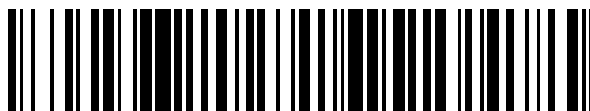


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 641 290**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.11.2008 PCT/US2008/012998**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.05.2009 WO09067243**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.11.2008 E 08852011 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.06.2017 EP 2222851**

54 Título: **Modulación de la expresión de CD40**

30 Prioridad:

20.11.2007 US 989421 P

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

08.11.2017

73 Titular/es:

**IONIS PHARMACEUTICALS, INC (100.0%)
2855 Gazelle Court
Carlsbad, CA 92010, US**

72 Inventor/es:

**BENNETT, C., FRANK;
COWSERT, LEX, M. y
FREIER, SUSAN, M.**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 641 290 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).

Modulación de la expresión de CD40**Descripción****5 Campo de la invención**

[0001] La presente invención se refiere a métodos y composiciones para bajar niveles de CD40 en un animal. Tales métodos y composiciones son útiles como compuestos antiinflamatorios y compuestos antitumorales.

10 Antecedentes de la invención

[0002] El sistema inmune tiene un papel vital en la protección del cuerpo frente a agentes infecciosos. Está bien establecido, sin embargo, que una serie de estados de enfermedad y/o trastornos son el resultado de una activación anormal o indeseable de respuestas inmunes. Los ejemplos comunes incluyen la enfermedad de injerto contra huésped (GVHD) y rechazo de injerto, y enfermedades autoinmunes ligadas tales como esclerosis múltiple (MS), lupus eritematoso sistémico (LES) y ciertas formas de artritis.

[0003] En general, una respuesta inmunitaria se activa como resultado de cualquiera de lesión tisular o infección. Ambos casos implican el reclutamiento y la activación de un número de células efectoras del sistema inmune (por ejemplo, linfocitos B y T, macrófagos, eosinófilos, neutrófilos) en un proceso coordinado a través de una serie de complejas interacciones célula-célula. Un escenario típico por el que una respuesta inmune se monta contra una proteína extraña es como sigue: proteínas extrañas capturadas por células presentadoras de antígeno (APC) tales como macrófagos o células dendríticas se procesan y se muestran en la superficie celular de la APC. Las células T auxiliares circulantes que expresan una inmunoglobulina que reconoce (es decir, se une a) el antígeno mostrado sufren activación por la APC. Estas células T auxiliares activan a su vez clones de células B apropiados para proliferar y diferenciarse en células plasmáticas que producen y segregan anticuerpos humorales dirigidos contra el antígeno extraño. Los anticuerpos humorales secretados están libres para circular y unirse a cualquier célula que exprese la proteína extraña en su superficie celular, marcando en efecto la célula para su destrucción por otras células efectoras inmunes. En cada una de las etapas descritas anteriormente, se requiere el contacto directo célula-célula entre los tipos de células implicados para que se produzca la activación. (Gruss *et al*, *Leuk Lymphoma* 1989, 24: 393). En los últimos años, se ha identificado una serie de receptores de superficie celular que median estos eventos de activación dependiente de contacto célula-célula. Entre estos receptores de la superficie celular está el CD40 y su ligando fisiológico, el ligando CD40 (CD40L) que también se conoce como CD154.

[0004] CD40 se caracterizó por primera vez como un receptor expresado en los linfocitos B. Más tarde se encontró que el compromiso de CD40 de células B con CD40L expresado en células T activadas es esencial para la activación de células B dependientes de células T (es decir, proliferación, secreción de inmunoglobulina y cambio de clase). Posteriormente se reveló que CD40 funcional se expresa en una variedad de tipos de células distintas de las células B, incluyendo macrófagos, células dendríticas, células epiteliales tímicas, células de Langerhans y células endoteliales. Estos estudios han llevado a la creencia actual de que CD40 desempeña un papel amplio en la regulación inmune mediando las interacciones de las células T con las células B, así como otros tipos de células. En apoyo de esta noción, se ha demostrado que la estimulación de CD40 en los macrófagos y los resultados dendríticos se requiere para la activación de las células T durante la presentación del antígeno. (Gruss *et al*, *Leuk. Lymphoma*, 1997, 24: 393). La evidencia reciente apunta a un papel para CD40 en la inflamación de tejido también. Se ha demostrado que la producción de los mediadores inflamatorios IL-12 y óxido nítrico por los macrófagos depende del CD40. (Buhlmann y Noelle, *J. Clin. Immunol.*, 1996, 16:83). En las células endoteliales se ha encontrado que la estimulación de CD40 por CD40L induce la expresión superficial de E-selectina, ICAM-1 y VCAM-1, promoviendo la adhesión de leucocitos a sitios de inflamación (Buhlmann y Noelle, *J. Clin. Immunol.*, 1996, 16:83); Gruss *et al*, *Leuk. Lymphoma*, 1997, 24: 393). Por último, varios informes han documentado la sobreexpresión de CD40 en tumores epiteliales y hematopoyéticos, así como en células endoteliales infiltrantes de tumores, lo que indica que CD40 puede desempeñar también un papel en el crecimiento tumoral y/o angiogénesis (Gruss *et al*, *Leuk. Lymphoma*, 1997, 24: 393, Kluth *et al*, *Cancer Res.*, 1997, 57: 891).

[0005] Debido al papel fundamental que CD40 juega en la inmunidad humoral, existe el potencial de que las estrategias terapéuticas dirigidas a la regulación negativa de CD40 o interferencia con la señalización de CD40 pueden proporcionar una nueva clase de agentes útiles en el tratamiento de una serie de trastornos del sistema inmune asociado, incluyendo pero no limitados a la enfermedad de injerto contra huésped (GVHD), rechazo de injerto y enfermedades autoinmunes tales como esclerosis múltiple (EM), lupus eritematoso sistémico (LES) y ciertas formas de artritis. Los inhibidores de CD40 también pueden ser útiles como compuestos antiinflamatorios y por lo tanto podrían ser útiles como tratamiento para una variedad de afecciones inflamatorias y alérgicas tales como asma, artritis reumatoide, rechazos de aloinjertos, enfermedad inflamatoria del intestino, encefalomiелitis autoinmune, tiroiditis, diversas condiciones dermatológicas, y psoriasis. Recientemente, se ha demostrado que tanto CD40 como CD 154 se expresan en células endoteliales vasculares, células de músculo liso vascular y macrófagos presentes en placas ateroscleróticas, lo que sugiere que la inflamación y la inmunidad contribuyen al proceso aterogénico. El hecho de que este proceso involucre la señalización de CD40 es sugerido por varios estudios en modelos de ratón en los que la interrupción del CD 154 (por nocaout o por anticuerpo monoclonal) redujo la

progresión o el tamaño de las lesiones ateroscleróticas. (Mach et al., Nature, 1998, 394: 200 - 3, Lutgens et al., 1999, Nat Med. 5: 1313 - 6).

5 **[0006]** Por último, al aprenderse más de la asociación entre sobreexpresión CD40 y el crecimiento tumoral, los inhibidores de CD40 pueden resultar útiles como agentes anti-tumorales e inhibidores de otras condiciones hiperproliferativas también.

10 **[0007]** En la actualidad, no existen agentes terapéuticos conocidos que inhiben eficazmente la síntesis de CD40. Hasta la fecha, las estrategias dirigidas a inhibir la función de CD40 han implicado el uso de una variedad de agentes que alteran la unión de CD40/CD40L. Estos incluyen anticuerpos monoclonales dirigidos contra CD40 o CD40L, formas solubles de CD40 y péptidos sintéticos derivados de una segunda proteína de unión a CD40, A20. El uso de anticuerpos neutralizantes contra CD40 y/o CD40L en modelos animales ha proporcionado evidencia de que la inhibición de la señalización de CD40 tendría un beneficio terapéutico para GVHD, rechazo de aloinjertos, artritis reumatoide, SLE, MS y linfoma de células B. (Buhmann y Noelle, J. Clin. Immunol, 1996, 16:83). Las investigaciones clínicas se iniciaron utilizando anticuerpos monoclonales anti-CD154 en pacientes con nefritis lúpica. Sin embargo, los estudios se terminaron debido al desarrollo de eventos trombóticos. (Boumpas et al., 2003, Arthritis Rheum., 2003, 48: 719 - 27).

20 **[0008]** Debido a los problemas asociados con el uso de proteínas grandes como agentes terapéuticos, existe una necesidad largamente sentida de agentes adicionales capaces de inhibir eficazmente la función de CD40. Los oligonucleótidos antisentido evitan muchas de las trampas de los agentes actuales usados para bloquear las interacciones de CD40/CD40L y pueden por lo tanto demostrar ser de utilidad única en una serie de aplicaciones terapéuticas, diagnósticas y de investigación. La patente de EE.UU. 6.197.584 (Bennett y Cowser) describe compuestos antisentido dirigidos a CD40. US 2004-0186071 A1, WO 99/57320 y Siwkowski et al. Nucleic Acids Res., 2004, 32 (9): 2695-2706, también describen compuestos antisentido dirigidos a ácidos nucleicos que codifican CD40.

Resumen de la invención

30 **[0009]** La invención proporciona un compuesto antisentido para su uso en el tratamiento o la prevención de una condición asociada inflamatoria o inmune en el que el compuesto antisentido comprende un oligonucleótido modificado de 12 a 30 nucleobases de longitud y tiene una secuencia de nucleobase que comprende al menos 8 nucleobases contiguas complementarias a una región igual de intrón del gen CD40, en las posiciones 11250-12685 de SEQ ID NO: 4, correspondiendo al intrón 6, en el que el oligonucleótido comprende:

- un segmento de separación que consiste en desoxinucleósidos enlazados;
- un segmento de ala 5' que consiste en nucleósidos unidos;
- un segmento de ala 3' que consiste en nucleósidos unidos;

40 en el que el segmento de separación está situado entre el segmento de ala 5' y el segmento de ala 3' y en el que cada nucleósido de cada segmento de ala comprende un azúcar modificado, en el que la secuencia de nucleobase del compuesto es al menos 98% complementaria a la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 4, y en el que el compuesto antisentido es capaz de reducir el ARNm de CD40.

45 **[0010]** La invención también proporciona una sal farmacéuticamente aceptable de un compuesto antisentido, para uso en el tratamiento o prevención de una condición asociada inflamatoria o inmune, en el que el compuesto antisentido es un compuesto antisentido como se ha expuesto en las reivindicaciones.

50 **[0011]** La invención también proporciona una composición para uso en el tratamiento o prevención de una condición asociada inflamatoria o inmune, donde la composición comprende un compuesto antisentido como el expuesto en las reivindicaciones o una sal del mismo y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

[0012] Otros aspectos de la invención se exponen en las reivindicaciones adjuntas.

55 Resumen de la Divulgación

[0013] Se da a conocer en el presente documento compuestos antisentido, composiciones y métodos para el tratamiento y prevención de afecciones inflamatorias y el cáncer.

60 **[0014]** Compuestos antisentido descritos en este documento pueden ser de 12 a 30 nucleobases de longitud dirigidas a un ácido nucleico CD40. El ácido nucleico CD40 puede ser cualquiera de las secuencias como se expone en el N° de Acceso GENBANK® X60592.1, incorporado en la presente memoria como SEQ ID NO: 1; N° de acceso GENBANK® H50598.1, incorporado en la presente memoria como SEQ ID NO: 2; N° de acceso GENBANK® AA203290.1, incorporado en la presente memoria como SEQ ID NO: 3; y los nucleótidos 9797000 al nucleótido 9813000 del N° de Acceso GENBANK NT_011362.9, incorporado en la presente memoria como SEQ ID NO: 4, o al N° de Acceso GENBANK® BC064518.1, incorporado en la presente memoria como SEQ ID NO: 237.

[0015] El compuesto antisentido puede ser de 12 a 30 nucleobases de longitud y puede tener una secuencia de nucleobases que comprende al menos 8 nucleobases contiguas complementaria a una porción de longitud igual de una región del intrón del gen CD40, seleccionado de las siguientes regiones de SEQ ID NO: 4:

- 5 (a) posiciones 11250-12685, correspondientes a intrón 6;
- (b) posiciones 2943-6367, correspondientes a intrón 1,
- (c) posiciones 6447-6780, correspondientes a intrón 2,
- (d) posiciones 6907-7157, correspondientes a intrón 3,
- (e) posiciones 7305-7673, correspondientes a intrón 4,
- 10 (f) posiciones 7768-11187, correspondientes a intrón 5,
- (g) posiciones 12773-12877, correspondientes a intrón 7, o
- (h) posiciones 12907 - 133429, correspondientes a intrón 8,

15 en el que la parte o partes restantes del compuesto antisentido son al menos 70% complementarias de la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 4. Preferiblemente, las partes restantes del compuesto antisentido son al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, o, lo más preferiblemente, 100% complementarias a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 4.

20 **[0016]** Preferiblemente, el compuesto antisentido puede comprender al menos 8 nucleobases contiguas complementarias a una porción de igual longitud de las posiciones 12527-12685 de la SEQ ID NO: 4, que es una región que puede ser parte del intrón 6, o puede ser parte de una versión alternativa del exón 7 cuando se selecciona un sitio aceptor de empalme diferente. Preferiblemente, el compuesto antisentido tiene una secuencia de nucleobases que comprende al menos 8 nucleobases contiguas de la secuencia de nucleobase de SEQ ID NO: 208, en donde la secuencia de nucleobases del compuesto es al menos 70% complementaria a la secuencia mostrada en

25 SEQ ID NO: 4. Preferiblemente, el compuesto antisentido es al menos un 75%, un 80%, un 85%, un 90%, un 95%, un 98%, un 99% o, lo más preferiblemente, un 100% complementario de la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 4. Más preferiblemente, el compuesto antisentido tiene la secuencia de SEQ ID NO: 208. Incluso más preferiblemente, el compuesto antisentido tiene 20 nucleobases de longitud y consiste en la secuencia de nucleobase de SEQ ID NO: 208. Lo más preferiblemente, el compuesto antisentido es un oligonucleótido antisentido 20 nucleótidos de longitud que tienen la secuencia de nucleótidos como se expone en la SEQ ID NO: 208, en donde cada citosina es una 5-

30 metilcitosina, cada enlace internucleósido es un enlace fosforotioato, los nucleótidos 1-5 y 16-20 son 2'-O-metoxietilo nucleótidos y nucleótidos 6-15 son 2'-desoxinucleótidos; más preferiblemente el compuesto antisentido es ISIS 396236.

35 **[0017]** Un compuesto antisentido según la invención puede ser de 12 a 30 nucleobases de longitud y tienen una secuencia de nucleobases que comprende al menos 8 nucleobases contiguas complementaria a una porción de longitud igual de una región del gen CD40, correspondiente a las posiciones 13662-16001 de la SEQ ID NO: 4 que forma parte del exón 9 o una región 3' con respecto al exón 9, donde las partes restantes del compuesto antisentido son al menos 70% complementarias de la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 4. Preferiblemente, la región diana

40 del gen CD40 que corresponde a las posiciones 13877 - 14084, aún más preferiblemente a las posiciones 13937 - 13996, de SEQ ID NO: 4. Preferiblemente, las partes restantes del compuesto antisentido son al menos 75%, 80%, 85%, 90% 95%, 98%, 99%, o, lo más preferiblemente, 100% complementarios a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 4.

45 **[0018]** Otro compuesto antisentido descrito en la presente es de 12 a 30 nucleobases de longitud y tiene una secuencia de nucleobases complementaria a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 1, empezando en la posición 69 o 70 de la SEQ ID NO: 1, en el que la secuencia de nucleobase es al menos un 95% complementario a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 1. Preferiblemente, la secuencia de la nucleobase es esencialmente complementaria a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 1. Más preferiblemente, la secuencia de la nucleobase se selecciona de las secuencias de SEQ ID Nos: 90 y 163. Incluso más preferiblemente, el compuesto antisentido

50 tiene una secuencia de nucleobase de SEQ ID NO: 90. Incluso más preferiblemente, el compuesto antisentido tiene 18 ó 20 nucleobases de longitud y consiste en la secuencia de nucleobase de SEQ ID NO: 90 o SEQ ID NO: 163. El compuesto antisentido puede ser ISIS26163, ISIS396201 o ISIS396278. Preferiblemente, el compuesto antisentido es un oligonucleótido antisentido de 18 nucleótidos de longitud que tiene la secuencia de nucleótidos como se expone en la SEQ ID NO: 90, donde cada citosina es una 5-metilcitosina, cada enlace internucleósido es un enlace fosforotioato, nucleótidos 1-4 y 15-18 son nucleótidos 2'-O-metoxietilo, y los nucleótidos 5 a 14 son 2'-desoxinucleótidos. Más preferiblemente, el compuesto antisentido es ISIS26163.

55 **[0019]** Un compuesto antisentido según la invención puede comprender un oligonucleótido modificado que consta de 12 a 30 nucleósidos enlazados y que tiene una secuencia de nucleobases que comprende al menos 12 bases nucleotídicas contiguas de una secuencia de nucleobase seleccionada de entre las secuencias de nucleobases indicadas en SEQ ID NOs: 5 a 236. Preferiblemente, el compuesto consiste en un oligonucleótido modificado monocatenario. Preferiblemente, la secuencia de la nucleobase del oligonucleótido modificado es 100% complementaria a una secuencia de nucleobase de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 o

60 SEQ ID NO: 237 .

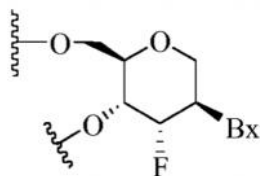
[0020] El compuesto antisentido puede comprender nucleósidos enlazados. Preferiblemente, el compuesto antisentido es un oligonucleótido antisentido.

5 **[0021]** El compuesto antisentido puede ser de una sola hebra o de doble hebra de oligonucleótidos. Preferiblemente, el compuesto anti-sentido es un oligonucleótido monocatenario.

[0022] El oligonucleótido antisentido puede ser modificado, en donde al menos un enlace internucleosídico es un enlace internucleosídico modificado. El enlace internucleosídico puede ser un enlace internucleosídico de fosforotioato.

10 **[0023]** El oligonucleótido antisentido puede ser modificado, en el que al menos un nucleósido comprende un azúcar modificado. El azúcar modificado puede ser un azúcar bicíclico. Preferiblemente, al menos un azúcar bicíclico comprende un puente 4'-CH(CH₃)-O-2'. El azúcar modificado puede comprender un 2'-O-metoxietilo. El compuesto antisentido puede comprender al menos un nucleósido modificado con tetrahidropirano, en el que un anillo de tetrahidropirano reemplaza al anillo de furanosa. Preferiblemente, cada uno de al menos un nucleósido modificado con tetrahidropirano tiene la estructura

20



25

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

30 **[0024]** El compuesto antisentido puede comprender una nucleobase modificada. La nucleobase modificada puede ser una 5-metilcitosina. Preferiblemente, cada citosina es una 5-metilcitosina.

[0025] El compuesto antisentido puede ser un gápmero, por ejemplo que comprende un oligonucleótido:

35 un segmento de separación que consiste en desoxinucleósidos enlazados;
 un segmento de ala 5' que consiste en nucleósidos unidos;
 un segmento de ala 3' que consiste en nucleósidos unidos;
 en el que el segmento de separación está situado entre el segmento de ala 5' y el segmento de ala 3' y en el que
 40 cada nucleósido de cada segmento de ala comprende un azúcar modificado. Preferiblemente, cada nucleósido de cada segmento de ala comprende un azúcar 2'-O-metoxietilo; y preferiblemente cada enlace internucleosídico es un enlace fosforotioato.

45 **[0026]** El oligonucleótido antisentido puede ser un gápmero MOE 5-10-5 o un gápmero MOE 2-15-3. El oligonucleótido antisentido puede consistir en 20 nucleósidos unidos.

[0027] El oligonucleótido antisentido puede ser un gápmero MOE 4-10-4. El oligonucleótido antisentido puede consistir en 18 nucleósidos unidos.

50 **[0028]** Las composiciones descritas en este documento pueden comprender un oligonucleótido que consiste en 12 a 30 nucleósidos enlazados, dirigidos a un ácido nucleico de CD40 o una sal del mismo y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

[0029] La composición puede comprender un oligonucleótido monocatenario o bicatenario.

55 **[0030]** También se describe aquí una composición farmacéutica que comprende un compuesto antisentido como se ha descrito anteriormente y un liposoma o un sistema de suministro basado en lípidos. Preferiblemente, dicho liposoma es un liposoma anfótero. Preferiblemente, dicho liposoma anfótero se forma a partir de una fase lipídica que comprende un lípido anfótero o una mezcla de componentes lipídicos con propiedades anfóteras. Dicho liposoma anfótero puede comprender además uno o más lípidos neutros o zwitteriónicos. Más preferiblemente, dicho liposoma anfótero se forma a partir de una fase lipídica que comprende

- 60
- (a) aproximadamente 15% en moles de POPC, aproximadamente 45% en moles de DOPE, aproximadamente 20% en moles de MoChol, aproximadamente 20% en moles de Chems
 - (b) aproximadamente 60% en moles de POPC, aproximadamente 10% en moles de DOTAP, aproximadamente 30% en moles de Chems
 - (c) aproximadamente 30% en moles de POPC, aproximadamente 10% en moles de DOTAP, aproximadamente

65

20% en moles de Chems, aproximadamente 40% en moles de Chol
(d) aproximadamente 60% en moles de POPC, aproximadamente 20% en moles de HistChol, aproximadamente 20% en moles de Chol.

5 **[0031]** También se describe aquí un compuesto antisentido o composición como se describe anteriormente para uso médico. También se describe aquí un compuesto antisentido o una composición como se ha descrito anteriormente para el tratamiento de cáncer o una afección inflamatoria o inmunológica asociada. El tratamiento puede comprender además administrar un segundo fármaco, que puede administrarse por separado o concomitantemente con el compuesto antisentido de la invención.

10 **[0032]** Los métodos descritos en el presente documento pueden comprender administrar a un animal un compuesto antisentido como se describe anteriormente, preferiblemente un compuesto antisentido que comprende un oligonucleótido que consiste en 12 a 30 nucleósidos enlaces dirigidos a un ácido nucleico CD40, o una composición que comprende dicho compuesto antisentido. Preferiblemente, el animal es un ser humano.

15 **[0033]** La administración del compuesto antisentido y/o el segundo fármaco puede ser por administración parenteral, administración tópica, administración oral o administración en aerosol. La administración parenteral puede ser cualquiera de la administración subcutánea o intravenosa.

20 Descripción detallada

[0034] Ha de entenderse que tanto la descripción general anterior como la siguiente descripción detallada son ejemplares y explicativas y no son restrictivas de la invención, según se reivindica. En este caso, el uso del singular incluye el plural a menos que se indique específicamente lo contrario. Como se usa en este documento, el uso de "o" significa "y/o" a menos que se indique lo contrario. Además, el uso del término "incluyendo", así como otras formas, tales como "incluye" y "incluido", no es limitante. Además, términos tales como "elemento" o "componente" abarcan elementos y componentes que comprenden una unidad y elementos y componentes que comprenden más de una subunidad, a menos que se indique específicamente lo contrario.

30 **[0035]** Los encabezados de sección usados en este documento son sólo para fines de organización y no deben interpretarse como limitantes del objeto descrito.

Definiciones

35 **[0036]** A menos que se proporcionen definiciones específicas, la nomenclatura utilizada en relación con, y los procedimientos y técnicas de química analítica, química orgánica sintética y química médica y farmacéutica descritas en el presente documento son aquellas bien conocidas y comúnmente utilizadas en la técnica. Las técnicas estándar se pueden utilizar para la síntesis química, y el análisis químico.

40 **[0037]** A menos que se indique lo contrario, los siguientes términos tienen los siguientes significados:

"2'-O-metoxietilo" (también 2'-MOE y 2'-O(CH₂)₂-OCH₃) se refiere a una modificación O-metoxietilo de la posición 2' de un anillo de furosilo. Un azúcar modificado con 2'-O-metoxietilo es un azúcar modificado.

45 **[0038]** "Nucleótido 2'-O-metoxietilo" significa un nucleótido que comprende un resto de azúcar modificado 2'-O-metoxietilo.

[0039] "5-metilcitosina" significa una citosina modificada con un grupo metilo unido a la posición 5'. Una 5-metilcitosina es una nucleobase modificada.

50 **[0040]** "Perfil de seguridad aceptable" significa un patrón de efectos secundarios que está dentro de límites clínicamente aceptables.

55 **[0041]** "Ingrediente farmacéutico activo": la sustancia o sustancias de una composición farmacéutica que proporciona un efecto deseado.

[0042] "Región diana activa" significa una región diana a la que uno o más compuestos activos antisentido está dirigido. "Compuestos antisentido activos" significa compuestos antisentido que reducen los niveles de ácido nucleico diana.

60 **[0043]** "Administrado concomitantemente" se refiere a la co-administración de dos agentes en cualquier manera en la que los efectos farmacológicos de ambos se manifiestan en el paciente al mismo tiempo. La administración concomitante no requiere que ambos agentes se administren en una composición farmacéutica única, en la misma forma de dosificación, o por la misma vía de administración.

65 **[0044]** "Administración" significa proporcionar un agente farmacéutico a un individuo, e incluye, pero no está limitado

a la administración por un profesional médico y la auto-administración.

[0045] "Compuesto antisentido" significa un compuesto oligomérico que es capaz de experimentar la hibridación con un ácido nucleico diana a través de puentes de hidrógeno.

5 **[0046]** "Inhibición antisentido" significa reducción de los niveles de ácido nucleico diana en presencia de un compuesto antisentido complementario a un ácido nucleico diana en comparación con los niveles objetivo de ácido nucleico en la ausencia del compuesto antisentido.

10 **[0047]** "Oligonucleótido antisentido" significa un oligonucleótido monocatenario que tiene una secuencia de nucleobases que permite la hibridación con una región correspondiente o segmento de un ácido nucleico diana.

[0048] "Azúcar bicíclico" significa un anillo de furosilo modificado por el puente de dos átomos del anillo no geminales. Un azúcar bicíclico es un azúcar modificado.

15 **[0049]** "Ácido nucleico bicíclico" o "BNA" o "nucleósido bicíclico" o "nucleótido bicíclico" se refiere a un nucleósido o nucleótido en el que la porción de furanosa del nucleósido incluye un puente que conecta dos átomos de carbono en el anillo de furanosa, formando de este modo un sistema de anillo bicíclico. Tal como se usa en el presente documento, a menos que se indique otra cosa, el término "metilenoxi BNA" solo se refiere a β-D-metilenoxi BNA.

20 **[0050]** "Estructura de tapa" o "resto de tapa terminal" significa modificaciones químicas, que se han incorporado en cualquier extremo de un compuesto antisentido.

25 **[0051]** "Compuestos antisentido quiméricos" significa compuestos antisentido que tienen al menos 2 regiones químicamente distintas, cada una posición que tiene una pluralidad de subunidades. Un "gápmero" significa un compuesto antisentido en el que una posición interna que tiene una pluralidad de nucleótidos que soporta la escisión de RNasaH se posiciona entre regiones externas que tienen uno o más nucleótidos que son químicamente distintos de los nucleósidos de la región interna. Un "segmento de separación" significa la pluralidad de nucleótidos que constituyen la región interna de un gápmero. Un "segmento de ala" significa la región externa de un gápmero.

30 **[0052]** "Co-administración" significa la administración de dos o más agentes farmacéuticos a un individuo. Los dos o más agentes farmacéuticos pueden estar en una sola composición farmacéutica, o pueden estar en composiciones farmacéuticas separadas. Cada uno de los dos o más agentes farmacéuticos puede administrarse por la misma o diferentes vías de administración. La coadministración abarca la administración en paralelo o secuencialmente.

35 **[0053]** "Complementariedad" significa la capacidad de emparejamiento entre nucleobases de un primer ácido nucleico y un segundo ácido nucleico.

