 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 oligómeros, y grupos que potencian las propiedades farmacocinéticas de oligómeros. Los grupos conjugados típicos incluyen colesterol, lípidos, fosfolípidos, biotina, fenazina, folato, fenantridina, antraquinona, acridina, fluoresceínas, rodaminas, cumarinas y tintes. Los grupos que potencian las propiedades farmacodinámicas, en el contexto de esta invención, incluyen grupos que mejoran la captación de oligómero, potencian la resistencia de oligómero a la degradación y/o refuerzan la hibridación específica de secuencia con ARN. Los grupos que potencian las propiedades farmacocinéticas, en el contexto de esta invención, incluyen grupos que mejoran la captación, distribución, metabolismo o excreción de oligómero. Se dan a conocer grupos conjugados representativos en la solicitud de patente internacional PCT/US92/09196, presentada el 23 de octubre de 1992. Los restos de conjugados incluyen, pero no se limitan a, restos de lípidos tales como un resto de colesterol (Letsinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 6553-6556), ácido cólico (Manoharan *et al.*, Bioorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4, 1053-1060), un tioéter, por ejemplo, hexil-S-tritiltiol (Manoharan *et al.*, Ann. N.Y. Acad. Sci., 1992, 660, 306-309; Manoharan *et al.*, Bioorg. Med. Chem. Lett., 1993, 3, 2765-2770), un tiocolesterol (Oberhauser *et al.*, Nucl. Acids Res., 1992, 20, 533-538), una cadena alifática, por ejemplo, residuos de dodecanodiol o undecilo (Saison-Behmoaras *et al.*, EMBO J., 1991, 10, 1111-1118; Kabanov *et al.*, FEBS Lett., 1990, 259, 327-330; Svinarchuk *et al.*, Biochimie, 1993, 75, 49-54), un fosfolípido, por ejemplo, di-hexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato de trietilamonio (Manoharan *et al.*, Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654; Shea *et al.*, Nucl. Acids Res., 1990, 18, 3777-3783), una poliamina o una cadena de polietilenglicol (Manoharan *et al.*, Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14, 969-973) o ácido adamantanoacético (Manoharan *et al.*, Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654), un resto de palmitilo (Mishra *et al.*, Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264, 229-237) o un resto de octadecilamina o hexilamino-carbonilcolesterol (Croke *et al.*, J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277, 923-937). Los oligonucleótidos de la invención también pueden conjugarse con principios farmacológicos activos, por ejemplo, aspirina, warfarina, fenilbutazona, ibuprofeno, suprofen, fenbufeno, ketoprofeno, (S)-(+)-pranoprofeno, carprofeno, dansilsarcosina, ácido 2,3,5-triyodobenzoico, ácido flufenámico, ácido folínico, una benzotiadiazida, clorotiazida, una diazepina, indometicina, un barbiturato, una cefalosporina, un fármaco de tipo sulfa, un antidiabético, un antibacteriano o un antibiótico. Se describen conjugados de oligonucleótido-fármaco y su preparación en la solicitud de patente estadounidense con n.^o de serie 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, las patentes estadounidenses n.^{os}: 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 conjunta con la presente solicitud.

En otra realización de la invención, el compuesto comprende el oligonucleótido modificado que consiste en 20 nucleósidos unidos.

En una realización preferida de la invención, el compuesto comprende la secuencia de nucleobases que es la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 39, 40 y 166.

En una realización de la invención la composición comprende un oligonucleótido modificado que comprende nucleósidos unidos, cuya secuencia de nucleobases es una secuencia expuesta en una de SEQ ID NO: 39, 40 y 166 o una sal del mismo, y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable. Los expertos en la técnica conocen bien ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables.

En una realización de la invención, el compuesto antisentido es complementario dentro de un intervalo de nucleótidos en la secuencia de CTGF. En determinadas realizaciones el compuesto antisentido es complementario dentro del intervalo de nucleótidos 1388-1423 de SEQ ID NO: 9. Los compuestos dirigidos a este intervalo demuestran una inhibición de al menos el 50% (es decir SEQ ID NO: 37, 38, 39 y 40). En determinadas realizaciones el compuesto antisentido es complementario dentro del intervalo de nucleótidos 1394-1423 de SEQ ID NO: 9. Los compuestos dirigidos al mismo demuestran una inhibición de al menos el 60% (es decir SEQ ID NO: 38, 39 y 40). En determinadas realizaciones el compuesto antisentido es complementario dentro del intervalo de nucleótidos 1399-1423. Los compuestos dirigidos al mismo demuestran una inhibición de al menos el 70% (es decir SEQ ID NO: 39 y 40). En determinadas realizaciones, el porcentaje de inhibición se logra cuando se administra el compuesto antisentido a células HuVec a una concentración de 50 nm. Véase el ejemplo 8, proporcionado a continuación en el presente documento, para más detalles.

En una realización de la composición, el oligonucleótido modificado es un oligonucleótido monocatenario o bicatenario. En otra realización de la invención, que comprende un oligonucleótido modificado, el oligonucleótido modificado consiste en 20 nucleósidos unidos.

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

Composiciones y métodos para formular composiciones farmacéuticas

Pueden mezclarse oligonucleótidos antisentido con sustancias farmacéuticamente aceptables activas y/o inertes para la preparación de composiciones o formulaciones farmacéuticas. Las composiciones y los métodos para la formulación de composiciones farmacéuticas dependen de varios criterios, incluyendo, pero sin limitarse a, la vía de administración, el grado de enfermedad o la dosis que va a administrarse.

Puede usarse un compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico en composiciones farmacéuticas combinando el compuesto antisentido con un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable adecuado. Un diluyente farmacéuticamente aceptable incluye solución salina tamponada con fosfato (PBS). PBS es un diluyente adecuado para su uso en composiciones que van a administrarse por vía parenteral. Por consiguiente, en una realización, en los métodos descritos en el presente documento se emplea una composición farmacéutica que comprende un compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico y un diluyente farmacéuticamente aceptable. En una realización, el diluyente farmacéuticamente aceptable es PBS. En otra realización, el diluyente farmacéuticamente aceptable es solución salina de calidad farmacéutica o PBS de calidad farmacéutica. En otras realizaciones, el compuesto antisentido es un oligonucleótido antisentido.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden compuestos antisentido engloban cualquier sal, éster o sal de tales ésteres farmacéuticamente aceptable, o cualquier otro oligonucleótido que, tras 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 divulgación también se refiere a sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos antisentido, profármacos, sales farmacéuticamente aceptables de tales profármacos, y otros bioequivalentes. Las sales farmacéuticamente aceptables adecuadas incluyen, pero no se limitan a, sales de sodio y de potasio.

Un profármaco puede incluir la incorporación de nucleósidos adicionales en uno o ambos extremos de un compuesto antisentido que se escinden mediante nucleasas endógenas dentro del organismo, para formar el compuesto antisentido activo. En particular, se preparan versiones de profármaco de los oligonucleótidos de la invención como derivados de [(S-acetil-2-tioetil)fosfato] según los métodos dados a conocer en el documento WO 93/24510 a nombre de Gosselin *et al.*, publicado el 9 de diciembre de 1993 o en el documento WO 94/26764 y la patente estadounidense n.º 5.770.713 a nombre de Imbach *et al.*

El término "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales fisiológica y farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la invención: es decir, sales que conservan la actividad biológica deseada del compuesto original y no confieren efectos toxicológicos no deseados al mismo.

Se forman sales de adición de base farmacéuticamente aceptables con metales o aminas, tales como metales alcalinos o alcalinotérreos o aminas orgánicas. Ejemplos de metales usados como cationes son sodio, potasio, magnesio, calcio y similares. Ejemplos de aminas adecuadas son N,N'-dibenciletilendiamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, dicitlohexilamina, etilendiamina, N-metilglucamina y procaína (véase, por ejemplo, Berge *et al.*, "Pharmaceutical Salts", J. of Pharma Sci., 1977, 66, 1-19). Las sales de adición de base de dichos compuestos ácidos se preparan poniendo en contacto la forma de ácido libre con una cantidad suficiente de la base deseada para producir la sal de la manera convencional. La forma de ácido libre puede regenerarse poniendo en contacto la forma de sal con un ácido y aislando el ácido libre de la manera convencional. Las formas de ácido libre se diferencian de sus formas de sal respectivas en cierta medida en algunas propiedades físicas tales como solubilidad en disolventes polares, pero por lo demás las sales son equivalentes a su ácido libre respectivo para los fines de la presente invención. Tal como se usa en el presente documento, una "sal de adición farmacéutica" incluye una sal farmacéuticamente aceptable de una forma de ácido de uno de los componentes de las composiciones de la invención. Estas incluyen sales de ácido orgánico o inorgánico de aminas. Sales de ácido preferidas son los clorhidratos, acetatos, salicilatos, nitratos y fosfatos. Los expertos en la técnica conocen bien otras sales farmacéuticamente aceptables adecuadas e incluyen sales básicas de una variedad de ácidos inorgánicos y orgánicos, tales como, por ejemplo, con ácidos inorgánicos, tales como por ejemplo ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico o ácido fosfórico; con ácidos orgánicos carboxílicos, sulfónicos, de sulfo o fosfo o ácidos sulfámicos N-sustituídos, por ejemplo ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido succínico, ácido maleico, ácido hidroximaleico, ácido metilmaleico, ácido fumárico, ácido málico, ácido tartárico, ácido láctico, ácido oxálico, ácido glucónico, ácido glucárico, ácido glucurónico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido salicílico, ácido 4-aminosalicílico, ácido 2-fenoxibenzoico, ácido 2-acetoxibenzoico, ácido embónico, ácido nicotínico o ácido isonicotínico; y con aminoácidos, tales como los 20 alfa-aminoácidos implicados en la síntesis de proteínas en la naturaleza, por ejemplo ácido glutámico o ácido aspártico, y también con ácido fenilacético, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido 2-hidroxietanosulfónico, ácido etano-1,2-disulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido 4-metilbencenosulfónico, ácido naftaleno-2-sulfónico, ácido naftaleno-1,5-disulfónico, 2- o 3-fosfoglicerato, glucosa-6-fosfato, ácido N-ciclohexilsulfámico (con la formación de ciclamatos), o con otros compuestos orgánicos ácidos, tales como ácido ascórbico. También pueden prepararse sales farmacéuticamente aceptables de compuestos con un catión farmacéuticamente aceptable. Los expertos en la técnica conocen bien cationes farmacéuticamente aceptables adecuados e incluyen cationes alcalinos, alcalinotérreos, de amonio y de amonio cuaternario. También son posibles carbonatos o hidrogenocarbonatos.

Para los oligonucleótidos, los ejemplos preferidos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, (a) sales formadas con cationes tales como sodio, potasio, amonio, magnesio, calcio, poliaminas tales como espermina y espermidina, etc.; (b) sales de adición de ácido formadas con ácidos inorgánicos, por ejemplo ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido nítrico y similares; (c) sales formadas con ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, ácido acético, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido glucónico, ácido cítrico, ácido málico, ácido ascórbico, ácido benzoico, ácido tánico, ácido palmítico, ácido algínico, ácido poliglutamato, ácido naftalenosulfónico, ácido metanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido naftalenodisulfónico, ácido poligalacturónico, y similares; y (d) sales formadas a partir de aniones elementales tales como cloro, bromo y yodo.

En determinada realización de la invención, un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable es un componente en una composición que carece de actividad farmacológica, pero es farmacéuticamente necesario o deseable como disolvente, agente de suspensión o cualquier otro vehículo farmacéuticamente inerte para administrar uno o más ácidos nucleicos a un ser humano o animal no humano. Los expertos en la técnica conocen bien portadores farmacéuticos.

Portadores

Determinadas composiciones de la presente invención también incorporan compuestos portadores en la formulación. Tal como se usa en el presente documento, "compuesto portador" o "portador" puede hacer referencia a un ácido nucleico, o análogo del mismo, que es inerte (es decir, no presenta actividad biológica en sí mismo) pero se reconoce como ácido nucleico mediante procesos *in vivo* que reducen la biodisponibilidad de un ácido nucleico que tiene actividad biológica, por ejemplo, degradando el ácido nucleico biológicamente activo o fomentando su eliminación de la circulación. La administración conjunta de un ácido nucleico y un compuesto portador,

normalmente con un exceso de esta última sustancia, puede dar como resultado una reducción sustancial de la cantidad de ácido nucleico recuperada en el hígado, riñón u otro depósito extracirculatorio, supuestamente debido a competencia entre el compuesto portador y el ácido nucleico por un receptor común. Por ejemplo, la recuperación de un oligonucleótido parcialmente de fosforotioato en tejido hepático puede reducirse cuando se administra conjuntamente con ácido poliinosínico, sulfato de dextrano, ácido policitídico o ácido 4-acetamido-4'-isotiocianoestilbena-2,2'-disulfónico (Miyao *et al.*, *Antisense Res. Dev.*, 1995, 5, 115-121; Takakura *et al.*, *Antisense & Nucl. Acid Drug Dev.*, 1996, 6, 177-183).

Excipientes

Al contrario que un compuesto portador, un "portador farmacéutico" o "excipiente" es un disolvente farmacéuticamente aceptable, agente de suspensión o cualquier otro vehículo farmacológicamente inerte para administrar uno o más ácidos nucleicos a un animal. El excipiente puede ser líquido o sólido y se selecciona, teniendo en cuenta la manera de administración prevista, para proporcionar el volumen deseado, la consistencia, etc., cuando se combina con un ácido nucleico y los demás componentes de una composición farmacéutica dada. Los portadores farmacéuticos típicos incluyen, pero no se limitan a, agentes aglutinantes (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa, etc.); cargas (por ejemplo, lactosa y otros azúcares, celulosa microcristalina, pectina, gelatina, sulfato de calcio, etilcelulosa, poliácridatos o hidrogenofosfato de calcio, etc.); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco, sílice, dióxido de silicio coloidal, ácido esteárico, estearatos metálicos, aceites vegetales hidrogenados, almidón de maíz, polietilenglicoles, benzoato de sodio, acetato de sodio, etc.); disgregantes (por ejemplo, almidón, glicolato sódico de almidón, etc.); y agentes humectantes (por ejemplo, laurilsulfato de sodio, etc.).

También pueden usarse excipientes orgánicos o inorgánicos farmacéuticamente aceptables adecuados para la administración no parenteral que no reaccionan de manera perjudicial con ácidos nucleicos para formular las composiciones de la presente invención. Los portadores farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, pero no se limitan a, agua, soluciones salinas, alcoholes, polietilenglicoles, gelatina, lactosa, amilosa, estearato de magnesio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidona y similares.

Las formulaciones para la administración tópica de ácidos nucleicos pueden incluir disoluciones acuosas estériles y no estériles, disoluciones no acuosas en disolventes comunes tales como alcoholes, o disoluciones de los ácidos nucleicos en bases oleosas líquidas o sólidas. Las disoluciones también pueden contener tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados. Pueden usarse excipientes orgánicos o inorgánicos farmacéuticamente aceptables adecuados para la administración no parenteral que no reaccionan de manera perjudicial con ácidos nucleicos.

En una realización de la invención, la composición comprende un oligonucleótido modificado que comprende un oligonucleótido monocatenario o bicatenario, y en la que el oligonucleótido modificado consiste en 20 nucleósidos unidos.

En otra realización de la invención se implica un método para inhibir la expresión del factor de crecimiento de tejido conjuntivo en una célula o un tejido que comprende poner en contacto la célula o tejido con uno cualquiera de los compuestos mencionados anteriormente en condiciones tales que se inhibe la expresión del factor de crecimiento de tejido conjuntivo.

En determinada realización de la invención se implica un método de tratamiento de un animal que tiene una enfermedad o un estado asociado con la expresión del factor de crecimiento de tejido conjuntivo que comprende administrar al animal una cantidad del compuesto descrito anteriormente en el presente documento eficaz para inhibir la expresión del factor de crecimiento de tejido conjuntivo para así tratar al animal.

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

La presente invención también incluye composiciones farmacéuticas y formulaciones que incluyen los compuestos antisentido de la invención. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse de varias maneras dependiendo de si se desea un tratamiento local o sistémico y de la zona que va a tratarse. La administración puede ser tópica (incluyendo oftálmica y a membranas mucosas incluyendo administración 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 farmacéuticas y formulaciones para la administración tópica pueden incluir parches transdérmicos, pomadas, lociones, cremas, geles, colirios, supositorios, pulverizaciones, líquidos y polvos. Pueden ser necesarios o deseables portadores, bases acuosas, de polvo u oleosas, espesantes y similares farmacéuticos convencionales. También pueden ser útiles preservativos, guantes y similares recubiertos. Las formulaciones tópicas

preferidas incluyen aquellas en las que los oligonucleótidos de la invención están mezclados con un agente de administración tópica tal como lípidos, liposomas, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, esteroides, agentes quelantes y tensioactivos. Los lípidos y liposomas preferidos incluyen neutros (por ejemplo dioleoilfosfatidiletanolamina DOPE, dimiristoilfosfatidilcolina DMPC, diestearoilfosfatidilcolina), negativos (por ejemplo dimiristoilfosfatidilglicerol DMPG) y catiónicos (por ejemplo dioleoiltetrametilaminopropilo DOTAP y dioleoilfosfatidiletanolamina DOTMA). Los oligonucleótidos de la invención pueden encapsularse dentro de liposomas o pueden formar complejos con los mismos, en particular con liposomas catiónicos. Alternativamente, pueden complejarse oligonucleótidos con lípidos, en particular con lípidos catiónicos. Los ésteres y ácidos grasos preferidos incluyen, pero no se limitan a, ácido araquidónico, ácido oleico, ácido eicosanoico, ácido láurico, ácido caprílico, ácido cáprico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoleico, ácido linoléico, dicaprato, tricaprato, monooleina, dilaurina, 1-monocaprato de glicerilo, 1-dodecilazacicloheptan-2-ona, una acilcarnitina, una acilcolina o un éster alquílico C₁₋₁₀ (por ejemplo miristato de isopropilo IPM), monoglicérido, diglicérido o sal farmacéuticamente aceptable de los mismos. Se describen en detalle formulaciones tópicas en la solicitud de patente estadounidense con n.º de serie 09/315.298 presentada el 20 de mayo de 1999.

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 minicompimidos. Pueden ser deseables espesantes, agentes aromatizantes, diluyentes, emulsionantes, adyuvantes de dispersión o aglutinantes. Formulaciones orales preferidas son aquellas en las que se administran oligonucleótidos de la invención junto con uno o más potenciadores de la penetración, tensioactivos y quelantes. Los tensioactivos preferidos incluyen ácidos y/o ésteres grasos o sales de los mismos, ácidos biliares y/o sales de los mismos. Los ácidos biliares/sales preferidos incluyen ácido quenodesoxicólico (CDCA) y ácido ursodesoxicólico (UDCA), ácido cólico, ácido deshidrocólico, ácido desoxicólico, ácido glucólico, ácido glicólico, ácido glicodesoxicólico, ácido taurocólico, ácido taurodesoxicólico, tauro-24,25-dihidro-fusidato de sodio, glicodihidrofusidato de sodio. Los ácidos grasos preferidos incluyen ácido araquidónico, ácido undecanoico, ácido oleico, ácido láurico, ácido caprílico, ácido cáprico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoleico, ácido linoléico, dicaprato, tricaprato, monooleina, dilaurina, 1-monocaprato de glicerilo, 1-dodecilazacicloheptan-2-ona, una acilcarnitina, una acilcolina o un monoglicérido, un diglicérido o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos (por ejemplo sodio). También se prefieren combinaciones de potenciadores de la penetración, por ejemplo, ácidos grasos/sales en combinación con ácidos biliares/sales. Una combinación particularmente preferida es la sal de sodio de ácido láurico, ácido cáprico y UDCA. Los potenciadores de la penetración adicionales incluyen lauril éter de polioxietileno-9, cetil éter de polioxietileno-20. Los oligonucleótidos de la invención pueden administrarse por vía oral en forma granular incluyendo partículas secadas por pulverización o complejados para formar micro o nanopartículas. Los agentes complejantes de oligonucleótidos incluyen poli-aminoácidos; poliiminas; poliacrilatos; polialquilacrilatos, polioxetanos, polialquilcianoacrilatos; gelatinas cationizadas, albúminas, almidones, acrilatos, polietilenglicoles (PEG) y almidones; polialquilcianoacrilatos; poliiminas derivatizadas con DEAE, pululanos, celulosas y almidones. Los agentes complejantes particularmente preferidos incluyen quitosano, N-trimetilquitosano, poli-L-lisina, polihistidina, poliornitina, poliesperminas, protamina, polivinilpiridina, politiodietilaminometil-etileno P(TDAE), poliaminoestireno (por ejemplo p-amino), poli(cianoacrilato de metilo), poli(cianoacrilato de etilo), poli(cianoacrilato de butilo), poli(cianoacrilato de isobutilo), poli(cianoacrilato de iso-hexilo), DEAE-metacrilato, DEAE-hexilacrilato, DEAE-acrilamida, DEAE-albúmina y DEAE-dextrano, poli(acrilato de metilo), poli(acrilato de hexilo), poli(D,L-ácido láctico), poli(DL-ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), alginato y polietilenglicol (PEG). Se describen formulaciones orales para oligonucleótidos y su preparación en detalle en las solicitudes estadounidenses con n.º de serie 08/886.829 (presentada el 1 de julio de 1997), n.º de serie 09/108.673 (presentada el 1 julio de 1998), n.º de serie 09/256.515 (presentada el 23 de febrero de 1999), n.º de serie 09/082.624 (presentada el 21 de mayo de 1998) y n.º de serie 09/315.298 (presentada el 20 de mayo de 1999).

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.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, disoluciones, emulsiones y formulaciones que contienen liposomas. Estas composiciones pueden generarse a partir de una variedad de componentes que incluyen, pero no se limitan a, líquidos previamente formados, sólidos autoemulsionables y semisólidos autoemulsionables.

Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención, que pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria, pueden prepararse según técnicas convencionales bien conocidas en la industria farmacéutica. Tales técnicas incluyen la etapa de poner en asociación los principios activos con el/los portador(es) o excipiente(s) farmacéutico(s). En general las formulaciones se preparan poniendo en asociación de manera uniforme e íntima los principios activos con portadores líquidos o portadores sólidos finamente divididos o amos y después, si es necesario, conformando el producto.

Las composiciones de la presente invención pueden formularse en cualquiera de muchas posibles formas de

dosificación 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 además sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión incluyendo, por ejemplo, carboximetilcelulosa sódica, sorbitol y/o dextrano. La suspensión también puede contener estabilizadores.

En una realización de la presente invención las composiciones farmacéuticas pueden formularse y usarse como espumas. Las espumas farmacéuticas incluyen formulaciones tales como, pero sin limitarse a, emulsiones, microemulsiones, cremas, jaleas y liposomas. Aunque son de naturaleza básicamente similar, estas formulaciones varían en cuanto a los componentes y la consistencia del producto final. La preparación de tales composiciones y formulaciones la conocen generalmente los expertos en las técnicas farmacéutica y de formulación y pueden aplicarse a la formulación de las composiciones de la presente invención.

Emulsiones

Las composiciones de la presente invención pueden prepararse y formularse como emulsiones. Las emulsiones son normalmente sistemas heterogéneos de un líquido dispersado en otro en forma de gotitas que superan habitualmente 0,1 μm de diámetro. (Idson, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, pág. 199; Rosoff, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, pág. 245; Block en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 2, pág. 335; Higuchi *et al.*, en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, pág. 301). Las emulsiones son con frecuencia sistemas bifásicos que comprenden dos fases líquidas inmiscibles mezcladas de manera íntima y dispersadas una en otra. En general, las emulsiones pueden ser de una variedad o bien de agua en aceite (w/o) o bien de aceite en agua (o/w). Cuando se divide finamente una fase acuosa y se dispersa en gotitas diminutas en una fase oleosa voluminosa la composición resultante se denomina emulsión de agua en aceite (w/o). Alternativamente, cuando se divide finamente una fase oleosa y se dispersa como gotas diminutas en una fase acuosa voluminosa la composición resultante se denomina emulsión de aceite en agua (o/w). Las emulsiones pueden contener componentes adicionales además de las fases dispersadas y el fármaco activo que puede estar presente como disolución en cualquiera de la fase acuosa, la fase oleosa o en sí mismo como fase separada. También pueden estar presentes excipientes farmacéuticos tales como emulsionantes, estabilizadores, tintes y antioxidantes en las emulsiones según se necesite. Las emulsiones farmacéuticas también pueden ser emulsiones múltiples que están compuestas por más de dos fases tales como, por ejemplo, en el caso de las emulsiones de aceite en agua en aceite (o/w/o) y de agua en aceite en agua (w/o/w). Tales formulaciones complejas proporcionan con frecuencia ciertas ventajas que no proporcionan las emulsiones binarias simples. Las emulsiones múltiples en las que gotitas oleosas individuales de una emulsión de o/w encierran gotitas de agua pequeñas constituyen una emulsión de w/o/w. Asimismo, un sistema de gotitas oleosas encerradas en glóbulos de agua estabilizados en una fase continua oleosa proporciona una emulsión de o/w/o.

Las emulsiones se caracterizan por poca o ninguna estabilidad termodinámica. Con frecuencia, la fase dispersa o discontinua de la emulsión está bien dispersada en la fase externa o continua y se mantiene en esta forma por medio de emulsionantes o la viscosidad de la formulación. Cualquiera de las fases de la emulsión puede ser un semisólido o un sólido, tal como es el caso de las cremas y bases de pomada de tipo emulsión. Otros medios de estabilizar emulsiones conllevan el uso de emulsionantes que pueden incorporarse en cualquier fase de la emulsión. Los emulsionantes pueden clasificarse ampliamente en cuatro categorías: tensioactivos sintéticos, emulsionantes que se producen de manera natural, bases de absorción y sólidos finamente dispersados (Idson, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, pág. 199).

Los tensioactivos sintéticos, también conocidos como agentes activos en superficie, han encontrado amplia aplicabilidad en la formulación de emulsiones y se han revisado en la bibliografía (Rieger, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, pág. 285; Idson, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., 1988, volumen 1, pág. 199). Los tensioactivos son normalmente anfífilos y comprenden una parte hidrófila y una hidrófoba. La razón de la naturaleza hidrófila con respecto a la hidrófoba del tensioactivo se ha denominado equilibrio hidrófilo/lipófilo (HLB) y es una valiosa herramienta para clasificar y seleccionar tensioactivos en la preparación de formulaciones. Los tensioactivos pueden clasificarse en diferentes clases basándose en la naturaleza del grupo hidrófilo: no iónicos, aniónicos, catiónicos y anfóteros (Rieger, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, pág. 285).

Los emulsionantes que se producen de manera natural usados en formulaciones en emulsión incluyen lanolina, cera de abejas, fosfátidos, lecitina y goma arábiga. Las bases de absorción presentan propiedades hidrófilas de manera que pueden absorber agua para formar emulsiones de w/o pero conservar sus consistencias semisólidas, tales como lanolina anhidra y vaselina hidrófila. También se han usado sólidos finamente divididos como buenos emulsionantes especialmente en combinación con tensioactivos y en preparaciones viscosas. Estos incluyen sólidos inorgánicos polares, tales como hidróxidos de metales pesados, arcillas que no se hinchan tales como bentonita,

atapulgita, hectorita, caolín, montmorillonita, silicato de aluminio coloidal y silicato de magnesio y aluminio coloidal, pigmentos y sólidos no polares tales como carbono o triestearato de glicerilo.

También se incluye una gran variedad de materiales no emulsionantes en formulaciones de emulsión y contribuyen a las propiedades de emulsiones. Estos incluyen grasas, aceites, ceras, ácidos grasos, alcoholes grasos, ésteres grasos, humectantes, coloides hidrófilos, conservantes y antioxidantes (Block, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, pág. 335; Idson, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, pág. 199).

Los coloides hidrófilos o hidrocoloides incluyen gomas que se producen de manera natural y polímeros sintéticos tales como polisacáridos (por ejemplo, goma arábica, agar, ácido algínico, carragenanos, goma guar, goma karaya, y goma tragacanto), derivados de celulosa (por ejemplo, carboximetilcelulosa y carboxipropilcelulosa) y polímeros sintéticos (por ejemplo, carbómeros, éteres de celulosa y polímeros de carboxivinilo). Estos se dispersan o se hinchan en agua para formar disoluciones coloidales que estabilizan las emulsiones formando fuertes películas de interfase alrededor de las gotitas de fase dispersa y aumentando la viscosidad de la fase externa.

Dado que las emulsiones contienen con frecuencia varios componentes tales como hidratos de carbono, proteínas, esteroides y fosfátidos que pueden soportar fácilmente el crecimiento de microbios, estas formulaciones incorporan con frecuencia conservantes. Los conservantes comúnmente usados incluidos en formulaciones de emulsión incluyen metilparabeno, propilparabeno, sales de amonio cuaternario, cloruro de benzalconio, ésteres de ácido p-hidroxibenzoico y ácido bórico. También se añaden comúnmente antioxidantes a formulaciones de emulsión para prevenir el deterioro de la formulación. Los antioxidantes usados pueden ser eliminadores de radicales libres tales como tocoferoles, galatos de alquilo, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, o agentes reductores tales como ácido ascórbico y metabisulfito de sodio, y agentes sinérgicos antioxidantes tales como ácido cítrico, ácido tartárico y lecitina.

La aplicación de formulaciones de emulsión a través de vías dermatológica, oral y parenteral y métodos para su preparación se han revisado en la bibliografía (Idson, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, pág. 199). Se han usado muy ampliamente formulaciones de emulsión para administración oral debido a motivos de facilidad de formulación, eficacia desde un punto de vista de absorción y biodisponibilidad (Rosoff, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, pág. 245; Idson, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, pág. 199). Laxantes a base de aceite mineral, vitaminas liposolubles y preparaciones nutritivas con alto contenido en grasa se encuentran entre los materiales que se han administrado comúnmente por vía oral como emulsiones de o/w.

En una realización de la presente invención, las composiciones de oligonucleótidos y ácidos nucleicos se formulan como microemulsiones. Una microemulsión puede definirse como un sistema de agua, aceite y compuesto anfífilo que es una única disolución líquida ópticamente isotrópica y termodinámicamente estable (Rosoff, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, pág. 245). Normalmente las microemulsiones son sistemas que se preparan dispersando en primer lugar un aceite en una disolución acuosa de tensioactivo y después añadiendo una cantidad suficiente de un cuarto componente, generalmente un alcohol de longitud de cadena intermedia para formar un sistema transparente. Por tanto, también se han descrito las microemulsiones como dispersiones termodinámicamente estables, isotrópicamente claras de dos líquidos inmiscibles que se estabilizan mediante películas de interfase de moléculas activas en superficie (Leung y Shah, en: *Controlled Release of Drugs: Polymers and Aggregate Systems*, Rosoff, M., Ed., 1989, VCH Publishers, Nueva York, páginas 185-215). Las microemulsiones se preparan comúnmente mediante una combinación de tres a cinco componentes que incluyen aceite, agua, tensioactivo, cotensioactivo y electrolito. Si la microemulsión es del tipo de agua en aceite (w/o) o de aceite en agua (o/w) depende de las propiedades del aceite y el tensioactivo usados y de la estructura y el empaquetamiento geométrico de las cabezas polares y las colas de hidrocarburo de las moléculas de tensioactivo (Schott, en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, pág. 271).

El enfoque fenomenológico usando diagramas de fases se ha estudiado ampliamente y ha proporcionado un conocimiento exhaustivo para un experto en la técnica sobre cómo formular microemulsiones (Rosoff, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, pág. 245; Block, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, pág. 335). En comparación con emulsiones convencionales, las microemulsiones ofrecen la ventaja de solubilizar fármacos insolubles en agua en una formulación de gotitas termodinámicamente estables que se forman de manera espontánea.

Los tensioactivos usados en la preparación de microemulsiones incluyen, pero no se limitan a, tensioactivos iónicos, tensioactivos no iónicos, Brij 96, oleil éteres de polioxietileno, ésteres de ácidos grasos de poliglicerol, monolaurato de tetraglicerol (ML310), monooleato de tetraglicerol (MO310), monooleato de hexaglicerol (PO310), pentaoleato de hexaglicerol (PO500), monocaprato de decaglicerol (MCA750), monooleato de decaglicerol (MO750), sequioleato de

decaololeato de decaglicerol (DAO750), solos o en combinación con cotensioactivos. El cotensioactivo, habitualmente un alcohol de cadena corta tal como etanol, 1-propanol y 1-butanol, sirve para aumentar la fluidez de interfase penetrando en la película de tensioactivo y creando en consecuencia una película desordenada debido al espacio vacío generado entre moléculas de tensioactivo. Sin embargo, pueden prepararse microemulsiones sin el uso de cotensioactivos y en la técnica se conocen sistemas de microemulsión autoemulsionantes libres de alcohol. La fase acuosa puede ser normalmente, pero no se limita a, agua, una disolución acuosa del fármaco, glicerol, PEG300, PEG400, poliglicérols, propilenglicoles y derivados de etilenglicol. La fase oleosa puede incluir, pero no se limita a, materiales tales como Captex 300, Captex 355, Capmul MCM, ésteres de ácidos grasos, mono, di y triglicéridos de cadena media (C₈-C₁₂), ésteres de ácidos grasos de glicerilo polioxietilados, alcoholes grasos, glicéridos poliglicolizados, glicéridos C₈-C₁₀ poliglicolizados saturados, aceites vegetales y aceite de silicona.

Las microemulsiones son particularmente interesantes desde el punto de vista de solubilización de fármaco y la absorción potenciada de fármacos. Se han propuesto microemulsiones basadas en lípidos (tanto o/w como w/o) para potenciar la biodisponibilidad oral de fármacos, incluyendo péptidos (Constantinides *et al.*, Pharmaceutical Research, 1994, 11, 1385-1390; Ritschel, Met. Find. Exp. Clin. Pharmacol., 1993, 13, 205). Las microemulsiones proporcionan ventajas de solubilización de fármaco mejorada, protección de fármaco frente a hidrólisis enzimática, posible potenciación de la absorción de fármaco debido a alteraciones inducidas por tensioactivo en la fluidez y permeabilidad de membrana, facilidad de preparación, facilidad de administración oral con respecto a formas de dosificación sólidas, potencia clínica mejorada y toxicidad reducida (Constantinides *et al.*, Pharmaceutical Research, 1994, 11, 1385; Ho *et al.*, J. Pharm. Sci., 1996, 85, 138-143). Con frecuencia las microemulsiones pueden formarse espontáneamente cuando se juntan sus componentes a temperatura ambiental. Esto puede ser particularmente ventajoso cuando se formulan fármacos, péptidos u oligonucleótidos termolábiles. Las microemulsiones también han sido eficaces en la administración transdérmica de componentes activos en aplicaciones tanto cosméticas como farmacéuticas. Se espera que las composiciones y formulaciones de microemulsión de la presente invención facilitarán la absorción sistémica aumentada de oligonucleótidos y ácidos nucleicos a partir del tracto gastrointestinal, así como mejorarán la captación celular local de oligonucleótidos y ácidos nucleicos dentro del tracto gastrointestinal, vagina, cavidad bucal y otras zonas de administración.

Las microemulsiones de la presente invención también pueden contener componentes y aditivos adicionales tales como monoestearato de sorbitano (Grill 3), Labrasol y potenciadores de la penetración para mejorar las propiedades de la formulación y para potenciar la absorción de los oligonucleótidos y ácidos nucleicos de la presente invención. Los potenciadores de la penetración usados en las microemulsiones de la presente invención pueden clasificarse como que pertenecen a una de cinco categorías principales, tensioactivos, ácidos grasos, sales biliares, agentes quelantes y componentes no tensioactivos no quelantes (Lee *et al.*, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, pág. 92). Cada una de estas clases se comentó anteriormente.

Liposomas

Hay muchas estructuras de tensioactivos organizadas además de las microemulsiones que se han estudiado y usado para la formulación de fármacos. Estas incluyen monocapas, micelas, bicapas y vesículas. Las vesículas, tales como liposomas, han atraído mucho interés debido a su especificidad y la duración de acción que ofrecen desde el punto de vista de la administración farmacológica. Tal como se usa en la presente invención, el término "liposoma" significa una vesícula compuesta por lípidos anfífilos dispuestos en bicapa o bicapas esféricas.

Los liposomas son vesículas unilaminares o multilaminares que tienen una membrana formada a partir de un material lipófilo y un interior acuoso. La parte acuosa contiene la composición que va a administrarse. Los liposomas catiónicos presentan la ventaja de poder fusionarse con la pared celular. Los liposomas no catiónicos, aunque no pueden fusionarse igual de eficazmente con la pared celular, se captan por macrófagos *in vivo*.

Con el fin de atravesar la piel de mamíferos intacta, las vesículas lipídicas deben pasar a través de una serie de poros finos, cada uno con un diámetro inferior a 50 nm, bajo la influencia de un gradiente transdérmico adecuado. Por tanto, es deseable usar un liposoma que sea altamente deformable y que pueda pasar a través de tales poros finos.

Las ventajas adicionales de liposomas incluyen; los liposomas obtenidos a partir de fosfolípidos naturales son biocompatible y biodegradables; los liposomas pueden incorporar una amplia gama de fármacos solubles en agua y en lípidos; los liposomas pueden proteger fármacos encapsulados en sus compartimentos internos frente a metabolismo y degradación (Rosoff, en Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, pág. 245). Consideraciones importantes en la preparación de formulaciones de liposoma son la carga superficial de lípido, el tamaño de vesícula y el volumen acuoso de los liposomas.

Los liposomas son útiles para la transferencia y administración de principios activos al sitio de acción. Dado que la membrana liposomal es estructuralmente similar a membranas biológicas, cuando se aplican liposomas a un tejido, los liposomas comienzan a fusionarse con las membranas celulares. A medida que avanza la fusión del liposoma y

la célula, el contenido del liposoma se vacía en la célula en la que puede actuar el agente activo.

Las formulaciones liposomales han sido el centro de una extensa investigación como modo de administración para muchos fármacos. Hay cada vez más evidencias de que para la administración tópica los liposomas presentan varias ventajas con respecto a otras formulaciones. Tales ventajas incluyen efectos secundarios reducidos relacionados con la alta absorción sistémica del fármaco administrado, acumulación aumentada del fármaco administrado en la diana deseada, y la capacidad para administrar una amplia variedad de fármacos, tanto hidrófilos como hidrófobos, en la piel.

Varios informes han detallado la capacidad de los liposomas para administrar agentes que incluyen ADN de alto peso molecular en la piel. Se han administrado a la piel compuestos incluyendo analgésicos, anticuerpos, hormonas y ADN de alto peso molecular. La mayoría de las aplicaciones dieron como resultado la selección como diana de la epidermis superior.

Los liposomas se dividen en dos clases principales. Los liposomas catiónicos son liposomas con carga positiva que interaccionan con moléculas de ADN con carga negativa para formar un complejo estable. El complejo de ADN/liposoma con carga positiva se une a la superficie celular con carga negativa y se internaliza en un endosoma. Debido al pH ácido dentro del endosoma, los liposomas se rompen, liberando su contenido en el citoplasma celular (Wang *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1987, 147, 980-985).

Los liposomas que son sensibles al pH o tienen carga negativa, atrapan ADN en vez de complejarse con el mismo. Dado que tanto el ADN como el lípido tienen carga similar, se produce repulsión en lugar de formación de complejo. No obstante, algo de ADN se atrapa dentro del interior acuoso de estos liposomas. Se han usado liposomas sensibles al pH para administrar ADN que codifica para el gen de timidina cinasa a monocapas celulares en cultivo. Se detectó la expresión del gen exógeno en las células diana (Zhou *et al.*, *Journal of Controlled Release*, 1992, 19, 269-274).

Un tipo principal de composición liposomal incluye fosfolípidos distintos de fosfatidilcolina derivada de manera natural. Pueden formarse composiciones de liposomas neutros, por ejemplo, a partir de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) o dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC). Generalmente se forman composiciones de liposomas aniónicos a partir de dimiristoilfosfatidilglicerol, mientras que se forman liposomas fusogénicos aniónicos principalmente a partir de dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE). Otro tipo de composición liposomal se forma a partir de fosfatidilcolina (PC) tal como, por ejemplo, PC de semilla de soja y PC de huevo. Otro tipo se forma a partir de mezclas de fosfolípido y/o fosfatidilcolina y/o colesterol.

Varios estudios han evaluado la administración tópica de formulaciones farmacológicas liposomales a la piel. La aplicación de liposomas que contenían interferón a la piel de cobayas dio como resultado una reducción de las úlceras por herpes de piel mientras que la administración de interferón por otros medios (por ejemplo como disolución o como emulsión) fue ineficaz (Weiner *et al.*, *Journal of Drug Targeting*, 1992, 2, 405-410). Además, un estudio adicional sometió a prueba la eficacia de interferón administrado como parte de una formulación liposomal para la administración de interferón usando un sistema acuoso, y concluyó que la formulación liposomal era superior a la administración acuosa (du Plessis *et al.*, *Antiviral Research*, 1992, 18, 259-265).

También se han examinado sistemas liposomales no iónicos para determinar su utilidad en la administración de fármacos a la piel, en particular sistemas que comprenden tensioactivo no iónico y colesterol. Se usaron formulaciones liposomales no iónicas que comprendían Novasome™ I (dilaurato de glicerilo/colesterol/estearil éter de polioxietileno-10) y Novasome™ II (diestearato de glicerilo/colesterol/estearil éter de polioxietileno-10) para administrar ciclosporina A en la dermis de piel de ratón. Los resultados indicaron que tales sistemas liposomales no iónicos eran eficaces para facilitar la deposición de ciclosporina A en diferentes capas de la piel (Hu *et al.* *S.T.P. Pharma. Sci.*, 1994, 4, 6, 466).

Los liposomas también incluyen liposomas "estéricamente estabilizados", 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 útiles en circulación potenciadas con respecto a liposomas que carecen de tales lípidos especializados. Los ejemplos de liposomas estéricamente estabilizados son aquellos en los que parte de la parte de lípido que forma la vesícula del liposoma (A) comprende uno o más glicolípidos, tales como monosialogangliósido G_{M1}, o (B) se derivatiza con uno o más polímeros hidrófilos, tales como un resto de polietilenglicol (PEG). Sin desear limitarse a ninguna teoría particular, en la técnica se piensa que, al menos para liposomas estéricamente estabilizados que contienen gangliósidos, esfingomiélinas o lípidos derivatizados con PEG, la semivida en circulación potenciada de estos liposomas estéricamente estabilizados se deriva de una captación reducida en células del sistema reticuloendotelial (RES) (Allen *et al.*, *FEBS Letters*, 1987, 223, 42; Wu *et al.*, *Cancer Research*, 1993, 53, 3765).

En la técnica se conocen diversos liposomas que comprenden uno o más glicolípidos. Papahadjopoulos *et al.* (*Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1987, 507, 64) notificaron la capacidad de monosialogangliósido G_{M1}, sulfato de galactocerebrósido y fosfatidilinositol para mejorar las semividas en sangre de liposomas. Estos hallazgos los expusieron Gabizon *et al.*

(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1988, 85, 6949). La patente estadounidense n.º 4.837.028 y el documento WO 88/04924, ambos a nombre de Allen *et al.*, dan a conocer liposomas que comprenden (1) esfingomiolina y (2) el gangliósido G_{M1} o un éster de sulfato de galactocerebrósido. La patente estadounidense n.º 5.543.152 (Webb *et al.*) da a conocer liposomas que comprenden esfingomiolina. Se dan a conocer liposomas que comprenden 1,2-sn-dimiristoilfosfatidilcolina en el documento WO 97/13499 (Lim *et al.*).

En la técnica se conocen muchos liposomas que comprenden lípidos derivatizados con uno o más polímeros hidrófilos, y métodos de preparación de los mismos. Sunamoto *et al.* (Bull. Chem. Soc. Jpn., 1980, 53, 2778) describieron liposomas que comprenden un detergente no iónico, 2C₁₂ 15G, que contiene un resto de PEG. Illum *et al.* (FEBS Lett., 1984, 167, 79) observaron que el recubrimiento hidrófilo de partículas de poliestireno con glicoles poliméricos da como resultado semividas en sangre significativamente potenciadas. Se describen fosfolípidos sintéticos modificados mediante la unión de grupos carboxílicos de polialquilenglicoles (por ejemplo, PEG) por Sears (patentes estadounidenses n.ºs 4.426.330 y 4.534.899). Klibanov *et al.* (FEBS Lett., 1990, 268, 235) describieron experimentos que demuestran que liposomas que comprenden fosfatidiletanolamina (PE) derivatizada con PEG o estearato de PEG tienen aumentos significativos en las semividas en circulación en sangre. Blume *et al.* (Biochimica et Biophysica Acta, 1990, 1029, 91) amplían tales observaciones a otros fosfolípidos derivatizados con PEG, por ejemplo, DSPE-PEG, formados a partir de la combinación de diestearoilfosfatidiletanolamina (DSPE) y PEG. Se describen liposomas que tienen restos de PEG unidos covalentemente en su superficie externa en la patente europea n.º EP 0 445 131 B1 y el documento WO 90/04384 a nombre de Fisher. Se describen composiciones de liposoma que contienen un 1-20 por ciento en moles de PE derivatizado con PEG, y métodos de uso de las mismas, por Woodle *et al.* (patentes estadounidenses n.ºs 5.013.556 y 5.356.633) y Martin *et al.* (patente estadounidense n.º 5.213.804 y patente europea n.º EP 0 496 813 B1). Se dan a conocer liposomas que comprenden varios de otros conjugados de lípido-polímero en el documento WO 91/05545 y la patente estadounidense n.º 5.225.212 (ambos a nombre de Martin *et al.*) y en el documento WO 94/20073 (Zalipsky *et al.*) Se describen liposomas que comprenden lípidos de ceramida modificados con PEG en el documento WO 96/10391 (Choi *et al.*). Las patentes estadounidenses n.ºs 5.540.935 (Miyazaki *et al.*) y 5.556.948 (Tagawa *et al.*) describen liposomas que contienen PEG que pueden derivatizarse adicionalmente con restos funcionales en sus superficies.