40 **[0054]** "Cumplir" significa la adherencia con una terapia recomendada por un individuo.

[0055] "Nucleobases contiguas" significa nucleobases inmediatamente adyacentes entre sí.

45 **[0056]** "Diluyente" significa un ingrediente en una composición que carece de actividad farmacológica, pero es farmacéuticamente necesario o deseable. Por ejemplo, en los fármacos que se inyectan, el diluyente puede ser un líquido, por ejemplo solución salina.

50 **[0057]** "Dosis" significa una cantidad especificada de un agente farmacéutico proporcionada en una única administración, o en un período de tiempo especificado. Se puede administrar una dosis en dos o más bolos, comprimidos o inyecciones. Por ejemplo, cuando se desea la administración subcutánea, la dosis deseada requiere un volumen que no se acomoda fácilmente mediante una sola inyección. En tales casos, se pueden usar dos o más inyecciones para lograr la dosis deseada. Se puede administrar una dosis en dos o más inyecciones para minimizar la reacción en el sitio de inyección en un individuo. En otros casos, el agente farmacéutico se administra por infusión durante un periodo de tiempo prolongado o continuamente. Las dosis se pueden indicar como la cantidad de agente farmacéutico por hora, día, semana o mes.

55 **[0058]** "Dosificación unitaria" significa una forma en la que se proporciona un agente farmacéutico, por ejemplo píldora, comprimido, u otra unidad de dosificación conocida en la técnica. En ciertos casos, una unidad de dosificación es un vial que contiene oligonucleótido antisentido liofilizado. En ciertos casos, una unidad de dosificación es un vial que contiene oligonucleótido antisentido reconstituido.

60 **[0059]** "Duración" significa el período de tiempo durante el cual continúa una actividad o acontecimiento. En ciertos casos, la duración del tratamiento es el período de tiempo durante el cual se administran las dosis de un agente farmacéutico.

65 **[0060]** "Eficacia" significa la capacidad de producir el efecto deseado.

- 5 **[0061]** "Ácido nucleico CD40" significa cualquier ácido nucleico que codifique CD40. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, un ácido nucleico de CD40 incluye, sin limitación, una secuencia de ADN que codifica CD40, una secuencia de ARN transcrita a partir de ADN que codifica CD40, y una secuencia de ARNm que codifica CD40. "ARNm CD40" significa un ARNm que codifica una proteína CD40.
- 10 **[0062]** "Totalmente complementario" significa que cada nucleobase de un primer ácido nucleico tiene una nucleobase complementaria en un segundo ácido nucleico. En ciertas realizaciones, un primer ácido nucleico es un compuesto antisentido y un ácido nucleico diana es un segundo ácido nucleico. En ciertas realizaciones de este tipo, un oligonucleótido antisentido es un primer ácido nucleico y un ácido nucleico diana es un segundo ácido nucleico.
- 15 **[0063]** "Ensanchado por hueco" significa que un compuesto antisentido tiene un segmento de hueco de 12 o más 2'-desoxirribonucleótidos contiguos posicionados entre e inmediatamente adyacentes a segmentos de ala 5' y 3' que tienen de uno a seis nucleótidos que tienen restos de azúcar modificado. "Inmediatamente adyacente" significa que no hay nucleótidos intermedios entre los elementos inmediatamente adyacentes.
- 20 **[0064]** "Hibridación" significa la hibridación de moléculas de ácido nucleico complementarias. En ciertas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico complementarias incluyen, pero no se limitan a, un compuesto antisentido y una diana de ácido nucleico. En ciertas realizaciones de este tipo, las moléculas de ácido nucleico complementarias incluyen, pero no se limitan a, un oligonucleótido antisentido y una diana de ácido nucleico
- 25 **[0065]** "Individual" significa un animal humano o no humano seleccionado para tratamiento o terapia.
- [0066]** "Cumplimiento individual" significa adherencia a una terapia recomendada o prescrita por un individuo.
- 30 **[0067]** "Reacción en el sitio de inyección" significa inflamación o enrojecimiento anormal de la piel en un sitio de inyección en un individuo.
- [0068]** "Enlace internucleósido" se refiere al enlace químico entre nucleósidos.
- [0069]** Nucleósidos enlazados significan nucleósidos adyacentes que están unidos entre sí.
- [0070]** La expresión "enlace internucleósido modificado" se refiere a una sustitución y/o cualquier cambio de un enlace internucleósido (es decir, un enlace internucleósido fosfodiéster).
- 35 **[0071]** "Oligonucleótido modificado" significa un oligonucleótido que comprende un enlace internucleósido modificado, un azúcar modificado, y/o una nucleobase modificada.
- [0072]** "Azúcar modificado" se refiere a una sustitución y/o cualquier cambio de un azúcar natural.
- 40 **[0073]** "Nucleobase modificada" significa cualquier nucleobase que no sea adenina, citosina, guanina, timidina o uracilo. Una "nucleobase no modificada" significa las bases purínicas adenina (A) y guanina (G), y las bases pirimidínicas timina (T), citosina (C) y uracilo (U).
- 45 **[0074]** "Nucleótido modificado" significa un nucleótido que tiene, independientemente, un resto de azúcar modificado, enlace internucleósido modificado, o nucleobase modificada. Un nucleósido modificado significa un nucleótido que tiene, independientemente, un resto de azúcar modificado o una nucleobase modificada.
- [0075]** "Resto de azúcar modificado" significa un resto de azúcar que tiene cualquier sustitución y/o cambio de un resto de azúcar natural.
- 50 **[0076]** "Motivo" significa el patrón de nucleósidos no modificados y modificados en un compuesto antisentido.
- [0077]** "Enlace internucleósido natural" significa un enlace fosfodiéster de 3' a 5'.
- 55 **[0078]** "Resto de azúcar natural" significa un resto de azúcar encontrado en el ADN (2'-H) o ARN (2'-OH).
- [0079]** "Nucleobase no complementaria" o "incompatibilidad" significa una nucleobase de un primer ácido nucleico que no es capaz de emparejamiento con la correspondiente nucleobase de un segundo o ácido nucleico diana.
- 60 **[0080]** "Nucleósido" significa una nucleobase unida a un azúcar.
- [0081]** Como se usa en la presente memoria, el término "nucleósido mimético" pretende incluir aquellas estructuras usadas para reemplazar el azúcar o el azúcar y la base y no necesariamente el enlace en una o más posiciones de un compuesto oligomérico tal como, por ejemplo, miméticos de nucleósidos que tienen morfolina, ciclohexenilo, ciclohexilo, tetrahidropiraniolo, miméticos de azúcar bicíclicos o tricíclicos, por ejemplo unidades de azúcar no de furanosa.

- 5
- [0082] Nucleobase significa un resto de heterocíclico capaz de emparejarse con una base de otro ácido nucleico.
- [0083] "Secuencia de nucleobase" significa el orden de nucleobases contiguas independientes de cualquier azúcar, enlace, y/o modificación de la nucleobase.
- [0084] "Nucleótido" significa un nucleósido que tiene un grupo de fosfato unido covalentemente a la porción de azúcar del nucleósido.
- 10
- [0085] El término "mimético de nucleótidos" se pretende que incluya aquellas estructuras utilizadas para reemplazar el nucleósido y el enlace en una o más posiciones de un compuesto oligomérico tal como por ejemplo ácidos nucleicos peptídicos o morfolinos (morfolinos unidos por -N(H)-C(=O)-O- u otro enlace no fosfodiéster).
- [0086] "Compuesto oligomérico" se refiere a un polímero u oligómero de subunidades monoméricas con enlaces que es capaz de hibridación a por lo menos una región de una molécula de ácido nucleico.
- 15
- [0087] "Oligonucleósido" significa un oligonucleótido en el que los enlaces internucleósido no contienen un átomo de fósforo.
- [0088] "Oligonucleótido" se refiere a un polímero u oligómero de nucleósidos ligados cada uno de los cuales se pueden modificar o no modificar, independientes uno de otro.
- 20
- [0089] "Administración parenteral", significa la administración a través de inyección o infusión. La administración parenteral incluye, pero no se limita a, administración subcutánea, administración intravenosa o administración intramuscular.
- 25
- [0090] "Agente farmacéutico" se refiere a una sustancia que proporciona un beneficio terapéutico cuando se administra a un individuo. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, un oligonucleótido de antisentido dirigido a CD40 es un agente farmacéutico.
- [0091] "Sales farmacéuticamente aceptables" se refieren a sales fisiológicas y farmacéuticamente aceptables de los compuestos de antisentido, es decir, sales que retienen la actividad biológica deseada del oligonucleótido madre y no imparten efectos toxicológicos no deseados al mismo.
- 30
- [0092] "Composición farmacéutica" significa una mezcla de sustancias adecuadas para administración a un individuo. Por ejemplo, una composición farmacéutica puede comprender uno o más oligonucleótidos de antisentido o una combinación de oligonucleótidos de antisentido y agentes activos no antisentido y una solución acuosa estéril o aditivo otro farmacéuticamente aceptable.
- 35
- [0093] "Enlace de fosforotioato" significa un enlace entre nucleósidos donde el enlace fosfodiéster se modifica mediante la sustitución de uno de los átomos de oxígeno no puente con un átomo de azufre. Un enlace fosforotioato es un enlace de internucleósido modificado.
- 40
- [0094] "Porción" significa un número definido de nucleobases contiguas (es decir, enlaces) de un ácido nucleico. En ciertas realizaciones, una parte es un número definido de nucleobases contiguas de un ácido nucleico diana. En ciertas realizaciones, una parte es un número definido de nucleobases contiguas de un compuesto antisentido.
- 45
- [0095] "Profármaco" significa un agente terapéutico que se prepara en una forma inactiva que se convierte en una forma activa (es decir, un fármaco) dentro del cuerpo o las células del mismo por la acción de enzimas endógenas u otros productos químicos y/o condiciones.
- 50
- [0096] "Terapia recomendada" significa un régimen terapéutico recomendado por un profesional de la medicina para el tratamiento, mejora o prevención de una enfermedad.
- [0097] "Efectos secundarios" se refiere a respuestas fisiológicas atribuibles a un tratamiento aparte de los efectos deseados. Los efectos secundarios incluyen, sin limitación, reacciones en el sitio de la inyección, anomalías en las pruebas de función hepática, anomalías en la función renal, toxicidad hepática, toxicidad renal, anomalías del sistema nervioso central, y miopatías. Por ejemplo, el aumento de los niveles de aminotransferasas en suero pueden indicar toxicidad hepática o anomalías de la función hepática. Por ejemplo, aumento de la bilirrubina pueden indicar toxicidad hepática o anomalías de la función hepática.
- 55
- [0098] "Oligonucleótido de cadena sencilla modificado" significa un oligonucleótido modificado que no se hibrida a una cadena complementaria.
- 60
- [0099] "Hibridar específicamente" significa un compuesto antisentido que se hibrida con un ácido nucleico diana para inducir un efecto deseado, mientras que exhiben un mínimo o ningún efecto sobre los ácidos nucleicos no diana.
- 65

[0100] El término "sustituto de azúcar" se superpone con el término ligeramente más amplio "mimético de nucleósido", pero pretende indicar la sustitución de la unidad de azúcar (anillo de furanosa) solamente. Los anillos de tetrahidropiraniolo proporcionados en este documento son ilustrativos de un ejemplo de un sustituto de azúcar en el que el grupo de azúcar de furanosa ha sido sustituido por un sistema de anillo de tetrahidropiraniolo.

[0101] "Condiciones de hibridación rigurosas" significan condiciones en las que una molécula de ácido nucleico, tal como un compuesto antisentido, se hibridará a una secuencia de ácido nucleico diana, sino a un número mínimo de otras secuencias. Las condiciones rigurosas son dependientes de la secuencia y pueden variar en diferentes circunstancias. En el contexto de esta invención, "condiciones rigurosas" en las que los compuestos oligoméricos se hibridan con una secuencia diana vienen determinadas por la naturaleza y la composición de los compuestos oligoméricos y los ensayos en que están siendo investigados.

[0102] "Administración subcutánea" se refiere a la administración justo debajo de la piel. "La administración intravenosa" significa administración en una vena.

[0103] "Selectivos" o "dirigidos a" significa que tiene una secuencia de nucleobases que permitirá la hibridación específica de un compuesto antisentido a un ácido nucleico diana para inducir un efecto deseado. Un efecto deseado es la reducción de un ácido nucleico diana. En ciertas realizaciones, un efecto deseado es la reducción de un ARNm CD40.

[0104] "Orientación" significa el proceso de diseño y selección de un compuesto antisentido que se hibride específicamente con un ácido nucleico diana e inducir un efecto deseado.

[0105] "Ácido nucleico diana", "ARN diana", "transcripción de ARN diana" y "ácido nucleico diana" significan un ácido nucleico capaz de ser diana de compuestos antisentido. Ácidos nucleicos diana pueden incluir, pero no se limitan a, ADN, ARN (incluyendo, pero no limitado a pre-ARNm y ARNm o porciones de los mismos) transcrito a partir de ADN que codifica una diana, y también miARN.

[0106] "Región diana" se refiere a una porción de un ácido nucleico diana a la que uno o más compuestos antisentido está dirigido.

[0107] "Segmento diana" significa la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico diana a la que un compuesto antisentido está dirigido. "Sitio diana 5'" se refiere al nucleótido extremo 5' más de un segmento diana. "Sitio diana 3'" se refiere al extremo 3' más nucleótidos de un segmento diana.

[0108] "Cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad de un agente farmacéutico que proporciona un beneficio terapéutico a un individuo.

[0109] "Nucleótido no modificado" significa un nucleótido compuesto de nucleobases de origen natural, restos de azúcares y enlaces de internucleósido. En ciertas realizaciones, un nucleótido no modificado es un nucleótido de ARN (es decir, β -D-ribonucleósidos) o un nucleótido de ADN (es decir, -D-desoxirribonucleósido).

Compuestos antisentido

[0110] Los compuestos antisentido incluyen, pero no se limitan a, oligonucleótidos, oligonucleósidos, análogos de oligonucleótidos, miméticos de oligonucleótidos, oligonucleótidos antisentido, y siARN. Un compuesto oligomérico puede ser "antisentido" frente a un ácido nucleico diana, es decir que es capaz de experimentar hibridación con un ácido nucleico diana a través de enlaces de hidrógeno.

[0111] En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido tiene una secuencia de nucleobases que, cuando se escribe en la dirección 5' a 3', comprende el complemento inverso del segmento diana de un ácido nucleico diana al que está dirigido. En ciertas realizaciones de este tipo, un oligonucleótido antisentido tiene una secuencia de nucleobase que, cuando está escrita en la dirección 5' a 3', comprende el complemento inverso del segmento diana de un ácido nucleico diana al que está dirigido.

[0112] En la invención reivindicada, un compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico CD40 es de 12 a 30 subunidades de longitud. En otras palabras, los compuestos antisentido reivindicados son de 12 a 30 subunidades enlazadas. En otros casos, el compuesto antisentido es 8 a 80, 12 a 50, 15 a 30, 18 a 24, 19 a 22, o 20 subunidades enlazadas. En ciertos casos, los compuestos antisentido son 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 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 enlazadas en longitud, o un intervalo definido por cualquiera de los dos valores anteriores. El compuesto antisentido es un oligonucleótido antisentido, y las subunidades unidas son nucleótidos.

[0113] En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido acortado o truncado dirigido a un ácido nucleico CD40 tiene una única subunidad suprimido del extremo 5' (truncado 5'), o alternativamente desde el extremo 3' (truncado

3'). Un compuesto antisentido acortado o truncado dirigido a un ácido nucleico CD40 puede tener dos subunidades suprimidas del extremo 5', o alternativamente puede tener dos subunidades suprimidas del extremo 3', del compuesto antisentido. Alternativamente, los nucleósidos eliminados pueden dispersarse a través del compuesto antisentido, por ejemplo, en un compuesto antisentido que tiene un nucleósido suprimido del extremo 5' y un nucleósido suprimido del extremo 3'.

[0114] Cuando una sola subunidad adicional está presente en un compuesto antisentido alargado, la subunidad adicional puede estar situada en el extremo 5' o 3' del compuesto antisentido. Cuando dos o más subunidades adicionales están presentes, las subunidades añadidas pueden ser adyacentes entre sí, por ejemplo, en un compuesto antisentido que tiene dos subunidades añadidas al extremo 5' (adición 5') o, alternativamente, al extremo 3' (3'), del compuesto antisentido. Alternativamente, las subunidades añadidas pueden dispersarse a través del compuesto antisentido, por ejemplo, en un compuesto antisentido que tiene una subunidad añadida al extremo 5' y una subunidad añadida al extremo 3'.

[0115] Es posible aumentar o disminuir la longitud de un compuesto antisentido, tal como un oligonucleótido antisentido, y/o introducir bases de desajuste sin eliminar la actividad. Por ejemplo, en Woolf et al. (Proc. Nat. Acad. Sci. USA 89: 7305-7309, 1992), se ensayó una serie de oligonucleótidos de 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 oocitos. Los oligonucleótidos de antisentido de 25 nucleobases de longitud con 8 o 11 bases desajustadas cerca de los extremos de los oligonucleótidos de antisentido fueron capaces de dirigir la escisión específica del ARNm diana, aunque en menor grado que los oligonucleótidos de antisentido que no contenían desajustes. De forma similar, se consiguió la división específica del objetivo usando 13 oligonucleótidos de antisentido de nucleobase, incluyendo aquellos con 1 o 3 desajustes.

[0116] Gautschi et al (J. Natl Cancer Inst 93: 463-471, marzo de 2001) demostró la capacidad de un oligonucleótido que tiene 100% de complementariedad con el ARNm de bcl-2 y que tiene 3 desajustes a bcl-xL ARNm para reducir la expresión tanto de Bcl-2 y Bcl-xL *in vitro* e *in vivo*. Además, este oligonucleótido demostró actividad antitumoral potente *in vivo*.

[0117] Maher y Dolnick (Nuc Acid Res 16: 3341-3358, 1988) probaron una serie de oligonucleótidos antisentido de nucleobase tándem 14, y oligonucleótidos de antisentido de 28 y 42 nucleobases compuestos de la secuencia de dos o tres de los oligonucleótidos de antisentido tándem, respectivamente, por su capacidad para detener la traducción de DHFR humano en un ensayo de reticulocitos de conejo. Cada uno de los tres oligonucleótidos de antisentido de nucleobase solo fue capaz de inhibir la traducción, aunque a un nivel más modesto que los oligonucleótidos de antisentido de 28 o 42 nucleobases.

[0118] Bhanot et al. (PCT/US2007/068401) proporcionaron compuestos de antisentido cortos, incluyendo compuestos que comprenden monómeros de alta afinidad modificados químicamente de 8 a 16 monómeros de longitud. Se demostró que estos compuestos de antisentido cortos eran útiles para reducir ácidos nucleicos diana y/o proteínas en células, tejidos y animales con potencia incrementada e índice terapéutico mejorado. Los compuestos de antisentido cortos eran eficaces a dosis más bajas que los compuestos anti-sentido descritos previamente, lo que permite una reducción en la toxicidad y el coste del tratamiento. Además, los compuestos de antisentido cortos descritos tienen mayor potencial para la dosificación oral.

45 *Motivos de compuesto de antisentido*

[0119] En ciertas realizaciones, los compuestos de antisentido dirigidos a un ácido nucleico CD40 han modificado químicamente subunidades dispuestas en patrones, o motivos, para conferir a los compuestos de antisentido propiedades tales como actividad inhibitoria mejorada, aumento de la afinidad de unión para un ácido nucleico diana, o resistencia a la degradación por nucleasas *in vivo*.

[0120] Compuestos de antisentido quiméricos contienen típicamente al menos una región modificada de modo que confieren una mayor resistencia a la degradación por nucleasas, aumento de la captación celular, aumento de la afinidad de unión para el ácido nucleico diana, y/o aumento de la actividad inhibitoria. Una segunda región de un compuesto antisentido quimérico puede servir opcionalmente como sustrato para la endonucleasa celular RNasa H, que escinde la cadena de ARN de un dúplex ARN:ADN.

[0121] Los compuestos de antisentido que tienen un motivo de gámpero se consideran compuestos de antisentido quiméricos. En un gámpero, una región interna que tiene una pluralidad de nucleótidos que soporta la escisión de RNasaH se posiciona entre regiones externas que tienen una pluralidad de nucleótidos que son químicamente distintos de los nucleósidos de la región interna. En el caso de un oligonucleótido antisentido que tiene un motivo de gámpero, el segmento de hueco sirve generalmente como el sustrato para la escisión de endonucleasa, mientras que los segmentos de ala comprenden nucleósidos modificados. En una realización preferida, las regiones de un gámpero se diferencian por los tipos de restos de azúcar que comprende cada región distinta. Los tipos de restos de azúcar que se utilizan para diferenciar las regiones de un gámpero puede, en algunas formas de realización incluir -D-ribonucleósidos, -D-desoxirribonucleósidos, nucleósidos 2'-modificados (tales nucleósidos 2'-modificados pueden

incluir 2'-MOE, y nucleósidos modificados en el azúcar bicíclico (tales nucleósidos bicíclicos modificados en el azúcar pueden incluir los que tienen un puente 4'-(CH₂)_n-O-2', donde n = 1 o n = 2). Preferiblemente, cada región distinta comprende restos de azúcares uniformes. El motivo ala-ala-hueco se describe con frecuencia como "X-Y-Z", donde "X" representa la longitud de la región de ala 5', "Y" representa la longitud de la región de hueco, y "Z" representa la longitud de la región de ala 3'. Cualquiera de los compuestos de antisentido descritos en este documento puede tener un motivo gápmero. En algunas realizaciones, X y Z son iguales, en otras realizaciones son diferentes. Y puede estar entre 8 y 15 nucleótidos. X, Y o Z pueden ser 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 lo tanto, los gápmeros de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo 5-10-5, 4-8-4, 4-10-4, 2-15-3, 4-12-3, 4-12-4, 3-14-3, 2-16-2, 1-18-1, 3-10-3, 2-10-2, 1-10-1 o 2-8-2.

[0122] En algunos casos, el compuesto antisentido como un motivo "wingmer", que tiene un ala-hueco o configuración de brecha de ala, es decir, una configuración X-Y o Y-Z como se describió anteriormente para la configuración de gápmero. Por lo tanto, las configuraciones de alas 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 ó 8-2.

[0123] En una realización, los compuestos de antisentido dirigidos a un ácido nucleico CD40 poseen un motivo gápmero 5-10-5.

[0124] En algunas realizaciones, un compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico CD40 tiene un motivo ensanchado con brechas. En otras realizaciones, un oligonucleótido antisentido dirigido a un ácido nucleico CD40 tiene un motivo ensanchado con huecos.

[0125] En una realización, un oligonucleótido antisentido de hueco ensanchado dirigido a un ácido nucleico CD40 tiene un segmento de hueco de catorce 2'-desoxirribonucleótidos posicionados entre los segmentos de ala de tres lados nucleósidos modificados químicamente. En una realización, la modificación química comprende una modificación de azúcar 2'. En otra realización, la modificación química comprende una modificación de azúcar 2'-MOE.

Ácidos nucleicos diana, regiones diana y secuencias de nucleótidos

[0126] Las secuencias de nucleótidos que codifican CD40 incluyen, sin limitación, los siguientes: GENBANK N° de Acceso X60592.1, depositado primero con GENBANK® el 21 de abril, 1993 e incorporado en este documento como SEQ ID NO: 1; GENBANK® N° de acceso H50598.1, depositado por primera vez con GENBANK® el 19 de septiembre de 1995, e incorporado en la presente memoria como SEQ ID NO: 2; GENBANK N° de acceso AA203290.1, depositado por primera vez con GENBANK® el 25 de enero de 1997, e incorporado en la presente como SEQ ID NO: 3; y los nucleótidos 9797000 a 9813000 del N° de acceso de GENBANK NT_011362.9, depositados por primera vez con GENBANK® el 29 de noviembre de 2000 e incorporados en la presente memoria como SEQ ID NO: 4, y el N° de acceso de GENBANK® BC064518.1, incorporado en la presente como SEQ ID NO: 237.

[0127] Se entiende que la secuencia expuesta en cada SEQ ID N° en los ejemplos contenidos en este documento es independiente de cualquier modificación de un resto azúcar, un enlace internucleosídico o una base nucleotídica. Como tal, los compuestos de antisentido definidos por una SEQ ID NO pueden comprender, independientemente, una o más modificaciones a un resto de azúcar, un enlace internucleósido o una nucleobase. Los compuestos de antisentido descritos por Número Isis (Isis No) indican una combinación de secuencia de nucleobase y motivo.

[0128] Una región diana es una región estructuralmente definida del ácido nucleico. Por ejemplo, una región diana puede abarcar una UTR 3', una UTR 5', un exón, un intrón, una región codificadora, una región de iniciación de la traducción, región de terminación de la traducción u otra región de ácido nucleico definida. Las regiones estructuralmente definidas para CD40 pueden obtenerse por número de acceso a partir de bases de datos de secuencias tales como NCBI. Una región diana puede abarcar la secuencia desde un sitio diana 5' de un segmento diana dentro de la región diana a un sitio diana 3' de otro segmento diana dentro de la región diana.

[0129] La orientación incluye la determinación de al menos un segmento diana a la que un compuesto antisentido se hibrida, de manera que se produce un efecto deseado. En ciertas realizaciones, el efecto deseado es una reducción en los niveles de ácido nucleico diana de ARNm. En otras realizaciones, el efecto deseado es la reducción de niveles de proteína codificada por el ácido nucleico diana o un cambio fenotípico asociado con el ácido nucleico diana.

[0130] Una región diana puede contener uno o más segmentos objetivo. Múltiples segmentos objetivo dentro de una región de destino pueden estar superpuestos. Alternativamente, pueden estar no superpuestos. En una realización, los segmentos diana dentro de una región diana están separados por no más de aproximadamente 300 nucleótidos. En otros procedimientos, los segmentos diana dentro de una región diana están separados por no más de aproximadamente 250, 200, 150, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 ó 10 nucleótidos sobre el ácido nucleico diana. En otra realización, los segmentos diana dentro de una región diana están separados por no más de

aproximadamente 5 nucleótidos sobre el ácido nucleico diana. En realizaciones adicionales, los segmentos diana son contiguos.

5 **[0131]** Segmentos diana adecuados de la descripción pueden ser encontrados dentro de un UTR 3', una región codificante, una UTR 5', un intrón, o un exón. Los segmentos objetivo que contienen un codón de inicio o un codón de parada son también segmentos objetivo adecuados. Un segmento diana adecuado puede excluir específicamente una cierta región estructuralmente definida tal como el codón de inicio o codón de parada.

10 **[0132]** La determinación de segmentos diana adecuados pueden incluir una comparación de la secuencia de un ácido nucleico diana con otras secuencias de todo el genoma. Por ejemplo, el algoritmo BLAST puede usarse para identificar regiones de similitud entre diferentes ácidos nucleicos. Esta comparación puede impedir la selección de secuencias de compuestos de antisentido que pueden hibridarse de una manera no específica con secuencias distintas de un ácido nucleico diana seleccionado (es decir, secuencias no diana o fuera de diana).

15 **[0133]** Puede haber variación en la actividad (por ejemplo, tal como se define por el porcentaje de reducción de la meta de los niveles de ácido nucleico) de los compuestos de antisentido dentro de una región diana activo. En una realización, las reducciones en los niveles de ARNm de CD40 son indicativas de la inhibición de la expresión de CD40. Las reducciones en los niveles de una proteína CD40 son también indicativas de la inhibición de la expresión de ARNm diana. Además, los cambios fenotípicos son indicativos de la inhibición de la expresión de CD40. Por ejemplo, los cambios en la morfología celular en el tiempo o en la dosis de tratamiento, así como los cambios en los niveles de componentes celulares tales como proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, hormonas, sacáridos o metales, son indicativos de la inhibición de la expresión de CD40. La reducción de los eosinófilos es indicativa de la inhibición de la expresión de CD40. Las mediciones del estado celular que incluyen el pH, la etapa del ciclo celular, la ingesta o la excreción de indicadores biológicos por la célula son también puntos finales de interés.