En la técnica se conoce un número limitado de liposomas que comprenden ácidos nucleicos. El documento WO 96/40062 a nombre de Thierry *et al.* da a conocer métodos para encapsular ácidos nucleicos de alto peso molecular en liposomas. La patente estadounidense n.º 5.264.221 a nombre de Tagawa *et al.* da a conocer liposomas unidos a proteína y afirma que el contenido de tales liposomas puede incluir un ARN antisentido. La patente estadounidense n.º 5.665.710 a nombre de Rahman *et al.* describe determinados métodos de encapsular oligodesoxinucleótidos en liposomas. El documento WO 97/04787 a nombre de Love *et al.* da a conocer liposomas que comprenden oligonucleótidos antisentido dirigidos al gen raf.

Los transferosomas son aún otro tipo de liposomas, y son agregados de lípidos altamente deformables que son candidatos atractivos para vehículos de administración de fármacos. Los transferosomas pueden describirse como gotitas de lípidos que son tan altamente deformables que pueden penetrar fácilmente a través de poros que son más pequeños que la gotita. Los transferosomas pueden adaptarse al entorno en el que se usan, por ejemplo pueden autooptimizarse (adaptarse a la forma de los poros en la piel), autorrepararse, alcanzan con frecuencia sus dianas sin fragmentarse y con frecuencia presentan autocarga. Para preparar transferosomas es posible añadir activadores de borde de la superficie, habitualmente tensioactivos, a una composición liposomal convencional. Se han usado transferosomas para administrar albúmina sérica a la piel. Se ha mostrado que la administración mediada por transferosomas de albúmina sérica es tan eficaz como la inyección subcutánea de una disolución que contiene albúmina sérica.

Los tensioactivos encuentran amplia aplicación en formulaciones tales como emulsiones (incluyendo microemulsiones) y liposomas. La manera más común de clasificar y ordenar las propiedades de los muchos tipos diferentes de tensioactivos, tanto naturales como sintéticos, es mediante el uso del equilibrio hidrófilo/lipófilo (HLB). La naturaleza del grupo hidrófilo (también conocido como "cabeza") proporciona el medio más útil para clasificar los diferentes tensioactivos usados en formulaciones (Rieger, en Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., 1988, pág. 285).

Si la molécula de tensioactivo no está ionizada, se clasifica como tensioactivo no iónico. Los tensioactivos no iónicos encuentran una amplia aplicación en productos farmacéuticos y cosméticos y pueden usarse a lo largo de un amplio intervalo de valores de pH. En general sus valores de HLB oscilan entre 2 y aproximadamente 18 dependiendo de su estructura. Los tensioactivos no iónicos incluyen ésteres no iónicos tales como ésteres de etilenglicol, ésteres de propilenglicol, ésteres de glicerilo, ésteres de poliglicerilo, ésteres de sorbitano, ésteres de sacarosa y ésteres etoxilados. En esta clase también se incluyen alcanolamidas no iónicas y éteres tales como etoxilatos de alcoholes grasos, alcoholes propoxilados y polímeros en bloque etoxilados/propoxilados. Los tensioactivos de polioxietileno son los miembros más populares de la clase de tensioactivos no iónicos.

Si la molécula de tensioactivo porta una carga negativa cuando se disuelve o dispersa en agua, el tensioactivo se clasifica como aniónico. Los tensioactivos aniónicos incluyen carboxilatos tales como jabones, acil-lactilatos, acilamidas de aminoácidos, ésteres de ácido sulfúrico tales como alquilsulfatos y alquilsulfatos etoxilados, sulfonatos

tales como alquilbencenosulfonatos, acilisetionatos, aciltauratos y sulfosuccinatos, y fosfatos. Los miembros más importantes de la clase de tensioactivos aniónicos son los alquilsulfatos y los jabones.

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

Si la molécula de tensioactivo tiene la capacidad de portar una carga o bien positiva o bien negativa, el tensioactivo se clasifica como anfótero. Los tensioactivos anfóteros incluyen derivados de ácido acrílico, alquilamidas sustituidas, N-alquilbetaínas y fosfátidos.

Se ha revisado el uso de tensioactivos en productos terminados, formulaciones y en emulsiones (Rieger, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., 1988, pág. 285).

Potenciadores de la penetración

En una realización, la presente invención emplea diversos potenciadores de la penetración para realizar la administración eficaz de ácidos nucleicos, particularmente oligonucleótidos, a la piel de animales. La mayoría de los fármacos están presentes en disolución en formas tanto ionizada como no ionizada. Sin embargo, habitualmente sólo los fármacos solubles en lípidos o lipófilos atraviesan fácilmente las membranas celulares. Se ha descubierto que incluso los fármacos no lipófilos pueden atravesar las membranas celulares si se trata la membrana que va a atravesarse con un potenciador de la penetración. Además de ayudar a la difusión de fármacos no lipófilos a través de membranas celulares, los potenciadores de la penetración también potencian la permeabilidad de fármacos lipófilos.

Los potenciadores de la penetración pueden clasificarse como que pertenecen a una de cinco categorías amplias, es decir, tensioactivos, ácidos grasos, sales biliares, agentes quelantes y componentes no tensioactivos no quelantes (Lee *et al.*, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, pág. 92). A continuación se describen con más detalle cada una de las clases anteriormente mencionadas de potenciadores de la penetración.

Tensioactivos: En relación con la presente invención, los tensioactivos (o "agentes activos en superficie") son entidades químicas que, cuando se disuelven en una disolución acuosa, reducen la tensión superficial de la disolución o la tensión de interfase entre la disolución acuosa y otro líquido, con el resultado de que se potencia la absorción de oligonucleótidos a través de la mucosa. Además de sales biliares y ácidos grasos, estos potenciadores de la penetración incluyen, por ejemplo, laurilsulfato de sodio, lauril éter de polioxietileno-9 y cetil éter de polioxietileno-20 (Lee *et al.*, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, pág. 92); y emulsiones perfluoroquímicas, tales como FC-43. Takahashi *et al.*, *J. Pharm. Pharmacol.*, 1988, 40, 252).

Ácidos grasos: Diversos ácidos grasos y sus derivados que actúan como potenciadores de la penetración incluyen, por ejemplo, ácido oleico, ácido láurico, ácido cáprico (ácido n-decanoico), ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoleico, ácido linolénico, dicaprato, tricaprato, monooleína (1-monooleoil-rac-glicerol), dilaurina, ácido caprílico, ácido araquidónico, 1-monocaprato de glicerol, 1-dodecilazacicloheptan-2-ona, acilcarnitinas, acilcolinas, ésteres alquílicos C₁₋₁₀ de los mismos (por ejemplo, metilo, isopropilo y t-butilo) y mono y di-glicéridos de los mismos (es decir, oleato, laurato, caprato, miristato, palmitato, estearato, linoleato, etc.) (Lee *et al.*, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, pág. 92; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33; El Hariri *et al.*, *J. Pharm. Pharmacol.*, 1992, 44, 651-654).

Sales biliares: El papel fisiológico de la bilis incluye la facilitación de la dispersión y absorción de lípidos y vitaminas liposolubles (Brunton, capítulo 38 en: Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9^a ed., Hardman *et al.* Eds., McGraw-Hill, Nueva York, 1996, págs. 934-935). Diversas sales biliares naturales, y sus derivados sintéticos, actúan como potenciadores de la penetración. Por tanto, el término "sales biliares" incluye cualquiera de los componentes de la bilis que se producen de manera natural así como cualquiera de sus derivados sintéticos. Las sales biliares de la invención incluyen, por ejemplo, ácido cólico (o su sal de sodio farmacéuticamente aceptable, colato de sodio), ácido deshidrocólico (deshidrocolato de sodio), ácido desoxicólico (desoxicolato de sodio), ácido glucólico (glucolato de sodio), ácido glicólico (glicocolato de sodio), ácido glicodesoxicólico (glicodesoxicolato de sodio), ácido taurocólico (taurocolato de sodio), ácido taurodesoxicólico (taurodesoxicolato de sodio), ácido quenodesoxicólico (quenodesoxicolato de sodio), ácido ursodesoxicólico (UDCA), tauro-24,25-dihidro-fusidato de sodio (STDHF), glicodihidrofusidato de sodio y lauril éter de polioxietileno-9 (POE) (Lee *et al.*, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, página 92; Swinyard, capítulo 39 en: Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 18^a ed., Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990, páginas 782-783; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33; Yamamoto *et al.*, *J. Pharm. Exp. Ther.*, 1992, 263, 25; Yamashita *et al.*, *J. Pharm. Sci.*, 1990, 79, 579-583).

Agentes quelantes: Los agente quelantes, tal como se usan en relación con la presente invención, pueden definirse como compuestos que retiran iones metálicos de la disolución formando complejos con los mismos, con el resultado de que se potencia la absorción de oligonucleótidos a través de la mucosa. Con respecto a su uso como

potenciadores de la penetración en la presente invención, los agentes quelantes tienen la ventaja añadida de que también sirven como inhibidores de ADNasa, ya que la mayoría de las nucleasas de ADN caracterizadas requieren un ion de metal divalente para la catálisis y, por tanto, se inhiben por agentes quelantes (Jarrett, *J. Chromatogr.*, 1993, 618, 315-339). Los agentes quelantes de la invención incluyen pero no se limitan a etilendiaminatetraacetato de sodio (EDTA), ácido cítrico, salicilatos (por ejemplo, salicilato, 5-metoxisalicilato y homovanilato de sodio), derivados de N-acilo de colágeno, derivados de Laureth-9 y N-aminoacilo de beta-dicetonas (enaminas) (Lee *et al.*, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, página 92; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33; Buur *et al.*, *J. Control Rel.*, 1990, 14, 43-51).

Agentes no tensioactivos no quelantes: Tal como se usan en el presente documento, los compuestos que potencian la penetración no tensioactivos no quelantes pueden definirse como compuestos que demuestran una actividad insignificante como agentes quelantes o como tensioactivos pero que no obstante potencian la absorción de oligonucleótidos a través de la mucosa del tubo digestivo (Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33). Esta clase de potenciadores de la penetración incluyen, por ejemplo, ureas cíclicas insaturadas, derivados de 1-alkil- y 1-alkenilazacilo-alcanonas (Lee *et al.*, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, página 92); y agentes antiinflamatorios no esteroideos tales como diclofenaco sódico, indometacina y fenilbutazona (Yamashita *et al.*, *J. Pharm. Pharmacol.*, 1987, 39, 621-626).

También pueden añadirse agentes que potencian la captación de oligonucleótidos a nivel celular a las composiciones farmacéuticas y otras de la presente invención. Por ejemplo, también se sabe que lípidos catiónicos, tales como Lipofectin (Junichi *et al.*, patente estadounidense n.º 5.705.188), derivados de glicerol catiónicos y moléculas policitónicas, tales como polilisina (Lollo *et al.*, solicitud PCT WO 97/30731), potencian la captación celular de oligonucleótidos.

Pueden utilizarse otros agentes para potenciar la penetración de los ácidos nucleicos administrados, incluyendo glicoles tales como etilenglicol y propilenglicol, pirroles tales como 2-pirrol, azonas y terpenos tales como limoneno y mentona.

Otros componentes

Las composiciones de la presente invención pueden contener adicionalmente otros componentes adyuvantes que se encuentran convencionalmente en composiciones farmacéuticas, a sus niveles de uso establecidos en la técnica. Por tanto, por ejemplo, las composiciones pueden contener materiales farmacéuticamente activos adicionales, compatibles tales como, por ejemplo, antipruríticos, astringentes, anestésicos locales o agentes antiinflamatorios, o pueden contener materiales adicionales útiles en la formulación física de diversas formas de dosificación de las composiciones de la presente invención, tales como colorantes, agentes aromatizantes, conservantes, antioxidantes, opacificantes, agentes espesantes y estabilizadores. Sin embargo, tales materiales, cuando se añaden, no deben interferir excesivamente en las actividades biológicas de los componentes de las composiciones de la presente invención. Las formulaciones pueden esterilizarse y, si se desea, mezclarse con agentes auxiliares, por ejemplo, lubricantes, conservantes, estabilizadores, agentes humectantes, emulsionantes, sales para influir en la presión osmótica, tampones, colorantes, aromatizantes y/o sustancias aromáticas y similares que no interaccionan de manera perjudicial con el/los ácido(s) nucleico(s) de la formulación.

Las suspensiones acuosas pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión incluyendo, por ejemplo, carboximetilcelulosa sódica, sorbitol y/o dextrano. La suspensión puede contener también estabilizadores.

Determinadas realizaciones de la invención proporcionan composiciones farmacéuticas que contienen (a) uno o más compuestos antisentido y (b) 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 daunorubicina, daunomicina, dactinomicina, doxorubicina, epirubicina, idarubicina, esorubicina, bleomicina, mafosfamida, ifosfamida, arabinósido de citosina, bis-cloroetilnitrosourea, busulfano, mitomicina C, actinomicina D, mitramicina, prednisona, hidroxiprogesterona, testosterona, tamoxifeno, dacarbazina, procarbazona, hexametilmelamina, pentametilmelamina, mitoxantrona, amsacrina, clorambucilo, metilciclohexilnitrosourea, mostazas de nitrógeno, melfalán, ciclofosfamida, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-azacitidina, hidroxiiurea, desoxicoformicina, 4-hidroxiperoxifosforamida, 5-fluorouracilo (5-FU), 5-fluorodesoxiuridina (5-FUdR), metotrexato (MTX), colchicina, taxol, vincristina, vinblastina, etopósido (VP-16), trimetrexato, irinotecán, topotecán, gemcitabina, tenipósido, cisplatino y dietilestilbestrol (DES). Véase, en general, *The Merck Manual of Diagnosis and Therapy*, 15ª ed. 1987, págs. 1206-1228, Berkow *et al.*, eds., Rahway, N.J. Cuando se usan con los compuestos 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 otros agentes quimioterápicos de este tipo (por ejemplo, 5-FU, MTX y oligonucleótido, o 5-FU, radioterapia y oligonucleótido). También pueden combinarse en las composiciones 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. Véanse, en general, *The Merck Manual of Diagnosis and Therapy*, 15ª ed., Berkow *et al.*, eds., 1987, Rahway, N.J., páginas 2499-2506 y

46-49, respectivamente). Otros agentes quimioterápicos no antisentido también están dentro del alcance de esta invención. Pueden usarse juntos o secuencialmente dos o más compuestos combinados. En otra realización relacionada, las composiciones de la invención pueden contener uno o más compuestos antisentido, particularmente oligonucleótidos, dirigidos a un primer ácido nucleico y uno o más compuestos antisentido adicionales dirigidos a un segundo ácido nucleico diana. En la técnica se conocen numerosos ejemplos de compuestos antisentido. Pueden usarse juntos o secuencialmente dos o más compuestos combinados.

Los compuestos antisentido usados según esta invención pueden prepararse de manera conveniente y rutinaria a través de la técnica bien conocida de síntesis en fase sólida. Los equipos para tal síntesis los comercializan varios proveedores incluyendo, por ejemplo, Applied Biosystems (Foster City, Calif.). Puede emplearse adicional o alternativamente cualquier otro medio para tal síntesis conocido en la técnica. Se sabe bien cómo usar técnicas similares para preparar oligonucleótidos tales como los fosforotioatos y derivados alquilados.

Los compuestos antisentido de la invención se sintetizan *in vitro* y no incluyen composiciones antisentido de origen biológico, ni constructos de vectores genéticos diseñados para dirigir la síntesis *in vivo* de moléculas antisentido. Los compuestos de la invención también pueden mezclarse, encapsularse, conjugarse o asociarse de otro modo con otras moléculas, estructuras moleculares o mezclas de compuestos, como por ejemplo, liposomas, moléculas dirigidas a receptores, 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 en la captación, distribución y/o absorción incluyen, pero no se limitan a, las patentes estadounidenses n.^{os}: 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.

Determinadas indicaciones

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

En una determinada realización de la invención, se proporciona un método de tratamiento de una enfermedad o un estado asociado con la expresión de CTGF, en el que la enfermedad es un trastorno hiperproliferativo que incluye cáncer, en el que el cáncer es cáncer de mama, de próstata, renal, de páncreas, de cabeza y cuello, gástrico y mieloma múltiple (véanse Pickles M y Leask A, *J Cell Commun Signal.* septiembre de 2007; (2):85-90. Epub del 17 de julio de 2007; Mullis T.C., Tang X., Chong K.T., *J Clin Pathol.* mayo de 2008; 61(5):606-10; Liu L.Y., *et al.* *World J Gastroenterol.* 7 de abril de 2008; 14(13):2110-4; Chintalapudi M.R., *et al.*, *Carcinogenesis.* abril de 2008; 29(4):696-703. Epub del 22 de enero de 2008; Munemasa S., *et al.* *Br J Haematol.* octubre de 2007; 139(1):41-50; Shimo T., *et al.* *J Bone Miner Res.* julio de 2006; 21(7):1045-59; y Yang F., *et al.* *Cancer Res.* 1 de octubre de 2005; 65(19):8887-95.)

En una realización de la invención, el método comprende tratar una enfermedad o un estado, en el que la enfermedad o el trastorno es una enfermedad fibrótica. En una realización del método de la invención, la enfermedad fibrótica es cicatrización hipertrófica, queloides, cicatrización de la piel, fibrosis hepática, fibrosis pulmonar, fibrosis renal, fibrosis cardíaca o reestenosis.

En otra realización de la invención, el método comprende además tratar la enfermedad o el estado mencionado anteriormente, en el que la enfermedad o el trastorno es fibrosis articular (incluyendo síndrome de hombro rígido, daño de tendones y nervios periféricos), daño de la médula espinal, derivación coronaria, adherencias abdominales y peritoneales (incluyendo endometriosis, fibroides y leiomiomas uterinos), queratotomía radial y queratectomía fotorrefractiva, cirugía de re inserción de la retina, fibrosis mediada por dispositivos (por ejemplo en la diabetes), adhesiones tendinosas, contractura de Dupuytren o esclerodermia.

En otra realización de la invención, también se proporciona un método para reducir la cicatrización hipertrófica que resulta de la curación de heridas dérmicas en un sujeto que lo necesita que comprende administrar al sujeto una cantidad de compuesto de un oligonucleótido antisentido eficaz para inhibir la expresión del factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) en el sujeto para reducir de ese modo la cicatrización de la curación de heridas en el sujeto. Dicho sujeto puede incluir un ser humano o un animal no humano.

Se cree que la formulación de composiciones terapéuticas y su posterior administración están dentro de los conocimientos de los expertos en la técnica. La dosificación depende de la gravedad y capacidad de respuesta del estado patológico que va a tratarse, durando el ciclo de tratamiento desde varios días hasta varios meses, o hasta que se efectúa la cura o se logra una disminución del estado patológico. Pueden calcularse programas de

5 dosificación óptimos a partir de mediciones de la acumulación de fármaco en el cuerpo del paciente. Los expertos habituales en la técnica pueden determinar fácilmente dosificaciones, metodologías de dosificación y tasas de repetición óptimas. Las dosificaciones óptimas pueden variar dependiendo de la potencia relativa de los oligonucleótidos individuales, y pueden estimarse generalmente basándose en las CE₅₀ que se encuentra que son eficaces en modelos animales *in vitro* e *in vivo*. En general, la dosificación es de desde 0,01 µg hasta 100 g por kg de peso corporal, y puede administrarse una vez o más veces al día, una vez a la semana, al mes o al año, o incluso una vez cada de 2 a 20 años. Los expertos habituales en la técnica pueden estimar fácilmente las tasas de repetición para la dosificación basándose en las concentraciones y los tiempos de residencia medidos del fármaco en líquidos corporales o tejidos. Tras un tratamiento satisfactorio, puede ser deseable que el paciente se someta a terapia de mantenimiento para prevenir la reaparición del estado patológico, en la que el oligonucleótido se administra en dosis de mantenimiento, que oscilan entre 0,01 µg y 100 g por kg de peso corporal, de una vez o más veces al día, a una vez cada 20 años.

15 En otra realización de esta invención, el método comprende además reducir la cicatrización hipertrófica que resulta de la curación de heridas dérmicas, en el que la curación de heridas es la curación en una herida seleccionada del grupo que consiste en rotura de la piel, incisiones quirúrgicas y quemaduras.

20 En determinadas realizaciones, la invención proporciona métodos de tratamiento de un individuo que comprende administrar una o más composiciones farmacéuticas de la presente invención. En determinadas realizaciones, el individuo tiene uno de los trastornos mencionados anteriormente. En determinadas realizaciones, el individuo corre el riesgo de desarrollar uno de los trastornos mencionados anteriormente. En determinadas realizaciones, se ha identificado que el individuo necesita terapia. En determinadas realizaciones, la invención proporciona métodos para reducir profilácticamente la expresión de CTGF en un individuo.

25 Determinadas realizaciones incluyen tratar a un individuo que lo necesita administrando a un individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico de CTGF.

30 En una realización, la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico de CTGF va acompañada por la monitorización de los niveles de CTGF en el suero de un individuo, para determinar la respuesta de un individuo a la administración del compuesto antisentido. Un médico usa la respuesta de un individuo a la administración del compuesto antisentido para determinar la cantidad y duración de la intervención terapéutica.

35 En una realización, la administración de un compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico de CTGF da como resultado la reducción de la expresión de CTGF en al menos el 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o el 99%, o un intervalo definido por dos cualesquiera de estos valores. En una realización, la administración de un compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico de CTGF da como resultado un cambio en una medida de CTGF tal como se mide mediante una prueba convencional, por ejemplo, pero sin limitarse a, CTGF. En algunas realizaciones, la administración de un compuesto antisentido de CTGF aumenta la medida en al menos el 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o el 99%, o un intervalo definido por dos cualesquiera de estos valores. En algunas realizaciones, la administración de un compuesto antisentido de CTGF disminuye la medida en al menos el 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o el 99%, o un intervalo definido por dos cualesquiera de estos valores.

45 En determinadas realizaciones, se usa la composición farmacéutica que comprende un compuesto antisentido dirigido a CTGF para la preparación de un medicamento para tratar a un paciente que padece o es susceptible a uno cualquiera de los trastornos mencionados anteriormente.