20 **[0134]** Análisis del genotipo de la célula (la medición de la expresión de uno o más de los genes de la célula) después del tratamiento también se utiliza como un indicador de la eficacia o potencia de los inhibidores de CD40. Los genes Hallmark, o aquellos genes que se sospecha que están asociados con un estado patológico específico, condición o fenotipo, se miden tanto en células tratadas como no tratadas.

30 *Estructura genómica, exones e intrones*

[0135] Aunque algunos transcritos de ARNm eucariotas se traducen directamente, muchos contienen una o más regiones, conocidas como "intrones", que se escindió de una transcripción antes de que se traduce. Las regiones restantes (y por lo tanto traducidas) se conocen como "exones" y se unen entre sí para formar una secuencia continua de ARNm. Los sitios de empalme dirigidos, es decir, las uniones intrón-exón o las uniones exón-intrón, también pueden ser particularmente útiles en situaciones en las que el empalme aberrante está implicado en la enfermedad o cuando una sobreproducción de un producto de empalme particular está implicada en la enfermedad. Las uniones de fusión aberrantes debido a reordenamientos o deleciones son también sitios diana preferidos. Transcripciones de ARNm producidas a través del proceso de empalme de dos (o más) ARNMs de diferentes fuentes de genes se conocen como "transcripciones de fusión". También se sabe que los intrones pueden dirigirse eficazmente usando compuestos de antisentido dirigidos a, por ejemplo, ADN o pre-ARNm.

45 **[0136]** También se conoce en la técnica que los transcritos de ARN alternativos se pueden producir de la misma región genómica de ADN. Estas transcripciones alternativas se conocen generalmente como "variantes". Más específicamente, las "variantes pre-ARNm" son transcriptas producidas a partir del mismo ADN genómico que difieren de otros transcritos producidos a partir del mismo ADN genómico en su posición de inicio o de parada y contienen secuencia intrónica y exónica.

50 **[0137]** Tras la escisión de una o más regiones de exón o intrónicas, o porciones de las mismas durante el empalme, variantes pre-ARNm producen más pequeñas "variantes de ARNm". Consecuentemente, las variantes de ARNm son variantes de pre-ARNm procesadas y cada variante de pre-ARNm única debe producir siempre una variante única de ARNm como resultado del empalme. Estas variantes de ARNm se conocen también como "variantes alternativas de empalme". Si no se produce el empalme de la variante pre-ARNm entonces la variante pre-ARNm es idéntica a la variante de ARNm.

Hibridación

60 **[0138]** La hibridación puede ocurrir entre un compuesto antisentido descrito en este documento y un ácido nucleico CD40. El mecanismo más común de hibridación implica el enlace de hidrógeno (por ejemplo, Watson-Crick, Hoogsteen o Hoogsteen invertido enlace de hidrógeno) entre nucleobases complementarias de las moléculas de ácido nucleico.

65 **[0139]** La hibridación puede producirse bajo condiciones variables. Las condiciones rigurosas son dependientes de la secuencia y están determinadas por la naturaleza y composición de las moléculas de ácido nucleico a hibridar.

[0140] Los métodos para determinar si una secuencia es específicamente hibridable con un ácido nucleico diana son bien conocidos en la técnica. Los compuestos de antisentido descritos en el presente documento son específicamente hibridables con un ácido nucleico CD40.

5 *Complementariedad*

[0141] 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, antisentido inhibición de un ácido nucleico diana, tal como un ácido nucleico CD40). **[0142]** nucleobases no complementarias entre un compuesto antisentido y un ácido nucleico CD40 pueden tolerarse siempre que el compuesto antisentido sigue siendo capaz de hibridarse específicamente a un ácido nucleico diana. Además, un compuesto antisentido puede hibridarse sobre uno o más segmentos de un ácido nucleico CD40 de tal manera que los segmentos intervinientes o adyacentes no están implicados en el evento de hibridación (por ejemplo, estructura de bucle, falta de coincidencia o estructura en horquilla).

[0143] En algunos casos, los compuestos de antisentido descritos en este documento son al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% complementarios a un ácido nucleico CD40. El porcentaje de complementariedad de un compuesto antisentido con un ácido nucleico diana se puede determinar usando métodos rutinarios. Por ejemplo, un compuesto antisentido en el que 18 de 20 nucleobases del compuesto antisentido son complementarias a una región diana, y por lo tanto se hibridarían específicamente, representarían una complementariedad del 90 por ciento. En este ejemplo, las nucleobases no complementarias restantes pueden agruparse o intercalarse con nucleobases complementarias y no necesitan ser contiguas entre sí o con nucleobases complementarias. Como tal, un compuesto antisentido que tiene 18 nucleobases de longitud que tiene 4 (cuatro) nucleobases no complementarias que están flanqueadas por dos regiones de complementariedad completa con el ácido nucleico diana, tendría un 77,8% de complejidad global con el ácido nucleico diana y por lo tanto caería dentro del alcance de la presente invención. El porcentaje de complementariedad de un compuesto antisentido con una región de un ácido nucleico diana se puede determinar rutinariamente usando programas BLAST (herramientas básicas de búsqueda de alineación local) y programas PowerBLAST conocidos en la técnica (Altschul et al., J. Mol. Biol., 1990, 215, 403 410, Zhang y Madden, Genome Res., 1997, 7, 649 656). El porcentaje de homología, identidad de secuencia o complementariedad puede determinarse, por ejemplo, mediante el programa Gap (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, Parque de Investigación de la Universidad, Madison Wis. utiliza el algoritmo de Smith y Waterman (Adv. Appl. Math., 1981, 2, 482, 489).

[0144] En otras realizaciones, los compuestos de antisentido proporcionados en este documento son totalmente complementarias (es decir, 100% complementarias) a un ácido nucleico diana. Por ejemplo, un compuesto antisentido puede ser completamente complementario a un ácido nucleico CD40, o una región diana, o un segmento diana o secuencia diana de la misma. Tal como se utiliza en la presente memoria, "totalmente complementario" significa que cada nucleobase de un compuesto antisentido es capaz de emparejamiento de bases preciso con las nucleobases correspondientes de un ácido nucleico diana.

[0145] La ubicación de una nucleobase no complementaria puede estar en el extremo o 3' de la 5 final del compuesto antisentido. Alternativamente, la o las nucleobases no complementarias pueden estar en una posición interna del compuesto antisentido. Cuando dos o más nucleobases no complementarias están presentes, pueden ser contiguas (es decir, enlazadas) o no contiguas. En una realización, una nucleobase no complementaria está localizada en el segmento de ala de un oligonucleótido antisentido gámpero.

[0146] En una realización, compuestos de 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 no complementario (s) con respecto a un ácido nucleico diana, tal como un ácido nucleico CD40.

[0147] En otra realización, compuestos de 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 no complementaria (s) con respecto a un ácido nucleico diana, tal como un ácido nucleico CD40.

[0148] Los compuestos de antisentido proporcionados en este documento también incluyen los que son complementarios a una porción de un ácido nucleico diana. Como se usa en la presente memoria, "porción" se refiere a un número definido de nucleobases contiguas (es decir, enlazadas) dentro de una región o segmento de un ácido nucleico diana. Una "porción" también puede referirse a un número definido de nucleobases contiguas de un compuesto antisentido. En una realización, los compuestos de antisentido son complementarios de al menos una porción de 8 nucleobases de un segmento diana. En otra realización, los compuestos de antisentido son complementarios de al menos una porción de 12 nucleobases de un segmento diana. En otra realización más, los compuestos de antisentido son complementarios a por lo menos una porción de 15 nucleobases de un segmento diana. También se contemplan compuestos de antisentido que son complementarios de al menos una porción de nucleobase de 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, o más de un segmento diana, o un intervalo definido por

dos de estos valores.

Identificar

5
 10
 15
[0149] Los compuestos de antisentido proporcionados en este documento también pueden tener un porcentaje de identidad se define a una secuencia particular de nucleótidos, SEQ ID NO, o compuesto representado por un número específico Isis. Como se usa aquí, un compuesto antisentido es idéntico a la secuencia descrita en este documento si tiene la misma capacidad de apareamiento de nucleobasas. Por ejemplo, un ARN que contiene uracilo en lugar de timidina en una secuencia de ADN descrita se consideraría idéntico a la secuencia de ADN puesto que tanto el uracilo como la timidina se unen con adenina. También se contemplan las versiones acortadas y alargadas de los compuestos de antisentido descritos en la presente memoria, así como los compuestos que tienen bases no idénticas con respecto a los compuestos de antisentido proporcionados aquí. Las bases no idénticas pueden ser adyacentes entre sí o dispersadas a lo largo del compuesto antisentido. El porcentaje de identidad de un compuesto antisentido se calcula de acuerdo con el número de bases que tienen pares de bases idénticos con relación a la secuencia a la que se compara.

20
[0150] Los compuestos de antisentido descritos en este documento son al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a una o más de la compuestos de antisentido o SEQ ID NOs, o una porción de los mismos, descritos aquí.

Modificaciones

25
 30
[0151] Un nucleósido es una combinación de base-azúcar. La porción nucleobase (también conocida como base) del nucleósido es normalmente un resto base heterocíclico. Los nucleótidos son nucleósidos que incluyen además un grupo fosfato unido covalentemente a la porción de azúcar del nucleósido. Para aquellos nucleósidos que incluyen un azúcar de pentofuranosilo, el grupo fosfato puede estar unido al resto hidroxilo 2', 3' o 5' del azúcar. Los oligonucleótidos se forman a través del enlace covalente de nucleósidos adyacentes entre sí, para formar un oligonucleótido polimérico lineal. Dentro de la estructura oligonucleotídica, los grupos fosfato se denominan comúnmente por formar los enlaces internucleósidos del oligonucleótido.

35
[0152] Las modificaciones de los compuestos de antisentido comprenden sustituciones o cambios a enlaces internucleosídicos, restos de azúcar, o nucleobasas. Los compuestos de antisentido modificados se prefieren a menudo a las formas nativas debido a propiedades deseables tales como, por ejemplo, captación celular mejorada, afinidad mejorada para la diana de ácido nucleico, estabilidad incrementada en presencia de nucleasas o actividad inhibidora incrementada.

40
[0153] Nucleósidos químicamente modificados también se pueden emplear para aumentar la afinidad de unión de un oligonucleótido antisentido acortado o truncado por su ácido nucleico diana. En consecuencia, a menudo se pueden obtener resultados comparables con compuestos de antisentido más cortos que tienen tales nucleósidos modificados químicamente.

Enlaces internucleósidos modificados

45
 50
[0154] El enlace internucleosídico de origen natural de ARN y ADN es un enlace 3' a 5' fosfodiéster. Los compuestos de antisentido que tienen uno o más enlaces internucleósidos modificados, es decir, no naturales, se seleccionan a menudo sobre compuestos de antisentido que tienen enlaces internucleósidos naturales, debido a propiedades deseables tales como, por ejemplo, captación celular mejorada, afinidad mejorada para ácidos nucleicos diana y estabilidad incrementada en presencia de nucleasas.

55
[0155] Los oligonucleótidos que tienen enlaces internucleósidos modificados incluyen enlaces internucleósidos que retienen un átomo de fósforo, así como enlaces internucleósidos que no tienen un átomo de fósforo. Los enlaces internucleósidos que contienen fósforo representativo incluyen, pero no se limitan a, fosfodiésteres, fosfotriésteres, metilfosfonatos, fosfonoacetatos, fosforamidatos y fosforotioatos o fosforoditioatos. Los enlaces internucleósidos que no tienen un átomo de fósforo incluyen, entre otros, enlaces de metileno (metilimino) o MMI, enlaces de morfolino o enlaces de amida. En los ácidos nucleicos peptídicos (PNA), el esqueleto de azúcar se reemplaza por una cadena principal que contiene amida.

Métodos de preparación de enlaces que contienen fósforo y que no contienen fósforo son bien conocidos.

60
 65
[0156] Ratentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de uniones que contienen fósforo incluyen, pero no se limitan a, la patente de los Estados Unidos. 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; 5.625.050 y US 6.693.187.

[0157] Patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de enlaces que no contienen fósforo incluyen, pero no se limitan a la patente de los Estados Unidos. 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.

[0158] En una realización, los compuestos de antisentido dirigidos a un ácido nucleico CD40 comprenden uno o más enlaces internucleósidos modificados. En algunas realizaciones, los enlaces internucleósidos modificados son enlaces de fosforotioato. En otras realizaciones, cada enlace internucleósido de un compuesto antisentido es un enlace internucleósido fosforotioato.

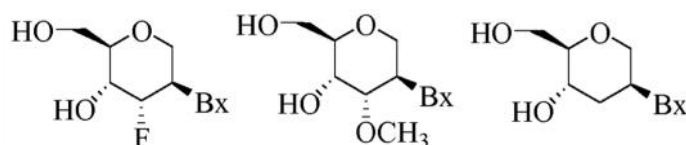
Motivos de azúcar modificados

[0159] Los compuestos de antisentido descritos en este documento pueden contener opcionalmente uno o más nucleósidos en el que el grupo azúcar se ha modificado. Tales nucleósidos modificados con azúcar pueden impartir mayor estabilidad a las nucleasas, mayor afinidad de unión o alguna otra propiedad biológica beneficiosa a los compuestos antisentido. En ciertas realizaciones, los nucleósidos se modifican por modificación del anillo de ribofurano. Tales modificaciones incluyen, sin limitación, la adición de grupos sustituyentes, el puente de átomos de anillo no geminales para formar un ácido nucleico bicíclico (BNA), como en ácidos nucleicos bloqueados (LNA), la sustitución del átomo de oxígeno de anillo de ribosilo por S, N(R), o C(R1) (R₂ (R = H, alquilo C1-C12 o un grupo protector) y combinaciones de los mismos. Ejemplos de azúcares modificados químicamente incluyen nucleósido sustituido con 2'-F-5'-metilo (véase la Solicitud Internacional PCT WO 2008/101157 publicada el 21 de agosto de 2008 para otros nucleósidos 5', 2'-bis sustituidos) o reemplazo del átomo de oxígeno del anillo de ribosilo con S con sustitución adicional en la posición 2' (véase la Solicitud de Patente de EE.UU. publicada US2005 - 0130923, publicada el 16 de junio de 2005) o alternativamente la sustitución en 5' de un BNA (véase la Solicitud Internacional PCT WO 2007/134181 Publicada el 22 de noviembre de 2007 en la que LNA está sustituida con, por ejemplo, un grupo 5'-metilo o 5'-vinilo).

[0160] Ejemplos de nucleósidos que tienen restos de azúcares modificados incluyen, sin limitación nucleósidos que comprenden grupos sustituyentes 5'-vinilo, 5'-metilo (R o S), 4'-S, 2'-F, 2'-OCH₃ (conocido como 2'-OMe) y 2'-O-(CH₂)₂OCH₃ (conocidos como 2'MOE). El sustituyente en la posición 2' también puede ser seleccionado de alilo, amino, azido, tio, O-alilo, O-alquilo C1-C10, OCF₃, O-CH₂CH₂CH₂NH₂, O(CH₂)₂SCH₃, o (CH₂)₂-ON (R_m) (R_n), tales como 2'-dimetilaminooxietoxi (2'-O-(CH₂)₂ON(CH₃)₂ o 2'-DMAOE), o (CH₂)₂-O-(CH₂)₂-N (R_m) (R_n), tales como 2'-dimetilaminoetoxietoxi (2'-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-N (CH₃)₂ o 2'-DMAEOE y o-CH₂-C(=O)-N (R_m) (R_n), donde cada R_m y R_n es, independientemente, H o alquilo C1-C10 sustituido o no sustituido.

[0161] Los ejemplos de ácidos nucleicos bicíclicos (BNA) incluyen, sin limitación de nucleósidos que comprenden un puente entre los átomos de anillo ribosilo 4' y 2', por ejemplo un puente 4'-(CH₂)_n-O-2', donde n = 1 ó n = 2. En ciertas realizaciones, los compuestos de antisentido proporcionados en este documento incluyen uno o más nucleósidos BNA en el que el puente comprende una de las fórmulas: 4'-(CH₂)-O-2' (LNA); 4'-(CH₂)-S-2'; 4'-(CH₂)-O-2' (LNA); 4'-(CH₂)₂-O-2' (ENA); 4'-C(CH₃)₂-O-2' (véase PCT/US2008/068922); 4'-CH(CH₃)-O-2' y 4' CH (CH₂OCH₃)-O-2' (véase la patente US 7.399.845, expedida el 15 de julio de 2008); 4'-CH₂-N(OCH₃)-2' (véase PCT/LTS2008/064.591); 4'-CH₂-ON(CH₃)-2' (véase la Solicitud de Patente de Estados Unidos US2004-0171570, publicada el 2 de septiembre del 2004); 4'-CH₂-N(R)-O-2' (véase Patente de Estados Unidos 7.427.672, expedida el 23 de septiembre de 2008); 4'-CH₂-C(CH₃)-2' y 4'-CH₂-C(=CH₂)-2' (véase PCT/US2008/066154); y en donde R es, independientemente, H, alquilo C1-C12, o un grupo protector. Cada uno de los anteriores BNAs incluyen varias configuraciones de azúcar estereoquímicas incluyendo, por ejemplo -L-ribofuranosa y -D-ribofuranosa (véase el documento WO99/14226).

[0162] En ciertas realizaciones, los nucleósidos se modifican por sustitución del anillo de ribosilo con un sustituto de azúcar. Tal modificación incluye, sin limitación, la sustitución del anillo de ribosilo con un sistema de anillo sustituto (a veces referido como análogos de ADN) tal como un anillo morfolino, un anillo ciclohexenilo, un anillo de ciclohexilo o un anillo de tetrahidropirano tales como uno que tiene uno de la fórmula:



en donde Bx es un resto de base heterocíclica opcionalmente protegida.

[0163] Muchos otros sistemas de anillo de sustituto de azúcar bicíclico y tricíclico también se conocen en la técnica que se puede utilizar para modificar los nucleósidos para la incorporación en compuestos de antisentido (véase por

ejemplo Leumann, CJ, Bioorg. Med. Chem. 10, (2002), 841-854). Tales sistemas de anillo pueden someterse a diversas sustituciones adicionales para mejorar la actividad.

[0164] Los métodos para las preparaciones de azúcares modificados son bien conocidos para los expertos en la técnica. Patentes representativas de Estados Unidos que enseñan la preparación de azúcares modificados incluyen, pero no se limitan a la patente de EE.UU. No.4,981, 957; 5.118.800; 5.319.080; 5.359.044; 5.393.878; 5446, 137; 5.466.786; 5.514.785; 5.519.134; 5.567.811; 5.576.427; 5.591.722; 5.597.909; 5.610.300; 5.627.053; 5.639.873; 5.646.265; 5.658.873; 5.670.633; y 5.700.920.

[0165] En ciertas realizaciones, un nucleósido modificado en 2' tiene un resto de azúcar bicíclico. En ciertas de dichas realizaciones, el resto de azúcar bicíclico es un azúcar D en la configuración alfa. En ciertas de dichas realizaciones, el resto de azúcar bicíclico es un azúcar D en la configuración beta. En ciertas de dichas realizaciones, el resto de azúcar bicíclico es un azúcar L en la configuración alfa. En ciertas de dichas realizaciones, el resto de azúcar bicíclico es un azúcar L en la configuración beta.

[0166] En ciertas realizaciones, el resto de azúcar bicíclico comprende un grupo puente entre los átomos de carbono 2' y 4'. En ciertas de dichas realizaciones, el grupo puente comprende de 1 a 8 grupos birradicales vinculados. En ciertas realizaciones, el resto de azúcar bicíclico comprende de 1 a 4 grupos birradicales vinculados. En ciertas realizaciones, el resto de azúcar bicíclico comprende 2 ó 3 grupos birradicales vinculados. En ciertas realizaciones, el resto de azúcar bicíclico comprende 2 grupos birradicales vinculados. En ciertas realizaciones, un grupo birradical ligado se selecciona de -O-, -S-, -N(R1)-, -C(R1) (R2)-, -C(R1) = C(R1) -, -C(R1) = N-, -C (= NR1)-, -Si (R1) (R2)-, -S (= O)₂-, -S(=O)-, -C(=O)- y -C (= S) -; donde cada R1 y R2 es, independientemente, H, hidroxilo, alquilo C1-C12, alquilo sustituido C1-C12, alquenilo C2-C12 alquenilo, sustituido alquenilo C2-C12, alquinilo C2-C12, alquinilo sustituido C2-C12, cicloalquilo C5-C20 arilo, arilo sustituido C5-C20, un radical heterociclo, un heterociclo sustituido radical, heteroarilo, heteroarilo sustituido, cicloalquilo C5-C7 alicíclico radical sustituido alicíclico radical, halógeno, oxi sustituido, cicloalquilo C5-C7 (-O-), amino, amino, azido, carboxilo, carboxilo sustituido, acilo, acilo sustituido, CN, tiol, tiol sustituido, sulfonilo (S(=O)₂-H), sulfonilo sustituido, sulfoxilo (S(=O)-H) o sustituido sulfoxilo; y cada grupo sustituyente es, independientemente, halógeno, alquilo C1-C12, alquilo sustituido C1-C12, alquenilo C2-C12 alquenilo, alquenilo sustituido C2-C12, alquenilo C2-C12, alquinilo sustituido C2-C12, alquinilo, amino, amino sustituido, acilo, acilo sustituido, alquilo C1-C12, aminoalquilo C1-C12 aminoalcoxi, aminoalquilo sustituido C1-C12 sustituidos aminoalcoxi C1-C12 o un grupo protector.

[0167] En algunas realizaciones, el resto de azúcar bicíclico se puentea entre el 2' y 4' átomos de carbono 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-, o -ON(alquilo)-(CH₂)p-, en donde p es 1, 2, 3, 4 o 5 y cada grupo alquilo puede estar sustituido adicionalmente. En ciertas realizaciones, p es 1, 2 o 3.

[0168] 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)-ON(R1)-. En otro aspecto, cada uno de dichos puentes es, de forma independiente, 4'-(CH₂)₃-2', 4'-(CH₂)₂-2', 4'-CH₂-O-2', 4'-(CH₂)₂-O-2', 4'-CH₂-ON(R1)-2' y 4'CH₂-N (R1)-O-2', en el que cada R1 es, independientemente, H, un grupo protector o alquilo C1-C12.

[0169] En los nucleótidos que tienen restos modificados de azúcar, los restos de nucleobases (naturales, modificados o una combinación de los mismos) se mantienen para la hibridación con una diana de ácido nucleico apropiado.

[0170] Los compuestos de antisentido dirigidos a un ácido nucleico CD40 descrito en este documento pueden comprender uno o más nucleótidos que tienen restos de azúcar modificados. En una realización preferida, el resto de azúcar modificado es 2'-MOE. Los nucleótidos modificados por 2'MOE están dispuestos en un motivo gápmero.

Nucleobases modificadas

[0171] Modificaciones o sustituciones de nucleobase (o base) son estructuralmente distinguibles de, pero funcionalmente intercambiables con, nucleobases de origen natural o no modificadas sintéticas. Tanto nucleobases naturales como modificadas son capaces de participar en enlaces de hidrógeno. Tales modificaciones de nucleobases pueden impartir estabilidad nucleasa, afinidad de unión o alguna otra propiedad biológica beneficiosa para compuestos antisentido. Las nucleobases modificadas incluyen nucleobases sintéticas y naturales tales como, por ejemplo, 5-metilcitosina (5-me-C). Ciertas sustituciones de nucleobases, incluyendo las sustituciones 5-metilcitosina, son particularmente útiles para aumentar la afinidad de unión de un compuesto antisentido para un ácido nucleico diana. Por ejemplo, las sustituciones 5-metilcitosina han demostrado aumentar la estabilidad del dúplex de ácido nucleico mediante 0,6-1,2°C (Sanghvi, YS, Crooke, ST y Lebleu, B., eds., Antisense Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278).

[0172] Nucleobases no modificadas adicionales incluyen citosina de 5-hidroximetilo, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-propilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracilo y citosina, 5-propinilo (-C C-CH₃) uracilo y

5 citosina y otros derivados de alquilo de bases pirimidínicas, 6-azo uracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo y otras adeninas y guaninas 8-sustituidas, 5-halo particularmente 5-bromo, 5-trifluorometilo y otros uracilos y citosinas 5-sustituidos, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 2-F-adenina, 2-aminoadenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-desazaguanina y 7-desazaadenina y 3-desazaguanina y 3-deazaadenina.

10 **[0173]** Restos de base heterocíclica también pueden incluir aquellos en los que la base de purina o pirimidina se reemplaza con 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 de antisentido incluyen pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y N-2, N-6 y O-6 purinas sustituidas, incluyendo 2 aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina.

15 **[0174]** Los métodos para la preparación de nucleobases modificadas son bien conocidos para los expertos en la técnica. Las patentes representativas de Estados Unidos que describen la preparación de nucleobases modificadas incluyen, pero no se limitan a las patentes de EE.UU. N° 3.687.808, así como la Patente de los Estados Unidos. N°s 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; 5.750.692 y 5.681.941.

20 **[0175]** En una realización, los compuestos de antisentido dirigidos a un ácido nucleico CD40 comprenden una o más nucleobases modificadas. En una realización adicional, los oligonucleótidos de antisentido ensanchados por hueco dirigidos a un ácido nucleico CD40 comprenden una o más nucleobases modificadas. En algunas realizaciones, la nucleobase modificada es 5-metilcitosina. En realizaciones adicionales, cada citosina es una 5-metilcitosina.

25 *Compuestos de antisentido conjugados*

30 **[0176]** Los compuestos de antisentido pueden ser unidos covalentemente a uno o más restos o conjugados que potencian la actividad, la distribución celular o la captación celular de los oligonucleótidos de antisentido resultantes. Grupos conjugados típicos incluyen restos de colesterol y restos lipídicos. Grupos conjugados adicionales incluyen carbohidratos, fosfolípidos, biotina, fenazina, folato, fenantridina, antraquinona, acridina, fluoresceínas, rodaminas, cumarinas y colorantes.

35 **[0177]** Los compuestos de antisentido también se pueden modificar para tener uno o más grupos estabilizadores que son generalmente unidos a uno o ambos extremos terminales de compuestos de antisentido para mejorar propiedades tales como, por ejemplo, la estabilidad de la nucleasa. Incluidas en grupos estabilizadores son estructuras de tapa. Estas modificaciones terminales protegen el compuesto antisentido que tiene ácido nucleico de terminales de la degradación de exonucleasa, y puede ayudar en la administración y/o localización dentro de una célula. La tapa puede estar presente en el extremo 5' (5'-tapa), o en el extremo 3' (3'-tapa), o puede estar presente en ambos extremos terminales. Estructuras de tapa son bien conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, tapas invertidas abásicas desoxi. Además, grupos estabilizadores 3' y 5' que se pueden utilizar para limitar uno o ambos extremos de un compuesto antisentido para impartir estabilidad de nucleasa 5' de estabilización incluyen los descritos en el documento WO 03/004602 publicado el 16 de enero de 2003.

45 *Composiciones y métodos para la formulación de composiciones farmacéuticas*

50 **[0178]** Los oligonucleótidos de antisentido se pueden mezclar con sustancias activas y/o inertes farmacéuticamente aceptables para la preparación de composiciones farmacéuticas o formulaciones. Composiciones y métodos para la formulación de composiciones farmacéuticas que dependen de una serie de criterios, incluyendo, pero no limitados a, vía de administración, extensión de la enfermedad, o la dosis a administrar.

55 **[0179]** Compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico de CD40 puede ser utilizado en composiciones farmacéuticas mediante combinación del compuesto antisentido con un diluyente farmacéuticamente aceptable o portador adecuado. Un diluyente farmacéuticamente aceptable incluye por ejemplo solución salina tamponada con fosfato de ejemplo (PBS). PBS es un diluyente adecuado para uso en composiciones para ser administrado parenteralmente. Por consiguiente, en una realización, empleada en los métodos descritos en este documento es una composición farmacéutica que comprende un compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico de CD40 y un diluyente farmacéuticamente inaceptable. En una realización, el diluyente farmacéuticamente aceptable es PBS. En otras realizaciones, el compuesto antisentido es un oligonucleótido antisentido.

60 **[0180]** Las composiciones farmacéuticas que comprenden compuestos de antisentido abarcan cualesquiera sales farmacéuticamente aceptables, ésteres, o sales de tales ésteres, o cualquier otro oligonucleótido que, tras la administración a un animal, incluyendo un ser humano, es capaz de proporcionar (directa o indirectamente) el metabolito o residuo biológicamente activo del mismo. De acuerdo con ello, por ejemplo, la divulgación también se extrae de las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos antisentido, profármacos, sales farmacéuticamente aceptables de dichos profármacos y otros bioequivalentes. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a sales de potasio, y sodio.

[0181] Un profármaco puede incluir la incorporación de nucleósidos adicionales en uno o ambos extremos de un compuesto antisentido que se escinde por nucleasas endógenas dentro del cuerpo, para formar el compuesto antisentido activo.

5 **[0182]** También se describe en el presente documento composiciones farmacéuticas y formulaciones que incluyen los compuestos antisentido descritos en este documento. Las composiciones farmacéuticas para uso de acuerdo con la presente invención se pueden administrar en un número de maneras, dependiendo de si se desea tratamiento local o sistémico y del área a ser tratada. La administración puede ser tópica (incluyendo oftálmica y a las membranas mucosas incluyendo 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 la administración intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular o infusión; o intracraneal, por ejemplo, intratecal o intraventricular, administración. Los oligonucleótidos con al menos una modificación 2'-O-metoxietilo se cree que son particularmente útiles para administración oral.

15 **[0183]** Las composiciones farmacéuticas y formulaciones para administración tópica pueden incluir parches transdérmicos, pomadas, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, pulverizaciones, líquidos y polvos. Vehículos farmacéuticos convencionales, acuosos, bases en polvo u oleosas, espesantes y similares pueden ser necesarios o deseables. Condones recubiertos, guantes y similares también pueden ser útiles.

20 **[0184]** Las formulaciones farmacéuticas para uso de acuerdo con la presente invención, que pueden ser convenientemente presentadas en forma de dosificación unitaria, se pueden preparar de acuerdo con técnicas convencionales bien conocidas en la industria farmacéutica. Tales técnicas incluyen la etapa de poner en asociación los ingredientes activos con el vehículo farmacéutico (s) o excipiente (s). En general, las formulaciones se preparan poniéndose uniforme e íntimamente en asociación los ingredientes activos con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos o ambos, y después, si es necesario, dando forma al producto.

25 **[0185]** Las composiciones para uso de acuerdo con la presente invención pueden formularse en cualquiera de muchas formas de dosificación posibles tales como, pero no limitados a, tabletas, cápsulas, cápsulas de gel, jarabes líquidos, geles suaves, 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 de sodio, sorbitol y/o dextrano. La suspensión también puede contener estabilizadores.

30 **[0186]** Las composiciones farmacéuticas para uso de acuerdo con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, soluciones, emulsiones, espumas y formulaciones que contienen liposomas. Las composiciones farmacéuticas y formulaciones de la presente invención pueden comprender potenciadores de uno o más de penetración, vehículos, excipientes u otros ingredientes activos o inactivos.

35 **[0187]** Las emulsiones son normalmente sistemas heterogéneos de un líquido disperso en otro en forma de gotitas por lo general superiores a 0,1 μm de diámetro. Las emulsiones pueden contener componentes adicionales además de las fases dispersadas y el fármaco activo que puede estar presente como una solución, ya sea en la fase acuosa, la fase aceitosa o como una fase separada. Las microemulsiones se incluyen como una realización de la presente invención. Emulsiones y sus usos son bien conocidos en la técnica y se describen adicionalmente en la patente de Estados Unidos. No. 6.287.860.

40 **[0188]** Las formulaciones para uso de acuerdo con la presente invención incluyen formulaciones liposomales. Tal como se utiliza en la presente invención, el término "liposoma" significa una vesícula compuesta por lípidos anfífilicos dispuestos en una bicapa esférica o bicapas. Los liposomas son vesículas unilamelares o multilamelares que tienen una membrana formada a partir de un material lipófilo y un interior acuoso que contiene la composición a ser administrada. Los liposomas catiónicos son liposomas que se cree que interactúan con las moléculas de ADN cargadas negativamente para formar un complejo estable con carga positiva. Los liposomas que son sensibles al pH o negativamente cargados se cree que atrapan el ADN en lugar de complejo. Ambos liposomas catiónicos y no catiónicos se han utilizado para suministrar ADN a las células.

45 **[0189]** Los liposomas también incluyen liposomas "estéricamente estabilizados", un término que, 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 lugar a tiempos de vida de circulación mejorada en relación con liposomas que carecen de tales lípidos especializados. Ejemplos de liposomas estabilizados estéricamente son aquellos en los que parte de la porción de lípido formador de vesículas de liposoma comprende uno o más glicolípidos o se derivatiza con uno o más polímeros hidrófilos, tales como un resto de polietilenglicol (PEG). Los liposomas y sus usos se describen adicionalmente en la patente de Estados Unidos. N° 6.287.860.

50 **[0190]** Se describen otros liposomas o sistemas de administración basados en lípidos conocidos en la técnica, por ejemplo en el documento WO 05/105152; WO 06/069782; Morrissey et al, Nature Biotechnology, 23 (8), 1002-1007., 2005; WO 05/007196; Wheeler et al, Gene Therapy, 6 (2), 271-281., 1999; WO 02/34236; Budker et al, Nature

Biotechnology, 14 (6), 760-764., 1996; US 5.965.434; US 5.635.487; Spagnou et al, Biochemistry, 43 (42), 13.348 a 13.356., 2004; US 6.756.054; WO 06/016097 y US 5.785.992; WO 04/035523.

[0191] En una realización preferida de la invención los liposomas anfóteros se pueden usar como formulaciones que incluyen los compuestos de antisentido mencionadas en las reivindicaciones. Liposomas anfotéricos son una clase de liposomas que tienen un tensioactivo aniónico o carga neutra a pH 7,5 y una carga catiónica a un pH de 4. Se hace referencia al documento WO 02/066012 por Panzner et al. El uso, la selección y la fabricación de liposomas anfóteros para la transfección de las células se describe adicionalmente en el documento WO 05/094783 de Endert et al., WO 07/031333 de Panzner et al., WO 07/107304 de Panzner et al. y WO 08/043575 de Panzner et al. Liposomas anfóteros tienen una excelente biodistribución y son bien tolerados en animales. Pueden encapsular moléculas de ácido nucleico con alta eficiencia. WO 06/048329 de Panzner et al., describe composiciones farmacéuticas que comprenden liposomas anfóteros y oligonucleótidos que están adaptados para dirigir ácidos nucleicos que codifican CD40.

[0192] Por "anfótero" se entiende en este documento que los liposomas comprenden grupos cargados tanto de carácter aniónico como catiónico en que:

- (i) al menos uno de los grupos cargados tiene un pKa entre 4 y 7,4,
- (ii) la carga catiónica prevalece a pH 4 y
- (iii) la carga aniónica prevalece a pH 7,4;

con lo que los liposomas tienen un punto isoeléctrico de carga neta cero entre pH 4 y pH 7,4. carácter anfótero, según esta definición, es diferente de "carácter zwitteriónico", debido a iones híbridos no tienen un pKa en el intervalo mencionado anteriormente. En consecuencia, zwitteriones son esencialmente neutrales en un intervalo de valores de pH. Fosfatidilcolina o fosfatidiletanolaminas, por ejemplo, son lípidos neutros, con carácter de ion híbrido.

[0193] Liposomas anfóteros pueden estar formados de una fase lipídica que comprende un lípido anfótero. En algunas realizaciones dicha fase lipídica puede comprender 5 a 30 mol.% de dicho lípido anfótero, preferiblemente 10 a 25 mol.%.

[0194] Lípidos anfóteros adecuados se describen en el documento WO 02/066489 y WO 03/070735 por Panzner et al. Preferentemente, dicho lípido anfótero se selecciona del grupo que consiste en HistChol, HistDG, isoHistSuccDG, acilcarosina y HCChol. (Un glosario de tales formas abreviadas de los nombres de los lípidos denominados en este documento se incluye a continuación para facilitar la referencia. Un número de tales abreviaturas son las que se usan comúnmente por los expertos en la técnica.)

[0195] Alternativamente, dichos liposomas anfóteros pueden estar formados de una fase lipídica que comprende una mezcla de componentes de lípidos con propiedades anfóteras. Tales liposomas anfóteros pueden formarse a partir de componentes aniónicos y/o catiónicos sensibles al pH, como se describe por ejemplo en WO 02/066012. Los lípidos catiónicos sensibles a pH se describen en WO 02/066489 y WO 03/070220 y en las referencias que se hacen en el mismo, en particular en Budker, et al. 1996, Nat Biotechnol. 14 (6): 760-4, y se puede utilizar en combinación con lípidos aniónicos constitutivamente cargados o con lípidos aniónicos que son sensibles al pH.

[0196] Alternativamente, la carga catiónica puede ser introducida a partir de lípidos constitutivamente cargados que son conocidos por los expertos en la técnica en combinación con un pH lípido aniónico sensible. Las combinaciones de lípidos aniónicos y catiónicos constitutivamente cargados, por ejemplo DOTAP y DPPG, no se prefieren. Así, en algunas formas de realización actualmente preferidas de la invención, dicha mezcla de los componentes de lípidos puede comprender (i) un lípido catiónico estable y un lípido aniónico cargable, (ii) un lípido catiónico cargable y lípido aniónico cargable o (iii) un lípido aniónico estable y un lípido catiónico cargable.

[0197] Componentes catiónicos preferidos incluyen DMTAP, DPTAP, DOTAP, DC-Chol, MoChol, HisChol, DPIM, CHIM, DORIE, DDAB, DAC-Chol, TC-Chol, DOTMA, DOGS, (C18)₂Gly⁺N, N-dioctadecilamido-glicina, CTAB, CPyC, DODAP y DOEPC.

[0198] Lípidos aniónicos preferidos para uso con la invención incluyen DOGSucc, POGSucc, DMGSucc, DPGSucc, DMPS, DPPS, DOPS, POPS, DMPG, DPPG, DOPG, POPG, DMPA, DPPA, DOPA, POPA, CHEMS y CetylP.

[0199] Preferiblemente, una mezcla de este tipo anfótero de lípidos no constituye más de aproximadamente 70 mol.% de la fase lipídica. En algunas realizaciones, dicha mezcla puede constituir no más de 50% en moles de la fase lipídica; preferiblemente dicha fase lipídica comprende aproximadamente 20 a aproximadamente 40 mol.% de tal mezcla.

[0200] En algunas realizaciones, dicha fase lipídica puede comprender además un lípido neutro, preferiblemente un fosfolípido neutro, tal como una fosfatidilcolina. Fosfatidilcolinas preferidas actualmente incluyen POPC, haba de soja PC natural o hidrogenado, PC de huevo natural o hidrogenado, DMPC, DPPC, DSPC y DOPC. Más preferiblemente, dicha fosfatidilcolina comprende POPC, PC de soja no hidrogenado o PC de huevo no hidrogenado.

- 5 [0201] La fase lipídica puede comprender al menos 15 mol.% de dicha fosfatidilcolina, preferiblemente al menos 20 mol.%. En algunas realizaciones, dicha fase lipídica puede comprender no menos de aproximadamente 25 mol.% de fosfatidilcolina. Alternativamente, dicha fase lipídica puede comprender no menos de aproximadamente 40 mol.% de fosfatidilcolina.
- 10 [0202] Una formulación actualmente preferida de acuerdo con la presente invención comprende un liposoma que tiene de aproximadamente 60 mol.% de POPC, aproximadamente 10 mol.% de DOTAP y aproximadamente 30 mol.% de CHEMS.
- 15 [0203] En algunas realizaciones dicho lípido neutro puede comprender una fosfatidiletanolamina o una mezcla de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina. Dichas fosfatidilcolinas neutras o fosfatidiletanolaminas o mezclas de ambas pueden estar presentes en la fase lipídica en la cantidad molar (mol.%) no constituida por los otros componentes de la fase lipídica, pero al menos 20 mol.% (siendo el total de la fase lipídica 100 mol.%).
- [0204] Fosfatidiletanolaminas preferidas incluyen DOPE, DMPE y DPPE.
- [0205] En algunas realizaciones dicho lípido neutro puede comprender POPC y DOPE.
- 20 [0206] Ventajosamente, dicha fase lipídica puede comprender una mezcla de lípidos aniónicos y catiónicos con propiedades de anfótero, fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina. Liposomas anfotéricos formados a partir de una fase de tales lípidos pueden ser estables en suero y por lo tanto adecuados para la administración sistémica. Preferiblemente, dicha fase lipídica comprende MoChol como un lípido catiónico y CHEMS o DMG-Succ como un lípido aniónico.
- 25 [0207] Liposomas anfóteros además actualmente preferidos para uso como formulaciones que incluyen los compuestos de antisentido de la presente invención pueden seleccionarse de entre el grupo que consiste en:
- (a) aproximadamente 15% en moles de POPC, alrededor del 45% en moles de DOPE, aproximadamente el 20% en moles MoChol y aproximadamente 20 mol% CHEMS;
- 30 (b) aproximadamente 10% en moles de POPC, alrededor del 30% en moles de DOPE, aproximadamente el 30% en moles MoChol y aproximadamente 30 mol% CHEMS;
- (c) aproximadamente 10% en moles de POPC, alrededor del 30% en moles de DOPE, aproximadamente el 20% en moles MoChol y aproximadamente 40 mol% CHEMS;
- 35 (d) aproximadamente 6 mol.% POPC, aproximadamente 24 mol.% DOPE, aproximadamente 47 mol.% MoChol y aproximadamente 23 mol.% CHEMS.
- [0208] Alternativamente, dicha fase lipídica puede comprender una mezcla de lípidos aniónicos y catiónicos con propiedades anfóteras, una fosfatidilcolina neutral y colesterol. Tales liposomas también pueden ser estables en suero. En algunas realizaciones, dicha fase lipídica puede comprender de 30 mol.% a 50 mol.% de colesterol, preferiblemente de aproximadamente 35 mol.% a aproximadamente 45 mol.%. Alternativamente, dicha fase lipídica puede comprender fosfatidilcolina y de 10 mol.% a 25 mol.% de colesterol, preferiblemente de aproximadamente 15 mol.% a aproximadamente 25 mol.%.
- 40 [0209] Una formulación actualmente preferida comprende 10 a 25 mol.% de lípidos anfóteros, por ejemplo HistChol, HistDG o acilcarnosina, 15 a 25 mol.% de colesterol y siendo el resto POPC, haba de soja PC, PC de huevo, DMPC, DPPC o DOPC, preferiblemente POPC; por ejemplo de aproximadamente 60 mol.% POPC, aproximadamente 20 mol.% HistChol y aproximadamente 20 mol.% Chol.
- 45 [0210] Otra formulación actualmente preferida de acuerdo con la presente invención comprende un liposoma que incluye una mezcla de componentes lipídicos con propiedades anfóteras y que tienen de aproximadamente 30 mol.% POPC, aproximadamente 10 mol.% DOTAP, alrededor de 20 mol.% CHEMS y aproximadamente 40 mol.% Chol.
- 50 [0211] Los liposomas anfóteros pueden tener un tamaño en el intervalo de 50 a 500 nm, preferiblemente de 100 a 500 nm, más preferiblemente 150 y 300 nm.
- 55 [0212] Las formulaciones de liposomas anfóteros para su uso según la presente invención se pueden formular para su uso como un coloide en un vehículo farmacológicamente aceptable adecuado. Vehículos tales como agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato y similares son bien conocidos para los expertos en la técnica para este propósito.
- 60 [0213] En algunas realizaciones, las formulaciones de liposomas anfóteros para su uso según la presente invención pueden administrarse a un pH fisiológico de entre aproximadamente 7 y aproximadamente 8. Para este fin, la formulación que comprende el compuesto antisentido, excipiente y vehículo se puede formular para tener un pH en este intervalo.
- 65

[0214] Las formulaciones de liposomas anfóteros para su uso según la invención pueden ser fabricadas usando métodos adecuados que son conocidos para los expertos en la técnica. Tales métodos incluyen, pero no se limitan a, extrusión a través de membranas de tamaño de poro definido, la inyección de soluciones de lípidos en etanol en una fase de agua que contiene la carga a ser encapsulada, o la homogeneización a alta presión.

[0215] Una solución del oligonucleótido puede ponerse en contacto con dicho excipiente a un pH neutro, lo que resulta en la inclusión de volumen de un cierto porcentaje de la solución. Altas concentraciones del excipiente, que van desde aproximadamente 50 mM a aproximadamente 150 mM, se prefiere para lograr la encapsulación sustancial del agente activo.

[0216] Liposomas anfóteros utilizados como formulaciones de acuerdo con la presente invención ofrecen la ventaja de oligonucleótidos de unión en o por debajo de su punto isoeléctrico, concentrando de ese modo dicho agente activo en la superficie del liposoma. Este proceso se describe con más detalle en el documento WO 02/066012.

[0217] Independientemente del proceso de producción real utilizado para hacer las formulaciones de liposomas anfóteros, en algunas realizaciones, oligonucleótido no encapsulado puede ser retirado de los liposomas después de la etapa de producción inicial en la que los liposomas se forman recipientes como estrechos. Una vez más, la literatura técnica y las referencias incluidas en este documento describen dicha metodología en detalle y pasos de proceso adecuados pueden incluir, pero no se limitan a, cromatografía de exclusión por tamaño, sedimentación, diálisis, ultrafiltración y diafiltración.

[0218] Sin embargo, no se requiere la eliminación de cualquier oligonucleótido no encapsulado para la realización de la invención, y en algunas realizaciones la composición puede comprender fármaco libre, así como atrapado.

[0219] En algunos aspectos de la invención, las formulaciones de liposomas anfóteros, que incluyen los compuestos de antisentido mencionados en las reivindicaciones pueden usarse como composiciones farmacéuticas para la prevención o tratamiento de un trastorno inflamatorio, inmunológico o autoinmune de un animal humano o no humano tal como rechazo de injerto, enfermedad de injerto contra huésped, esclerosis múltiple, eritematoso lupus sistémico, artritis reumatoide, asma, enfermedad inflamatoria del intestino, psoriasis o tiroiditis, enfermedad de Crohn y Colitis ulcerosa.

Glosario de nombres de lípidos abreviados comunes

[0220]

DMPC	Dimiristoilfosfatidilcolina
DPPC	DiPalmitoílofosfatidilcolina
DSPC	Diestearoilfosfatidilcolina
POPC	Palmitoílo-oleoilfosfatidilcolina
DOPC	Dioleoilfosfatidilcolina
DOPE	Dioleoilfosfatidiletanolamina
DMPE	Dimiristoilfosfatidiletanolamina
DPPE	DiPalmitoílofosfatidiletanolamina
DOPG	Dioleoilfosfatidilglicerol
POPG	Palmitoílo-oleoilfosfatidilglicerol
DMPG	Dimiristoilfosfatidilglicerol
DPPG	Dipalmitoílofosfatidilglicerina
DMPS	Dimiristoilfosfatidilserina
DPPS	Dipalmitoílofosfatidilserina
DOPS	Dioleoilfosfatidilserina
POPS	Palmitoílo-oleoilfosfatidilserina
DMPA	Ácido dimiristoilfosfatídico
DPPA	Ácido dipalmitoílofosfatídico
DOPA	Ácido dioleoilfosfatídico
POPA	Ácido palmitoílo-oleoilfosfatídico
CHEMS	Colesterolhemisuccinato
DC-Chol 3-	-[N-(N',N'-dimetiletano) carbamoílo] colesterol
CetylP	Cetilfosfato
DODAP	(1,2)-dioleoiloxipropilo)-N,N-dimetilamonio cloruro
DOEPC	1,2-dioleóilo-sn-glicero-3-etilfosfocolina
DAC-Chol 3-	(3-[N-(N',N'-dimetiletano) carbamoílo] colesterol
TC-Chol 3-	-[N-(N',N',N'-trimetilaminoetano) carbamoílo] colesterol
DOTMA	(1,2-dioleiloxipropil)-N,N,N-trimetilammoniumchlorid (Lipofectin®)
DOGS	((C18) ₂ GlySper3 ⁺) N,N-dioctadecilamido-glicilo-espermina (Transfectam®)
CTAB	Cetilo-trimetilamonio,
CPyC	Cetilo-piridiniocloruro

	DOTAP (1,2-dioleoiloxipropilo)-N,N, sal de N-trimetilamonio
	DMTAP (1,2-dimiristoiloxipropilo)-N,N,N-trimetilamonio sal
	DPTAP (1,2-dipalmitoiloxipropilo)-N,N, sal de N-trimetilamonio
	DOTMA (1,2-dioleoiloxipropil)-N,N,N-trimetilamonio cloruro)
5	DORIE (1,2-dioleoiloxipropilo)-3 amoniobromuro dimetilhidroxietilo)
	DDAB Bromuro de dimetildiocetadecilamonio
	DPIM 4-(2,3-bis-palmitoilooxi-propilo)-1-metilo-1H-imidazol
	CHIM Histaminilo-Colesterolcarbarnato
	MoCol 4-(2-aminoetilo)-Morfolino-Colesterolhemisuccinato
10	HisCol Histaminilo-Colesterolhemisuccinato.
	HCCol N -Histidinilo-Colesterolcarbarnato
	HistCol N -Histidinilo-colesterol-hemisuccinato.
	AC Acilcarnosina, estearilo- & Palmitoilcarnosina
15	HistDG 1,2-Dipalmitoiloglicerol-hemisuccinato-N -Histidinilo-hemisuccinato, y diestearoilo-, dimiristoilo-, dioleoilo- o palmitoilo-oleoilderivados
	IsoHistSuccDG 1,2-Dipalmitoiloglicerol-O -Histidinilo-N -hemisuccinato, y diestearoilo-, dimiristoilo-, dioleoilo- o Palmitoilo-oleoilderivados
	DGSucc 1,2-Dipalmitoiloglicerol-3-hemisuccinato y diestearoilo-, dimiristoilo- dioleoilo- o palmitoilo-oleoilderivados

20 **[0221]** Las formulaciones y composiciones farmacéuticas para uso de acuerdo con la presente invención también pueden incluir tensioactivos. El uso de tensioactivos en productos farmacéuticos, formulaciones y emulsiones es bien conocido en la técnica. Los surfactantes y sus usos se describen adicionalmente en la patente de los Estados Unidos. No. 6.287.860. En una realización, la presente invención emplea varios potenciadores de penetración para efectuar la administración eficiente de los ácidos nucleicos, particularmente oligonucleótidos. Además de ayudar a la

25 difusión de fármacos no lipofílicos a través de las membranas celulares, los potenciadores de penetración también potencian la permeabilidad de fármacos lipofílicos. Potenciadores de la penetración pueden clasificarse como pertenecientes a una de las cinco amplias categorías, es decir, agentes tensioactivos, ácidos grasos, sales biliares, agentes quelantes, y no quelantes no tensioactivos. Potenciadores de la penetración y sus usos se describen

30 adicionalmente en la patente de los Estados Unidos. No. 6.287.860.

[0222] Un experto en la técnica reconocerá que las formulaciones están diseñadas de forma rutinaria de acuerdo con su uso previsto, es decir, la vía de administración.

35 **[0223]** Las formulaciones preferidas para la administración tópica incluyen aquellas en las que los oligonucleótidos de la invención están en mezcla con un agente de administración tópica como por ejemplo lípidos, liposomas, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, esteroides, agentes quelantes y tensioactivos. Lípidos y liposomas preferidos incluyen lípidos neutros (por ejemplo dioleoilfosfatidilo etanolamina DOPE, dimiristoilfosfatidilo colina DMPC, distearoilfosfatidilo colina) negativo (por ejemplo, dimiristoilfosfatidilo glicerol DMPG); catiónicos (por ejemplo dioleoiltetrametilaminopropilo DOTAP y DOTMA dioleoilfosfatidilo etanolamina) o lípidos anfóteros o mezclas en las

40 que una mezcla de lípidos catiónicos y aniónicos muestra propiedades anfóteras. Para la administración tópica u otra, los oligonucleótidos de la invención pueden ser encapsulados dentro de liposomas o pueden formar complejos de los mismos, en particular para los liposomas catiónicos. Alternativamente, los oligonucleótidos pueden formar complejos con los lípidos, en particular, a los lípidos catiónicos. Prefieren los ácidos y ésteres grasos, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, y sus usos se describen adicionalmente en la patente de Estados Unidos. N° 6.287.860. Las formulaciones tópicas se describen en detalle en la solicitud de patente de EE.UU. N° 09/315.298 presentada el 20 de mayo de 1999.

50 **[0224]** Las composiciones y formulaciones para administración oral incluyen polvos o gránulos, micropartículas, nanopartículas, suspensiones o soluciones en agua o medios no acuosos, cápsulas, cápsulas de gel, sobrecitos, comprimidos o minitables. Espesantes, agentes aromatizantes, diluyentes, emulsionantes, coadyuvantes de dispersión o aglutinantes pueden ser deseables. Formulaciones orales preferidas son aquellas en las que oligonucleótidos de la invención se administran en combinación con potenciadores de uno o más de penetración de agentes tensioactivos y quelantes. Los tensioactivos preferidos incluyen ácidos grasos y/o ésteres o sales de los mismos, ácidos biliares y/o sales de los mismos. Ácidos biliares preferidos/sales y ácidos grasos y sus usos se describen adicionalmente en la patente de Estados Unidos. No. 6.287.860. 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 AUCD. Otros potenciadores de la penetración incluyen éter de polioxietileno-9-laurilo, éter de polioxietileno-20-cetilo. Los oligonucleótidos pueden estar administrados por vía oral, en forma granular que incluye partículas secas pulverizadas, o complejadas para formar micro o nanopartículas. Agentes complejantes de oligonucleótidos y sus usos se describen adicionalmente en la patente de los Estados Unidos N° 6.287.860. Las formulaciones orales para oligonucleótidos y su preparación se describen en detalle en la patente de los Estados Unidos N° 6.887.906, la solicitud de patente de Estados Unidos N° 09/315.298 (presentada el 20 de mayo de 1999) y US 2003-0027780 A1.

60

65 **[0225]** Las composiciones y formulaciones para la administración parenteral, intratecal o intraventricular pueden incluir soluciones acuosas estériles que también pueden contener tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados

tales como, pero no limitados a, potenciadores de la penetración, compuestos portadores y otros vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables.