50 Determinadas terapias de combinación

55 En determinadas realizaciones, se coadministran una o más composiciones farmacéuticas de la presente invención con uno o más de otros agentes farmacéuticos. En determinadas realizaciones, se diseñan uno o más de otros agentes farmacéuticos de este tipo para tratar la misma enfermedad o el mismo estado que la una o más composiciones farmacéuticas de la presente invención. En determinadas realizaciones, se diseñan uno o más de otros agentes farmacéuticos de este tipo para tratar una enfermedad o un estado diferente que la una o más composiciones farmacéuticas de la presente invención. En determinadas realizaciones, se diseñan uno o más de otros agentes farmacéuticos de este tipo para tratar un efecto no deseado de una o más composiciones farmacéuticas de la presente invención. En determinadas realizaciones, se coadministran una o más composiciones farmacéuticas de la presente invención con otro agente farmacéutico para tratar un efecto no deseado de ese otro agente farmacéutico. En determinadas realizaciones, se administran al mismo tiempo una o más composiciones farmacéuticas de la presente invención y uno o más de otros agentes farmacéuticos. En determinadas realizaciones, se administran en diferentes momentos una o más composiciones farmacéuticas de la presente invención y uno o más de otros agentes farmacéuticos. En determinadas realizaciones, se preparan juntos en una misma formulación una o más composiciones farmacéuticas de la presente invención y uno o más de otros agentes farmacéuticos. En determinadas realizaciones, se preparan por separado una o más composiciones farmacéuticas de la presente invención y uno o más de otros agentes farmacéuticos.

En determinadas realizaciones, los agentes farmacéuticos que pueden coadministrarse con una composición farmacéutica de la presente invención incluyen un segundo terapéutico agente. En determinadas de tales realizaciones, los agentes farmacéuticos que pueden coadministrarse con una composición farmacéutica de la presente invención incluyen, pero no se limitan a un segundo agente terapéutico. En determinadas de tales realizaciones, el segundo agente terapéutico se administra antes de la administración de una composición farmacéutica de la presente invención. En determinadas de tales realizaciones, el segundo agente terapéutico se administra tras la administración de una composición farmacéutica de la presente invención. En determinadas de tales realizaciones, el segundo agente terapéutico se administra al mismo tiempo que la composición farmacéutica de la presente invención. En determinadas de tales realizaciones, la dosis de un segundo agente terapéutico coadministrado es igual que la dosis que se administraría si el segundo agente terapéutico se administrara solo. En determinadas de tales realizaciones, la dosis de un segundo agente terapéutico coadministrado es menor que la dosis que se administraría si el segundo agente terapéutico se administrara solo. En determinadas de tales realizaciones, la dosis de un segundo agente terapéutico coadministrado es mayor que la dosis que se administraría si el segundo agente terapéutico se administrara solo.

En determinadas realizaciones, la coadministración de un segundo compuesto potencia el efecto terapéutico de un primer compuesto, de manera que la coadministración de los compuestos da como resultado un efecto terapéutico que es mayor que el efecto de administrar el primer compuesto solo, un efecto sinérgico. En otras realizaciones, la coadministración da como resultado efectos terapéuticos que son aditivos de los efectos de los compuestos cuando se administran solos. En otras realizaciones, la coadministración da como resultado efectos terapéuticos que son supraaditivos de los efectos de los compuestos cuando se administran solos. En algunas realizaciones, el primer compuesto es un compuesto antisentido. En algunas realizaciones, el segundo compuesto es un compuesto antisentido.

Esta invención se ilustra en la sección de detalles experimentales que sigue. Esta sección se expone para ayudar a comprender la invención pero no pretende, y no debe interpretarse que limita de ningún modo la invención tal como se expone en las reivindicaciones que siguen después de esto.

30 Ejemplos

EJEMPLO 1: Cultivo celular y tratamiento con compuestos antisentido

Pueden someterse a prueba los efectos de compuestos antisentido sobre el nivel, la actividad o expresión de ácidos nucleicos de CTGF *in vitro* en una variedad de tipos de células. Los tipos de células usados para tales análisis están disponibles de proveedores comerciales (por ejemplo Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, VA; Zen-Bio, Inc., Research Triangle Park, NC; Clonetics Corporation, Walquersville, MD) y se cultivan células según las instrucciones del proveedor usando reactivos disponibles comercialmente (por ejemplo Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). Los tipos de células ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, células HepG2, células Hep3B y hepatocitos primarios.

Ejemplo 2: Pruebas *in vitro* de oligonucleótidos antisentido

Se describen en el presente documento métodos para el tratamiento de células con oligonucleótidos antisentido, que pueden modificarse apropiadamente para el tratamiento con otros compuestos antisentido.

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

Un reactivo comúnmente usado para introducir oligonucleótidos antisentido en células cultivadas incluye el reactivo de transfección de lípidos catiónicos LIPOFECTIN® (Invitrogen, Carlsbad, CA). Los oligonucleótidos antisentido se mezclan con LIPOFECTIN® en OPTI-MEM® 1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) para lograr la concentración final deseada de oligonucleótido antisentido y una concentración de LIPOFECTIN® que oscila normalmente entre 2 y 12 µg/ml por oligonucleótido antisentido 100 nM.

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

Se tratan células con oligonucleótidos antisentido mediante métodos de rutina. Se recogen las células normalmente 16-24 horas tras el tratamiento con oligonucleótido antisentido, momento en el que se miden los niveles de ARN o proteína de ácidos nucleicos diana mediante métodos conocidos en la técnica y descritos en el presente documento. En general, cuando se realizan tratamientos en múltiples réplicas, los datos se presentan como el promedio de los tratamientos replicados.

La concentración de oligonucleótido antisentido usada varía de una línea celular a otra. Se conocen en la técnica métodos para determinar la concentración de oligonucleótido antisentido óptima para una línea celular particular. Los oligonucleótidos antisentido se usan normalmente a concentraciones que oscilan entre 1 nM y 300 nM.

EJEMPLO 3: Aislamiento de ARN

El análisis de ARN puede realizarse con ARN celular total o poli(A)⁺-ARNm. Se conocen bien en la técnica métodos de aislamiento de ARN. Se prepara ARN usando métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, usando el reactivo TRIZOL® (Invitrogen, Carlsbad, CA) según los protocolos recomendados por el fabricante.

EJEMPLO 4: Análisis de inhibición de la expresión o niveles diana

Puede someterse a ensayo la inhibición de los niveles o la expresión de un ácido nucleico de CTGF de una variedad de maneras conocidas en la técnica. Por ejemplo, los niveles de ácido nucleico diana pueden cuantificarse mediante, por ejemplo, análisis de transferencia de tipo Northern, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) competitiva o PCR en tiempo real cuantitativa. El análisis del ARN puede realizarse con ARN celular total o poli(A)⁺-ARNm. Se conocen bien en la técnica métodos de aislamiento de ARN. El análisis de transferencia de tipo Northern también es rutinario en la técnica. Puede lograrse de manera conveniente PCR en tiempo real cuantitativa usando el sistema de detección de secuencias ABI PRISM® 7600, 7700 ó 7900 disponible comercialmente, disponible de PE-Applied Biosystems, Foster City, CA y usado según las instrucciones del fabricante.

Ejemplo 5: Análisis de PCR en tiempo real cuantitativa de los niveles de ARN diana

Puede lograrse la cuantificación de los niveles de ARN diana mediante PCR en tiempo real cuantitativa usando el sistema de detección de secuencias ABI PRISM® 7600, 7700 ó 7900 (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA) según las instrucciones del fabricante. Se conocen bien en la técnica métodos de PCR en tiempo real cuantitativa.

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

Las cantidades diana de gen (o ARN) obtenidas mediante PCR en tiempo real se normalizan usando o bien el nivel de expresión de un gen cuya expresión es constante, tal como ciclofilina A, o bien cuantificando el ARN total usando RIBOGREEN® (Invitrogen, Inc. Carlsbad, CA). La expresión de ciclofilina A se cuantifica mediante PCR en tiempo real, ejecutando simultáneamente con la diana, multiplexando, o por separado. El ARN total se cuantifica usando el reactivo de cuantificación de ARN RIBOGREEN® (Invitrogen, Inc. Eugene, OR). Se enseñan métodos de cuantificación de ARN mediante RIBOGREEN® en Jones, L.J., *et al*, (Analytical Biochemistry, 1998, 265, 368-374). Se usa un instrumento CYTOFLUOR® 4000 (PE Applied Biosystems) para medir la fluorescencia de RIBOGREEN®.

Se diseñan sondas y cebadores para hibridarse con un ácido nucleico de CTGF. Se conocen bien en la técnica métodos para diseñar cebadores y sondas de PCR en tiempo real, y pueden incluir el uso de software tal como el software PRIMER EXPRESS® (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Ejemplo 6: Análisis de los niveles de proteína

Puede evaluarse la inhibición antisentido de ácidos nucleicos de CTGF midiendo los niveles de proteína de CTGF. Pueden evaluarse los niveles de proteína de CTGF o cuantificarse de una variedad de maneras bien conocidas en la técnica, tales como inmunoprecipitación, análisis de inmunotransferencia de tipo Western (inmunotransferencia) tal como se describe en el ejemplo 9 más adelante, ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), ensayos cuantitativos de proteínas, ensayos de actividad de proteínas (por ejemplo, ensayos de actividad caspasa), inmunohistoquímica, inmunocitoquímica o separación celular activada por fluorescencia (FACS). Pueden identificarse anticuerpos dirigidos contra una diana y obtenerse de una variedad de fuentes, tales como el catálogo de anticuerpos de MSRS (Aerie Corporation, Birmingham, MI), o pueden prepararse por medio de métodos de generación de anticuerpos monoclonales o policlonales convencionales bien conocidos en la técnica. Están disponibles comercialmente anticuerpos útiles para la detección de CTGF de ser humano y rata.

Ejemplo 7: Pruebas *in vivo* de compuestos antisentido

Se someten a prueba compuestos antisentido, por ejemplo, oligonucleótidos antisentido, en animales para evaluar su capacidad para inhibir la expresión de CTGF y producir cambios fenotípicos. Pueden realizarse pruebas en animales normales, o en modelos de enfermedad experimentales. Para su administración a animales, se formulan oligonucleótidos antisentido en un diluyente farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina tamponada con fosfato. La administración incluye vías parenterales de administración, tales como intraperitoneal, intravenosa y

subcutánea. El cálculo de la dosificación de oligonucleótidos antisentido y la frecuencia de dosificación está dentro de las capacidades de los expertos en la técnica, y depende de factores tales como la vía de administración y el peso corporal del animal. Tras un periodo de tratamiento con oligonucleótidos antisentido, se aísla ARN de tejido hepático y se miden los cambios en la expresión de ácido nucleico de CTGF. También se miden los cambios en los niveles de proteína de CTGF usando los métodos descritos anteriormente en el presente documento en el ejemplo 6.

Ejemplo 8: Selección de candidatos líder de oligonucleótidos antisentido de factores de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humanos

Introducción

Según la presente invención, se diseñaron una serie de oligonucleótidos para seleccionar como diana diferentes regiones de ARN del factor de crecimiento de tejido conjuntivo humano, usando secuencias publicadas (número de registro de GenBank NM_001901.2, incorporada en el presente documento como SEQ ID NO: 9, y número de registro de GenBank NT_025741.14, incorporada en el presente documento como SEQ ID NO: 10).

Este estudio analiza el espacio de secuencias disponibles y los oligonucleótidos antisentido modificados que seleccionan como diana el espacio tanto exónico como intrónico de CTGF. Se sintetizaron aproximadamente 150 secuencias novedosas por diana y se evaluaron para determinar la actividad contra CTGF en cultivo celular. Los oligonucleótidos se muestran en la tabla 1. Todos los compuestos en la tabla 1 son oligonucleótidos quiméricos ("gápmers") de 20 nucleótidos de longitud, compuestos por una región de separación ("gap") central que consiste en o bien diez 2'-desoxinucleótidos, que está flanqueada en ambos lados (sentidos 5' y 3') por "alas" de cinco nucleótidos o 13 2'-desoxinucleótidos, que está flanqueada en ambos lados (sentidos 5' y 3') por "alas" de dos y cinco nucleótidos, respectivamente. Las alas se componen de nucleótidos de 2'-metoxietilo (2'-MOE). Las uniones internucleosídicas (estructura principal) son fosforotioato (P=S) en todo el oligonucleótido. Todos los residuos de citidina son 5-metilcitidinas. Se analizaron los compuestos para determinar su efecto sobre los niveles de ARNm del factor de crecimiento de tejido conjuntivo humano mediante PCR en tiempo real cuantitativa tal como se describe en otros ejemplos en el presente documento. Los datos son promedios de dos experimentos. Si está presente, "N.D." indica "sin datos".

TABLA 1

Inhibición de los niveles de ARNm de factor de crecimiento de tejido conjuntivo humano por oligonucleótidos de fosforotioato quiméricos que tienen alas de 2'-MOE y una separación desoxi						
N.º de ISIS	Región	SEQ ID NO. DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	% DE INHIB.	SEQ ID NO.
124173	CDS	9	380	CCAGCTGCTTGCGCAGACG	35	11
124189	CDS	9	1003	GCCAGAAAGCTCAAACCTTGA	57	12
124212	3'-UTR	9	1783	CCACAAGCTGTCCAGTCTAA	47	13
124235	3'-UTR	9	2267	GGTCACACTCTCAACAAATA	47	14
124238	3'-UTR	9	2282	AAACATGTAACCTTTTGGTCA	53	15
412271	5'-UTR	9	4	GGGAAGAGTTGTTGTGTGAG	0	16
412272	5'-UTR	9	38	AGGGTGGAGTCGCACTGGCT	46	17
412273	CDS	9	228	ACGAAGGCGACGCGGACGGG	35	18
412274	CDS	9	265	GCCGACGGCCGGCCGGCTGC	40	19
412275	CDS	9	475	GGTGCACACGCCGATCTTGC	52	20
412276	CDS	9	483	TCTTTGGCGGTGCACACGCC	0	21
412277	CDS	9	489	GCACCATCTTTGGCGGTGCA	0	22
412278	CDS	9	496	GCAGGGAGCACCATCTTTGG	16	23
412279	CDS	9	501	AAGATGCAGGGAGCACCATC	63	24
412280	CDS	9	507	CCACCGAAGATGCAGGGAGC	0	25
412281	CDS	9	512	CCGTACCACCGAAGATGCAG	47	26
412282	CDS	9	553	GTACTTGCAGCTGCTCTGGA	68	27
412283	CDS	9	592	GGGCATGCAGCCCACCGCCC	72	28
412284	CDS	9	718	AGGCCAACCCACGGTTTGGT	59	29
412285	CDS	9	723	AGGGCAGGCCAACCCACGGT	79	30
412286	CDS	9	732	TAAGCCGCGAGGGCAGGCC	55	31
412287	CDS	9	829	CCCACAGGTCTTGGAACAGG	30	32
412288	CDS	9	839	AGATGCCCATCCCACAGGTC	55	33
412289	3'-UTR	9	1273	CCAGTCTAATGAGTTAATGT	56	34
412290	3'-UTR	9	1281	TTCAAGTTCCAGTCTAATGA	10	35
412291	3'-UTR	9	1361	TTTTCCCCCAGTTAGAAAA	38	36
412292	3'-UTR	9	1388	CACATGTTTTGAATTGGGT	50	37
412293	3'-UTR	9	1394	ACATGGCACAAATGTTTTGAA	67	38

ES 2 566 508 T3

412294	3'-UTR	9	1399	GTTTGACATGGCACAATGTT	73	39
412295	3'-UTR	9	1404	TATTTGTTTGACATGGCACA	74	40
412296	3'-UTR	9	1412	TGATAGACTATTTGTTTGAC	35	41
412297	3'-UTR	9	1457	GTTCCACTGTCAAGCTTAA	55	42
412298	3'-UTR	9	1469	TGACTAATGTAGTTCCACT	69	43
412299	3'-UTR	9	1482	CATTCTGGTGTGTGTACTA	86	44
412300	3'-UTR	9	1489	TAATATACATTCTGGTGCTG	76	45
412301	3'-UTR	9	1495	ACACCTTAATATACATTCTG	54	46
412302	3'-UTR	9	1502	TAAAGCCACACCTTAATATA	54	47
412303	3'-UTR	9	1520	GTACCCTCCCCTGCTCCTA	53	48
412304	3'-UTR	9	1554	AAGATGCTATCTGATGATAC	52	49
412305	3'-UTR	9	1559	CGTATAAGATGCTATCTGAT	69	50
412306	3'-UTR	9	1577	AATAGCAGGCATATTACTCG	74	51
412307	3'-UTR	9	1586	TACACTCAAATAGCAGGCA	69	52
412308	3'-UTR	9	1591	TCAATTACACTTCAAATAGC	50	53
412309	3'-UTR	9	1659	GGAGAATGCACATCCTAGCT	66	54
412310	3'-UTR	9	1665	ATGGCTGGAGAATGCACATC	60	55
412311	3'-UTR	9	1670	TCTTGATGGCTGGAGAATGC	71	56
412312	3'-UTR	9	1729	GAATCAGAATGTCAGAGCTG	37	57
412313	3'-UTR	9	1946	CATTGAAATATCAAAGCATT	0	58
412314	3'-UTR	9	1952	GGCTAACATTGAAATATCAA	25	59
412315	3'-UTR	9	1958	AATTGAGGCTAACATTGAAA	1	60
412316	3'-UTR	9	1965	GTTCAGAAATTGAGGCTAAC	65	61
412317	3'-UTR	9	1971	TATGGTGTTCAGAAATTGAG	13	62
412318	3'-UTR	9	1976	CTACCTATGGTGTTCAGAAA	61	63
412319	3'-UTR	9	1982	TACATTCTACCTATGGTGTT	38	64
412320	3'-UTR	9	1991	GACAAGCTTTACATTCTACC	24	65
412321	3'-UTR	9	1996	GATCAGACAAGCTTTACATT	37	66
412322	3'-UTR	9	2007	ATGCTTTGAACGATCAGACA	64	67
412323	3'-UTR	9	2012	ATTTTCATGCTTTGAACGATC	44	68
412324	3'-UTR	9	2018	GTATCCATTTTCATGCTTTGA	60	69
412325	3'-UTR	9	2026	CCATATAAGTATCCATTTCA	48	70
412326	3'-UTR	9	2032	GAATTTCCATATAAGTATCC	28	71
412327	3'-UTR	9	2040	TCTGAGCAGAATTTCCATAT	58	72
412328	3'-UTR	9	2050	TGTCATTCTATCTGAGCAGA	61	73
412329	3'-UTR	9	2060	TTTGACGGACTGTCAATTCTA	47	74
412330	3'-UTR	9	2070	AACAATCTGTTTTGACGGAC	48	75
412331	3'-UTR	9	2088	TGATGCCTCCCCTTTGCAAA	53	76
412332	3'-UTR	9	2100	TGCCAAGGACACTGATGCCT	68	77
412333	3'-UTR	9	2105	CAGCCTGCCAAGGACACTGA	75	78
412334	3'-UTR	9	2110	GAAATCAGCCTGCCAAGGAC	60	79
412335	3'-UTR	9	2115	ACCTAGAAATCAGCCTGCCA	46	80
412336	3'-UTR	9	2120	TTCTACCTAGAAATCAGCC	51	81
412337	3'-UTR	9	2128	TACCACATTTCTACCTAGA	59	82
412338	3'-UTR	9	2134	TGAGGCTACCACATTTCTTA	0	83
412339	3'-UTR	9	2140	TAAAAGTGAGGCTACCACAT	48	84
412340	3'-UTR	9	2213	CAAATGCTTCCAGGTGAAAA	49	85
412341	3'-UTR	9	2219	TAGAAACAAATGCTTCCAGG	66	86
412342	3'-UTR	9	2230	TCATATCAAAGTAGAAACAA	12	87
412343	3'-UTR	9	2242	TCCGAAAAACAGTCATATCA	24	88
412368	Intrón 1	10	1308	ACCCGGCTGCAGAGGGCGAG	0	89
412369	Intrón 1	10	1313	CGCTTACCCGGCTGCAGAGG	0	90
412370	Intrón 1	10	1410	GACAGGGCGGTGAGCGGCGC	0	91
412371	Intrón 2	10	1730	AGTCCGAGCGGTTTCTTTTT	0	92
412372	Intrón 2	10	1735	AACTCAGTCCGAGCGGTTTC	19	93
412373	Intrón 2	10	1740	AAAGAAACTCAGTCCGAGCG	10	94
412374	Intrón 2	10	1745	TGGAGAAAGAAACTCAGTCC	45	95
412375	Intrón 2	10	1750	GCAGCTGGAGAAAGAAACTC	14	96
412376	Intrón 2	10	1755	TGGCAGCAGCTGGAGAAAGA	46	97
412377	Intrón 2	10	1887	AGGGAGCACCATCTTTGGCT	20	98
412378	Intrón 3	10	2125	TCACCCGCGAGGGCAGGCC	33	99
412379	Intrón 3	10	2137	GGAAGACTCGACTCACCCGC	0	100
412380	Intrón 3	10	2142	TTAGAGGAAGACTCGACTCA	0	101
412381	Intrón 3	10	2150	ACCCTGACTTAGAGGAAGAC	47	102
412382	Intrón 3	10	2155	TCACGACCTGACTTAGAGG	31	103
412383	Intrón 3	10	2160	GAGAATCACGACCCTGACTT	2	104

ES 2 566 508 T3

412384	Intrón 3	10	2165	TGGGAGAGAATCACGACCCT	31	105
412385	Intrón 3	10	2170	CTCCCTGGGAGAGAATCACG	0	106
412386	Intrón 3	10	2191	GGTCGGCACAGTTAGGACTC	53	107
412387	Intrón 3	10	2196	CGTTCGGTCGGCACAGTTAG	30	108
412388	Intrón 3	10	2216	CCTGGATAAGGTATTTCCCC	0	109
412389	Intrón 3	10	2235	ACAAACACCATGTAAAACGC	11	110
412390	Intrón 3	10	2241	GAGCACAAAACACCATGTA	0	111
412391	Intrón 3	10	2251	TGCGAGAGCAGAGCACACAA	0	112
412392	Intrón 3	10	2256	TAAGCTGCGAGAGCAGAGCA	2	113
412393	Intrón 3	10	2261	GTCGGTAAGCTGCGAGAGCA	23	114
412394	Intrón 3	10	2266	TTCCAGTCGGTAAGCTGCGA	15	115
412395	Intrón 4	10	2472	ACATGTACCTTAATGTTCTC	0	116
412396	Intrón 4	10	2477	GCAGAACATGTACCTTAATG	0	117
412397	Intrón 4	10	2482	TAGGACGAGAACATGTACCT	9	118
412398	Intrón 4	10	2487	GTTAATAGGAGCAGAACATG	19	119
412399	Intrón 4	10	2496	TGAAAAATAGTTAATAGGAG	0	120
412400	Intrón 4	10	2511	CCACTGTTTTTCTGTGAAA	10	121
412401	Intrón 4	10	2525	AAGTTGGGTCCATCCACTG	28	122
412402	Intrón 4	10	2530	GCCCTAAGTTGGGTCCATC	20	123
412403	Intrón 4	10	2535	CAAGAGCCCTAAGTTGGGTC	0	124
412404	Intrón 4	10	2540	CGTGGCAAGAGCCCTAAGTT	64	125
412405	Intrón 4	10	2558	CGGGCTTATACTAACAAAGCG	6	126
412406	Intrón 4	10	2563	GATAACGGGCTTATACTAAC	33	127
412407	Intrón 4	10	2568	TTGGAGATAACGGGCTTATA	73	128
412408	Intrón 4	10	2573	TAGTTTTGGAGATAACGGGC	51	129
412409	Intrón 4	10	2578	TTAGATAGTTTTGGAGATAA	24	130
412410	Intrón 4	10	2584	CAATGGTTAGATAGTTTTGG	36	131
412411	Intrón 4	10	2589	CAGCTCAATGGTTAGATAGT	53	132
412412	Intrón 4	10	2594	CAAAACAGCTCAATGGTTAG	34	133
412413	Intrón 4	10	2599	TCCAGCAAAAACAGCTCAATG	59	134
412414	Intrón 4	10	2604	CTCATTCCAGCAAAAACAGCT	42	135
412415	Intrón 4	10	2609	AAGCTCTCATTCCAGCAAAA	57	136
412416	Intrón 4	10	2614	TACACAAGCTCTCATTCCAG	44	137
412417	Intrón 4	10	2623	GGTTGCTATTACACAAGCTC	72	138
412418	Intrón 4	10	2628	CTGGTGGTTGCTATTACACA	61	139
412419	Intrón 4	10	2633	GAAAACAGCTGGTGGTTGCTATT	29	140
412420	Intrón 4	10	2638	TAGTGGAAAACAGCTGGTGGTTG	5	141
412421	Intrón 4	10	2663	TTAACTAACCCCTGTGGAAGA	15	142
412422	Intrón 4	10	2672	TGTCTTGAATTAACCTAACCC	4	143
412423	Intrón 4	10	2677	TGGAATGTCTTGAATTAACCT	0	144
412424	Intrón 4	10	2691	GCCAGAGCCTCTCTTGGAAAT	36	145
412425	Intrón 4	10	2698	AAAATAGCCAGAGCCTCTC	59	146
412426	Intrón 4	10	2703	TGTCCAAAAATAGCCAGAGC	28	147
412427	Intrón 4	10	2708	TGCTATGTCCAAAAATAGCC	15	148
412428	Intrón 4	10	2713	TCATTTGCTATGTCCAAAAA	28	149
412429	Intrón 4	10	2718	GAGTCTCATTTGCTATGTCC	20	150
412430	Intrón 4	10	2723	AGTTTGAGTCTCATTTGCTA	30	151
412431	Intrón 4	10	2728	GAGGAAGTTTGAGTCTCATT	55	152
412432	Intrón 4	10	2763	CTTCTGTTGCTGACTTCTG	55	153
412433	Intrón 4	10	2778	CCTCTGTGTTTTAGTCTTCT	56	154
412434	Intrón 4	10	2788	TTTCTTCAACCCTCTGTGTT	15	155
412435	Intrón 4	10	2796	GGAGTGGCTTTCTTCAACCC	43	156
412436	Intrón 4	10	2849	AGGAAGACAAGGGAAAAGAG	20	157
412437	Intrón 4	10	2854	TTCTAAGGAAGACAAGGGAA	0	158
412438	Intrón 4	10	2859	TGCCCTTCTAAGGAAGACAA	31	159
412439	Intrón 2	10	1791	GGATGCGAGTTGGGATCTGG	0	160
412440	CDS	9	380	CCAGCTGCTTGGCGCAGACG	64	161
412441	CDS	9	1003	GCCAGAAAGCTCAAACCTGA	37	162
412442	3'-UTR	9	1783	CCACAAGCTGTCCAGTCTAA	32	163
412443	3'-UTR	9	2267	GGTCACACTCTCAACAAATA	59	164
412444	3'-UTR	9	2282	AAACATGTAACTTTTGGTCA	55	165
418899	3'-UTR	9	1391	TGACATGGCACAAATGTTTTG	ND*	166

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

Tal como se muestra en la tabla 1, SEQ ID NO 11-15, 17-20, 24, 26-34, 36-57, 59, 61, 63-82, 84-86, 88, 95, 97, 99,

102, 103, 105, 107, 108, 122, 125, 127-140, 145, 146, 149, 151-154, 156, 159, 161-165 demostraron una inhibición de al menos el 24% de la expresión del factor de crecimiento de tejido conjuntivo humano en este ensayo y por tanto se prefieren. Los sitios diana para los que estas secuencias preferidas con complementarias se denominan en el presente documento "sitios activos" y por tanto son sitios preferidos para su selección como diana por compuestos de la presente invención.

Algunos compuestos antisentido son complementarios dentro de un intervalo de nucleótidos en la secuencia de CTGF, es decir dentro del intervalo de nucleótidos 718-751, 1388-1423, 1457-1689, 2040-2069, 2120-2147 ó 2267-2301 de SEQ ID NO: 9, o son complementarios dentro del intervalo de nucleótidos 2728-2797 de SEQ ID NO: 10. Los compuestos dirigidos a estos intervalos demuestran una inhibición de al menos el 50% (es decir SEQ ID NO: 15, 29, 31, 42, 46-49, 53, 72, 81, 82, 152-154, 164 y 165). Determinados sitios diana enumerados en la tabla 1 también demuestran una inhibición de al menos el 50% (es decir SEQ ID NO: 12, 20, 33, 34, 76, 107, 129, 132, 134, 136 y 146).

Compuestos antisentido adicionales son complementarios dentro del intervalo de nucleótidos 553-611, 1394-1423, 1469-1508, 1559-1605, 1659-1689 ó 2100-2129. Los compuestos dirigidos a los mismos demuestran una inhibición de al menos el 60% (es decir SEQ ID NO: 27, 38, 43, 50, 52, 54, 55, 77, 79 y 86). Determinados sitios diana enumerados en la tabla 1 también demuestran una inhibición de al menos el 60% (es decir SEQ ID NO: 24, 61, 63, 67, 69, 73, 125, 139 y 161).

Compuestos antisentido adicionales también son complementarios dentro del intervalo de nucleótidos 1399-1423. Los compuestos dirigidos a los mismos demuestran una inhibición de al menos el 70% (es decir SEQ ID NO: 39 y 40). Determinados sitios diana enumerados en la tabla 1 también demuestran una inhibición de al menos el 70% (es decir SEQ ID NO: 28, 30, 45, 51, 56, 78, 128 y 138). Un sitio diana enumerado en la tabla 1 también demuestra una inhibición de al menos el 80% (es decir SEQ ID NO: 44). En determinadas realizaciones, el porcentaje de inhibición se logra cuando el compuesto antisentido se suministra a células HuVec a una concentración de 50 nM.

Se identificaron múltiples candidatos líder con actividad aparente mayor que la secuencia líder de ASO histórica, SEQ ID No. 15 (ISIS 124238), en secuencias tanto exónicas como intrónicas.

Se completaron estudios de respuesta a la dosis con nueve secuencias altamente activas (SEQ ID NO: 28, 30, 39, 40, 45, 52, 56, 78, 125) (véase la figura 8). SEQ NO. 13 y 15 (ISIS 124212 y 124238) son los oligonucleótidos designados previamente y SEQ ID NO: 167 (ISIS 141923, secuencia CCTCCCTGA AGGTTCTCC) es el control negativo.

Materiales y métodos

Se examinaron los oligonucleótidos y se confirmaron a una concentración de 50 nM en células endoteliales de vena umbilical humana (HuVEC) usando transfección mediada por Lipofectin. Se sembraron en placa células HuVEC de Cascade Biologics (Portland, OR) mantenidas en medio 200 complementado con complemento de crecimiento con bajo contenido en suero (de Cascade Biologics) en placas de 96 pocillos a 5.000 células por pocillo y se incubaron durante la noche a 37°C en presencia del 5% de CO₂. Al día siguiente, se aspiró el medio y se substituyó por mezcla de Opti-MEM I (Invitrogen) precalentado que contenía Oligo-Lipofectamine 2000 (Invitrogen) (3 mg de Lipofectamine 2000 por 1 ml de medio Opti-MEM I). Tras 4 horas, se intercambió la mezcla de transfección por medio 200 nuevo complementado con complemento de crecimiento con bajo contenido en suero y se incubó a 37°C en presencia del 5% de CO₂. Tras 16-24 horas, a una confluencia de aproximadamente el 80%, se lavaron las células con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se lisaron para la purificación del ARN con el kit RNeasy de Qiagen. Se midió el mensaje de CTGF mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa (RT-PCR) (conjuntos de cebador/sonda mostrados a continuación) y se normalizaron los resultados con respecto a ARN total.

Análisis estadístico

Se analizó cada muestra por duplicado, y las barras verticales representan la dispersión entre las dos mediciones.

Resultados y discusión

De las aproximadamente 150 secuencias novedosas por diana sintetizadas y evaluadas para determinar la actividad contra CTGF en cultivo celular, los nuevos oligonucleótidos de CTGF (SEQ ID NO: 28, 30, 39, 40, 45, 52, 56, 78, 125 y 166) muestran una excelente inhibición de la expresión de ARNm de CTGF humano. Los oligonucleótidos altamente activos identificados se proporcionan en la figura 7.

Sorprendentemente, varios de los nuevos oligonucleótidos intrónicos (figuras 4, 5 y 6) y exónicos (figuras 1, 2 y 3) son significativamente más activos que los compuestos examinados previamente históricos, incluyendo ISIS 124238.

La eficacia de la selección como diana antisentido de exones es generalmente mayor que la de la selección como diana de intrones (figura 7A). En la figura 7B se proporciona una lista de estas secuencias de nucleótidos exónicas.

Se confirmaron los 10 oligonucleótidos antisentido más activos en experimentos de respuesta a la dosis en células HuVEC usando el método descrito anteriormente.

5 Ejemplo 9: Análisis de inmunotransferencia de tipo Western de los niveles de proteína del factor de crecimiento de tejido conjuntivo

10 Se lleva a cabo análisis de inmunotransferencia de tipo Western (análisis de inmunotransferencia) usando métodos convencionales. Se recogen células 16-20 horas tras el tratamiento con oligonucleótidos, se lavan una vez con PBS, se suspenden en tampón de Laemmli (100 µl/pocillo), se someten a ebullición durante 5 minutos y se cargan sobre un gel de SDS-PAGE al 16%. Se corren los geles durante 1,5 horas a 150 V, y se transfieren a una membrana para la inmunotransferencia de tipo Western. Se usa un anticuerpo primario apropiado dirigido contra el factor de crecimiento de tejido conjuntivo, con un anticuerpo secundario radiomarcado o marcado de manera fluorescente dirigido contra la especie de anticuerpo primario. Se visualizan bandas usando un instrumento PHOSPHORIMAGER™ (Molecular Dynamics, Sunnyvale Calif.).

15 Ejemplo 10: Estudio piloto de toxicología en ratones de oligonucleótidos antisentido contra CTGF

20 Objetivo del estudio

El fin de este estudio piloto de toxicología era evaluar tres oligonucleótidos que seleccionan como diana CTGF humano para determinar su posible toxicidad en ratones BALB/c macho normales. Los oligonucleótidos sometidos a prueba fueron las secuencias de ISIS 412294 (SEQ ID NO: 39), 412295 (SEQ ID NO: 40) y 418899 (SEQ ID NO: 166).

25 Métodos

Se alimentaron ratones BALB/c macho (de aproximadamente 8 semanas de edad) que pesaban aproximadamente 25 gramos con una dieta de alimento de laboratorio normal a lo largo de todo el estudio. Se les dosificaron a los ratones por vía subcutánea (s.c.) dos veces a la semana oligonucleótidos antisentido 25 ó 50 mg/kg durante 4 semanas (n=6). Se midieron los siguientes criterios de valoración:

- Pesos corporales semanales;
- 35 • Análisis bioquímicos del plasma sanguíneo a las 4 semanas;
- Peso de órganos, peso corporal en la necropsia; y
- Tinción con H&E de hígado y riñón.

40 Resultados

Los resultados tras 4 semanas de dosificación con oligonucleótido antisentido ISIS 412294 (SEQ ID NO: 39), ISIS 412295 (SEQ ID NO: 40) o ISIS 418899 (SEQ ID NO: 166) 25 mg/kg o 50 mg/kg indican que varios criterios de valoración difieren significativamente del grupo control de ratones tratados con solución salina. Estos incluían:

1) Los niveles en plasma de alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST) tras 4 semanas de tratamiento con 25 mg/kg o 50 mg/kg de ISIS 412294 (SEQ ID NO: 39) o ISIS 412295 (SEQ ID NO: 40), o con 25 mg/kg de ISIS 418899 (SEQ ID NO: 166) eran similares a los niveles en el control de solución salina (vehículo), sin embargo los ratones a los que se les dosificaron 50 mg/kg de ISIS 418899 (SEQ ID NO: 166) mostraron niveles de ALT/AST significativamente aumentados por encima de los valores observados en el grupo control (véanse las figuras 9A y 9B). Esto fue un resultado sorprendente que no se predijo en estudios previos ni mediante los ensayos basados en células.

55 2) El aumento de peso para el grupo tratado con 412295 50 mg/kg era significativamente menor que el aumento de peso en el grupo control (véase la figura 10).

Conclusión

60 SEQ ID NO: 39 (ISIS 412294) no presentaba tantas características toxicológicas no deseadas como SEQ ID NO: 40 (ISIS 412295) y SEQ ID NO: 166 (ISIS 418899). Este resultado era totalmente inesperado, y no se predijo mediante el comportamiento en cultivo celular de estas secuencias de oligonucleótido.

65 Ejemplo 11: Efecto de un oligonucleótido antisentido (SEQ ID NO: 163) contra CTGF de rata sobre la expresión de ARNm de CTGF y colágeno en ratas con heridas

Objetivo

Se usó el oligonucleótido antisentido contra CTGF SEQ ID NO: 163 (ISIS 412442) para examinar la capacidad de un oligonucleótido antisentido contra CTGF para reducir la expresión tanto de CTGF como de Col1A2 (un biomarcador de cicatrización) en un modelo animal de cicatrización en rata. Este oligonucleótido antisentido tiene una estructura química idéntica a la de SEQ ID NO: 39 (ISIS 412294), sin embargo la secuencia se ha modificado ligeramente para que sea complementaria al 100% con la secuencia de ARNm de CTGF de rata.

Heridas

Se introdujeron cuatro sacabocados de biopsia de 0,8 centímetros de grosor total en los lomos de ratas sin pelo de 10 semanas de edad (día 1 del estudio), dos en cada lado de la línea media de la columna vertebral. Las heridas se dejaron abiertas, pero se vendaron con un vendaje oclusivo estéril.

Dosificación de oligonucleótidos antisentido

Se trataron los dos sitios de biopsia en el lado derecho del animal por vía intradérmica con el oligonucleótido antisentido contra CTGF en los días 1, 5, 9 y 13 tras la biopsia a o bien 3,0, 1,0, 0,3 o bien 0,1 mg de oligonucleótido antisentido. Los sitios de biopsia en el lado izquierdo del animal se trataron por vía intradérmica con solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se sacrificaron los animales en el día 15 tras la biopsia. Se suministró un volumen total de 200 µl de oligonucleótido antisentido o PBS a cada sitio de biopsia con sacabocados. Se dividió este volumen de 200 µl en cuatro alícuotas de 50 µl que se inyectaron alrededor de la periferia de la herida, a aproximadamente de 0,25 cm a 0,5 cm de los lados derecho, izquierdo, superior e inferior de la herida.

Recogida de muestras/sacrificio

En la fecha del sacrificio, se sacrificaron los animales y se obtuvo una muestra de piel del centro de la herida con un sacabocados de biopsia de 0,5 cm, y se extrajo ARNm de estas muestras usando procedimientos convencionales. Se realizó análisis de ARNm por RT-PCR de CTGF y Col1A2 de rata usando la metodología de curva patrón para el análisis de datos y RiboGreen como gen de mantenimiento/normalización.

Resultados

El tratamiento de las ratas a todas las dosis dio como resultado una reducción estadísticamente significativa en la expresión de ARNm tanto de CTGF como de Col1A2 (véase la figura 11). Estos resultados demuestran claramente que la inhibición de la expresión de CTGF con un oligonucleótido antisentido modificado con 2'MOE disminuirá la deposición de colágeno en la piel, lo que dará como resultado una reducción en la intensidad de la formación de cicatrices en la piel.

Ejemplo 12: Estudio farmacocinético intradérmico de dosis única de oligonucleótido antisentido contra CTGF en conejosObjetivo del estudio

El fin de este estudio farmacocinético en conejo es evaluar la concentración de un oligonucleótido antisentido contra CTGF (SEQ ID NO: 39, ISIS 412294/EXC 001) en piel de conejo a diferentes tiempos tras una única inyección intradérmica.

Diseño del estudio

En el día 0 del estudio, se les dosificó a todos los animales por vía intradérmica (i.d.) una única inyección de 100 µl de oligonucleótido antisentido contra CTGF SEQ ID NO: 39 a una concentración de 50 mg/ml (dosis total de 5 mg). Se les dosificó a los animales el oligonucleótido antisentido en un sitio a la izquierda de la línea media de la columna vertebral, aproximadamente en paralelo a los hombros del conejo. Se insertó la aguja de modo que el material de prueba se inyectó hacia abajo hacia la base de cuerpo del animal. En los días 1, 3, 7 ó 14, se sacrificaron los conejos y se obtuvieron dos biopsias con sacabocados de 1,0 cm de grosor total, una centrada sobre el sitio de inyección original y la otra verticalmente por debajo separada 0,5 cm. Se congelaron instantáneamente las muestras y se almacenaron a -80°C antes del análisis de los niveles de fármaco de oligonucleótido antisentido. Los resultados representan los niveles medios de oligonucleótido antisentido de ambas biopsias en el tiempo indicado.

Resultados y conclusiones

Están presentes niveles significativos del oligonucleótido antisentido hasta al menos el día 14 tras la dosificación intradérmica (véase la figura 12). Las concentraciones terapéuticas de fármaco son de entre 1 y 100 µg/gramo de tejidos. Estos resultados demostraron que por primera vez hay un tiempo de residencia prolongado de un 2'MOE-oligonucleótido antisentido con esta configuración química en la piel, y estos resultados muestran claramente el

potencial terapéutico de esta clase de compuesto en la piel.

EJEMPLO 13: Búsqueda genómica

5 Se evaluó el potencial de SEQ ID NO: 39 para inducir efectos antisentido no deseados que podrían traducirse en toxicidad “fuera de la diana” realizando una búsqueda en la base de datos del genoma humano para encontrar secuencias que tengan una homología o complementariedad completa o parcial con la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 39.

10 Se realizó una búsqueda exhaustiva de las bases de datos de secuencias de ADN humano publicadas para evaluar si secuencias que comprenden SEQ ID NO: 39 tienen homología suficiente con la serie conocida de genes humanos, de manera que pudiese ejercerse actividad antisentido u otra actividad inhibitoria no deseada contra la expresión de productos génicos humanos distintos del CTGF (factor de crecimiento de tejido conjuntivo) diana y de ese modo inducir efectos “fuera de la diana”. La búsqueda supuso el examen de secuencias homólogas que van de 15 20 nucleótidos (es decir, la longitud completa de SEQ ID NO: 39) a 12 nucleótidos.

No se detectaron sitios fuera de la diana en el genoma humano con 20, 19 ó 18 bases de homología con SEQ ID NO: 39. La ausencia completa de sitios fuera de la diana con 18, 19 ó 20 bases indica la probabilidad de que cualquier actividad fuera de la diana consecuente sea mínima. Se identificaron tres homologías de 17 bases con 20 SEQ ID NO: 39. Una de éstas está dentro del intrón del gen de LRFN2. Los intrones se eliminan normalmente por corte y empalme del transcrito antes de que el ARNm llegue al citoplasma, el sitio de acción de SEQ ID NO: 39. Por este motivo, no se espera que SEQ ID NO: 39 afecte a la expresión de LRFN2. Las otras dos homologías de 17 bases se ubican dentro de regiones espaciadoras intergénicas. Los espaciadores intergénicos generalmente no se transcriben sino que existen como ADN bicatenario en el compartimento nuclear, separados del sitio de acción de 25 SEQ ID NO: 39. Por tanto, no había homologías de 17 bases problemáticas.

Entre las homologías de 16 bases, 15 bases y 14 bases encontradas, sólo una estaba ubicada dentro de un transcrito conocido o sospechoso (es decir, FRMD5, que codifica para una transferasa de la biosíntesis de lípidos activa en el hígado). Sin embargo, la homología de 14 bases de SEQ ID NO: 39 con un transcrito sentido de ARNm 30 no sería propicia para la actividad antisentido (es decir, sólo sería posible la hibridación si una parte de la secuencia SEQ ID NO: 39 fuese complementaria, no homóloga, a la secuencia del transcrito de ARNm). Por tanto, SEQ ID NO: 39 no afectará a este transcrito. Todas las demás homologías de 16 bases a 14 bases correspondían a espaciadores intergénicos sin transcritos solapantes, transcritos predichos o etiquetas de secuencia expresadas. No había homologías de 13 bases. Cualquier transcrito basado en homología de sólo 12 nucleótidos o más corta 35 presentaría una diana termodinámicamente desfavorable, en comparación con la unión de un oligonucleótido de 20 bases como SEQ ID NO: 39 con su diana prevista. Por tanto, las homologías de 12 bases y más cortas no presentan un potencial significativo de actividad antisentido fuera de la diana.

40 Por tanto, la búsqueda en la base de datos del genoma humano mostró que SEQ ID NO: 39 tiene un alto grado de especificidad por la diana prevista con un potencial mínimo de efectos fuera de la diana.

Ejemplo 14: Estudio clínico intradérmico de dosis única de fase 1 para evaluar la seguridad y tolerabilidad de un oligonucleótido antisentido contra CTGF (SEQ ID NO: 39)

45 Objetivos del estudio

Se administró el oligonucleótido antisentido contra CTGF humano SEQ ID NO: 39 (n.º de Isis 412294) a seis 50 pacientes mediante dosificación intradérmica (dosis total de 80 mg) como parte de un protocolo de estudio de fase 1 para evaluar la seguridad y tolerabilidad de la dosis única de fármaco.

Resultados

No se notificaron acontecimientos adversos distintos de reacciones en el sitio de inyección local tales como eritema, inflamación, picor e induración. Se notificaron los acontecimientos adversos enumerados en aproximadamente el 55 50% de los sujetos con un nivel de intensidad “mínimo”. No se observaron cambios en el análisis bioquímico del suero, la hematología, el análisis de orina, ECG, signos vitales, exámenes físicos y activación del complemento.

Conclusiones

60 La administración del oligonucleótido antisentido contra CTGF a las dosis que se anticipa que están dentro del intervalo terapéutico se tolera bien en seres humanos, demostrando la seguridad de este compuesto para tratar la cicatrización de la piel.

65 EJEMPLO 15: Niveles de fármaco de oligonucleótido antisentido SEQ ID NO: 39 en piel humana tras dosificación intradérmica

Se evaluaron los niveles de fármaco en la piel en una cohorte de pacientes en un estudio clínico inicial, en el que 5 pacientes recibieron cada uno 40 mg del oligonucleótido antisentido (ASO) (administrado como 10 dosis iguales de 4 mg cada una). Se obtuvieron biopsias de piel 21 días tras la administración de dosis única del ASO en el día 1, en el sitio de la herida quirúrgica simulada (línea trazada sobre la piel como referencia para las ubicaciones de dosificación). La biopsia con sacabocados consistía en un núcleo cilíndrico de 4 mm de muestra de tejido. Se determinaron los niveles del ASO usando electroforesis capilar y sondas específicas de secuencias marcadas de manera fluorescente y eran de 84,2 µg/gramo de tejido. Se anticipa que las concentraciones terapéuticas proyectadas del fármaco de ASO están entre 1 y 100 µg/gramo de tejidos.