[0226] También se describen en este documento composiciones farmacéuticas que contienen uno o más compuestos oligoméricos y uno o más de otros agentes activos que funcionan por un mecanismo no antisentido, tal como por ejemplo, agentes quimioterapéuticos o fármacos antiinflamatorios. Ejemplos de tales agentes quimioterapéuticos incluyen, pero no se limitan a los fármacos quimioterapéuticos contra el cáncer tales como daunorrubicina, daunomicina, dactinomicina, doxorubicina, epirubicina, idarubicina, esorubicina, bleomicina, mafosfamida, ifosfamida, arabinósido de citosina, bis-cloroetilnitrosourea, busulfán, mitomicina C, actinomicina D, mitramicina, prednisona, hidroxiprogesterona, testosterona, tamoxifeno, dacarbazina, procarbazona, hexametilmelamina, pentametilmelamina, mitoxantrona, amsacrina, clorambucilo, metilciclohexilnitrosourea, mostazas nitrogenadas, melfalán, ciclofosfamida, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-azacitidina, hidroxiurea, desoxicoformicina, 4-hidroxiperoxiciclofosforamida, 5-fluorouracilo (5-FU), 5-fluorodesoxiuridina (5-FUdR), metotrexato (MTX), colchicina, taxol, vincristina, vinblastina, etopósido (VP-16), trimetrexato, irinotecan, topotecan, gemcitabina, tenipósido, cisplatino y dietilestilbestrol (DES). Cuando se utiliza con los compuestos de la invención, tales agentes quimioterapéuticos pueden usarse individualmente (por ejemplo, 5-FU y oligonucleótido), secuencialmente (por ejemplo, 5-FU y oligonucleótido durante un periodo de tiempo seguido de MTX y oligonucleótido), o en combinación con uno o más otros agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, 5-FU, MTX y oligonucleótido, o 5-FU, la radioterapia y oligonucleótidos).

[0227] Los fármacos anti-inflamatorios, incluyendo pero no limitados a los fármacos antiinflamatorios no esteroideos y corticosteroides, y fármacos antivirales, incluyendo, pero no limitados a, ribavirina, vidarabina, aciclovir y ganciclovir, se pueden combinar en composiciones para uso de acuerdo con la invención. Las combinaciones de los compuestos de antisentido y otros fármacos no antisentido también se describen en este documento. Dos o más compuestos combinados pueden utilizarse juntos o secuencialmente.

[0228] En otra realización relacionada, las composiciones para uso de acuerdo con la invención pueden contener uno o más compuestos antisentido, particularmente oligonucleótidos, dirigidos a un primer ácido nucleico y uno o más compuestos de antisentido adicionales dirigidos a un segundo ácido nucleico diana. Alternativamente, las composiciones para uso de acuerdo con la invención pueden contener dos o más compuestos de antisentido dirigidos a diferentes regiones del mismo ácido nucleico diana. Numerosos ejemplos de compuestos de antisentido se conocen en la técnica. Dos o más compuestos combinados pueden utilizarse juntos o secuencialmente.

Cultivo de células y tratamiento de compuestos antisentido

[0229] Los efectos de los compuestos de antisentido sobre el nivel, la actividad o expresión de ácidos nucleicos CD40 pueden ser probados *in vitro* en una variedad de tipos de células. Los tipos celulares utilizados para tales análisis están disponibles de proveedores comerciales (*p.ej.* American Type Culture Collection, Manassus, VA; Zen-Bio, Inc., Research Triangle Park, NC; Clonetics Corporation, Walkersville, MD) y las células se cultivan de acuerdo a las instrucciones del proveedor, utilizando reactivos disponibles comercialmente (por ejemplo Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). Tipos celulares ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, células HepG2, células Hep3B, células HUVEC, T24, A549, y hepatocitos primarios.

Pruebas in vitro de oligonucleótidos antisentido

[0230] Se describen aquí procedimientos para el tratamiento de células con oligonucleótidos antisentido, que pueden ser modificados apropiadamente para el tratamiento con otros compuestos antisentido.

[0231] En general, las células se tratan con oligonucleótidos de antisentido cuando las células alcanzan aproximadamente el 60-80% de confluencia en cultivo.

[0232] Un reactivo comúnmente usado para introducir oligonucleótidos de antisentido en células cultivadas incluye el reactivo de transfección de lípidos catiónicos LIPOFECTIN® (Invitrogen, Carlsbad, CA). Los oligonucleótidos de antisentido se mezclan con LIPOFECTIN® en OPTI-MEM® 1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) para alcanzar la concentración final deseada de oligonucleótido antisentido y una concentración de LIPOFECTIN® que varía típicamente de 2 a 12 ug/ml por 100 nM oligonucleótido antisentido.

[0233] Otro reactivo usado para introducir oligonucleótidos de antisentido en células cultivadas incluye LIPOFECTAMINE® (Invitrogen, Carlsbad, CA). Oligonucleótido antisentido se mezcla con LIPOFECTAMINE® en OPTI-MEM® 1 medio de suero reducido (Invitrogen, Carlsbad, CA) para alcanzar la concentración deseada de oligonucleótido antisentido y una concentración LIPOFECTAMINE® que varía típicamente de 2 a 12 ug/ml por 100 nM oligonucleótido antisentido.

[0234] Las células se tratan con oligonucleótidos de antisentido por métodos de rutina. Las células se recogen típicamente 16-24 horas después del tratamiento oligonucleótido antisentido, en el que el ARN tiempo o los niveles de proteína de ácidos nucleico diana se miden por métodos conocidos en la técnica y se describen en este

documento. En general, cuando los tratamientos se realizan en múltiples repeticiones, los datos se presentan como la media de los tratamientos repetidos.

[0235] La concentración de oligonucleótido antisentido utilizado varía de línea celular a línea celular. Los métodos para determinar la concentración óptima de oligonucleótidos de antisentido para una línea celular particular, son bien conocidos en la técnica. Oligonucleótidos de antisentido se usan típicamente en concentraciones que van de 1 nM a 300 nM.

Aislamiento de ARN

[0236] El análisis de ARN puede llevarse a cabo en el ARN celular total o poli(A) + ARNm. Los métodos de aislamiento de ARN son bien conocidos en la técnica. El ARN se preparó utilizando métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, usando el reactivo TRIZOL® (Invitrogen, Carlsbad, CA) según los protocolos recomendados por el fabricante.

Análisis de la inhibición de los niveles o expresión diana

[0237] La inhibición de los niveles o la expresión de un ácido nucleico CD40 se puede ensayar en una variedad de formas conocidas en la técnica. Por ejemplo, se dirigen a los niveles de ácido nucleico se pueden cuantificar mediante, por ejemplo, análisis de transferencia Northern, reacción de la polimerasa competitiva cadena (PCR), o cuantitativa en tiempo real PCR. El análisis de ARN puede llevarse a cabo en el ARN celular total o poli(A) + ARNm. Los métodos de aislamiento de ARN son bien conocidos en la técnica. Análisis de transferencia Northern también es rutinario en la técnica. PCR cuantitativa en tiempo real puede realizarse convenientemente usando el ABI PRISM 7600, 7700, o 7900 Sequence Detection System disponible comercialmente, disponible de PE-Applied Biosystems, Foster City, CA y que se utiliza de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Análisis PCR cuantitativo en tiempo real de niveles de ARN diana

[0238] La cuantificación de los niveles de ARN diana se puede realizar por PCR cuantitativa en tiempo real usando el ABI PRISM® 7600, 7700, o 7900 Sequence Detection System (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA) según las instrucciones del fabricante. Métodos de PCR cuantitativa en tiempo real son bien conocidos en la técnica.

[0239] Antes de la PCR en tiempo real, el ARN aislado se somete a una reacción de transcriptasa inversa (RT), que produce ADN complementario (ADNc) que se utiliza entonces como el sustrato para la amplificación por PCR en tiempo real. El RT y las reacciones de PCR en tiempo real se llevan a cabo secuencialmente en el mismo pocillo de muestra. Los reactivos RT y PCR en tiempo real se obtuvieron de Invitrogen (Carlsbad, CA). Reacciones de RT, PCR en tiempo real se llevan a cabo por métodos bien conocidos por los expertos en la técnica.

[0240] Cantidades diana de genes (o ARN) obtenidas por PCR en tiempo real se normalizan utilizando ya sea el nivel de expresión de un gen cuya expresión es constante, tal como GAPDH o cuantificando el ARN total usando RiboGreen® (Invitrogen, Inc. Carlsbad, CA). Expresión de GAPDH se cuantifica mediante PCR en tiempo real, al ejecutarse simultáneamente con la diana, la multiplexación, o por separado. El ARN total se cuantificó usando reactivo de cuantificación de RNA de RiboGreen® (Invitrogen, Inc. Eugene, OR). Los métodos de cuantificación del ARN por RiboGreen® se enseñan en Jones, LJ, et al, (Analytical Biochemistry, 1998, 265, 368-374). Un instrumento CYTOFLUOR® 4000 (PE Applied Biosystems) se utiliza para medir la fluorescencia RiboGreen®.

[0241] Las sondas y cebadores se diseñan para hibridar con un ácido nucleico CD40. Los métodos para diseñar sondas y cebadores de PCR en tiempo real son bien conocidos en la técnica, y pueden incluir el uso de software de tipo PRIMER Express® Software (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Análisis de niveles de proteína

[0242] La inhibición antisentido de los ácidos nucleicos de CD40 se puede evaluar mediante la medición de los niveles de proteína CD40. Los niveles de proteína de CD40 pueden ser evaluados o cuantificados en una variedad de maneras bien conocidas en la técnica, tales como inmunoprecipitación, análisis de transferencia Western (inmunotransferencia), ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), ensayos de proteína cuantitativos, ensayos de actividad de la proteína (por ejemplo, ensayos de actividad de la caspasa), inmunohistoquímica, inmunocitoquímica o células activadas por fluorescencia (FACS). Los anticuerpos dirigidos a una diana pueden ser identificados y obtenidos a partir de una variedad de fuentes, como el catálogo MSRS de anticuerpos (Aerie Corporation, Birmingham, MI), o se pueden preparar a través de métodos de generación de anticuerpos monoclonales o policlonales convencionales bien conocidos en la técnica. Los anticuerpos útiles para la detección de CD40 de rata humana están disponibles comercialmente.

Ensayo in vivo de los compuestos antisentido

[0243] Los compuestos antisentido, por ejemplo, oligonucleótidos antisentido, se ensayan en animales para evaluar

su capacidad para inhibir la expresión de CD40 y producir cambios fenotípicos, tales como cambios en la morfología celular en el tiempo o tratamiento de dosis, así como cambios en los niveles de los componentes celulares tales como proteínas, ácidos nucleicos, hormonas, citoquinas, y eosinófilos. Las pruebas pueden llevarse a cabo en animales normales, o en modelos de enfermedad experimentales. Para la administración a animales, los oligonucleótidos de antisentido se formulan en un diluyente farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina tamponada con fosfato. La administración incluye administración pulmonar, administración en aerosol, administración tópica, y vías de administración parenterales, tales como intraperitoneal, intravenosa y subcutánea. El cálculo de la dosis de oligonucleótido 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 peso del cuerpo del animal. Tras un período de tratamiento con oligonucleótidos antisentido, el ARN se aisló de tejido de hígado y se miden los cambios en la expresión de ácido nucleico CD40.

Ciertas indicaciones

[0244] También se describen en este documento métodos de tratamiento de un individuo que comprende administrar una o más composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento. En ciertos casos, el individuo tiene un trastorno inflamatorio o hiperproliferativo. También se describen en este documento métodos para reducir profilácticamente la expresión de CD40 en un individuo. Ciertos casos incluyen el tratamiento de un individuo en necesidad del mismo mediante la administración a un individuo de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico CD40.

[0245] En un caso, la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico CD40 se acompaña de monitoreo de eosinófilos en un individuo, para determinar la respuesta de un individuo a la administración del compuesto antisentido. La respuesta de un individuo a la administración del compuesto antisentido es utilizado por un médico para determinar la cantidad y la duración de la intervención terapéutica.

[0246] En un caso, la administración de un compuesto antisentido dirigido a un resultado de ácido nucleico CD40 en la reducción de la expresión de CD40 en al menos un 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 99%, o de un rango definido por dos de estos valores. En algunos casos, la administración de un compuesto CD40 antisentido aumenta la medida de al menos 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 99%, o de un rango definido por dos de estos valores. En algunos casos, la administración de un compuesto CD40 antisentido disminuye la medida por al menos 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 99%, o de un rango definido por dos de estos valores.

[0247] En ciertos casos, la composición farmacéutica que comprende un compuesto antisentido dirigido a CD40 se usa para la preparación de un medicamento para tratar un paciente que sufre o es susceptible a una afección inflamatoria o un trastorno hiperproliferativo.

[0248] La formulación de composiciones terapéuticas y su posterior administración (dosificación) se cree que está dentro de la experiencia de expertos en la técnica. La dosificación depende de la gravedad y capacidad de respuesta del estado de enfermedad a tratar, con el curso del tratamiento que dura de varios días a varios meses, o hasta que una cura se efectúe o se logre una disminución del estado de enfermedad. Los programas de dosificación óptimos pueden calcularse a partir de mediciones de la acumulación de fármaco en el cuerpo del paciente. Las personas de experiencia normal pueden determinar fácilmente las dosificaciones óptimas, metodologías de dosificación y tasas de repetición. Las dosificaciones óptimas pueden variar dependiendo de la potencia relativa de oligonucleótidos individuales, y generalmente pueden ser estimadas basadas en CE50 encontrado para ser eficaz en modelos animales in vitro e in vivo. En general, la dosis es de 0,01 ug a 100 g por kg de peso corporal, y puede administrarse una o más veces diariamente, semanalmente, mensualmente o anualmente, o incluso una vez cada 2 a 20 años. Las personas con experiencia ordinaria en la técnica pueden estimar fácilmente las tasas de repetición para la dosificación en base a los tiempos y concentraciones del fármaco en fluidos o tejidos corporales de residencia medidos. Tras un tratamiento exitoso, puede ser deseable hacer que el paciente se someta a terapia de mantenimiento para prevenir la recurrencia del estado de enfermedad, donde el oligonucleótido se administra en dosis de mantenimiento, que van desde 0,01 ug a 100 g por kg de peso corporal, una vez o más al día, a una vez cada 20 años.

Ciertas terapias de combinación

[0249] En ciertos casos, una o más composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento se administran conjuntamente con uno o más de otros agentes farmacéuticos. En ciertos casos, dichos uno o más agentes farmacéuticos distintos están diseñados para tratar la misma enfermedad o condición como las una o más composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento. En ciertos casos, dichos uno o más agentes farmacéuticos distintos están diseñados para tratar una enfermedad o afección diferente como las una o más composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento. En ciertos casos, dichos uno o más agentes farmacéuticos distintos están diseñados para tratar un efecto no deseado de una o más composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento. En ciertos casos, una o más composiciones farmacéuticas

descritas en el presente documento se administran conjuntamente con otro agente farmacéutico para tratar un efecto no deseado de ese otro agente farmacéutico. En ciertos casos, una o más composiciones farmacéuticas descritas en este documento y uno o más agentes farmacéuticos distintos se administran al mismo tiempo. En ciertos casos, una o más composiciones farmacéuticas descritas en este documento y uno o más agentes farmacéuticos distintos se administran en momentos diferentes. En ciertos casos, una o más composiciones farmacéuticas descritas en este documento y uno o más agentes farmacéuticos se preparan juntos en una única formulación. En ciertos casos, una o más composiciones farmacéuticas descritas en este documento y uno o más agentes farmacéuticos distintos se preparan por separado.

[0250] En ciertos casos, los agentes farmacéuticos que se pueden administrar de forma conjunta con una composición farmacéutica descrita en este documento incluyen esteroides y/o agentes quimioterapéuticos. En ciertas de dichas instancias, los agentes farmacéuticos que se pueden administrar de forma conjunta con una composición farmacéutica descrita incluyen, pero no se limitan a la prednisona, corticoesteroides, y paclitaxel. En ciertos casos, el agente se administra antes de la administración de una composición farmacéutica descrita en este documento. En ciertos casos, el agente se administra después de la administración de una composición farmacéutica descrita en este documento. En ciertos de dichos casos el agente se administra al mismo tiempo como una composición farmacéutica descrita en este documento. En ciertos de dichos casos la dosis de un agente co-administrado es la misma que la dosis que se administraría si el agente se administrara solo. En ciertos de dichos casos la dosis de un agente co-administrado es menor que la dosis que se administraría si el agente se administrara solo. En ciertos de dichos casos la dosis de un agente co-administrado es mayor que la dosis que se administraría si el agente se administrara solo.

[0251] En ciertos casos, la co-administración de un segundo compuesto potencia el efecto de un primer compuesto, de tal modo que la co-administración de los compuestos resulta en un efecto que es mayor que el efecto de la administración del primer compuesto solo. En otros casos, la co-administración se traduce en efectos que son aditivos de los efectos de los compuestos cuando se administran solos. En otros casos, la co-administración se traduce en efectos que son supra-aditivos de los efectos de los compuestos cuando se administran solos. En algunos casos, el primer compuesto es un compuesto antisentido. En algunos casos, el segundo compuesto es un compuesto antisentido.

EJEMPLOS

Divulgación no limitante

[0252] Mientras que ciertos compuestos, composiciones y métodos descritos en el presente documento se han descrito con especificidad de acuerdo con ciertas realizaciones, los siguientes ejemplos sirven solamente para ilustrar los compuestos descritos en este documento y no están destinados a limitar los mismos.

Ejemplo 1: Inhibición antisentido de CD40 humano *in vitro*

[0253] Los oligonucleótidos de antisentido dirigidos a un ácido nucleico CD40 se ensayaron para determinar sus efectos sobre CD40 ARNm *in vitro*. Cuando las células cultivadas, cultivadas en una placa de 96 pocillos, alcanzaron 80% de confluencia, fueron tratadas con 150 nM de oligonucleótido antisentido. Después de un período de tratamiento de aproximadamente 24 horas, se aisló ARN de las células y los niveles de CD40 ARNm se midieron por PCR cuantitativa en tiempo real, como se describe en el presente documento. Los niveles de ARNm de CD40 se ajustaron de acuerdo con el contenido de ARN total medido mediante normalización a RiboGreen®. Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición de CD40, respecto a las células de control no tratadas en la Tabla 1.

[0254] Los oligonucleótidos de antisentido se diseñaron como 18-meros con cadenas principales de fosforotioato (enlaces internucleósido). "Sitio diana 5'" indica el nucleótido más 5' al que el oligonucleótido antisentido está dirigido SEQ ID NO: 1 (GENBANK® Nº de acceso X60592.1). Los datos son los promedios de tres experimentos.

ES 2 641 290 T3

Inhibición de niveles humanos de ARNm CD40 por oligodeoxinucleótidos de fosforotioato							
Oligo ID	SEQ ID NO diana	Sitio de inicio diana	Sitio de parada diana	Región diana	Secuencia (5' a 3')	% Inhibición	SEQ ID NO
18623	1	18	35	5'UTR	CCAGGCGGCAGGACCACT	31	5
18624	1	20	37	5'UTR	GACCAGGCGGCAGGACCA	28	6
18625	1	26	43	5'UTR	AGGTGAGACCAGGCGGCA	22	7
18626	1	48	65	AUG	CAGAGGCAGACGAACCAT	0	8
18627	1	49	66	Codificación	GCAGAGGCAGACGAACCA	0	9
18628	1	73	90	Codificación	GCAAGCAGCCCCAGAGGA	0	10
18629	1	78	95	Codificación	GGTCAGCAAGCAGCCCCA	30	11
18630	1	84	101	Codificación	GACAGCGGTCAGCAAGCA	0	12
18631	1	88	105	Codificación	GATGGACAGCGGTCAGCA	0	13
18632	1	92	109	Codificación	TCTGGATGGACAGCGGTC	0	14
18633	1	98	115	Codificación	GGTGGTTCTGGATGGACA	0	15
18634	1	101	118	Codificación	GTGGGTGGTTCTGGATGG	0	16
18635	1	104	121	Codificación	GCAGTGGGTGGTTCTGGA	0	17
18636	1	152	169	Codificación	CACAAAGAACAGCACTGA	0	18
18637	1	156	173	Codificación	CTGGCACAAAGAACAGCA	0	19
18638	1	162	179	Codificación	TCCTGGCTGGCACAAAGA	0	20
18639	1	165	182	Codificación	CTGTCTGGCTGGCACAA	5	21
18640	1	176	193	Codificación	CTCACCAGTTTCTGTCT	0	22
18641	1	179	196	Codificación	TCACTCACCAGTTTCTGT	0	23
18642	1	185	202	Codificación	GTGCAGTCACTCACCAGT	0	24
18643	1	190	207	Codificación	ACTCTGTGCAGTCACTCA	0	25
18644	1	196	213	Codificación	CAGTGAACCTGTGCAGT	5	26
18645	1	205	222	Codificación	ATTCCGTTTCAGTGAAC	0	27
18646	1	211	228	Codificación	GAAGGCATTCCGTTTCAG	9	28
18647	1	222	239	Codificación	TTCACCGCAAGGAAGGCA	0	29
18648	1	250	267	Codificación	CTCTGTTCCAGGTGTCTA	0	30
18649	1	267	284	Codificación	CTGGTGGCAGTGTGTCTC	0	31
18650	1	286	303	Codificación	TGGGGTCGCAGTATTTGT	0	32
18651	1	289	306	Codificación	GGTTGGGGTCGCAGTATT	0	33
18652	1	292	309	Codificación	CTAGGTTGGGGTCGCAGT	0	34
18653	1	318	335	Codificación	GGTGCCCTTCTGCTGGAC	20	35
18654	1	322	339	Codificación	CTGAGGTGCCCTTCTGCT	16	36
18655	1	332	349	Codificación	GTGTCTGTTTCTGAGGTG	0	37
18656	1	334	351	Codificación	TGGTGTCTGTTTCTGAGG	0	38
18657	1	345	362	Codificación	ACAGGTGCAGATGGTGTG	0	39
18658	1	348	365	Codificación	TTCACAGGTGCAGATGGT	0	40
18659	1	360	377	Codificación	GTGCCAGCCTTCTTCA	6	41
18660	1	364	381	Codificación	TACAGTGCCAGCCTTCTT	8	42
18661	1	391	408	Codificación	GGACACAGCTCTCACAGG	0	43
18662	1	395	412	Codificación	TGCAGGACACAGCTCTCA	0	44
18663	1	401	418	Codificación	GAGCGGTGCAGGACACAG	0	45
18664	1	416	433	Codificación	AAGCCGGGCGAGCATGAG	0	46
18665	1	432	449	Codificación	AATCTGCTTGACCCAAA	6	47
18666	1	446	463	Codificación	GAAACCCCTGTAGCAATC	0	48

Inhibición de niveles humanos de ARNm CD40 por oligodeoxinucleótidos de fosforotioato								
Oligo ID	SEQ ID NO diana	Sitio de inicio diana	Sitio de parada diana	Región diana	Secuencia (5' a 3')	% Inhibición	SEQ ID NO	
5	18667	1	452	469	Codificación	GTATCAGAAACCCCTGTA	0	49
	18668	1	463	480	Codificación	GCTCGCAGATGGTATCAG	0	50
	18669	1	468	485	Codificación	GCAGGGCTCGCAGATGGT	34	51
10	18670	1	471	488	Codificación	TGGGCAGGGCTCGCAGAT	0	52
	18671	1	474	491	Codificación	GACTGGGCAGGGCTCGCA	3	53
	18672	1	490	507	Codificación	CATTGGAGAAGAAGCCGA	0	54
	18673	1	497	514	Codificación	GATGACACATTGGAGAAG	0	55
15	18674	1	500	517	Codificación	GCAGATGACACATTGGAG	0	56
	18675	1	506	523	Codificación	TCGAAAGCAGATGACACA	0	57
	18676	1	524	541	Codificación	GTCCAAGGGTGACATTTT	8	58
	18677	1	532	549	Codificación	CACAGCTTGTCCAAGGGT	0	59
20	18678	1	539	556	Codificación	TTGGTCTCACAGCTTGTC	0	60
	18679	1	546	563	Codificación	CAGGTCTTTGGTCTCACA	7	61
	18680	1	558	575	Codificación	CTGTTGCACAACCAGGTC	19	62
	18681	1	570	587	Codificación	GTTTGTGCCTGCCTGTTG	2	63
25	18682	1	575	592	Codificación	GTCTTGTGTGCCTGCC	0	64
	18683	1	590	607	Codificación	CCACAGACAACATCAGTC	0	65
	18684	1	597	614	Codificación	CTGGGGACCACAGACAAC	0	66
	18685	1	607	624	Codificación	TCAGCCGATCCTGGGGAC	0	67
30	18686	1	621	638	Codificación	CACCACCAGGGCTCTCAG	23	68
	18687	1	626	643	Codificación	GGGATCACCACCAGGGCT	0	69
	18688	1	657	674	Codificación	GAGGATGGCAAACAGGAT	0	70
	18689	1	668	685	Codificación	ACCAGCACAAGAGGATG	0	71
35	18690	1	679	696	Codificación	TTTTGATAAAGACCAGCA	0	72
	18691	1	703	720	Codificación	TATTGGTTGGCTTCTTGG	0	73
	18692	1	729	746	Codificación	GGGTTCTGCTTGGGGTG	0	74
	18693	1	750	767	Codificación	GTGGGAAAATTGATCTC	0	75
40	18694	1	754	771	Codificación	GATCGTCGGAAAATTGA	0	76
	18695	1	765	782	Codificación	GGAGCCAGGAAGATCGTC	0	77
	18696	1	766	783	Codificación	TGGAGCCAGGAAGATCGT	0	78
	18697	1	780	797	Codificación	TGGAGCAGCAGTGTGGGA	0	79
45	18698	1	796	813	Codificación	GTAAAGTCTCCTGCACTG	0	80
	18699	1	806	823	Codificación	TGGCATCCATGTAAAGTC	0	81
	18700	1	810	827	Codificación	CGGTTGGCATCCATGTAA	0	82
	18701	1	834	851	Codificación	CTCTTTGCCATCCTCCTG	4	83
50	18702	1	861	878	Codificación	CTGTCTCTCCTGCACTGA	0	84
	18703	1	873	890	Parar	GGTGCAGCCTCACTGTCT	0	85
	18704	1	910	927	3'UTR	AACTGCCTGTTTGCCAC	34	86
	18705	1	954	971	3'UTR	CTTCTGCCTGCACCCCTG	0	87
55	18706	1	976	993	3'UTR	ACTGACTGGGCATAGCTC	0	88

Ejemplo 2: Inhibición antisentido de CD40 humano *in vitro*

60 **[0255]** Se analizaron los oligonucleótidos antisentido dirigidos a un ácido nucleico CD40 para determinar sus efectos sobre el ARNm de CD40 *in vitro*. Se trataron células T24 a una densidad de 7000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos con oligonucleótido antisentido 150 nM. Después de un período de tratamiento de aproximadamente 24 horas, se aisló ARN de las células y se midieron los niveles de ARNm de CD40 mediante PCR cuantitativa en tiempo real, como se describe en la presente memoria. Los niveles de ARNm de CD40 se ajustaron de acuerdo con el contenido de GAPDH, un gen doméstico. Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición de CD40, en relación con las células de control no tratadas en la Tabla 2.

[0256] Los oligonucleótidos antisentido se diseñaron como 4-10-4 gápmers, donde el segmento de hueco comprende 2'-desoxinucleótidos y cada segmento de ala comprende nucleótidos 2'-MOE y sustituciones de 5-metilcitosina. Los oligonucleótidos antisentido comprenden esqueletos de fosforotioato (enlaces internucleósidos) a lo largo de todo el proceso. "Sitio diana 5'" indica el nucleótido más 5' al que el oligonucleótido antisentido está dirigido a la SEQ ID NO: 1 (Nº de Acceso GENBANK® X60592.1). Los datos son promedios de tres experimentos. "ND" indica que no se ha determinado un valor.