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

Ejemplo 16: Estudio de seguridad y eficacia clínica controlado intrasujeto, doble ciego, aleatorizado, de fase 2 de SEQ ID NO: 39 sobre la reducción de la intensidad de las cicatrices en sujetos que se someten a una abdominoplastia programada

Este estudio es un estudio controlado intrasujeto, doble ciego, aleatorizado que evalúa la eficacia y seguridad del oligonucleótido antisentido contra CTGF SEQ ID NO: 39 (es decir el producto terminado). El producto terminado se administra de manera adyacente a ambos lados de la incisión de abdominoplastia mediante inyecciones intradérmicas en sujetos que se someten a una abdominoplastia programada.

Se trata una sección de la incisión de abdominoplastia a ambos lados de la línea media, justo de manera lateral al vello púbico, con producto terminado o placebo, tras cerrarse la incisión quirúrgica.

La duración del estudio es de aproximadamente 24 semanas. Los sujetos reciben la abdominoplastia en el día 1, seguido por la dosificación del producto terminado y el placebo a lo largo de un periodo de 10 semanas. Se realizan la observación y evaluación de las cicatrices cada 4 semanas hasta la semana 12, y de nuevo en la semana 24.

Se determina la eficacia mediante las clasificaciones de cada par de incisiones emparejadas.

Se evalúa la eficacia en las semanas 12 y 24 tras la cirugía de abdominoplastia usando los dos métodos siguientes de clasificación de la intensidad de cicatrices por incisión:

- Evaluación por un panel de expertos de fotografías del estudio ciego usando una escala analógica visual (VAS);
- Escala de evaluación de cicatrices por un investigador, escala de evaluación de cicatrices por el sujeto;

SEQ ID NO: 39 es eficaz según estos criterios.

Ejemplo 17: Estudio de seguridad y eficacia clínica controlado intrasujeto, doble ciego, aleatorizado, de fase 2 de SEQ ID NO: 39 en la reducción de la cicatrización de la piel en sujetos que se someten a una revisión programada de las cicatrices medias que resultan de una cirugía de mastopexia o reducción de mamas previa.

Este estudio es un estudio controlado intrasujeto, doble ciego, aleatorizado que evalúa la eficacia y seguridad del oligonucleótido antisentido contra CTGF SEQ ID NO: 39 (es decir el producto terminado). El producto terminado se administra a la parte media de las cicatrices de la reducción de mamas revisadas por medio de inyecciones intradérmicas. Se trata una sección de cualquier lado de la parte media de la herida/cicatriz de mamas revisada con producto terminado o placebo, tras cerrarse la incisión quirúrgica.

Se reclutan hasta 40 sujetos en este estudio. La duración del estudio es de aproximadamente 24 semanas. Los sujetos reciben las revisiones de las cicatrices en el día 1, seguido por la dosificación del producto terminado y el placebo a lo largo de un periodo de 10 semanas. Se realizan la observación y evaluación de las cicatrices cada 4 semanas hasta la semana 12, y de nuevo en la semana 24.

Se determina la eficacia mediante las clasificaciones de cada par de incisiones emparejadas. Se evalúa la eficacia en las semanas 12 y 24 tras la revisión de las partes medias de la cicatriz de la reducción de mamas usando dos métodos de clasificación de la intensidad de cicatrices por incisión:

- Evaluación por un panel de expertos de fotografías del estudio ciego usando una escala analógica visual (VAS);
- Escala de evaluación de cicatrices por un investigador, escala de evaluación de cicatrices por el sujeto;

SEQ ID NO: 39 es eficaz según estos criterios.

Lista de secuencias

ES 2 566 508 T3

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

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

<160> 165

<170> PatentIn versión 3.5

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

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

<400> 1
 tccgtcatcg ctccctcaggg 20

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

<220>
 <221> exón
 <222> (130)..(1180)

<400>

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

ES 2 566 508 T3

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

ES 2 566 508 T3

	335	340	345	
	gccagagagt	gagagacatt	aactcattag	actggaactt gaactgattc acatctcatt 1240
	tttccgtaaa	aatgatttca	gtagcacaag	ttatntaaat ctgtttttct aactggggga 1300
	aaagattccc	acccaattca	aaacattgtg	ccatgtcaaa caaatagtct atcttcccca 1360
	gacactgggt	tgaagaatgt	taagacttga	cagtggaaact acattagtac acagcaccag 1420
	aatgtatatt	aaggtgtggc	tttaggagca	gtgggagggg accggcccgg ttagtatcat 1480
	cagatcgact	cttatacgag	taatatgcct	gctatttgaa gtgtaattga gaaggaaaat 1540
	tttagcgtgc	tactgacct	gcctgtagcc	ccagtgcag ctaggatgtg cattctccag 1600
	ccatcaagag	actgagtcaa	gttgttcctt	aagtcagaac agcagactca gctctgacat 1660
	tctgattcga	atgacactgt	tcaggaatcg	gaatcctgtc gattagactg gacagcttgt 1720
	ggcaagtgaa	tttgccgtga	acaagccaga	ttttttaaaa tttatattgt aatatattgt 1780
	tgtgtgtgtg	tgtgtgtata	tatatatata	tatgtacagt tatctaagtt aatttaaagt 1840
	tgtttgtgcc	tttttatttt	tgtttttaat	gctttgatat ttcaatgta gcctcaattt 1900
	ctgaacacca	taggtagaat	gtaaagcttg	tctgatcgtt caaagcatga aatggatact 1960
	tatatggaaa	ttctgctcag	atagaatgac	agtcctgcaa aacagattgt ttgcaaaggg 2020
	gaggcatcag	tgtcttgga	ggctgatttc	taggtaggaa atgtggtagc tcacg 2075
	<210> 3			
	<211> 22			
5	<212> ADN			
	<213> Secuencia artificial			
	<220>			
10	<223> Cebador de PCR directo dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano			
	<400> 3			
	acaagggcct ctctgtgac tt 22			
	<210> 4			
15	<211> 22			
	<212> ADN			
	<213> Secuencia artificial			
	<220>			
20	<223> Cebador de PCR inverso dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano			
	<400> 4			
	ggtacaccgt accaccgaag at 22			
	<210> 5			
25	<211> 23			
	<212> ADN			
	<213> Secuencia artificial			
	<220>			
30	<223> Sonda de PCR dirigida a factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano			
	<400> 5			
35	tgtgcaccgc caaagatggt gct 23			
	<210> 6			
	<211> 19			
	<212> ADN			
	<213> Secuencia artificial			
40				

ES 2 566 508 T3

<220>
 <223> Cebador de PCR directo dirigido a GAPDH humana

5 <400> 6
 gaaggtgaag gtcggagtc 19

10 <210> 7
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Cebador de PCR inverso dirigido a GAPDH humana

20 <400> 7
 gaagatggtg atgggatttc 20

25 <210> 8
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sonda de PCR dirigida a GAPDH humana

35 <400> 8
 caagcttccc gttctcagcc 20

40 <210> 9
 <211> 2358
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

45 <220>
 <221> exón
 <222> (207)..(1256)

50 <400> 9
 aaactcacac aacaactctt ccccgctgag aggagacagc cagtgcgact ccaccctcca 60
 gctcgacggc agccgccccg gccgacagcc ccgagacgac agcccggcgc gtcccggctcc 120
 ccacctccga ccaccgctag cgctccaggc cccgcccgtc cccgctcgcc gccaccgcgc 180
 cctccgctcc gcccgcagtg ccaacc atg acc gcc gcc agt atg ggc ccc gtc . 233

ES 2 566 508 T3

																Met	Thr	Ala	Ala	Ser	Met	Gly	Pro	Val								
																1						5										
cgc	gtc	gcc	ttc	gtg	gtc	ctc	ctc	gcc	ctc	tgc	agc	cgg	ccg	gcc	gtc	281	Arg	Val	Ala	Phe	Val	Val	Leu	Leu	Ala	Leu	Cys	Ser	Arg	Pro	Ala	Val
10				15						20					25																	
ggc	cag	aac	tgc	agc	ggg	ccg	tgc	cgg	tgc	ccg	gac	gag	ccg	gcg	ccg	329	Gly	Gln	Asn	Cys	Ser	Gly	Pro	Cys	Arg	Cys	Pro	Asp	Glu	Pro	Ala	Pro
				30						35				40																		
cgc	tgc	ccg	gcg	ggc	gtg	agc	ctc	gtg	ctg	gac	ggc	tgc	ggc	tgc	tgc	377	Arg	Cys	Pro	Ala	Gly	Val	Ser	Leu	Val	Leu	Asp	Gly	Cys	Gly	Cys	Cys
			45					50					55																			
cgc	gtc	tgc	gcc	aag	cag	ctg	ggc	gag	ctg	tgc	acc	gag	cgc	gac	ccc	425	Arg	Val	Cys	Ala	Lys	Gln	Leu	Gly	Glu	Leu	Cys	Thr	Glu	Arg	Asp	Pro
			60				65					70																				
tgc	gac	ccg	cac	aag	ggc	ctc	ttc	tgt	gac	ttc	ggc	tcc	ccg	gcc	aac	473	Cys	Asp	Pro	His	Lys	Gly	Leu	Phe	Cys	Asp	Phe	Gly	Ser	Pro	Ala	Asn
			75			80					85																					
cgc	aag	atc	ggc	gtg	tgc	acc	gcc	aaa	gat	ggt	gct	ccc	tgc	atc	ttc	521	Arg	Lys	Ile	Gly	Val	Cys	Thr	Ala	Lys	Asp	Gly	Ala	Pro	Cys	Ile	Phe
			90			95				100				105																		
ggt	ggt	acg	gtg	tac	cgc	agc	gga	gag	tcc	ttc	cag	agc	agc	tgc	aag	569	Gly	Gly	Thr	Val	Tyr	Arg	Ser	Gly	Glu	Ser	Phe	Gln	Ser	Ser	Tyr	Lys
				110					115					120																		
tac	cag	tgc	acg	tgc	ctg	gac	ggg	gcg	gtg	ggc	tgc	atg	ccc	ctg	tgc	617	Tyr	Gln	Cys	Thr	Cys	Leu	Asp	Gly	Ala	Val	Gly	Cys	Met	Pro	Leu	Cys
				125				130					135																			
agc	atg	gac	ggt	cgt	ctg	ccc	agc	cct	gac	tgc	ccc	ttc	ccg	agg	agg	665	Ser	Met	Asp	Val	Arg	Leu	Pro	Ser	Pro	Asp	Cys	Pro	Phe	Pro	Arg	Arg
			140			145						150																				
gtc	aag	ctg	ccc	ggg	aaa	tgc	tgc	gag	gag	tgg	gtg	tgt	gac	gag	ccc	713	Val	Lys	Leu	Pro	Gly	Lys	Cys	Cys	Glu	Glu	Trp	Val	Cys	Asp	Glu	Pro
			155			160					165																					
aag	gac	caa	acc	gtg	ggt	ggg	cct	gcc	ctc	gcg	gct	tac	cga	ctg	gaa	761	Lys	Asp	Gln	Thr	Val	Val	Gly	Pro	Ala	Leu	Ala	Ala	Tyr	Arg	Leu	Glu
				175						180				185																		
gac	acg	ttt	ggc	cca	gac	cca	act	atg	att	aga	gcc	aac	tgc	ctg	gtc	809	Asp	Thr	Phe	Gly	Pro	Asp	Pro	Thr	Met	Ile	Arg	Ala	Asn	Cys	Leu	Val
				190				195						200																		
cag	acc	aca	gag	tgg	agc	gcc	tgt	tcc	aag	acc	tgt	ggg	atg	ggc	atc	857	Gln	Thr	Thr	Glu	Trp	Ser	Ala	Cys	Ser	Lys	Thr	Cys	Gly	Met	Gly	Ile
				205				210					215																			
tcc	acc	cgg	ggt	acc	aat	gac	aac	gcc	tcc	tgc	agg	cta	gag	aag	cag	905	Ser	Thr	Arg	Val	Thr	Asn	Asp	Asn	Ala	Ser	Cys	Arg	Leu	Glu	Lys	Gln
				220			225					230																				
agc	cgc	ctg	tgc	atg	gtc	agg	cct	tgc	gaa	gct	gac	ctg	gaa	gag	aac	953	Ser	Arg	Leu	Cys	Met	Val	Arg	Pro	Cys	Glu	Ala	Asp	Leu	Glu	Glu	Asn
				235		240					245																					

ES 2 566 508 T3

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

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

5

<400>10

ES 2 566 508 T3

tatattattc actgtcaatc ttagtttata tccagataca acagggataca ctgctcttgt	60
aatggaatca gacttcttat tttacaaga caaaccaaat ccaatccaca tttgaagatt	120
ataggtttta atataagaaa atgcactcat ttctcaaaga ccctagttaa gctgtgttta	180
aatgctccta ggtgaacccc ctttgcaccc cagtgttccc accctgacac ccagagcccc	240
tacctacca acacagaatc atttgctctg atagaacaat ggatcccttt ttctggaac	300
attgatggcc actcctccct tgtccttgcc tatataaac tcctacatat attaagagaa	360
aactaagcaa gagttttgga aatctgcccc aggagactgc atcctgagtc acacgcgtct	420
ttgttctctt tcttgtccca aaaccgttac ctcaagtgc aaatgatcaa atctcaaata	480
tagaattcag ggttttacag gtaggcattc tgaggatttc aaatggtaa aagcaactca	540
ctccttttct actctttgga gagtttcaag agcctatagc ctctaaaacg caaatcattg	600
ctaagggttg ggggggagaa accttttcga attttttagg aattcctgct gtttgcctct	660
tcagctacct acttctaaa aaggatgtat gtcagtggac agaacagggc aaacttattc	720
gaaaaagaaa taagaaataa ttgccagtgt gtttataaat gatatgaatc aggagtggtg	780
cgaagaggat agggaaaaaa aaattctatt tgggtgctgga aatactgctc ttttttttt	840
cctttttttt ttttctgtg agctggagtg tgccagcttt ttcagacgga ggaatgctga	900
gtgtcaaggg gtcaggatca atccgggtgtg agttgatgag gcaggaagggt ggggaggaat	960
gagaggaatg tccctgtttg ttaggactc cattcagctc attggcgagc cgcggccgcc	1020
cggagcgtat aaaagcctcg ggcgccccgc cccaaactca cacaacaact cttccccgct	1080
gagaggagac agccagtgcg actccaccct ccagctcgac ggcagccgcc ccggccgaca	1140
gccccgagac gacagcccgg cgcgtcccgg tccccacctc cgaccaccgc cagcgtcca	1200
ggccccgccg cccccgctc gccgccaccg cgccctccgc tccgcccga gtgccaacca	1260
tgaccgccgc cagtatgggc cccgtccgcg tcgccttcgt ggtcctcctc gccctctgca	1320
gccgggtaag cgcgggagc ccccgctgcg gccggcggt gccagggagg gactcggggc	1380
cggccgggga gggcgtgctc gccgaccgag cgccgtgac cgccctgtcc tccctgcagc	1440
cggccgtcgg ccagaactgc agcgggccgt gccggtgccc ggacgagccg gcgcccgcct	1500
gccccggcgg cgtgagcctc gtgctggacg gctgcggctg ctgcccgtc tgcgccaagc	1560
agctgggcca gctgtgcacc gagcgcgacc catgcgacc gcacaagggc ctattctgtc	1620
acttcggctc cccggccaac cgcaagatcg gcgtgtgcac cgtaagacc cgcagcccc	1680

ES 2 566 508 T3

accgctaggt gtccggccgc ctccctccctc acgcccaccc gcccgctgga aaaagaaacc	1740
gctcggactg agtttctttc tccagctgct gccagcccgc cccctgcagc ccagatccca	1800
actcgcattc ctgacgctct ggatgtgaga gtgcccacat gcctgacctc tgcattcccc	1860
accctctctt tcccttctc ttctccagcc aaagatggtg ctccctgcat cttcggtggt	1920
acgggtgacc gcagcggaga gtccttcagc agcagctgca agtaccagtg cacgtgcctg	1980
gacggggcgg tgggctgcat gccctgtgc agcatggacg ttcgtctgcc cagccctgac	2040
tgccccttc cgaggagggt caagctgccc gggaaatgct gcgaggagtg ggtgtgtgac	2100
gagcccaagg accaaaccgt ggttggccct gccctcgcgg gtgagtcgag tcttctctta	2160
agtcagggtc gtgattctct cccagggagg gagtcctaac tgtgccgacc gaacggggga	2220
aataccttat ccaggcgttt tacatgggtt ttgtgtgctc tgctctcgca gcttaccgac	2280
tggaagacac gtttgccca gaccacaacta tgattagagc caactgcctg gtccagacca	2340
cagagtggag cgcctgttcc aagacctgtg ggatgggcat ctccaccggg gttaccaatg	2400
acaacgcctc ctgcaggcta gagaagcaga gccgcctgtg catggtcagg ccttgcaag	2460
ctgacctgga agagaacatt aaggctacat ttctgtctct attaactatt tttcacagga	2520
aaaacagtgg ataggaccca acttagggct cttgccacgc ttgttagtat aagcccgtta	2580
tctccaaaac tatctaacca ttgagctggt ttgctggaat gagagcttgt gtaatagcaa	2640
ccaccagttt tccactacga aatcttccac agggttagtt aattcaagac attccaagag	2700
aggctctggc tatttttggc catagcaaat gagactcaaa cttcctcccc tcaaaatata	2760
aacagaagtc agacaacaga agactaaaac acagaggggt gaagaaagcc actcctcttg	2820
tagagtcgct gattttttt tttctctct cttttccctt gtcttcctta gaaggcaca	2880
aagtgcattc gtactcccaa aatctccaag cctatcaagt ttgagcttcc tggctgcacc	2940
agcatgaaga cataccgagc taaattctgt ggagtatgta ccgacggccg atgctgcacc	3000
ccccacagaa ccaccacct gccggtggag ttcaagtgcc ctgacggcga ggtcatgaag	3060
aagaacatga tgttcatcaa gacctgtgcc tgccattaca actgtcccgg agacaatgac	3120
atctttgaat cgctgtacta caggaagatg tacggagaca tggcatgaag ccagagagtg	3180
agagacatta actcattaga ctggaacttg aactgattca catctcattt ttccgtaaaa	3240
atgatttcag tagcacaagt tatttaaatc tgtttttcta actgggggaa aagattccca	3300
ccaattcaa aacattgtgc catgtcaaac aaatagtcta tcaaccccag aactggttt	3360
gaagaatggt aagacttgac agtggaaacta cattagtaca cagcaccaga atgtatatta	3420
aggtgtggct ttaggagcag tgggagggtta ccagcagaaa ggttagtata atcagatagc	3480
atcttatacg agtaatatgc ctgctatttg aagtgttaatt gagaaggaaa attttagcgt	3540

ES 2 566 508 T3

gctcactgac ctgacctgtag ccccagtgac agctaggatg tgcattctcc agccatcaag	3600
agactgagtc aagttgttcc ttaagtcaga acagcagact cagctctgac attctgattc	3660
gaatgacact gttcaggaat cggaatcctg tcgattagac tggacagctt gtggcaagtg	3720
aatttgacct taacaagcca gattttttaa aatttatatt gtaaatattg tgtgtgtgtg	3780
tgtgtgtgta tataatata tatgtacagt tatctaagtt aatttaaagt tgtttgtgcc	3840
tttttatfff tgttttfaat gctttgatat ttcaatgta gcctcaattt ctgaacacca	3900
taggtagaat gtaaagcttg tctgatcgtt caaagcatga aatggatact tatatggaaa	3960
ttctgctcag atagaatgac agtccgtcaa aacagattgt ttgcaaaggg gaggcacag	4020
tgtccttggc aggctgattt ctaggtagga aatgtggtag cctcactttt aatgaacaaa	4080
tggcctttat taaaaactga gtgactctat atagctgac agttttttca cctggaagca	4140
tttgtttcta cttgatatg actgtttttc ggacagtta tttgttgaga gtgtgaccaa	4200
aagttacatg tttgcacctt tctagttgaa aataaagtgt atattttttc tataaagggc	4260
ttggttattc atttatcctt ctaaacattt ctgagttttc ttgagcataa ataggaagt	4320
cttattaatc ataagataat tcaccaataa ttttctaat atctttaatt attctataca	4380
ttaataaatt gattattcca tagaattttt atgtaaacat acttcacact gaatcaagta	4440
tcacagactt gcaggcatac acaccacatt gactatacag ccattttttt tgttatcttc	4500
acagaacttt atagacactt taaattcaat tctctctaga ttacttcagt ctccattaac	4560
cctgttgat tacacttggc ctttttggca tttgtacctc tctggccggt ataggttagt	4620
ttccaacctc tcacatcaca aactagtcta tgtgccttgc acgtggaaaa tgtttacatt	4680
ttttaaaaaat tttatgctct aggtctgttt ctgaacttca ttaccttact gttaaactctg	4740
aaaattatga aatgaaatcc tcatttaaat ggagctattt cataagtctt gttttgtata	4800
attccgtttt tggttgccat gataaccaat gacaaacaga tggcataaat agaaaaggg	4860
ggatgagcaa atcttccatt cattaacatt aatagaaatt tgttttgaaa gtaattcctc	4920
catttgccca agtcttttagc tttatcagac ttccagatta atgcatccta cttaccaag	4980
tggtttatac atgagaaaat ggaattgttc aagaagcttc atgtggaaac aatattgtac	5040
ctaccaggt aggtttttac taaagagtga accaaagtga atggtaaaca aaagcaatac	5100
accaaaggca actagaatct tctccacatg aggatagctg aggattctag gggaaaaaaa	5160
aattgcagac agactaactt ttcccaaggt aattagcaac gttgtagtgc caatgtcatt	5220
tggacagaca aaaatacacc tgaaaataaa gactagctct acaacaact gtccacacca	5280
caaaccaaaag gaaaaacttc ccgtgttcag aatgtgaaaa tttatgggtca aaactctggg	5340
ctttaaggat acaccacat ctgtatatag cagtgtctgcc aggagcagca cccacctcc	5400
ccaaataaat gcgcatgtac acatacacat aggcacacac acagagtaca ctgttagttc	5460