Inhibición de niveles ARNm CD40 por oligonucleótidos quiméricos teniendo alas 4-10-4 y hueco de deoxi							
Oligo ID	SEQ ID NO diana	Sitio de inicio diana	Sitio de parada diana	Región diana	Secuencia (5' a 3')	% Inhibición	SEQ ID NO
19211	1	18	35	5'UTR	CCAGGCGGCAGGACCACT	76	5
19212	1	20	37	5'UTR	GACCAGGCGGCAGGACCA	77	6
19213	1	26	43	5'UTR	AGGTGAGACCAGGCGGCA	81	7
19214	1	48	65	AUG	CAGAGGCAGACGAACCAT	24	8
19215	1	49	66	Codificación	GCAGAGGCAGACGAACCA	46	9
19216	1	73	90	Codificación	GCAAGCAGCCCCAGAGGA	66	10
19217	1	78	95	Codificación	GGTCAGCAAGCAGCCCCA	75	11
19218	1	84	101	Codificación	GACAGCGGTCAGCAAGCA	67	12
19219	1	88	105	Codificación	GATGGACAGCGGTCAGCA	65	13
19220	1	92	109	Codificación	TCTGGATGGACAGCGGTC	79	14
19221	1	98	115	Codificación	GGTGGTTCTGGATGGACA	81	15
19222	1	101	118	Codificación	GTGGGTGGTTCTGGATGG	58	16
19223	1	104	121	Codificación	GCAGTGGGTGGTTCTGGGA	74	17
19224	1	152	169	Codificación	CACAAAGAAGCAGCACTGA	40	18
19225	1	156	173	Codificación	CTGGCACAAGAAGCAGCA	60	19
19226	1	162	179	Codificación	TCCTGGCTGGCACAAGA	10	20
19227	1	165	182	Codificación	CTGTCCTGGCTGGCACA	24	21
19228	1	176	193	Codificación	CTCACCAGTTTCTGTCT	22	22
19229	1	179	196	Codificación	TCACTCACCAGTTTCTGT	41	23
19230	1	185	202	Codificación	GTGCAGTCACTCACCAGT	82	24
19231	1	190	207	Codificación	ACTCTGTGCAGTCACTCA	38	25
19232	1	196	213	Codificación	CAGTGAAGTCTGTGCAGT	40	26
19233	1	205	222	Codificación	ATTCCGTTTTCAGTGAAGT	56	27
19234	1	211	228	Codificación	GAAGGCATTCCGTTTCAG	32	28
19235	1	222	239	Codificación	TCACCGCAAGGAAGGCA	61	29
19236	1	250	267	Codificación	CTCTGTTCCAGGTGTCTA	62	30
19237	1	267	284	Codificación	CTGGTGGCAGTGTGTCTC	70	31
19238	1	286	303	Codificación	TGGGGTCGCAGTATTTGT	0	32
19239	1	289	306	Codificación	GGTTGGGGTCGCAGTATT	19	33
19240	1	292	309	Codificación	CTAGGTTGGGGTCGCAGT	36	34
19241	1	318	335	Codificación	GGTGCCCTTCTGCTGGAC	79	35
19242	1	322	339	Codificación	CTGAGGTGCCCTTCTGCT	70	36
19243	1	332	349	Codificación	GTGTCTGTTTCTGAGGTG	63	37
19244	1	334	351	Codificación	TGGTGTCTGTTTCTGAGG	43	38
19245	1	345	362	Codificación	ACAGGTGCAGATGGTGTG	73	39
19246	1	348	365	Codificación	TTCACAGGTGCAGATGGT	48	40
19247	1	360	377	Codificación	GTGCCAGCCTTCTTACA	61	41
19248	1	364	381	Codificación	TACAGTGCCAGCCTTCTT	47	42
19249	1	391	408	Codificación	GGACACAGCTCTCACAGG	0	43
19250	1	395	412	Codificación	TGCAGGACACAGCTCTCA	52	44
19251	1	401	418	Codificación	GAGCGGTGCAGGACACAG	50	45

ES 2 641 290 T3

Inhibición de niveles ARNm CD40 por oligonucleótidos quiméricos teniendo alas 4-10-4 y hueco de deoxi								
Oligo ID	SEQ ID NO diana	Sitio de inicio diana	Sitio de parada diana	Región diana	Secuencia (5' a 3')	% Inhibición	SEQ ID NO	
5	19252	1	416	433	Codificación	AAGCCGGGCGAGCATGAG	32	46
	19253	1	432	449	Codificación	AATCTGCTTGACCCCAA	0	47
10	19254	1	446	463	Codificación	GAAACCCCTGTAGCAATC	0	48
	19255	1	452	469	Codificación	GTATCAGAAACCCCTGTA	36	49
	19256	1	463	480	Codificación	GCTCGCAGATGGTATCAG	65	50
	19257	1	468	485	Codificación	GCAGGGCTCGCAGATGGT	75	51
15	19258	1	471	488	Codificación	TGGGCAGGGCTCGCAGAT	0	52
	19259	1	474	491	Codificación	GACTGGGCAGGGCTCGCA	82	53
	19260	1	490	507	Codificación	CATTGGAGAAGAAGCCGA	41	54
	19261	1	497	514	Codificación	GATGACACATTGGAGAAG	14	55
20	19262	1	500	517	Codificación	GCAGATGACACATTGGAG	78	56
	19263	1	506	523	Codificación	TCGAAAGCAGATGACACA	59	57
	19264	1	524	541	Codificación	GTCCAAGGGTGACATTTT	71	58
	19265	1	532	549	Codificación	CACAGCTTGTCCAAGGGT	0	59
25	19266	1	539	556	Codificación	TTGGTCTCACAGCTTGTC	46	60
	19267	1	546	563	Codificación	CAGGTCTTTGGTCTCACA	64	61
	19268	1	558	575	Codificación	CTGTTGCACAACCAGGTC	82	62
	19269	1	570	587	Codificación	GTTTGTGCCTGCCTGTTG	70	63
30	19270	1	575	592	Codificación	GTCTTGTTTGTGCCTGCC	69	64
	19271	1	590	607	Codificación	CCACAGACAACATCAGTC	11	65
	19272	1	597	614	Codificación	CTGGGGACCACAGACAAC	9	66
	19273	1	607	624	Codificación	TCAGCCGATCCTGGGGAC	0	67
35	19274	1	621	638	Codificación	CACCACCAGGGCTCTCAG	23	68
	19275	1	626	643	Codificación	GGGATCACCACCAGGGCT	58	69
	19276	1	657	674	Codificación	GAGGATGGCAAACAGGAT	49	70
	19277	1	668	685	Codificación	ACCAGCACCAAGAGGATG	ND	71
40	19278	1	679	696	Codificación	TTTTGATAAAGACCAGCA	31	72
	19279	1	703	720	Codificación	TATTGGTTGGCTTCTTGG	49	73
	19280	1	729	746	Codificación	GGTTCCTGCTTGGGGTG	14	74
	19281	1	750	767	Codificación	GTCGGGAAAATTGATCTC	55	75
45	19282	1	754	771	Codificación	GATCGTCGGGAAAATTGA	0	76
	19283	1	765	782	Codificación	GGAGCCAGGAAGATCGTC	69	77
	19284	1	766	783	Codificación	TGGAGCCAGGAAGATCGT	54	78
	19285	1	780	797	Codificación	TGGAGCAGCAGTGTGGGA	15	79
50	19286	1	796	813	Codificación	GTAAGTCTCCTGCACTG	31	80
	19287	1	806	823	Codificación	TGGCATCCATGTAAAGTC	65	81
	19288	1	810	827	Codificación	CGGTTGGCATCCATGTAA	34	82
	19289	1	834	851	Codificación	CTCTTTGCCATCCTCCTG	42	83
55	19290	1	861	878	Codificación	CTGTCTCTCCTGCACTGA	26	84
	19291	1	873	890	Parar	GGTGCAGCCTCACTGTCT	76	85
	19292	1	910	927	3'UTR	AACTGCCTGTTGCCAC	63	86
	19293	1	954	971	3'UTR	CTTCTGCCCTGCACCCCTG	0	87
60	19294	1	976	993	3'UTR	ACTGACTGGGCATAGCTC	12	88

Ejemplo 3: Inhibición antisentido de CD40 humano

[0257] Se ensayaron oligonucleótidos antisentido dirigidos a un ácido nucleico CD40 para determinar sus efectos sobre ARNm de CD40 in vitro. Las células T24 a una densidad de 7000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos se trataron con 100 nM de oligonucleótido antisentido. Después de un período de tratamiento de

ES 2 641 290 T3

aproximadamente 24 horas, se aisló ARN de las células y se midieron los niveles de ARNm de CD40 mediante PCR cuantitativa en tiempo real, como se describe en la presente memoria. Los niveles de ARNm de CD40 se ajustaron de acuerdo con el contenido de GAPDH, un gen doméstico. Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición de CD40, en relación con las células de control no tratadas en la Tabla 3.

[0258] Los oligonucleótidos antisentido se diseñaron como 4-10-4 gápmers, donde el segmento de hueco comprende 2'-desoxinucleótidos y cada segmento de ala comprende nucleótidos 2'-MOE. Los oligonucleótidos antisentido comprenden columnas de fosforotioato (enlaces internucleósidos) y sustituciones de 5-metilcitosina. "Sitio diana 5'" indica el nucleótido 5' más que el oligonucleótido antisentido está dirigido a SEQ ID NO: 1 (GENBANK N° de Acceso X60592.1), SEQ ID NO: 2 (GENBANK® N° de Acceso H50598.1) , y SEQ ID NO: 3 (GENBANK® N° de acceso AA203290.1).

Tabla 3: Inhibición de niveles humanos ARNm CD40 por oligonucleótidos quiméricos teniendo alas 4-10-4 MOE y hueco deoxi

Oligo ID	SEQ ID NO diana	Sitio de inicio diana	Sitio de parada diana	Secuencia (5' a 3')	% Inhibición	SEQ ID NO
26162	1	66	83	GCCCCAGAGGACGCACTG	0	89
26163	1	70	87	AGCAGCCCCAGAGGACGC	98	90
26164	1	74	91	AGCAAGCAGCCCCAGAGG	47	91
26165	1	80	97	GCGGTCAGCAAGCAGCCC	54	92
26167	1	95	112	GGTCTGGATGGACAGCG	66	93
26168	1	102	119	AGTGGGTGGTTCTGGATG	26	94
26169	1	141	158	GCACTGACTGTTTATTAG	43	95
26170	1	154	171	GGCACAAGAACAGCACT	53	96
26171	1	164	181	TGCTCTGGCTGGCACAAA	29	97
26172	1	171	188	CAGTTTCTGTCTGGCTG	48	98
26173	1	180	197	GTCCTCACCAGTTTCTG	47	99
26174	1	210	227	AAGGCATTCCGTTTCAGT	57	100
26175	1	224	241	CTTTCACCGCAAGGAAGG	34	101
26176	1	250	267	CTCTGTTCCAGGTGTCTA	78	30
26177	1	257	274	TGTGTCTCTCTGTTCCAG	57	102
26178	1	264	281	GTGGCAGTGTGTCTCTCT	0	103
26179	1	314	331	CCCTTCTGCTGGACCCGA	58	104
26180	1	321	338	TGAGGTGCCCTTCTGCTG	69	105
26181	1	329	346	TCTGTTTCTGAGGTGCC	44	106
26182	1	336	353	GATGGTGTCTGTTTCTGA	12	107
26183	1	364	381	TACAGTGCCAGCCTTCTT	14	42
26184	1	445	462	AAACCCCTGTAGCAATCT	15	108
26185	1	460	477	CGCAGATGGTATCAGAAA	53	109
26186	1	469	486	GGCAGGGCTCGCAGATGG	79	110
26202	1	485	502	GAGAAGAAGCCGACTGGG	0	111
26187	1	487	504	TGGAGAAGAAGCCGACTG	23	112

ES 2 641 290 T3

Oligo ID	SEQ ID NO diana	Sitio de inicio diana	Sitio de parada diana	Secuencia (5' a 3')	% Inhibición	SEQ ID NO	
5	26204	1	489	506	ATTGGAGAAGAAGCCGAC	0	113
	26205	1	491	508	ACATTGGAGAAGAAGCCG	4	114
	26206	1	493	510	ACACATTGGAGAAGAAGC	0	115
10	26207	1	495	512	TGACACATTGGAGAAGAA	46	116
	26188	1	496	513	ATGACACATTGGAGAAGA	0	117
	26208	1	497	514	GATGACACATTGGAGAAG	0	55
	26189	1	503	520	AAAGCAGATGACACATTG	6	118
15	26209	1	524	541	GTCCAAGGGTGACATTTT	53	58
	26210	1	545	562	AGGTCTTTGGTCTCACAG	81	119
	26211	1	555	572	TTGCACAACCAGGTCTTT	48	120
	26212	1	570	587	GTTTGTGCCTGCCTGTTG	76	63
20	26213	1	572	589	TTGTTTGTGCCTGCCTGT	50	121
	26214	1	574	591	TCTTGTGTTTGTGCCTGCCT	87	122
	26215	1	576	593	AGTCTTGTTTGTGCCTGC	83	123
	26216	1	577	594	CAGTCTTGTTTGTGCCTG	80	124
25	26217	1	578	595	TCAGTCTTGTTTGTGCCT	88	125
	26218	1	580	597	CATCAGTCTTGTTTGTGC	52	126
	26219	1	590	607	CCACAGACAACATCAGTC	16	65
	26220	1	592	609	GACCACAGACAACATCAG	11	127
30	26221	1	594	611	GGGACCACAGACAACATC	40	128
	26222	1	622	639	TCACCACCAGGGCTCTCA	37	129
	26223	1	624	641	GATCACCACCAGGGCTCT	82	130
	26224	1	658	675	AGAGGATGGCAAACAGGA	33	131
35	26225	1	659	676	AAGAGGATGGCAAACAGG	0	132
	26226	1	660	677	CAAGAGGATGGCAAACAG	0	133
	26227	1	669	686	GACCAGCACCAAGAGGAT	57	134
	26228	1	671	688	AAGACCAGCACCAAGAGG	35	135
40	26229	1	673	690	TAAAGACCAGCACCAAGA	13	136
	26230	1	676	693	TGATAAAGACCAGCACCA	0	137
	26231	1	678	695	TTTGATAAAGACCAGCAC	26	138
	26232	2	375	392	ACTCTCTTTGCCCATCCT	0	139
	26233	2	377	394	CGACTCTCTTTGCCCATC	31	140
45	26234	2	380	397	ATGCGACTCTCTTTGCC	12	141
	26235	2	382	399	AAATGCGACTCTCTTTGC	36	142
	26236	2	385	402	CTGAAATGCGACTCTCTT	51	143
50	26237	2	387	404	AACTGAAATGCGACTCTC	0	144

Oligo ID	SEQ ID NO diana	Sitio de inicio diana	Sitio de parada diana	Secuencia (5' a 3')	% Inhibición	SEQ ID NO
26238	2	406	423	CTTCACTGTCTCTCCCTG	0	145
26239	2	407	424	CCTTCACTGTCTCTCCCT	56	146
26240	2	409	426	AACCTTCACTGTCTCTCC	0	147
26190	3	520	537	GATCACCACAGGCTCTCA	0	148
26191	3	565	582	TGATAAGACAGCACCAAG	9	149
26192	3	584	601	GGTAGTTCTTGCCACTTT	0	150
26193	3	593	610	GGCCTATGGGTAGTTCT	0	151
26194	3	617	634	ATTATCTCTGGGTCTGCT	9	152
26195	3	646	663	ACTGACACATTTGAGCAG	0	153
26196	3	654	671	GACTCCCTACTGACACAT	0	154
26197	3	689	706	CAAAGAGCGGTTCTCCAC	0	155
26198	3	696	713	AATTCTCAAAGAGCGGT	0	156
26199	3	728	745	TCTTGACATCCTTTTCAT	0	157
26200	3	736	753	CCCACCTATCTTGACATC	0	158
26201	3	791	808	AGGCCGAGAGTTCAAAT	0	159

Ejemplo 4 Inhibición antisentido del CD40 humano

[0259] Se ensayaron oligonucleótidos antisentido dirigidos a un ácido nucleico CD40 para determinar sus efectos sobre ARNm de CD40 in vitro. Las células A549 a una densidad de 5000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos se trataron con 120 nM de oligonucleótido antisentido. Después de un período de tratamiento de aproximadamente 24 horas, se aisló ARN de las células y se midieron los niveles de ARNm de CD40 mediante PCR cuantitativa en tiempo real, como se describe en la presente memoria. El conjunto LTS37 de cebador de sonda CD40 se utilizó para medir los niveles de ARNm. Los niveles de ARNm de CD40 se ajustaron de acuerdo con el contenido de ARN total medido por RIBOGREEN®. Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición de CD40, en relación con las células de control no tratadas en la Tabla 4.

[0260] Los oligonucleótidos antisentido se diseñaron como 4-10-4 gápmeros, 5-10-5 gápmeros, o 2-15-3 gápmeros, donde el segmento de separación comprende 2'-desoxinucleótidos y cada segmento de ala comprende nucleótidos 2'-MOE. El motivo para cada compuesto se indica mediante la columna denominada "motivo". Los oligonucleótidos antisentido comprenden columnas de fosforotioato (enlaces internucleósidos) y sustituciones de 5-metilcitosina. "Sitio diana 5'" indica el nucleótido más 5' al que el oligonucleótido antisentido está dirigido a SEQ NO: 1 (GENBANK N° de acceso X60592.1) o SEQ ID NO: 4 (nucleótidos 9797000 a 9813000 de GENBANK N° de Acceso NT_011362.9).

Tabla 4

Inhibición de niveles humanos de ARNm CD40 por oligonucleótidos quiméricos teniendo alas 4-10-4 MOE y huecos deoxi, alas 5-10-5 MOE y hueco deoxi, y alas 2-15-3 MOE y hueco deoxi							
Oligo ID	SEQ ID NO diana	Motivo	Sitio de inicio diana	Sitio de parada diana	Secuencia (5' a 3')	% Inhibición	SEQ ID NO
26163	4	4-10-4	2914	2931	AGCAGCCCCAGAGGACGC	74	90
396243	4	5-10-5	2728	2747	CCAGCAATTCACCGCGCAGG	0	160
396320	4	2-15-3	2728	2747	CCAGCAATTCACCGCGCAGG	0	160
396199	4	5-10-5	2892	2911	TGCAGAGGCAGACGAACCAT	75	161
396276	4	2-15-3	2892	2911	TGCAGAGGCAGACGAACCAT	55	161

ES 2 641 290 T3

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Inhibición de niveles humanos de ARNm CD40 por oligonucleótidos quiméricos teniendo alas 4-10-4 MOE y huecos deoxi, alas 5-10-5 MOE y hueco deoxi, y alas 2-15-3 MOE y hueco deoxi							
Oligo ID	SEQ ID NO diana	Motivo	Sitio de inicio diana	Sitio de parada diana	Secuencia (5' a 3')	% Inhibición	SEQ ID NO
396200	4	5-10-5	2904	2923	CAGAGGACGCACTGCAGAGG	79	162
396277	4	2-15-3	2904	2923	CAGAGGACGCACTGCAGAGG	69	162
396201	4	5-10-5	2913	2932	AAGCAGCCCCAGAGGACGCA	76	163
396278	4	2-15-3	2913	2932	AAGCAGCCCCAGAGGACGCA	78	163
396202	4	5-10-5	2924	2943	CAGCGGTCAGCAAGCAGCCC	68	164
396279	4	2-15-3	2924	2943	CAGCGGTCAGCAAGCAGCCC	88	164
396244	4	5-10-5	2928	2947	CTCACAGCGGTCAGCAAGCA	86	165
396321	4	2-15-3	2928	2947	CTCACAGCGGTCAGCAAGCA	75	165
396245	4	5-10-5	3349	3368	GCTGGCAAGGAGATGATAAC	51	166
396322	4	2-15-3	3349	3368	GCTGGCAAGGAGATGATAAC	54	166
396246	4	5-10-5	3480	3499	AGGTTGGAACACCCAAGATA	69	167
396323	4	2-15-3	3480	3499	AGGTTGGAACACCCAAGATA	78	167
396247	4	5-10-5	3649	3668	GGAGAAACCCCTGGTTTCTC	45	168
396324	4	2-15-3	3649	3668	GGAGAAACCCCTGGTTTCTC	26	168
396248	4	5-10-5	3860	3879	TCATTCCCTGCCAGGCTTCA	43	169
396325	4	2-15-3	3860	3879	TCATTCCCTGCCAGGCTTCA	39	169
396249	4	5-10-5	3950	3969	TCAGGTGAAAGTGAAAGCTG	68	170
396326	4	2-15-3	3950	3969	TCAGGTGAAAGTGAAAGCTG	69	170
396250	4	5-10-5	4490	4509	TACCATCTTCAAACACATGA	79	171
396327	4	2-15-3	4490	4509	TACCATCTTCAAACACATGA	71	171
396251	4	5-10-5	4604	4623	TTACCCAAAATGGGAAAGGA	86	172
396328	4	2-15-3	4604	4623	TTACCCAAAATGGGAAAGGA	48	172
396252	4	5-10-5	4810	4829	GAAAGAATACATGTATATGG	72	173
396329	4	2-15-3	4810	4829	GAAAGAATACATGTATATGG	10	173
396253	4	5-10-5	4944	4963	AGAGTCAGACAGCTTTAGAC	78	174
396330	4	2-15-3	4944	4963	AGAGTCAGACAGCTTTAGAC	79	174
396254	4	5-10-5	5651	5670	GTACCACCCATGCTATTAAT	79	175
396331	4	2-15-3	5651	5670	GTACCACCCATGCTATTAAT	84	175
396255	4	5-10-5	5740	5759	ACAGTGACAGAGTCCAAATG	85	176
396332	4	2-15-3	5740	5759	ACAGTGACAGAGTCCAAATG	75	176
396256	4	5-10-5	5830	5849	AATGTAAAGCTGGAAGGGTA	52	177
396333	4	2-15-3	5830	5849	AATGTAAAGCTGGAAGGGTA	37	177
396257	4	5-10-5	5964	5983	GGGCTATGTTTAGCACTTGG	79	178
396334	4	2-15-3	5964	5983	GGGCTATGTTTAGCACTTGG	73	178
396258	4	5-10-5	6078	6097	GGGCTTGATGCCTGAGTCAT	73	179

ES 2 641 290 T3

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Inhibición de niveles humanos de ARNm CD40 por oligonucleótidos quiméricos teniendo alas 4-10-4 MOE y huecos deoxi, alas 5-10-5 MOE y hueco deoxi, y alas 2-15-3 MOE y hueco deoxi

Oligo ID	SEQ ID NO diana	Motivo	Sitio de inicio diana	Sitio de parada diana	Secuencia (5' a 3')	% Inhibición	SEQ ID NO
396335	4	2-15-3	6078	6097	GGGCTTGATGCCTGAGTCAT	40	179
396259	4	5-10-5	6251	6270	TGAAGTGCAAGTCAAAACAG	52	180
396336	4	2-15-3	6251	6270	TGAAGTGCAAGTCAAAACAG	44	180
396260	4	5-10-5	6332	6351	GCAATTTGAAGGGATCTTGA	68	181
396337	4	2-15-3	6332	6351	GCAATTTGAAGGGATCTTGA	42	181
396203	4	5-10-5	6374	6393	CATGCAGTGGGTGGTTCTGG	77	182
396280	4	2-15-3	6374	6393	CATGCAGTGGGTGGTTCTGG	83	182
396204	4	5-10-5	6385	6404	GTTTTTCTCTGCATGCAGTG	78	183
396281	4	2-15-3	6385	6404	GTTTTTCTCTGCATGCAGTG	70	183
396205	4	5-10-5	6424	6443	GCTGGCACAAGAAGAACAGCAC	61	184
396282	4	2-15-3	6424	6443	GCTGGCACAAGAAGAACAGCAC	65	184
396261	4	5-10-5	6709	6728	CACTAACCACACAATGATCA	85	185
396338	4	2-15-3	6709	6728	CACTAACCACACAATGATCA	62	185
396206	4	5-10-5	6787	6806	TGTGCAGTCACTCACCAGTT	83	186
396283	4	2-15-3	6787	6806	TGTGCAGTCACTCACCAGTT	72	186
396207	4	5-10-5	6838	6857	GTCTAGGAATTCGCTTTCAC	95	187
396284	4	2-15-3	6838	6857	GTCTAGGAATTCGCTTTCAC	85	187
396208	4	5-10-5	6843	6862	CAGGTGTCTAGGAATTCGCT	98	188
396285	4	2-15-3	6843	6862	CAGGTGTCTAGGAATTCGCT	90	188
396209	4	5-10-5	6883	6902	GTCGCAGTATTTGTGCTGGT	84	189
396286	4	2-15-3	6883	6902	GTCGCAGTATTTGTGCTGGT	86	189
396262	4	5-10-5	7154	7173	ACCCGAAGCCCTAGGTCTGA	92	190
396339	4	2-15-3	7154	7173	ACCCGAAGCCCTAGGTCTGA	84	190
396210	4	5-10-5	7158	7177	CTGGACCCGAAGCCCTAGGT	82	191
396287	4	2-15-3	7158	7177	CTGGACCCGAAGCCCTAGGT	90	191
396211	4	5-10-5	7163	7182	TTCTGCTGGACCCGAAGCCC	65	192
396288	4	2-15-3	7163	7182	TTCTGCTGGACCCGAAGCCC	80	192
396212	4	5-10-5	7204	7223	CTTCTTCACAGGTGCAGATG	79	193
396289	4	2-15-3	7204	7223	CTTCTTCACAGGTGCAGATG	72	193
396263	4	5-10-5	7590	7609	AGCCAGTGGCCAGGCAGGAC	70	194
396340	4	2-15-3	7590	7609	AGCCAGTGGCCAGGCAGGAC	56	194
396214	4	5-10-5	7704	7723	GAAGAAGCCGACTGGGCAGG	76	195
396291	4	2-15-3	7704	7723	GAAGAAGCCGACTGGGCAGG	80	195
396215	4	5-10-5	7709	7728	TTGGAGAAGAAGCCGACTGG	77	196
396292	4	2-15-3	7709	7728	TTGGAGAAGAAGCCGACTGG	80	196

ES 2 641 290 T3

Inhibición de niveles humanos de ARNm CD40 por oligonucleótidos quiméricos teniendo alas 4-10-4 MOE y huecos deoxi, alas 5-10-5 MOE y hueco deoxi, y alas 2-15-3 MOE y hueco deoxi