ES 2 566 508 T3

	acacttcctt tctgtcaatt aattcctaac tgcaaagatg aaggccatg catgataaac	5520
	gagactgact actgaattag agcattctgg aaatatagaa gcagcaggaa aagcatagat	5580
	ttcacatttt ccaaataccc acattaaaga aaaaaaaaaag agtcactaga ttgcaaaaca	5640
	aaaatcccac aggcaatggt tctacaaaaa ttagatggca atgcacactt tcacccccca	5700
	aatatcggag gtagggggtg ccaaatacgc aaccaccgta agatctgcac cgtgtcagca	5760
	catgtgtgag aaaagcagag aaacaacaag gtatctgatg cttctgagaa cacgagagct	5820
	ctcaaacagc cagcaggtag tcaactagata tatagaaggc caggctgaca gcagctggtg	5880
	aatctagtag gggtttgcc tagcactcca acaaagctta caagccaggg ctgcctccca	5940
	ggagaagatc ctcatactcc tggaaagtga atctaaattg agcaggtcac cagacagatg	6000
	t	6001
	<210> 11	
	<211> 20	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
10	<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano	
	<400> 11	
	ccagctgctt ggccgagacg 20	
	<210> 12	
15	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano	
	<400> 12	
	gccagaaagc tcaaactga 20	
25	<210> 13	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano	
	<400> 13	
35	ccacaagctg tccagtctaa 20	
	<210> 14	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano	
	<400> 14	
45	ggtcacactc tcaacaaata 20	
	<210> 15	
	<211> 20	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	

ES 2 566 508 T3

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

5 <400> 15
aaacatgtaa cttttggca 20

<210> 16
<211> 20
<212> ADN
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

15 <400> 16
gggaagagtt gttgtgtgag 20

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

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

25 <400> 17
agggtggagt cgcactggct 20

<210> 18
30 <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

<400> 18
acgaaggcga cgcggacggg 20

40 <210> 19
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

<400> 19
50 gccgacggcc ggccggctgc 20

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

55 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

<400> 20
60 ggtgcacacg ccgatcttc 20

<210> 21
<211> 20
<212> ADN
65 <213> Secuencia artificial

ES 2 566 508 T3

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

5 <400> 21
tctttggcgg tgcacacgcc 20

<210> 22
<211> 20
<212> ADN
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

15 <400> 22
gcaccatctt tggcgggtgca 20

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

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

25 <400> 23
gcaggagca ccatcttgg 20

<210> 24
30 <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

<400> 24
aagatgcagg gagcaccatc 20

40 <210> 25
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

<400> 25
50 ccaccgaaga tgcaggagc 20

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

55 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

<400> 26
60 ccgtaccacc gaagatgcag 20

<210> 27
<211> 20
<212> ADN
65 <213> Secuencia artificial

ES 2 566 508 T3

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

5 <400> 27
gtacttgacg ctgctctgga 20

<210> 28
<211> 20
<212> ADN
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

15 <400> 28
gggcatgcag cccaccgccc 20

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

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

25 <400> 29
aggcccaacc acggttggt 20

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

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

35 <400> 30
agggcaggcc caaccaggt 20

40 <210> 31
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

50 <400> 31
taagccgga ggcaggccc 20

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

55 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

60 <400> 32
cccacaggtc ttggaacagg 20

<210> 33
<211> 20
<212> ADN
65 <213> Secuencia artificial

ES 2 566 508 T3

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

5 <400> 33
agatgcccat cccacagtc 20

<210> 34
<211> 20
<212> ADN
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

15 <400> 34
ccagtctaag gagttaatgt 20

<210> 35
<211> 20
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

25 <400> 35
ttcaagtcc agtctaagga 20

<210> 36
30 <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

<400> 36
tttccccca gtagaaaaa 20

40 <210> 37
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

<400> 37
50 cacaatgttt tgaattgggt 20

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

55 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

<400> 38
60 acatggcaca atgtttgaa 20

<210> 39
<211> 20
<212> ADN
65 <213> Secuencia artificial

ES 2 566 508 T3

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

5 <400> 39
gtttgacatg gcacaatggt 20

<210> 40
<211> 20
<212> ADN
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

15 <400> 40
tattgtttg acatggcaca 20

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

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

25 <400> 41
tgatagacta tttgtttgac 20

<210> 42
<211> 20
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

35 <400> 42
gtccactgt caagtcttaa 20

<210> 43
<211> 20
40 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

45 <400> 43
tgtactaatg tagtccact 20

50 <210> 44
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

60 <400> 44
cattctggtg ctgtgtacta 20

<210> 45
<211> 20
<212> ADN
65 <213> Secuencia artificial

ES 2 566 508 T3

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

5 <400> 45
taatatacat tctggtgctg 20

<210> 46
<211> 20
<212> ADN
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

15 <400> 46
acacctaata atacattctg 20

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

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

25 <400> 47
taaagccaca ccttaata 20

<210> 48
30 <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

<400> 48
gtaccctccc actgctccta 20

40 <210> 49
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

<400> 49
50 aagatgctat ctgatgatac 20

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

55 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

<400> 50
60 cgtataagat gctatctgat 20

<210> 51
<211> 20
<212> ADN
65 <213> Secuencia artificial

ES 2 566 508 T3

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

5 <400> 51
aatagcaggc atattactcg 20

<210> 52
<211> 20
<212> ADN
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

15 <400> 52
tacacttcaa atagcaggca 20

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

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

25 <400> 53
tcaattacac tcaaatagc 20

<210> 54
30 <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

<400> 54
ggagaatgca catcctagct 20

40 <210> 55
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

<400> 55
50 atggctggag aatgcacatc 20

<210> 56
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

<400> 56
60 tcttgatggc tggagaatgc 20

<210> 57
<211> 20
<212> ADN
65 <213> Secuencia artificial

ES 2 566 508 T3

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

5 <400> 57
gaatcagaat gtcagagctg 20

<210> 58
<211> 20
<212> ADN
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

15 <400> 58
cattgaaata tcaaagcatt 20

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

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

25 <400> 59
ggctaacatt gaaatatcaa 20

<210> 60
30 <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

<400> 60
aattgaggct aacattgaaa 20

40 <210> 61
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

<400> 61
50 gttcagaaat tgaggctaac 20

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

55 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

<400> 62
60 tatggtgttc agaaattgag 20

<210> 63
<211> 20
<212> ADN
65 <213> Secuencia artificial

ES 2 566 508 T3

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

5 <400> 63
ctacctatgg tgtcagaaa 20

<210> 64
<211> 20
<212> ADN
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

15 <400> 64
tacattctac ctatggtgtt 20

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

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

25 <400> 65
gacaagcttt acattctacc 20

<210> 66
<211> 20
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

35 <400> 66
gatcagacaa gctttacatt 20

<210> 67
<211> 20
40 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

45 <400> 67
atgctttgaa cgatcagaca 20

50 <210> 68
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

60 <400> 68
atttcatgct ttgaacgatc 20

<210> 69
<211> 20
<212> ADN
65 <213> Secuencia artificial

ES 2 566 508 T3

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

5 <400> 69
gtatccattt catgctttga 20

<210> 70
<211> 20
<212> ADN
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

15 <400> 70
ccatataagt atccatttca 20

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

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

25 <400> 71
gaattccat ataagtatcc 20

<210> 72
<211> 20
<212> ADN
30 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

35 <400> 72
tctgagcaga atttccatat 20

<210> 73
<211> 20
<212> ADN
40 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

45 <400> 73
tgtcattcta tctgagcaga 20

50 <210> 74
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

60 <400> 74
ttgacggac tgtcattcta 20

<210> 75
<211> 20
<212> ADN
65 <213> Secuencia artificial

ES 2 566 508 T3

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

5 <400> 75
aacaatctgt ttgacggac 20

<210> 76
<211> 20
<212> ADN
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

15 <400> 76
tgatgctcc ccttgcaaa 20

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

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

25 <400> 77
tgccaaggac actgatgct 20

<210> 78
30 <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

<400> 78
cagcctgcca aggacactga 20

40 <210> 79
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

<400> 79
50 gaaatcagcc tgccaaggac 20

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

55 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

<400> 80
60 acctagaaat cagcctgcca 20

<210> 81
<211> 20
<212> ADN
65 <213> Secuencia artificial

ES 2 566 508 T3

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

5 <400> 81
ttctaccta gaaatcagcc 20

<210> 82
<211> 20
<212> ADN
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

15 <400> 82
taccacattt cctacctaga 20

<210> 83
<211> 20
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

25 <400> 83
tgaggctacc acatttcta 20

<210> 84
30 <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

<400> 84
taaaagtgag gctaccacat 20

40 <210> 85
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

<400> 85
50 caaatgcttc cagtgaaaa 20

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

55 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

<400> 86
60 tagaaacaaa tgctccagg 20

<210> 87
<211> 20
<212> ADN
65 <213> Secuencia artificial

ES 2 566 508 T3

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

5 <400> 87
tcatatcaaa gtagaaacaa 20

<210> 88
<211> 20
<212> ADN
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

15 <400> 88
tccgaaaaac agtcatatca 20

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

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

25 <400> 89
acccggctgc agagggcgag 20

<210> 90
<211> 20
<212> ADN
30 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

35 <400> 90
cgcttaccgc gctgcagagg 20

<210> 91
<211> 20
<212> ADN
40 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

45 <400> 91
gacagggcgg tcagcggcgc 20

50 <210> 92
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

60 <400> 92
agtccgagcg gtttctttt 20

<210> 93
<211> 20
<212> ADN
65 <213> Secuencia artificial

ES 2 566 508 T3

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

5 <400> 93
aactcagtcc gagcggtttc 20

<210> 94
<211> 20
<212> ADN
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

15 <400> 94
aaagaaactc agtccgagcg 20

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

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

25 <400> 95
tggagaaaga aactcagtcc 20

<210> 96
<211> 20
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

35 <400> 96
gcagctggag aaagaaactc 20

<210> 97
<211> 20
40 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

45 <400> 97
tggcagcagc tggagaaaga 20

50 <210> 98
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

<400> 98
60 agggagcacc atcttggtc 20

<210> 99
<211> 20
<212> ADN
65 <213> Secuencia artificial

ES 2 566 508 T3

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

5 <400> 99
tcaccgcga ggcaggccc 20

<210> 100
<211> 20
<212> ADN
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

15 <400> 100
ggaagactcg actcaccgc 20

<210> 101
<211> 20
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

25 <400> 101
ttagaggaag actcgactca 20

<210> 102
30 <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

<400> 102
accctgactt agaggaagac 20

40 <210> 103
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

<400> 103
50 tcacgaccct gacttagagg 20

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

55 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

<400> 104
60 gagaatcacg accctgactt 20

<210> 105
<211> 20
<212> ADN
65 <213> Secuencia artificial

ES 2 566 508 T3

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

5 <400> 105
tgggagagaa tcacgaccct 20

<210> 106
<211> 20
<212> ADN
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

15 <400> 106
ctccctggga gagaatcacg 20

<210> 107
<211> 20
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

25 <400> 107
ggtcggcaca gtaggactc 20

<210> 108
30 <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

<400> 108
cgttcggtcg gcacagttag 20

40 <210> 109
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

<400> 109
50 cctggataag gtattcccc 20

<210> 110
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

<400> 110
60 acaaacacca tgtaaaacgc 20

<210> 111
<211> 20
<212> ADN
65 <213> Secuencia artificial

ES 2 566 508 T3

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

5 <400> 111
gagcacacaa acaccatgta 20

<210> 112
<211> 20
<212> ADN
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

15 <400> 112
tgcgagagca gagcacacaa 20

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

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

25 <400> 113
taagctgcga gagcagagca 20

<210> 114
<211> 20
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

35 <400> 114
gtcggtaagc tgcgagagca 20

<210> 115
<211> 20
40 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

45 <400> 115
ttccagtcgg taagctgcga 20

<210> 116
<211> 20
50 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

55 <400> 116
acatgtacct taatgtctc 20

<210> 117
<211> 20
60 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

65

ES 2 566 508 T3

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

5 <400> 117
gcagaacatg taccttaatg 20

<210> 118
<211> 20
<212> ADN
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

15 <400> 118
taggagcaga acatgtacct 20

<210> 119
<211> 20
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

25 <400> 119
gttaatagga gcagaacatg 20

<210> 120
<211> 20
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

35 <400> 120
tgaaaaatag ttaataggag 20

<210> 121
<211> 20
40 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

45 <400> 121
ccactgtttt tccttgaaa 20

50 <210> 122
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

60 <400> 122
aagttgggtc ctatccactg 20

<210> 123
<211> 20
<212> ADN
65 <213> Secuencia artificial

ES 2 566 508 T3

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

5 <400> 123
gccctaagtt gggcctatc 20

10 <210> 124
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

20 <400> 124
caagagccct aagttgggtc 20

25 <210> 125
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

35 <400> 125
cgtggcaaga gccctaagtt 20

40 <210> 126
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

50 <400> 126
cgggcttata ctaacaagcg 20

55 <210> 127
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

65 <400> 127
gataacgggc ttatactaac 20

70 <210> 128
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

75 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

80 <400> 128
ttggagataa cgggcttata 20

85 <210> 129
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 566 508 T3

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

5 <400> 129
tagtttgggataacgggc 20

<210> 130
<211> 20
<212> ADN
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

15 <400> 130
ttagatagtttggagataa 20

<210> 131
<211> 20
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

25 <400> 131
caatggtagatagtttgg 20

<210> 132
<211> 20
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

35 <400> 132
cagctcaatggttagatag 20

<210> 133
<211> 20
40 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

45 <400> 133
caaacagctcaatggtag 20

50 <210> 134
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

60 <400> 134
tccagcaaaa cagctcaatg 20

<210> 135
<211> 20
<212> ADN
65 <213> Secuencia artificial

ES 2 566 508 T3

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

5 <400> 135
ctcattccag caaaacagct 20

<210> 136
<211> 20
<212> ADN
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

15 <400> 136
aagctctcat tccagcaaaa 20

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

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

25 <400> 137
tacacaagct ctcattccag 20

<210> 138
<211> 20
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

35 <400> 138
ggttgctatt acacaagctc 20

<210> 139
<211> 20
40 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

45 <400> 139
ctggtggtg ctattacaca 20

50 <210> 140
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

60 <400> 140
gaaaactggt ggttgctatt 20

<210> 141
<211> 20
<212> ADN
65 <213> Secuencia artificial

ES 2 566 508 T3

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

5 <400> 141
tagtggaaaa ctggtgggtg 20

<210> 142
<211> 20
<212> ADN
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

15 <400> 142
ttaactaacc ctgtggaaga 20

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

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

25 <400> 143
tgtcttgaat taactaacc 20

<210> 144
30 <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

<400> 144
tggaatgtct tgaattaact 20

40 <210> 145
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

<400> 145
50 gccagagcct ctcttggat 20

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

55 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

<400> 146
60 aaaaatagcc agagcctctc 20

<210> 147
<211> 20
<212> ADN
65 <213> Secuencia artificial

ES 2 566 508 T3

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

5 <400> 147
tgtccaaaa tagccagagc 20

<210> 148
<211> 20
<212> ADN
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

15 <400> 148
tgctatgtcc aaaaatagcc 20

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

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

25 <400> 149
tcatttgcta tgtccaaaa 20

<210> 150
30 <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

<400> 150
gagtctcatt tgctatgtcc 20

40 <210> 151
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

<400> 151
50 agtttgagtc tcatttgcta 20

<210> 152
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

<400> 152
60 gaggaagttt gagtctcatt 20

<210> 153
<211> 20
<212> ADN
65 <213> Secuencia artificial

ES 2 566 508 T3

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

5 <400> 153
cttctgtgtg ctgactctg 20

<210> 154
<211> 20
<212> ADN
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

15 <400> 154
cctctgtgtt ttagcttct 20

<210> 155
<211> 20
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

25 <400> 155
tttctcaac cctctgtgtt 20

<210> 156
30 <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

<400> 156
ggagtggctt tctcaaccc 20

40 <210> 157
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

<400> 157
50 aggaagaca gggaaaagag 20

<210> 158
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

<400> 158
60 ttctaaggaa gacaaggaa 20

<210> 159
<211> 20
<212> ADN
65 <213> Secuencia artificial

ES 2 566 508 T3

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

5 <400> 159
tgcccttcta aggaagacaa 20

<210> 160
<211> 20
<212> ADN
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

15 <400> 160
ggatgcgagt tgggatctgg 20

<210> 161
<211> 20
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

25 <400> 161
ccagctgctt ggcgacagcg 20

<210> 162
30 <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

<400> 162
gccagaaagc tcaaactga 20

40 <210> 163
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

<400> 163
50 ccacaagctg tccagtctaa 20

<210> 164
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

<400> 164
60 ggtcacactc tcaacaaata 20

<210> 165
<211> 20
<212> ADN
65 <213> Secuencia artificial

ES 2 566 508 T3

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

5 <400> 165
aaacatgtaa ctttggca 20

<210> 166
<211> 20
<212> ADN
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

15 <400> 166
tgacatggca caatgtttg 20

<210> 167
<211> 20
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) humano

25 <400> 167
ccttcctga aggtcctcc 20

REIVINDICACIONES

1. Compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que consiste en 12-30 nucleósidos unidos, del que al menos una parte de secuencia de 12 nucleobases es complementaria a los nucleótidos presentes dentro de la región seleccionada de los nucleótidos 1399-1423, 1388-1423 y 1394-1423 de SEQ ID NO: 9, en el que el oligonucleótido modificado comprende:
 - (a) un segmento de separación que consiste en desoxinucleósidos unidos;
 - (b) un segmento de ala en 5' que consiste en nucleósidos modificados unidos; y
 - (c) un segmento de ala en 3' que consiste en nucleósidos modificados unidos;
 en el que el segmento de separación está situado entre el segmento de ala en 5' y el segmento de ala en 3' y en el que cada nucleósido modificado dentro de cada segmento de ala comprende un azúcar modificado.
2. Compuesto según la reivindicación 1, en el que la parte de secuencia de al menos 12 nucleobases es complementaria a los nucleótidos presentes dentro de la región 1399-1423.
3. Compuesto según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el compuesto comprende un oligonucleótido modificado que consiste en 12-30 nucleósidos unidos, del que al menos una parte de secuencia de 12 nucleobases está presente dentro de las secuencias de nucleobases expuestas en SEQ ID NO: 39, 40 y 166.
4. Compuesto según la reivindicación 3, en el que la parte de secuencia de al menos 12 nucleobases está presente dentro de la secuencia de nucleobases expuesta en SEQ ID NO: 39.
5. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el oligonucleótido modificado consiste en 20 nucleósidos unidos.
6. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 ó 5, en el que el oligonucleótido modificado tiene una secuencia que es idéntica al 100% a lo largo de su longitud a una parte de una de las secuencias expuestas en SEQ ID NO: 39, 40 y 166.
7. Compuesto según la reivindicación 6, en el que el oligonucleótido modificado tiene una secuencia que es idéntica al 100% a lo largo de su longitud a una parte de la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 39.
8. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el oligonucleótido modificado comprende al menos una unión internucleosídica modificada.
9. Compuesto según la reivindicación 8, en el que al menos una unión internucleosídica modificada es una unión internucleosídica fosforotioato.
10. Compuesto según la reivindicación 8, en el que cada unión internucleosídica modificada es una unión fosforotioato.
11. Compuesto según la reivindicación 8 ó 10, en el que cada unión internucleosídica que no está modificada es una unión fosfodiéster.
12. Compuesto según la reivindicación 8, en el que cada unión internucleosídica está modificada y es una unión fosforotioato.
13. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que al menos un nucleósido comprende un azúcar modificado.
14. Compuesto según la reivindicación 13, en el que el azúcar modificado es un azúcar bicíclico.
15. Compuesto según la reivindicación 13, en el que al menos uno del azúcar modificado comprende un 2'-O-metoxietilo.
16. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, que comprende al menos un nucleósido modificado con tetrahidropirano en el que un anillo de tetrahidropirano sustituye al anillo de furanosa.
17. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en el que al menos un nucleósido comprende una nucleobase modificada tal como una 5'-metilcitosina.

18. Compuesto según la reivindicación 17, en el que cada citosina dentro de la secuencia de nucleobases es una 5'-metilcitosina.
- 5 19. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, en el que el oligonucleótido modificado comprende:
- (a) un segmento de separación que consiste en trece desoxinucleósidos unidos;
- 10 (b) un segmento de ala en 5' que consiste en dos nucleósidos modificados unidos; y
- (c) un segmento de ala en 3' que consiste en cinco nucleósidos modificados unidos;
- en el que el segmento de separación está situado entre el segmento de ala en 5' y el segmento de ala en 3',
- 15 en el que cada nucleósido modificado dentro de cada segmento de ala comprende un 2'-O-metoxietil-azúcar; y en el que cada unión internucleosídica es una unión fosforotioato.
- 20 20. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, en el que el oligonucleótido modificado consiste en 20 nucleósidos unidos, y en el que la secuencia de nucleobases es la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 39, 40 ó 166.
21. Compuesto según la reivindicación 20, en el que la secuencia de nucleobases es la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 39.
- 25 22. Compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que consiste en 20 nucleósidos unidos que tiene una secuencia de nucleobases citada en SEQ ID NO: 39, en el que el oligonucleótido modificado comprende:
- 30 (a) un segmento de separación que consiste en trece desoxinucleósidos unidos;
- (b) un segmento de ala en 5' que consiste en dos nucleósidos modificados unidos; y
- 35 (c) un segmento de ala en 3' que consiste en cinco nucleósidos modificados unidos;
- en el que el segmento de separación está situado entre el segmento de ala en 5' y el segmento de ala en 3',
- 40 en el que cada nucleósido modificado dentro de cada segmento de ala comprende un 2'-O-metoxietil-azúcar,
- en el que cada unión internucleosídica es una unión fosforotioato, y
- 45 en el que cada nucleobase de citosina es una 5'-metilcitosina.
23. Compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que comprende al menos 12 nucleósidos unidos, cuya secuencia de nucleobases está presente dentro de las secuencias de nucleobases expuestas en una cualquiera de SEQ ID NO: 39, 40 y 166, en el que el oligonucleótido modificado comprende:
- 50 (a) un segmento de separación que consiste en desoxinucleósidos unidos;
- (b) un segmento de ala en 5' que consiste en nucleósidos modificados unidos; y
- 55 (c) un segmento de ala en 3' que consiste en nucleósidos modificados unidos;
- en el que el segmento de separación está situado entre el segmento de ala en 5' y el segmento de ala en 3' y en el que cada nucleósido modificado dentro de cada segmento de ala comprende un azúcar modificado.
- 60 24. Compuesto según la reivindicación 23, en el que la secuencia de nucleobases se expone en SEQ ID NO: 39.
25. Oligonucleótido antisentido que consiste en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 39, estando caracterizado además dicho oligonucleótido antisentido porque tiene, en el sentido de 5' a 3',
- 65 un segmento de ala en 5' que consiste en dos nucleótidos, un segmento de separación que consiste en 13 nucleótidos y un segmento de ala en 3' que consiste en cinco nucleótidos,

en el que cada nucleótido de dichos segmentos de ala en 5' y en 3' comprende un 2'-O-metoxietil-azúcar,

en el que cada nucleótido de dicho segmento de separación comprende un azúcar de desoxirribosa,

en el que cada base de citosina de dicho oligonucleótido antisentido es una 5'-metilcitosina, y

en el que las uniones internucleotídicas entre cada nucleótido de dicho oligonucleótido antisentido son uniones fosforotioato.