Oligo ID	SEQ ID NO diana	Motivo	Sitio de inicio diana	Sitio de parada diana	Secuencia (5' a 3')	% Inhibición	SEQ ID NO
396216	4	5-10-5	7718	7737	GATGACACATTGGAGAAGAA	76	197
396293	4	2-15-3	7718	7737	GATGACACATTGGAGAAGAA	65	197
396264	4	5-10-5	7953	7972	TGTCTATTACCTCAAAGAGA	89	198
396341	4	2-15-3	7953	7972	TGTCTATTACCTCAAAGAGA	72	198
396265	4	5-10-5	8492	8511	ACAGTGTGTTTCAGAGGATTG	82	199
396342	4	2-15-3	8492	8511	ACAGTGTGTTTCAGAGGATTG	67	199
396266	4	5-10-5	9755	9774	ACAATACACTTTACATGTTT	90	200
396343	4	2-15-3	9755	9774	ACAATACACTTTACATGTTT	63	200
396267	4	5-10-5	10414	10433	ATTGTGTCTTTAGAACCAGA	84	201
396344	4	2-15-3	10414	10433	ATTGTGTCTTTAGAACCAGA	59	201
396268	4	5-10-5	10528	10547	GGGCCCTAAAGGATGTAAAA	34	202
396345	4	2-15-3	10528	10547	GGGCCCTAAAGGATGTAAAA	76	202
396217	4	5-10-5	11218	11237	CAGTCTTGTTTGTGCCTGCC	70	203
396294	4	2-15-3	11218	11237	CAGTCTTGTTTGTGCCTGCC	79	203
396269	4	5-10-5	11244	11263	TGTCCAGGACTCACCACAGA	77	204
396346	4	2-15-3	11244	11263	TGTCCAGGACTCACCACAGA	83	204
396270	4	5-10-5	11801	11820	TATGGCACCTTCTTAAATAT	85	205
396347	4	2-15-3	11801	11820	TATGGCACCTTCTTAAATAT	81	205
396271	4	5-10-5	12248	12267	TGCTTTTGGTATAGAAGAGT	86	206
396348	4	2-15-3	12248	12267	TGCTTTTGGTATAGAAGAGT	76	206
396235	4	5-10-5	12526	12545	AAATGTGGCTGGCAGATGTC	79	207
396312	4	2-15-3	12526	12545	AAATGTGGCTGGCAGATGTC	82	207
396236	4	5-10-5	12572	12591	GTCAGAGCTCATCTACATCA	87	208
396313	4	2-15-3	12572	12591	GTCAGAGCTCATCTACATCA	82	208
396237	4	5-10-5	12754	12773	CTGATAAAGACCAGCACCAA	69	209
396314	4	2-15-3	12754	12773	CTGATAAAGACCAGCACCAA	70	209
396238	4	5-10-5	12762	12781	AGGACTCACTGATAAAGACC	69	210
396315	4	2-15-3	12762	12781	AGGACTCACTGATAAAGACC	43	210
396239	4	5-10-5	12982	13001	CAGACTCTGAATCAGTTTTA	78	211
396316	4	2-15-3	12982	13001	CAGACTCTGAATCAGTTTTA	70	211
396240	4	5-10-5	13021	13040	CAGTCCCCAATTCTGCTGCC	43	212
396317	4	2-15-3	13021	13040	CAGTCCCCAATTCTGCTGCC	70	212
396241	4	5-10-5	13107	13126	CCAGTGTTAGGCTCTGCCAG	76	213
396318	4	2-15-3	13107	13126	CCAGTGTTAGGCTCTGCCAG	85	213
396242	4	5-10-5	13134	13153	GAATGCCAGGAAAGGAGTGA	69	214

ES 2 641 290 T3

Inhibición de niveles humanos de ARNm CD40 por oligonucleótidos quiméricos teniendo alas 4-10-4 MOE y huecos deoxi, alas 5-10-5 MOE y hueco deoxi, y alas 2-15-3 MOE y hueco deoxi

Oligo ID	SEQ ID NO diana	Motivo	Sitio de inicio diana	Sitio de parada diana	Secuencia (5' a 3')	% Inhibición	SEQ ID NO
396319	4	2-15-3	13134	13153	GAATGCCAGGAAAGGAGTGA	84	214
396272	4	5-10-5	13171	13190	CAGCCCCAAGGCCCAAAGAT	48	215
396349	4	2-15-3	13171	13190	CAGCCCCAAGGCCCAAAGAT	57	215
396220	4	5-10-5	13491	13510	CTGCACTGGAGCAGCAGTGT	81	216
396297	4	2-15-3	13491	13510	CTGCACTGGAGCAGCAGTGT	74	216
396221	4	5-10-5	13517	13536	ACCGGTTGGCATCCATGTAA	61	217
396298	4	2-15-3	13517	13536	ACCGGTTGGCATCCATGTAA	73	217
396222	4	5-10-5	13525	13544	CCTGGGTGACCGGTTGGCAT	71	218
396299	4	2-15-3	13525	13544	CCTGGGTGACCGGTTGGCAT	82	218
396223	4	5-10-5	13802	13821	CAAGTTGGGAGACTGGATGG	65	219
396300	4	2-15-3	13802	13821	CAAGTTGGGAGACTGGATGG	79	219
396224	4	5-10-5	13810	13829	CTTTAATACAAGTTGGGAGA	68	220
396301	4	2-15-3	13810	13829	CTTTAATACAAGTTGGGAGA	64	220
396225	4	5-10-5	13877	13896	TCGGAAGGTCTGGTGGATAT	65	221
396302	4	2-15-3	13877	13896	TCGGAAGGTCTGGTGGATAT	83	221
396226	4	5-10-5	13896	13915	TGGGCACCAAACCTGCTGGAT	70	222
396303	4	2-15-3	13896	13915	TGGGCACCAAACCTGCTGGAT	76	222
396227	4	5-10-5	13937	13956	TATGGCTTCCTGGGCGCAGG	59	223
396304	4	2-15-3	13937	13956	TATGGCTTCCTGGGCGCAGG	74	223
396228	4	5-10-5	13961	13980	AATGCTGCAATGGGCATCTG	78	224
396305	4	2-15-3	13961	13980	AATGCTGCAATGGGCATCTG	83	224
396229	4	5-10-5	13977	13996	GTTCACTATCACAAACAATG	84	225
396306	4	2-15-3	13977	13996	GTTCACTATCACAAACAATG	67	225
396230	4	5-10-5	13997	14016	CAGTTAAGCAGCTTCCAGTT	84	226
396307	4	2-15-3	13997	14016	CAGTTAAGCAGCTTCCAGTT	85	226
396231	4	5-10-5	14028	14047	AATTTTATTTAGCCAGTCTC	80	227
396308	4	2-15-3	14028	14047	AATTTTATTTAGCCAGTCTC	79	227
396232	4	5-10-5	14046	14065	GTTGTATAAATATATTCTAA	44	228
396309	4	2-15-3	14046	14065	GTTGTATAAATATATTCTAA	25	228
396233	4	5-10-5	14065	14084	ACAGTGTTTTTGAGATTCTG	83	229
396310	4	2-15-3	14065	14084	ACAGTGTTTTTGAGATTCTG	50	229
396273	4	5-10-5	14725	14744	CTCAGGACCCAGAGTGAGGA	37	230
396350	4	2-15-3	14725	14744	CTCAGGACCCAGAGTGAGGA	50	230
396274	4	5-10-5	15073	15092	TGGGTAAACCTCACCTCGA	59	231
396351	4	2-15-3	15073	15092	TGGGTAAACCTCACCTCGA	56	231

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

5

Inhibición de niveles humanos de ARNm CD40 por oligonucleótidos quiméricos teniendo alas 4-10-4 MOE y huecos deoxi, alas 5-10-5 MOE y hueco deoxi, y alas 2-15-3 MOE y hueco deoxi

Oligo ID	SEQ ID NO diana	Motivo	Sitio de inicio diana	Sitio de parada diana	Secuencia (5' a 3')	% Inhibición	SEQ ID NO
396275	4	5-10-5	15350	15369	ATTAGGTCCCAAAGTTCCCC	23	232
396352	4	2-15-3	15350	15369	ATTAGGTCCCAAAGTTCCCC	48	232
396234	1	5-10-5	42	61	GGCAGACGAACCATGGCGAG	86	233
396311	1	2-15-3	42	61	GGCAGACGAACCATGGCGAG	82	233
396213	1	5-10-5	435	454	GTAGCAATCTGCTTGACCCC	82	234
396290	1	2-15-3	435	454	GTAGCAATCTGCTTGACCCC	79	234
396218	1	5-10-5	590	609	GACCACAGACAACATCAGTC	89	235
396295	1	2-15-3	590	609	GACCACAGACAACATCAGTC	85	235
396219	1	5-10-5	683	702	CCACCTTTTTGATAAAGACC	65	236
396296	1	2-15-3	683	702	CCACCTTTTTGATAAAGACC	41	236

10

15

20

Ejemplo 5: Inhibición antisentido de CD40 humano en células HuVEC, Conjunto de sonda de cebador LTS37

25 **[0261]** Se ensayaron varios oligonucleótidos antisentido que exhibían inhibición in vitro de CD40 (véase el Ejemplo 4) a diversas dosis en células HuVEC. Las células se plaquearon a densidades de 5000 células por pocillo y se trataron con concentraciones nM de oligonucleótidos antisentido como se indica en la Tabla 5. Después de un período de tratamiento de aproximadamente de 24 horas, se aisló ARN de las células y se midieron los niveles de ARNm de CD40 mediante análisis cuantitativo en tiempo real PCR, como se describe en la presente memoria. El conjunto de sonda de cebador CD40 humano LTS37 se usó para medir los niveles de ARNm. Los niveles de ARNm de CD40 se ajustaron de acuerdo con el contenido de ARN total medido por RIBOGREEN®. Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición de CD40, en relación con células de control no tratadas. Como se ilustra en la Tabla 5, los niveles de ARNm de CD40 se redujeron de una manera dependiente de la dosis.

30

35 Tabla 5 Inhibición antisentido de CD40 humano en células HuVEC, Conjunto de sonda de cebador LTS37

ISIS N°	0,2344 nM	0,4688 nM	0,9375 nM	1,875 nM	3,75 nM	7,5 nM	15,0 nM	30,0 nM
26163	17	35	38	51	62	67	82	89
396236	23	49	59	77	86	92	91	89
396266	35	45	58	74	55	72	57	56
396307	21	45	43	56	80	79	82	82
396218	34	47	52	57	78	82	86	86
396279	34	54	59	49	72	82	88	87
396287	31	48	52	50	64	77	85	86
396264	39	34	49	56	71	84	88	86

40

45

50 **Ejemplo 6: Inhibición antisentido de CD40 humano en células AGS**

[0262] Los oligonucleótidos antisentido que presentan inhibición in vitro de CD40 (véase el Ejemplo 4) se ensayaron a diversas dosis en células AGS (células de adenocarcinoma humano). Los oligonucleótidos antisentido de SEQ ID N° 90 y SEQ ID N° 208 se diseñaron como 4-10-4 gápmeros o 5-10-5 gápmeros, respectivamente, donde el segmento de separación comprende 2'-desoxinucleótidos y cada segmento de ala comprende 2'-MOE o nucleótidos 2'OMe. Los oligonucleótidos antisentido comprenden esqueletos de fosforotioato (enlaces internucleósidos) y sustituciones de 5-metilcitosina.

55

[0263] Las células se sembraron en placas a densidades de 5000 células por pocillo y se trataron con concentraciones de nM de oligonucleótidos antisentido como se indica en la Tabla 6. Después de un período de tratamiento de aproximadamente 24 horas, se aisló ARN de las células y los niveles relativos de expresión de ARNm de CD40 se cuantificaron mediante RT-PCR en tiempo real usando el kit de RT-PCR QuantiTect SYBR® Green (Qiagen). Los niveles de ARNm de CD40 se ajustaron de acuerdo con el contenido de GAPDH, un gen doméstico. Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición de CD40, en relación con células tratadas con un oligonucleótido de control mezclado (TCCATT-TATTAGTCTAGGAA (5-10-5 gápmero, donde el segmento de separación comprende 2'-desoxinucleótidos y cada segmento de ala comprende nucleótidos de 2'-MOE. El

60

65

oligonucleótido comprende las columnas de fosforotioato (enlaces internucleósidos) y sustituciones de 5-metilcitosina.

Tabla 6: Inhibición antisentido de CD40 humano en células AGS

ISIS N°	Motivo	Segmento de ala	12,5 nM	25,0 nM	50,0 nM	Seq ID
26163	4-10-4	2'MOE	80	69	90	90
396236	5-10-5	2'MOE	83	86	94	208
--	4-10-4	2'OMe	51	54	66	90
	5-10-5	2'OMe	60	62	66	208

[0264] Como se ilustra en la Tabla 6, los niveles de ARNm de CD40 se redujeron de una manera dependiente de la dosis. Los oligonucleótidos antisentido que comprenden segmentos de ala de 2'MOE son más activos que aquellos con segmentos de ala 2'OMe.

Ejemplo 7 Inhibición antisentido de CD40 murino in vitro

[0265] Los oligonucleótidos antisentido quiméricos que tienen alas 5-10-5 MOE y separación de desoxi y alas 4-12-4 MOE y brecha de desoxi pueden diseñarse para dirigirse al CD40 murino. Estos oligonucleótidos antisentido pueden evaluarse por su capacidad para reducir el ARNm de CD40 en hepatocitos de ratón primario usando métodos similares a los descritos en el estudio humano in vitro.

[0266] Por ejemplo, los hepatocitos de ratón primarios pueden tratarse con oligonucleótidos antisentido de 0,2344 nM, 0,4688 nM, 0,9375 nM, 1,875 nM, 3,75 nM, 7,5 nM, 15,0 nM y 30,0 nM durante un período de aproximadamente 24 horas. El ARN se puede aislar de las células y los niveles de ARNm de CD40 se pueden medir mediante PCR cuantitativa en tiempo real, como se describe en el presente documento. Los conjuntos de sondas de cebador CD40 de murino se pueden usar para medir los niveles de ARNm. Los niveles de ARNm de CD40 pueden ajustarse entonces según el contenido de ARN total medido por RIBOGREEN®.

Ejemplo 8 Inhibición antisentido de CD40 murino in vivo

[0267] Los oligonucleótidos antisentido que muestran una inhibición dependiente de la dosis estadísticamente significativa a partir de un estudio in vitro pueden evaluarse por su capacidad para reducir el ARNm de CD40 in vivo.

Tratamiento

[0268] El oligonucleótido antisentido se puede evaluar en ratones Balb/c y se compara con un grupo de control tratado con solución salina. El oligonucleótido o solución salina se administraría por vía subcutánea a una dosis de 5 mg/kg, 10 mg/kg, 25 mg/kg o 50 mg/kg dos veces por semana durante tres semanas. Después del período de tratamiento, se puede recoger hígado entero para análisis de ARN y análisis de proteínas.

Análisis de ARN

[0269] Se puede aislar ARN de hígado para análisis de CD40 en tiempo real de PCR. Se teoriza que un oligonucleótido antisentido que muestra una inhibición dependiente de la dosis significativa in vitro puede mostrar una inhibición dependiente de la dosis significativa in vivo.

Análisis de Proteínas

[0270] La proteína CD40 de hígado puede medirse mediante transferencia Western.

Ejemplo 9 Tolerabilidad de compuestos antisentido en roedores

[0271] Los ratones Balb/c machos de 6 semanas de edad fueron dosificados por vía subcutánea 2x por semana durante 4 semanas con 25 ó 50 mg/kg de oligonucleótidos antisentido Isis 26163 o Isis 396236. Los ratones se sacrificaron 2 días después de la última administración. Los pesos corporales de los animales fueron monitoreados durante el estudio. Después del sacrificio, se determinó el hígado, el bazo y los pesos renales y las enzimas hepáticas ALT y AST del plasma de ratón.

[0272] En comparación con un tratamiento de control de solución salina, los pesos de los ratones no se ven afectados por oligonucleótidos antisentido Isis 26163 o Isis 396236. El peso del hígado y el peso del bazo mostraron un ligero aumento para Isis 26163 pero no para Isis 396236. Las pruebas de LFT (prueba de función hepática) eran pequeñas y estaban dentro del rango normal de estudios de ratón de dosis alta.

Ejemplo 10: Inhibición antisentido de CD40 humano in vitro en células T24 - Datos comparativos para ISIS 26163 e ISIS 19216

5 **[0273]** Los oligonucleótidos antisentido ISIS 26163 e ISIS 19216 dirigidos a un ácido nucleico CD40 se ensayaron para determinar sus efectos sobre ARNm de CD40 in vitro. Los oligonucleótidos antisentido se diseñaron como 4-10-4 gápmeros, donde el segmento de hueco comprende 2'-desoxinucleótidos y cada segmento de ala comprende nucleótidos 2'-MOE. Los oligonucleótidos antisentido comprenden esqueletos de fosforotioato (enlaces internucleósidos) y sustituciones de 5-metilcitosina en todo o en las alas, respectivamente.

10 **[0274]** Se trataron células T24 a una densidad de 7.000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos con 100 nM o 150 nM, respectivamente, de oligonucleótido antisentido. Después de un período de tratamiento de aproximadamente 24 horas, se aisló ARN de las células y se midieron los niveles de ARNm de CD40 mediante PCR cuantitativa en tiempo real, como se describe en la presente memoria. Los niveles de ARNm de CD40 se ajustaron de acuerdo con el contenido de GAPDH, un gen doméstico.

15 **[0275]** Los resultados se presentan en la Tabla 7 como porcentaje de inhibición de CD40, en relación con células de control no tratadas.

Tabla 7

Oligo ID	Sitios diana	nM en células T24	% Inhibición	SEQ ID N°
26163	70-87	100	98	90
19216	73-90	150	66	10

20 **[0276]** La secuencia ISIS 26163 muestra una actividad superior sobre ISIS 19216, que se superpone a la secuencia por 15 nucleobasas.

30 LISTADO DE SECUENCIAS

[0277]

<110> ISIS Pharmaceuticals Inc .; C. Frank Bennett

35 <120> MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CD40

<130> 33841 - 513

40 <150> US 60 / 989.421

<151> 2007-11-20

<160> 237

45 <170> FastSEQ para Windows versión 4.0

<210> 1

<211> 1004

<212> ADN

50 <213> H. sapiens

<400> 1

```

55 gcctcgctcg ggcgcccagt ggtcctgccc cctggtctca cctcgccatg gttcgtctgc 60
ctctgcagtg cgtcctctgg ggctgcttgc tgaccgctgt ccatccagaa ccaccactg 120
catgcagaga aaaacagtac ctaataaaca gtcagtgctg ttctttgtgc cagccaggac 180
agaaactggt gagtgactgc acagagtcca ctgaaacgga atgccttcct tgcggtgaaa 240
gccaattcct agacacctgg aacagagaga cactctgcca ccagcacaaa tactgcgacc 300
ccaacctagg gcttcggggtc cagcagaagg gcacctcaga aacagacacc atctgcacct 360
gtgaagaagg ctggcactgt acgagtgagg cctgtgagag ctgtgtcctg caccgctcat 420
gctcgcccgg ctttggggtc aagcagattg ctacaggggt ttctgatacc atctgcgagc 480
60 cctgcccagt cggcttcttc tccaatgtgt catctgcttt cgaaaaatgt cacccttggg 540
caagctgtga gaccaaagac ctggttgtgc aacaggcagg cacaaaacaag actgatgttg 600
tctgtggtcc ccaggatcgg ctgagagccc tgggtggtgat ccccatcatc ttcgggatcc 660
tgtttgccat cctcttggtg ctggtcttta tcaaaaaggt ggccaagaag ccaaccaata 720
aggcccccca cccaagcag gaaccccagg agatcaattt tcccagcagat cttcctggct 780
ccaactctgc tgctccagtg caggagactt tacatggatg ccaaccggtc acccaggagg 840
atggcaaaga gagtgcgcatc tcagtgcagg agagacagtg aggctgcacc caccaggag 900
75 tgtggccacg tgggcaaaca ggcagttggc cagagagcct ggtgctgctg ctgcaggggt 960
gcaggcagaa gcggggagct atgccagctc agtgccagcc cctc 1004

```

ES 2 641 290 T3

5 <210> 2
 <211> 427
 <212> ADN
 <213> H. sapeins

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 13, 52, 152, 193, 245, 254, 263, 298, 305, 323, 331, 344,
 374
 <223> n = A, T, C o G

15 <400> 2

```

20      gataccatct gcnagccctg cccagtcggc ttcttctcca atgtgtcatc tnccttcgaa 60
      aatgtcacc cttggacaag ctgtgagacc aaagacctgg ttgtgcaaca ggcaggcaca 120
      aacaagactg atgtttgtctg tgggtccccag gntcggctga gagccctggt ggtgatcccc 180
      atcatcttcg ggntcctggt tgccatcctc ttgggtctgg tctttatcaa aaaggtggcc 240
      aagangccaa ccantaaggc ccnccacccc aagcaggaac cccaggagat caatcttnc 300
      gacgntcttc ctggctccaa cantgctgct ncagtgagg agantttaca tggatgccaa 360
25      ccggtcacc aggnaggatg ggcaaagaga gtcgcatttc agttgcaggg agagacagt 420
      aaggtt 427
  
```

30 <210> 3
 <211> 871
 <212> ADN
 <213> H. sapiens

35 <400> 3

```

35      acctcgccat ggttcgtctg cctctgcagt gcgtcctctg gggctgctg ctgaccgctg 60
      tccatccaga accaccact gcattgcagag aaaaacagta cctaataaac agtcagtgtc 120
40      gttctttgtg ccagccagga cagaaactgg tgagtactg cacagagttc actgaaacgg 180
      aatgccttcc ttgcggtgaa agcgaattcc tagacacctg gaacagagag acacactgcc 240
      accagcacia atactgcgac cccaacctag ggcttcgggt ccagcagaag ggcacctcag 300
      aaacagacac catctgcacc tgtgaagaag gctggcactg tacgagtgag gcctgtgaga 360
      gctgtgtcct gcaccgctca tgctcgcccg gctttggtgt caagcagatt gctacagggg 420
      tttctgatac catctgcgag ccctgcccag tcggcttctt ctccaatgtg tcatctgctt 480
45      tcgaaaaatg tcacccttgg acaaggctcc aggatcggct gagagcctgt ggtgatccca 540
      tcatcttcgg atctgtttgc atctcttggg gctgtcttat caaaaagtgg caagaactac 600
      ccataggccc ccaccagca gacccagaga taatttctga gatttctgct caaatgtgtc 660
      agtagggagt catgagcaca gtcccacggg ggagaaccgc tctttggaga attgtgccca 720
      gattgccatg aaaaggatgt caagataggt ggggtttgtg gggggtaaac cttccccttt 780
      tgagctgtga attttgaact ctcgcccttt aagaatgggg ggtaaccaaa tttgactcca 840
50      acagttaaac ttgattatga ggtttgcctt t 871
  
```

55 <210> 4
 <211> 16001
 <212> ADN
 <213> H. sapiens

<400> 4

60

65

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

cagcttgagg	tctgtgttga	gattaccagc	ttcgcacccc	ctgccacca	ctctttgtca	60
tgattggagg	ctgtacttag	gatgagaagt	tgctgaaccc	actcattcat	ttattcattc	120
attcagcacc	catatattgg	tgccctatta	tgtacctagg	actgggatag	atccagtcct	180
gccctcaggg	agctcacagt	caaatgggac	caggcagaag	gagttatgag	ctggcatgct	240
aaatgctgtg	gcaacacagg	ggaggaggca	gggtgggata	gagtacctac	ctctgcctca	300
gggagttggg	gaaggtgtaa	gaggaggcaa	catttaaact	gtttaagaaa	ggagaaggaa	360
aggaaggaaa	catcaagagc	aatgagataa	accgtaagga	aaaaagattg	tgtgcctggg	420
aagtggggag	aggctgaagc	cagtgtgcat	gggaggacgt	ggcaggaagt	aagcatagaa	480
agagaggttg	gggctgagtg	aggaaggggtg	tgctttgcca	ggataagaaa	tttggatcat	540
cctgaggggtg	cagggaaacc	caaagaggct	tttatgcagg	aaagtgtccc	agtcgatcag	600
atctcgagtt	tafcaagaga	atcgcagcag	tgtaaagagt	tgcttggcac	atagtaggtg	660
ctcaataaat	cctgtggaat	gagagaggct	gttgggacag	tccagatgaa	agatggcacc	720
ctctgaatta	gggcagtggc	agaggtgaca	gaaaataagg	gatggatcct	agaggcagaa	780
tccacaagac	ttgcaaatgt	gcccttaaca	gcagaagcca	tgagaatggg	gttagaagtg	840
tcctcctctt	ccatcctccc	tgatctgtga	ggtctggcct	ctgtcctct	tcagaaaatt	900
gagagcttgg	agggcatca	cctcaaccgt	tgtctagtcc	aagctcctaa	gttttccttg	960
gagaaaaatt	taggcctaag	ggaacacagt	ccttcagagg	cagaggctgc	accagaaccc	1020
aggtgttcca	tgctgcaaag	cagagtgтта	acactggttc	aagaacatct	tgagggccag	1080
gtgcggtggc	tcatgcctgt	aatctcagca	ctttgggagg	ccaaggcagg	cggatcacct	1140
gaggtcagga	gtttgagacc	agcctggcca	acgtggagaa	accccgtctc	tactaaaaat	1200
acaaaaatta	gctgggcgtg	gtggcgccag	cctgtaatcc	cagctactcg	ggaggctgag	1260
gcaggagaat	tgcttgaacc	caggaggcag	aggttgacgt	gagccgagat	catgccactg	1320
cactccagcc	tgggcaacag	aatgagactc	tgtaaaaaaa	aaacccaaaa	ccaaaaacca	1380
aacaaacacc	caaaaaacaa	aacgaaacaa	aaaacaaaaa	aacaaaagca	cgcttccaga	1440
gttcatgaac	ccaggaaatg	taggcacaag	tgtgtgtgtt	tctgcaaaaat	gagaggggtcc	1500
cgagtttctt	aacatactta	aagtgtttta	tgatgccaca	aaaggctggc	ccactctttt	1560
tttttttttg	agatggagtt	ttgactgtc	gccaggctg	aagtgcagtg	atgtaatcat	1620
tgcaatcatg	gctcactgca	accttgactt	cttgagctca	agcgcctctc	ctgcctcagc	1680
ctcctgagta	gctgggacta	caggtgtttg	ccaccatgcc	tggctaactt	aaaaatttct	1740
ttatttttgta	gagatggggg	tcttgccatg	ttgccaggct	ggtcctgaac	tcttggcctc	1800
aagcaatctc	cctttttggc	cttccaaagt	gttagattac	aggcgtaagc	caccgcgcct	1860
ggccccacc	tttattttta	ttttatatta	ttatitattt	tttttttttt	tgagactgag	1920
tcttgctctg	ccttcgaggc	tggagtgcag	tggcacgatc	tcggctcatt	gcaatctctg	1980
cctctgcggt	tcaagcgatt	ctcctgcctc	agcctcccga	gtagctggga	ttacaggcga	2040
acgccactac	atccggttaa	tttttgtatt	tttagtagag	acggagtttc	actatgtttg	2100
ccaggttgg	ctcgaactcc	tgacctcaag	tgatctgccc	gcctcggcct	cctaaagtgc	2160
tggattacag	gcgtgagcca	ccgcgcccgg	ccccactctt	aataaatgcc	tgtctccagg	2220
tgctgggtgg	gaggtgggat	ggaatggaat	gaggtgagga	cgcatggatg	catggatgaa	2280
tggatgggaa	gttgagacga	cgcgcccaca	cgagggatt	tcctttgaaa	gagagcgaaa	2340
ttctgagttg	ggaaactctt	ccttgaaacg	cctccccata	ccccagctgt	ggccttcccg	2400
ttttctgctg	ggtggtgtgg	ggggaacttc	ctcaggcctc	tccgcagtgg	agcctctttc	2460
ggttctgcca	ggatacctag	aggcagcggg	gagcggggca	gggaggggaa	aaccgtgagg	2520
gtccctgtgg	caggccccag	cacccatggg	atctctctcc	ggtcgcagga	agcaggctag	2580
ctcctagccc	gcctcggcct	ggcctttgtg	ggacctgggg	gcaaagaaga	agagctgtct	2640
ctgggaccat	gcctcctccc	gtacacagca	agatgcgtcc	ctaaactccc	gggggaatta	2700
gacttgtggg	aatgttctgg	ggaaactcct	gcgcggtgaa	ttgctggggg	ctccgcccc	2760