26. Composición que comprende un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-24 o un oligonucleótido antisentido según la reivindicación 25, o una sal farmacéuticamente aceptable de tal compuesto o de tal oligonucleótido y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

27. Composición que comprende el compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-24 o un oligonucleótido antisentido según la reivindicación 25 formulado para la administración tópica.

28. Composición que comprende el compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-24 o un oligonucleótido antisentido según la reivindicación 25 formulado para la administración subcutánea.

29. Composición que comprende el compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-24 o un oligonucleótido antisentido según la reivindicación 25 formulado para la administración local.

30. Composición que comprende el compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-24 o un oligonucleótido antisentido según la reivindicación 25 formulado para la administración intradérmica.

31. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1-24, composición según una cualquiera de las reivindicaciones 26-30 u oligonucleótido antisentido según la reivindicación 25, para su uso como medicamento.

32. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-24, composición según cualquiera de las reivindicaciones 26-30 u oligonucleótido antisentido según la reivindicación 25, para su uso en el tratamiento de un animal que tiene una enfermedad o un estado asociado con la expresión del factor de crecimiento de tejido conjuntivo, preferiblemente en el que la enfermedad o el estado es un trastorno hiperproliferativo; un cáncer; una enfermedad fibrótica tal como cicatrización hipertrófica, queloides, cicatrización de la piel, fibrosis hepática, fibrosis pulmonar, fibrosis renal, fibrosis cardíaca o reestenosis; o fibrosis articular (incluyendo síndrome de hombro rígido, daño de tendones y nervios periféricos), daño de la médula espinal, derivación coronaria, adherencias abdominales y peritoneales (incluyendo endometriosis, fibroides y leiomiomas uterinos), queratotomía radial y queratectomía fotorrefractiva, cirugía de re inserción de la retina, fibrosis mediada por dispositivos (por ejemplo en la diabetes), adhesiones tendinosas, contractura de Dupuytren o esclerodermia.

33. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-24, composición según cualquiera de las reivindicaciones 26-30 u oligonucleótido antisentido según la reivindicación 25, para su uso en la reducción de la cicatrización que resulta de la curación de heridas en un sujeto que lo necesita, en el que la curación de heridas es curación en una herida seleccionada del grupo que consiste en rotura de la piel, incisiones quirúrgicas y quemaduras.

Figura 1

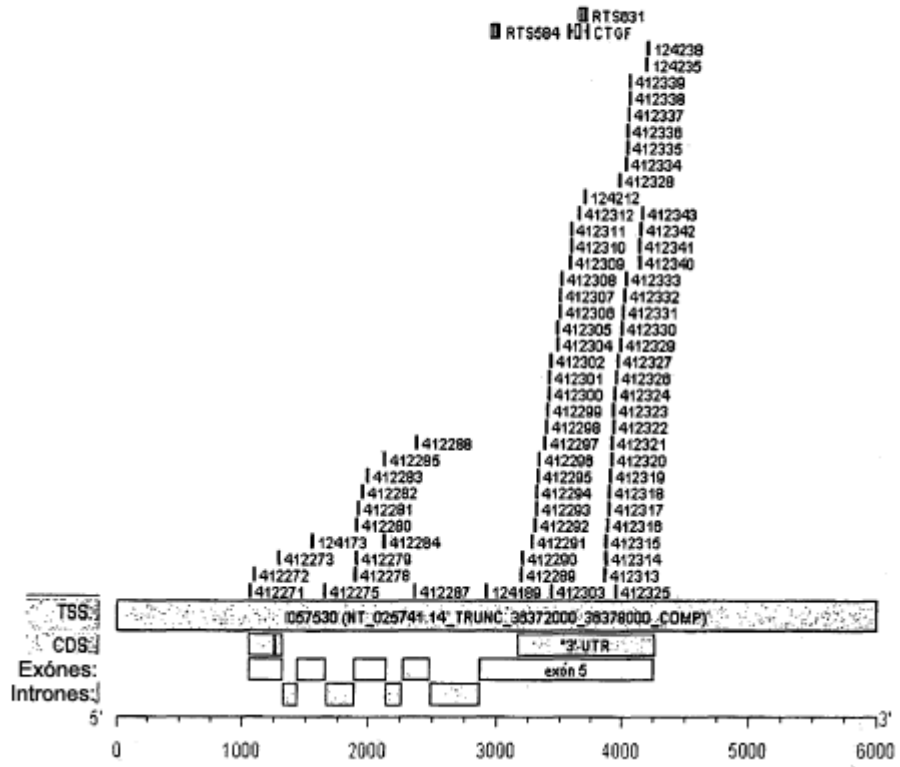


Figura 2

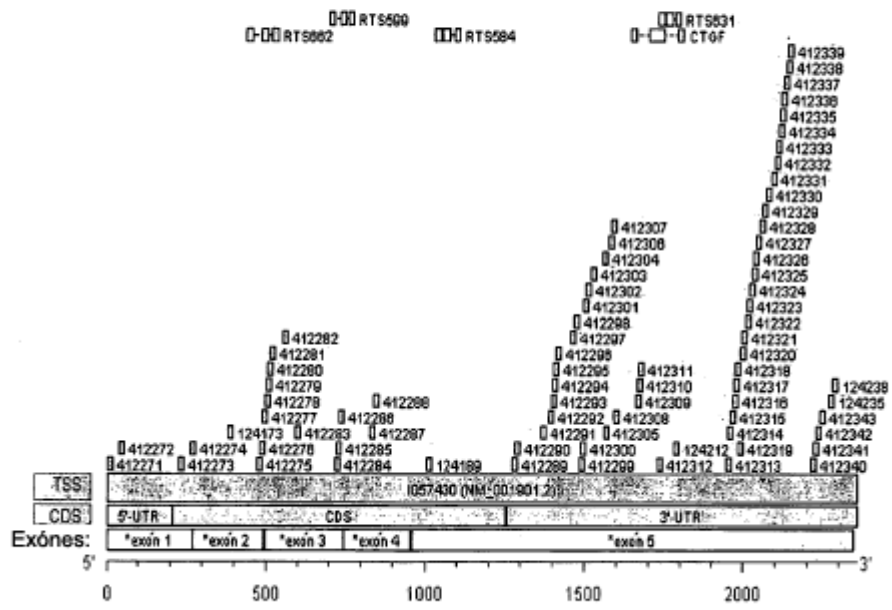


Figura 3

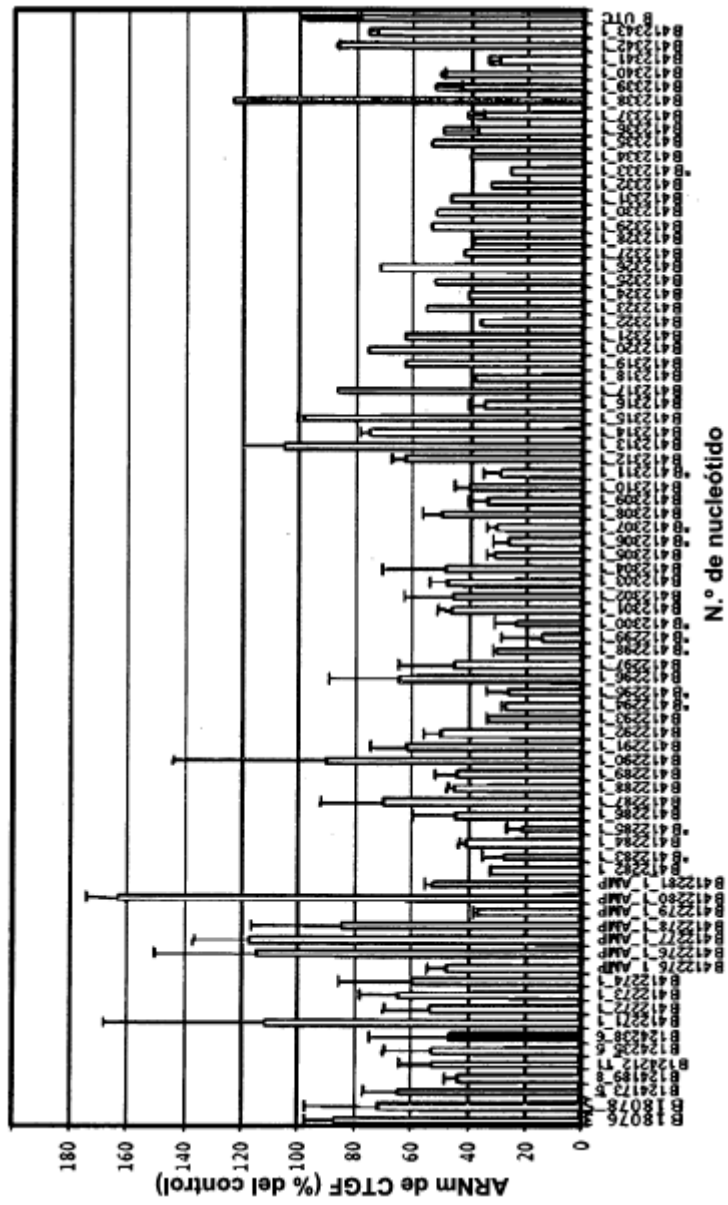


Figura 4

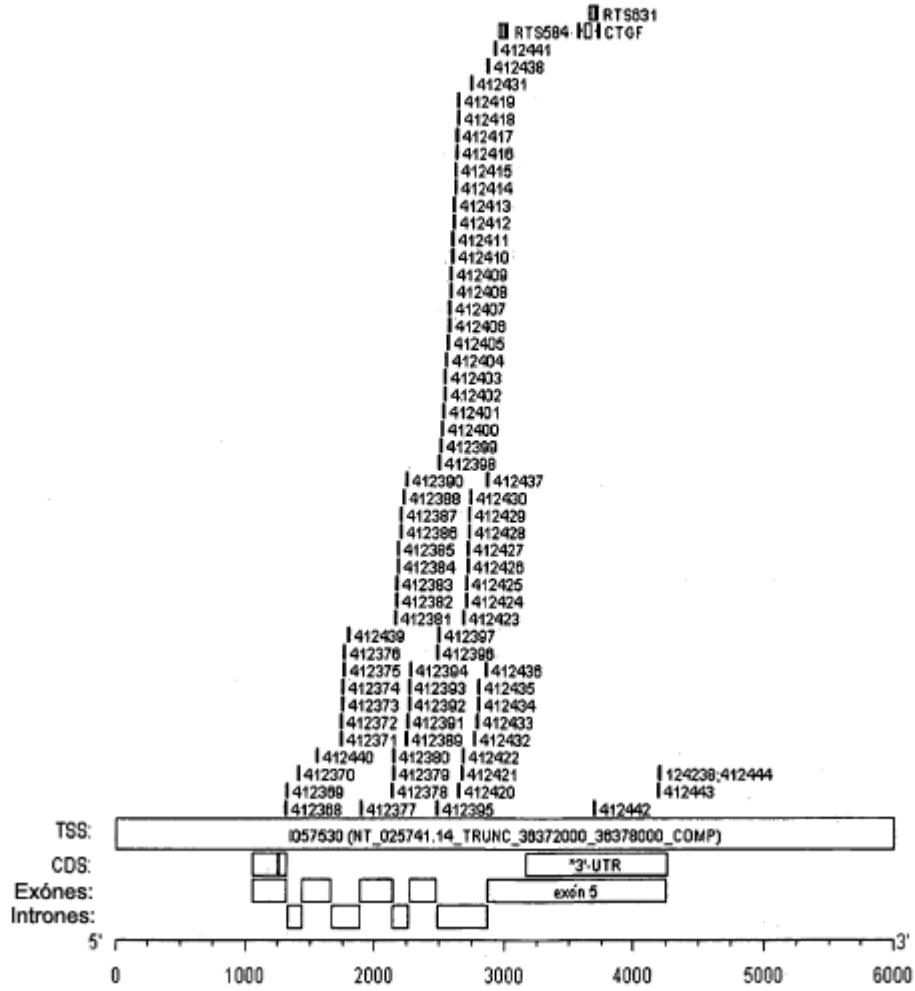


Figura 5

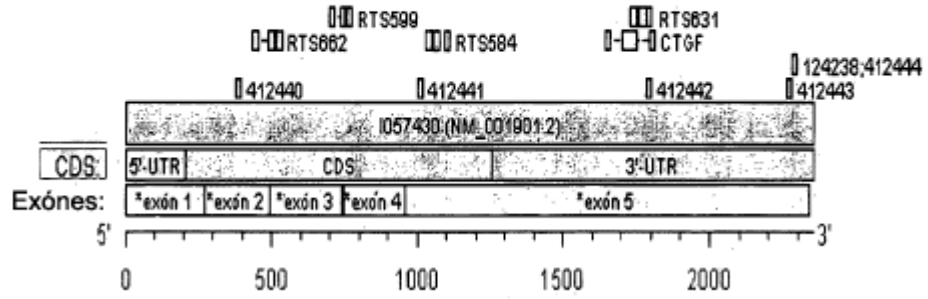


Figura 7A

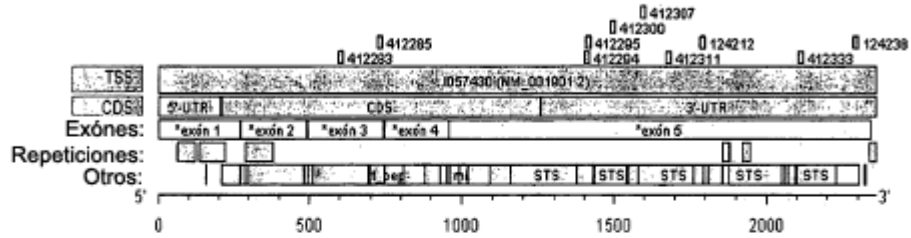


Figura 7B

N.º de oligonucleótido	Secuencia
412404	CGTGGCAAGAGCCCTAAGTT (INTRÓN)
412283	GGGCATGCAGCCACCGCCC (EXÓN 3)
412285	AGGCAGGCCCAACCGGT (EXÓN 3)
412294	GTTTGACATGGACAATGTT (EXÓN 5)
412295	TATTGTTTGACATGGACA (EXÓN 5)
412300	TAATATACATTCTGGTGCTG (EXÓN 5)
412307	TACACTCAAATAGCAGGCA (EXÓN 5)
412311	TCTTGATGGCTGGAGAATGC (EXÓN 5)
412333	CAGCCTGCCAAGGACTGA (EXÓN 5)
124238	AAACATGTAACTTTTGGTCA (Lider antigua)
124212	CCACAAGCTGTCCAGTCTAA (Lider antigua)

Figura 8

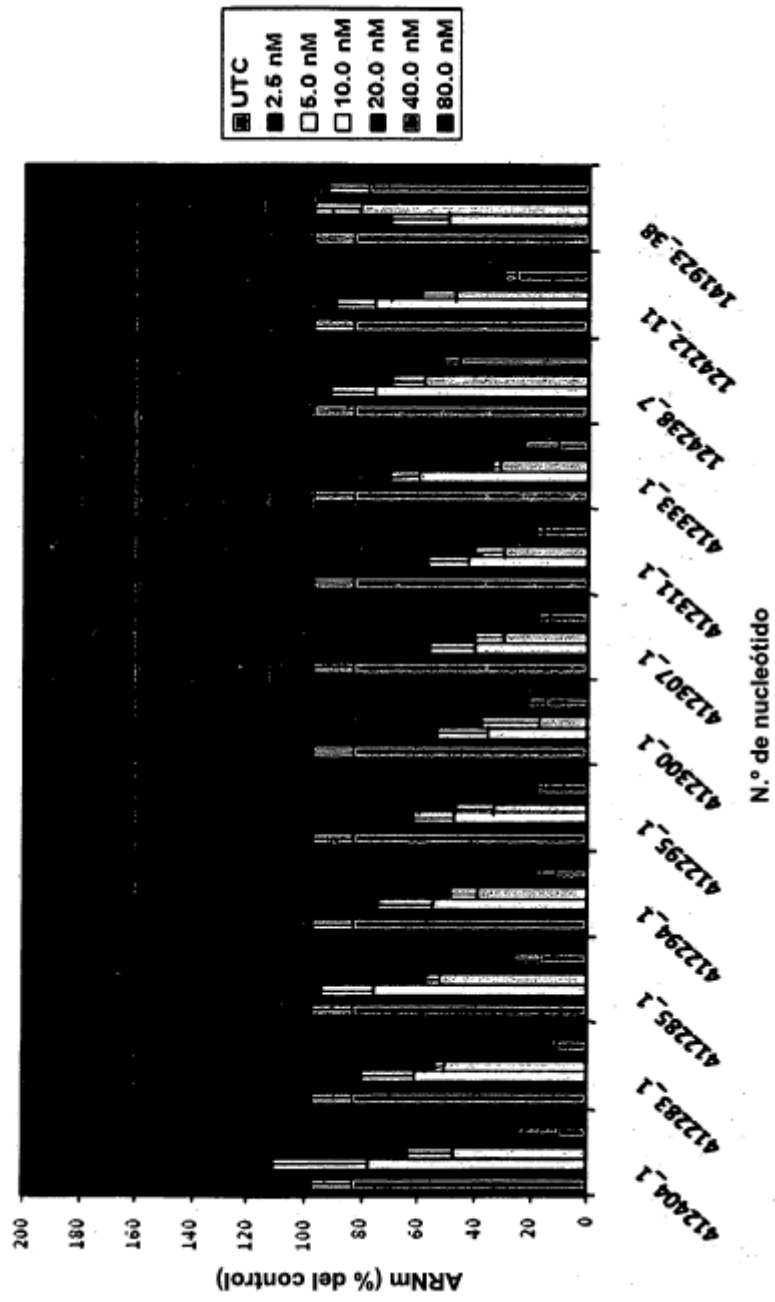


Figura 9A

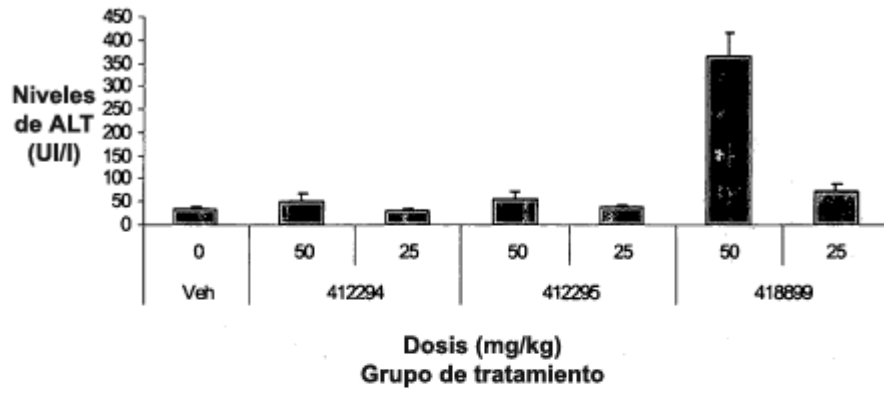


Figura 9B

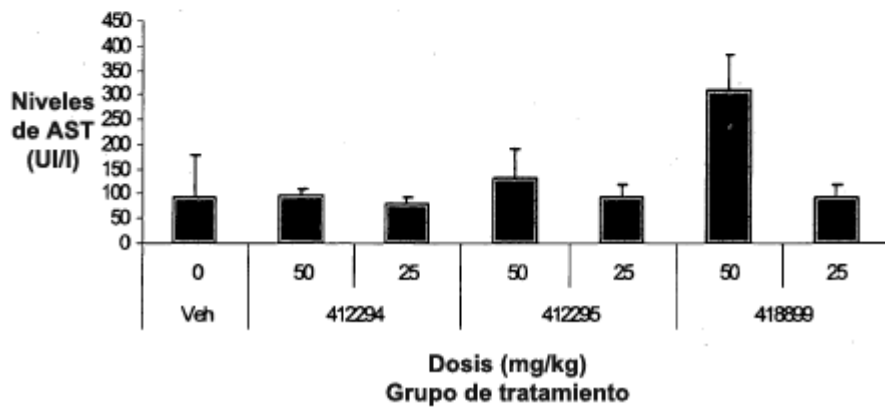


Figura 10

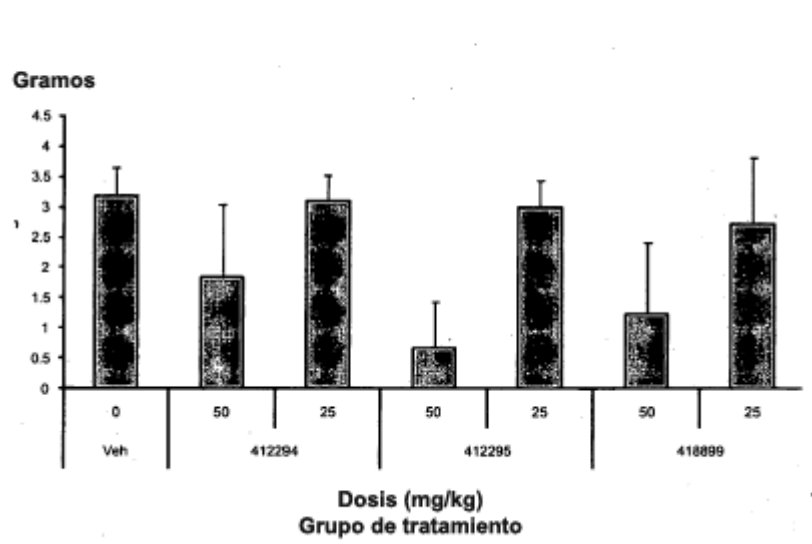


Figura 11

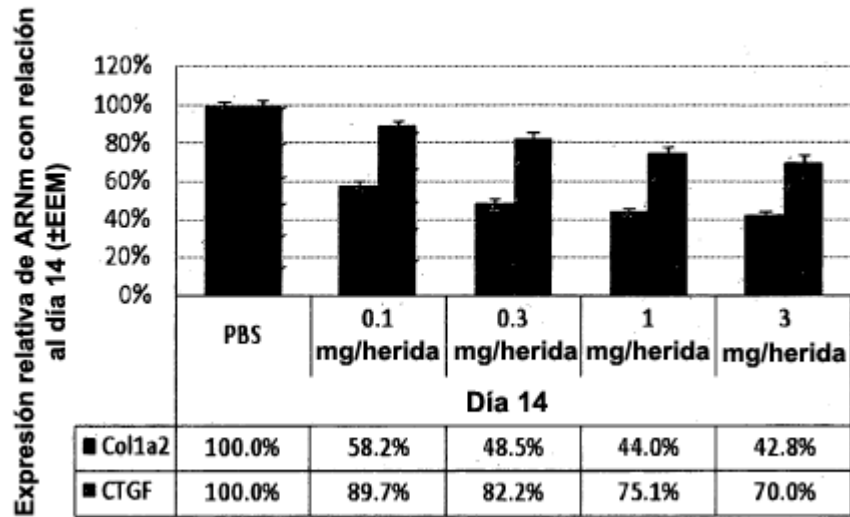


Figura 12