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

```

ccgataggtg gaccgcgatt ggtctttgaa gacccccccc ctttcctggg cggggccaag 2820
gctggggcag gggagtcagc agagggcctcg ctcgggcgcc cagtggctct gccgcctggt 2880
ctcacctcgc tatggttcgt ctgcctctgc agtgcgctct ctggggctgc ttgtgaccg 2940
ctgtgagttg tttttgcccc gaccagacgg gagtgggag tggggaatga gaaggaaagg 3000
gaaggaagac ttcggggaag aggccttcct ggctgatttt tgtgggggca ggagggtggg 3060
tgggagctgg gcaaggtgcc cccgctcctg gctgaatggg gtgggctgcc tctctctct 3120
cccgggctgg ggtcccggga gcgacctaca gggccgctc agggaaggca ctggctgcc 3180
aagcgtgcct agacgggctg gacgggttta gggagcctca gaggctggcc acacagagac 3240
tggtaggggg ttcagagggc ggggaagtgag gcggaccaag ggaagggcg ggtctggccc 3300
gtttcctgtc cccttcttat tgtggacaga tgccagcctc tgtaagtagt tatcatctcc 3360
ttgccagctg gggctgcctt ctccagggc atcttgtggg aacaagagat gggtgacag 3420
gccagggtac ttttgtgaga aggcaaggag cttttaacat cgccttccac cccgaaccgt 3480
atcttgggtg tccaacctt ggaggaatcc ccagggcttt gccttttct cctgaattta 3540
agatgacata ggagaccctt ggggagatga acagtttatg ggacacaata aagggttagg 3600
agaccagagt tctggttggc tctgacaggg ctggtgatca gagggctgga gaaaccaggg 3660
gtttctccag gcaccagagg ggtcagagc caaccaagca tatctccggg attttcagaa 3720
gcctacactt gactcacttt ttgtttaaat gtatttttgt agttcctcat tctggaggct 3780
gggaatcccc caagtacctg gtccttcat cccagcccct ctggcctccc cctactttag 3840
agggctgtag attcctgcct gaagcctggg caggaatgac ccatggtatc aaggaaagca 3900
agggaaagcag caaggggaaga gaggggagtgg ggaggctgct ttggtcccac agctttcact 3960
ttcacctgaa gcaatggctc ttagggaaaca gggaggcagg gggagggcgg agctggaaag 4020
aggtaaaggg gggcccttgt ggttaggagtg gagaaaagagc cagaggagggt ggggtgaagg 4080
gtgtgatcca ggcttctcaa gacagagtt tgccctcata actcccaact ttggctccag 4140
gtagaggctg ggctgtgaca acaatgtcag aagctatcta ttgagggctt cttgtgtgtc 4200
aggctctgag ccaaactg cctgttttct ttgtctgatt tctcaaacct cccccattat 4260
acagatgggc aaattgaggg tcagaaaagg gattgtctt gccaaaggct tcatagctag 4320
ctaattggaag aacctgggtg tgaatctaca tctgcatgat tcccagcct gcctctcaga 4380
tagtgagagt ctccaagctc tggctctgag ctgttttgtg gcagaaggac cagaactatg 4440
ggagctgaga actggagatt gacagacttt taggggagcg ttttatttct catgtgtttg 4500
aagatggtat caaggacttt cctatctttg ggagtgtggg agctccacgt tcacaggatg 4560
gtgtcttgca atgagctggt ggggggcagt agccttttct acttcccttc ccattttggg 4620
taagacacat tctgtaagt aatttgtctg gatacccagg ttgaatgaga gccaccagt 4680
aggtaggatt ctggacagcc agccaggtag ccggctgct tgccatata catgcaagca 4740
gaaacaaatg aatgatgatt aaaattgcc ttaatgagc acctactatg ttctgacac 4800
tgtgtctagg catatacatg tattctttct tatcttctgta atccaacctg cagggcaggc 4860
attattactc cacttttaga gatagagaaa ctgaggctaa gagaagcaaa ataactagta 4920
agtgttacia agtcaggact ggagtctaaa gctgtctgac tctcaaacct gtgttctttt 4980
cactggctgt tcccaaacct tgggacagtt ttaaggagca catggacata gaattaaaca 5040
tacacttact ttacagttct tttaaaaatc cttctcattt tttcaagag gaagtctctg 5100
gagctagaat agagttaatg cctctcaaa gcttgctaata ccttcttta aaacaaaaat 5160
caagagcagg cctgggaggg ctttcaacaa gcaaacacc agctgggttt taataacctt 5220
gttttgtttc cccagaattt attttttagg ttacctttta tttatgagaa gtgatactgg 5280
ttctgtctc ttggcaatga tgtgaggttt acatntaaag taaatgtacc ggcaggcac 5340
ggtggcttgt gcctgtaatc ccagcacttt gggaggccaa ggcagtcala tcactgagg 5400
tcaggagttt tagatcagcc tggccaacat ggtgaaacc tgtctctact aaaaatacat 5460
aaattagccg ggcatagtgg tacacacctg taatcccagc tactcaggag gctgaggctg 5520
gagaattgtc tgaaccagg agatagagg tgcagtggc tgagatgatg cccactgact 5580
ccagcctggg cgatggagcg agactctgtc tcaaaaaata aaataaaagt attgaaatta 5640
acaataagta attaatagca tgggtggtac ctgagttctc atttggactc tgtcactgtg 5700
acaagttagt ggagagagga gcaattgagac tctcttttgg tgctcagtct caactatctg taaaatgaaa 5820
agactctggg acccttccag ctttacattc tagcatttta tgagggagg gctggatgaa 5880
gtgtgagttt ggagttggag gaagaaaaca tgatgggctt tggaaaaggag caggaaggga 5940
agcagaagaa taggaggaag agggcaagtg ctaaacatag ccccaaacag cactgggacc 6000
agctgaagtc agccagcttc aggactccag gggagctgct ggagtcccca tatcctatgg 6060
gatctttggg aagaggaatg actcaggcat caagcccaa ggaattctgt tctgttcaga 6120
gaaatttgg agtttacagt accttgcct tgtaaaaaata ccagaatgat tctctgggtg 6180
cgattataat cagctcagtt gacaatttac ttgaaaacaa acatgcaaaa tatcatgcag 6240
gttccacttt ctgttttgac ttgcacttca gtttgagcc tctgtcctgg atgacttta 6300
cctttctgct gaagaagtgt caacggagat ttcaagatcc cttcaaattg cacaaattctg 6360
tttttaggtc catccagaac caccactgc atgcagagaa aaacagtagc taataaacag 6420
tcagtgtctg tctttgtgcc agccaggtga gatgccaac ctctagcccc atcatggagt 6480
ccccttttgc tttggtggca gacgcagacc ccatatgtta actgtaaac caaactgaa 6540
acgaccctat tcccagcctt gcttcactgt cagaatgttc tggttccctc tctaccagg 6600
aaaactctgt ctaccctgaa ctagggatcc cagcttctcc atcttctctg cctgattatg 6660
aaggatccaa gactttcatc tttgaatccc ctaccctaaa gcctggcctg atcatttgt 6720
ggttagtgtc tgactcatgg agttggccag agccctcctt catttctga tgtttccag 6780
gacagaaact ggtgagtgac tgacacagat tcaactgaaac ggaatgcctt ccttgcggtg 6840

```

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

```

aaagcgaatt cctagacacc tggAACagag agacacactg ccaccagcac aaatactgCG 6900
acccCagTgc gtgcgctgTt gggaaaggga cgcttgggaa ccgggctgat attcccGaca 6960
atgcagccat tctaatttta tgtagccagg gtctgctctg attggttGga gtccgggctg 7020
tactgatcat taaatgattt gattgccatc tctacttGga agagggctg aggaagaaag 7080
agcaggcaat gtggggagtg aggtcagag catggcccag cagggggttC ccatccttcc 7140
tgcccttctc ttctcagacc tagggcttcg ggtccagcag aagggcacct cagaaacaga 7200
caccatctgc acctgtgaag aaggctggca ctgtacgagt gaggcctgtg agagctgtgt 7260
cctgcaccgc tcatgctcgc ccggctttgg ggtcaagcag attggtaaGt ggctcatctg 7320
ggaatcagtt ttggaggggg acagaggagc ttaggGCCa aggtgagggg ctgggcagtg 7380
ggcacttagc cccagaggca gaggaagcag aggtcCcaac ctatgtcggT atccccactg 7440
gagtGagctg cagacgggac ctgttcatt ctgccttctg ccatggggat ctgcctttga 7500
agggcaatgg gagaagtcct cctggggact gcagctgtcg ggggcagTac cacatcgggg 7560
gaagatggct caaggcagga gctcttcccg tctgtcctgg cactggctg ccttgtgagc 7620
cggacaggtg gtccactgtg atggttaatg tccccctccc caccactcc cagctacagg 7680
ggtttctgat accatctcGg agcctgccc agtcggcttc ttctccaatg tgtcatctgC 7740
tttcgaaaaa tgtcaccctt ggacaaggtA taagcactca tcccttGtgt ttctgtctct 7800
aagatTggca tggagctgcc cctattctct taagccacct gtctgttccc ctggccttct 7860
ggtccacaca cactcatgta ctTgtgaagc atctgcagag tggcctcatg gccaaccaga 7920
caggcacatt tccacatTtt tttgCctgc Tgtctctttg aggtaataga cactgttgat 7980
ctctcgtctc atgagagcct cctatcttgg ggttattggg acacttattt tagctttctc 8040
tctgcccctc ctgcttctcc tCagtTttcc tCgtctgtct gagggcctcc ctctcttacc tccaactcca 8100
agggctttct gggctctggg tgcTaccct gagggcctcc ctctcttacc tccaactcca 8160
aaccacacc aggtcctgCt actggtctgT tacgtgtttt gggaaactTac tgtctccact 8220
gttgtcactt tagtttgggc ctcatcactg tggctcgggt gatgcctttt ctgcctctg 8280
gcctcactgc ctctgtctct cccctcctgc tggttctgtc tccatcctct tgccaactct 8340
agcgttcgac agtttctttc aaatcatgac actctcctat ttgagatgct tctgtctct 8400
ctgttggaaC taagactcct tagcatggca cccaacctc ctgttgcat tctgtctct 8460
ttctctgat cgcatagctt catgctactt ggaatcctt gaacacactg ttcatctct 8520
tccatcaaac tcatctgcct ggaatacctt aaactagggc cccaggccag gcgctggggc 8580
tcttgcctgt aatctcagca cttggatgc caaggcgggt ggatcacttg aggtcaggag 8640
ttcaagacca gccagcacaA accatctct actaaaata ccaaaaaatt 8700
agctgggtgt ggtggTgggc gcctgtaatc ccagctcctc gggaggctga ggcaggagaa 8760
tcactgaaC cgggaaggtg gagtttgCag tgagccaaga tagcgcact gcactccag 8820
ctggcCaaca cgcgacatt ctgtctcaaa aaacaaacac ctgccccatt aactttttgc 8880
atttgatttt taaaaatggg caagataggc acatgggaca gaaggcacaA aagagccaaa 8940
gtgatgtctt tctcccattc ctgcccctta ggctcccagt tctttctgga gggagccatt 9000
gttccTtGca tatecttcca gagattctac atataaaca accaacacac acacacacac 9060
acacaaaac acacaaaatt tccctcctt tacttttGca caaataggag tatacatTtt 9120
atttgTtaac tgtctgcctt tccctaataG attgaaaatt ccttaaattg agaaaacttg 9180
cctttttttt ttcttccatt gatacatccc ctatacctgg ctataacct aacagTacc 9240
aggtgcttaa atttttactg ataaatgttg actgataact ggaggcaca ctggtatag 9300
tttttttttt tttttttttt ttgtgacaga ttgagacaga gtctcactct gtcgcccagg 9360
ctggagtGca gtggcgcaat ctcggtcac tgcaagctct gcctcccagg ttcacgccat 9420
tctctgcct cagcctcctg agtagctggg actataggcg cccgccacca cccccgcta 9480
atttttttt atttttagta gagacggcgt ttcaccgtgt tagccaggat ggtcttgatc 9540
tctgacctc gtgatccgtc tgccttggcc tcccaaagtG ctgggattac aggcctgagc 9600
caccgtgcc ccgccaccagT ggtatagTat taatggaaTc agtgcatTgg cttacgtatc 9660
tgattacagc tcagtaagTg tgtgacCctc actgagcctc agtctcctca tctgaaaaat 9720
gggaatgacc ttcatttcac aaggcttag ctaaaacat gtaaagtGta ttgtaaattc 9780
ctgaatgctc tactcatgta agactaaagt agggcggcg atggctgctc cacctgtaat 9840
tgcagactt tgggaggccg aggaggcag atcatgaggT caagagatcg agaccatcct 9900
ggctaatatg gtaaaaccct gtcttacta aaaatacaaa aattagctgg gcgtggTggc 9960
gcacatctgt agtcccagct actcaggagg cggaggcagg agaattgctt gaaactggga 10020
ggTgagggt tCagTgagct gagatcgcgc cactgcattc cagccagTct ggcgaaagag 10080
caagactctg tctcaaaaaa aaaaaaaaag aaaaaaaaag actaaagtac atggtttctt 10140
caaagcttct ctctctttct cccaccttag atgatttttc ctttgcaatg tctgtgtctc 10200
attcgcCCC actcctcctg gggccactct gaccaggTct tcatcatctc atatctat 10260
gtttgtgtg tctcctggct ggcactctt ctgtaatttc tctcctctg agctctctg 10320
gcagctgaat cttctcacta gtgaagTgc ctggttggat gctgatgaga ctgaccagct 10380
gaatccagTt gaaaacttca cacttggcag tgatctggTt ctaaagacac aattttccat 10440
agtttctaa caccatcctg catgccacct gccttatttc cccacatcac atcgtcccac 10500
ttagcgggac tgcactgtct atccaaattt tacatctttt agggccact caggctat 10560
gtcctcaggg ggaagaacct ggaagaacct taaccagag gtctcaaca gggggcagtt 10620
ttgctcctg tggaaCgttt gccaatgtct ggacacattt cattcgtcac aaacggagag 10680
ggggatgcta cagggatctg gcggatagag gccagggatg ctgctgaaca tctgcaatgc 10740
ataggacagc ccacccccac cccacacccc ccagtaata atgatccagc ccaagtgtca 10800
ctggTctgga ccttgagTaa ccctatctta agctgaactc atctatctc atctccagc 10860
ttggtggatt ctgtctctc tgaaccattc ccatctcact ttagcctacc tagatcacaA 10920

```

5	agcttggcac	tcattataga	ctccccatt	tattactcct	tcaagatgtg	caagaatcct	10980
	ttctctgcac	ttttaagttc	tgtaagaaga	gtctgtgtcg	ttcctataat	aaccagcata	11040
	ggacgttgca	cgtgttgtgt	gctcagtgaa	cctggatttg	ttgattgttg	actgactcac	11100
	tctagagttg	gaaatcttat	gcttggggaa	acttaatac	tctttctttc	tctgtgtgtg	11160
	tgcatlgtg	cacgtgtctg	tgcatagctg	tgagaccaa	gacctgggtg	tgcaacaggc	11220
	aggcacaac	aagactgatg	ttgtctgtgg	tgagtcctgg	acaatgggcc	ctggagaaag	11280
10	cctaggaagg	tggaactga	agggggagat	gaggcacaca	ggaacactgg	atgggaaaaa	11340
	ggggaggga	ggcagtttg	gggtgtggta	tcacagctct	gccacttatc	ttgggagtct	11400
	gggcaaatca	cttccccctc	cttagcctca	gtttcttcat	ctgtaaaatg	ggatgataac	11460
	agcacttcct	tagtaggttt	tgattttaga	gtgagaaggt	tggcctacag	taaagatcag	11520
	ataatgtaaa	tcagtgaaaa	aggtcagggg	taagaaaatt	acattctctt	tacctaacgc	11580
	taaataacca	gttaatgggt	gcagcacacc	aacatggtac	atgtatacat	atgtaacaaa	11640
15	cctgcacatt	atgcacatgt	accctaaagc	ttaaagtata	ataataataa	aatttaaaaa	11700
	aacgaaaaat	acattctctt	tgcttttctc	caaaatgtac	tttctctttt	gtagggctgg	11760
	gactagaatg	aggtagcaaa	ggcacttgcc	ctcgggcgca	atatttaaga	aggtagcata	11820
	aaatgacatg	aatcaaggta	aattctattt	gaggtcaaat	tttataaaat	aaaaatctat	11880
	gcaaagaaat	ccatgatgag	caagatagca	acattttaaa	taaagaacag	gatccgaccc	11940
20	tgtgtttgca	tgaccctgcc	tcactcacct	caccctaata	ctggccctgg	ttccagtaaa	12000
	aggaataggg	agccagcctg	caggccgtag	tttgctgact	tgggtgtccgc	ctgatgattt	12060
	tcaaaatag	gcataaaaag	aatgtttacc	ttctgatgact	agtgttttgg	acatcctttt	12120
	caatltttgtc	ctgaaacaat	ttcatccctt	gcctcacgct	agtctccgcc	ctgccttttg	12180
	gtctttcttt	tattttccca	ctttgaaaaa	aaaattcggc	atgagaaata	ctttaccttt	12240
	cccctccact	cttctataacc	aaaagcaaca	tcagacatg	aatcatgcta	gacctcgcca	12300
25	ttgggcagag	agcaggaggt	gcgggggagc	atggtagca	ggtggtgaca	gccactcgca	12360
	ccactcgctt	ctagatggtt	cccagggtgg	gaggtcgcca	actggaaccc	agtcttccca	12420
	gtttgtaaga	gaaatcagat	gtctaggttt	gaatatgtga	tctcccagtt	taaaaatgtc	12480
	ggcaaatatt	tccaaacggt	aagaaaatgt	tctggctcct	ttaaagacat	ctgccagcca	12540
	cattttccca	aggaccgagg	tttgaacctt	ctgatgtaga	tgagctctga	cattggaaga	12600
	ttctggagtc	tgacaagtca	cagcagtttg	aggtagggga	gaaactgcag	gtgaggggtg	12660
30	catgctgaag	tcctgatttc	tccaggctcc	caggatcggc	tgagagccct	ggtggtgatc	12720
	cccattcatt	tcgggatcct	gtttgccatc	ctcttgggtg	tggcttttat	cagtgaagtc	12780
	tcaggttggg	aggtgttggg	ggaggggagg	gagaccacct	gtttctttat	ggcctctcc	12840
	aactccccat	cttttttttt	tttttttttt	tttttagaaa	aggtggccaa	gaagccaacc	12900
	aataaggtag	gtcacccttg	agaaccgagg	acagagtttt	gacaaactgg	gaagatggcc	12960
35	tcacggttgc	ctatggggca	gtaaaactga	ttcagagtct	gtctctgcag	ccagtggggt	13020
	ggcagcagaa	ttggggactg	tcactccccac	ccaccatgct	ccttccatcc	agagcatttc	13080
	ccccacagca	actgccccctg	gcaccactgg	cagagcctaa	cactggctgt	tcttcaatcc	13140
	tttcttgcca	ttcaacgcgt	ggggagctgc	atctttgggc	cttggggctg	ggtcaaatgg	13200
	gtgggagcaa	atgtggcagc	cccttaagcc	cactggctcc	caactctggaa	gctctctgct	13260
	gccctttgggt	tggccagcag	ggggcaggag	gcaccgagg	aatcagcact	gacccgacct	13320
40	ctgggaaagg	gggaggggct	ttgggaaagg	atccgcttcc	cagggagggg	ctcctcagag	13380
	gcacagctgc	ccctgctgct	gggggtgacc	tcacaccttg	ccctccagg	ccccccacc	13440
	caagcaggaa	ccccaggaga	tcaatlttcc	cgacgatctt	cttggctcca	acactgctgc	13500
	tcagctgcag	gagactttac	atggatgcca	accggctacc	caggaggatg	gcaaagagag	13560
	tcgcatctca	gtcaggaga	gacagtgagg	ctgcaccac	ccaggagtgt	gccacagtgg	13620
	gcaaacaggc	agttggccag	agagcctgg	gctgctgctg	ctgtggcgtg	aggggtgagg	13680
45	gctggcactg	actgggcata	gctccccgct	tctgcctgca	ccccctcag	ttgagacagg	13740
	agacctggca	ctggatgcag	aaacagttca	ccttgaagaa	cctctcactt	cacctggag	13800
	ccatcccagt	ctcccactt	gtatataaga	cagaggcaga	agtttgggtg	tggtggtgtt	13860
	ggggtatgg	ttagtaatat	ccaccagacc	ttccgatcca	gcagtttgg	gcccagagag	13920
	gcatcatggt	ggcttccctg	cgcccaggaa	gccatataca	cagatgcca	ttgcagcatt	13980
50	gtttgtgata	gtgaacaact	ggaagctgct	taactgtcca	tcagcaggag	actggctaaa	14040
	taaaattaga	atataattat	acaacagaat	ctcaaaaaa	ctgttgagta	aggaaaaaaa	14100
	ggcatgctgc	tgaatgatgg	gtatggaact	tttataaaaa	gtacatgctt	ttatgtatgt	14160
	atattgccta	tggatatatg	tataaatata	atatgcatca	tatatgtata	taacaaggg	14220
	tctggaaggg	tacacagaaa	accacagctg	cgaagagtgg	tgacgtctgg	gggggggag	14280
	aagggctctg	gggaggggtg	gttaaaggga	gatttggctt	tcccataatg	cttcatcatt	14340
55	tttcccaaaa	ggagagtga	ttcacataat	gcttatgtaa	ttaaaaaatc	atcaaacatg	14400
	taaaaagaaa	aacgggggtg	aacatgctgg	gtgacatgag	ctatttaacc	tgctgtcagg	14460
	ctcacggaat	gagggcattt	tctgtagata	aataagaatg	tccccaggct	gctgccccct	14520
	caggggtggt	ctccatgtg	ctcacatgtg	gtattgagat	tgcaaaagtgc	tcttccccat	14580
	tgattcatgt	tcacaaaaat	agccttcccc	agcaggggtg	gtctgcatcc	ctccctcttt	14640
	tacagaggtg	gaaatgaggt	ccagagaggg	gaagtgactt	gcctgtggtc	acagacgggt	14700
60	gtctggtggt	gccatgctca	gagctcctca	ctctgggtcc	tgagctcctc	ccagatctgc	14760
	ctgctgtctg	gcaactgacat	ctgtagctcc	ttcccaggga	gatcctgggt	ctctcaccgc	14820
	cttctgacct	ccctgtggct	gcaggagcta	ctgcttctcg	gtcagatggt	atccccctcc	14880
	cccaagcagt	atctcaggat	aaaaataaac	catcctgttc	tcttttctcg	ctgagccaac	14940
	tgagggggag	cctagccagg	aggagcggca	gatggagtgg	gagcagaggg	gaggggaggg	15000

65

5

10 gaggaagggtt ggaggacaag gaggagaagg aagagcaatg caaagtgccca tgcagaaccc 15060
 cggcacaaaag gttcgagggtg aggtttaacc caggggtctc agcctttccc aggaaagaac 15120
 ctgctttgga tttccccaac acatcctgct ggctggaggg tgtggggcga tggggggcaa 15180
 ggggagatgt ggagagggct tatcccagtg gaggctgtga gggcagctgc gagccaagag 15240
 aggggacact ggcttggcag gcttcccaga agagcttcaa gaaccatttg gatacaccag 15300
 15 gtggaggcct ttggtttaga aagtggagca aagtgggtgt ggcggggaag gggaaactttg 15360
 ggacctaat cttgtctctt atctagagcc taagagtgag tgtgttcac ttctttggtg 15420
 gtatggtgga aagagaccaa agaccacgc ctgccacaga tcctctgtgt ggccttggtg 15480
 gagtacttt cactgcttca cttctcagtt tccctatctg acaaatggtg acaatatctg 15540
 cagcagacgc tattgatgcc tcctgtgttc tcttctaggt cagagcttct caaatgtgag 15600
 20 tgtgggtcag ggcagtggtc tcacgtctgt aatcccagca ctctgggagg cttaggtggg 15660
 cagataacct aaggtcagga gttcagagacc agcctgacca acagggcaa accccgtctc 15720
 tactaaaaat acaaaaatta gccgggcatg atggcgggtg cctgtaatcc cagctacttg 15780
 ggaggctgag gcagaagaat cacttgaacc cgggaggtgg aggttgcagt gagccgagat 15840
 catgccactg tactccagcc tgggcaacag agtgaaactc catctaaaat aacaacaaca 15900
 acaatagcaa caacaacaac aacaatagca acaacaaca aacttgagcg tgtatctgga 15960
 25 ccacctgcaa ggtggtcctc tccactattt tcagaactgg a 16001

30 <210> 5
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 5
 ccaggcggca ggaccact 18

40 <210> 6
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 6
 gaccaggcgg caggacca 18

50 <210> 7
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 7
 aggtgagacc aggcggca 18

60 <210> 8
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

65 <220>

<223> Oligonucleótido sintético
 <400> 8
 cagaggaga cgaacat 18
 5
 <210> 9
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 9
 15 gcagaggcag acgaacca 18
 <210> 10
 <211> 18
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 25 <400> 10
 gcaagcagcc ccagagga 18
 <210> 11
 <211> 18
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 35 <400> 11
 ggtcagcaag cagcccca 18
 <210> 12
 40 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 45 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 12
 gacagcggtc agcaagca 18
 50 <210> 13
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 13
 60 gatggacagc ggtcagca 18
 <210> 14
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65 <220>

<223> Oligonucleótido sintético
 <400> 14
 tctggatgga cagcggtc 18
 5
 <210> 15
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 15
 15 gttggttctg gatggaca 18
 <210> 16
 <211> 18
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 25 <400> 16
 gtgggtggtt ctggatgg 18
 <210> 17
 <211> 18
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 35 <400> 17
 gcagtgggtg gttctgga 18
 <210> 18
 40 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 45 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 18
 cacaaagaac agcactga 18
 50 <210> 19
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 19
 60 ctggcacaaa gaacagca 18
 <210> 20
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65 <220>

<223> Oligonucleótido sintético
 <400> 20
 tcctggctgg cacaaga 18
 5
 <210> 21
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 21
 15 ctgtcctggc tggcaca 18
 <210> 22
 <211> 18
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 25 <400> 22
 ctcaccagtt tctgtcct 18
 <210> 23
 <211> 18
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 35 <400> 23
 tcactcacca gtttctgt 18
 <210> 24
 40 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 45 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 24
 gtgcagtcac tcaccagt 18
 50 <210> 25
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 25
 60 actctgtgca gtcactca 18
 <210> 26
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65 <220>

<223> Oligonucleótido sintético
 <400> 26
 cagtgaactc tgtgcagt 18
 5
 <210> 27
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 27
 15 attccgttcc agtgaact 18
 <210> 28
 <211> 18
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 25 <400> 28
 gaaggcattc cgtttcag 18
 <210> 29
 <211> 18
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 35 <400> 29
 ttcaccgcaa ggaaggca 18
 <210> 30
 40 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 45 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 30
 ctctgtcca ggtgtcta 18
 50 <210> 31
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 31
 60 ctggtggcag tgtgtctc 18
 <210> 32
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65 <220>

<223> Oligonucleótido sintético
 <400> 32
 tggggtcgca gtattgt 18
 5
 <210> 33
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 33
 15 gttggggtc gcagtatt 18
 <210> 34
 <211> 18
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 25 <400> 34
 ctaggtggg gtcgcagt 18
 <210> 35
 <211> 18
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 35 <400> 35
 gtgcccttc tgctggac 18
 <210> 36
 40 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 45 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 36
 ctgagtgcc cttctgct 18
 50 <210> 37
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 37
 60 gtgtctgtt ctgagtg 18
 <210> 38
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65 <220>

<223> Oligonucleótido sintético
 <400> 38
 tgggtctctgt ttctgagg 18
 5
 <210> 39
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 39
 15 acaggtgcag atggtgtc 18
 <210> 40
 <211> 18
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 25 <400> 40
 ttcacagtg cagatggt 18
 <210> 41
 <211> 18
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 35 <400> 41
 gtgccagcct tctcaca 18
 <210> 42
 40 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 45 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 42
 tacagtgcca gccttct 18
 50 <210> 43
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 43
 60 ggacacagct ctcacagg 18
 <210> 44
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65 <220>

<223> Oligonucleótido sintético
 <400> 44
 tgcaggacac agctctca 18
 5
 <210> 45
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 45
 15 gagcggcgca ggacacag 18
 <210> 46
 <211> 18
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 25 <400> 46
 aagccggcgc agcatgag 18
 <210> 47
 <211> 18
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 35 <400> 47
 aatctgcttg acccctaa 18
 <210> 48
 40 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 45 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 48
 gaaaccctg tagcaatc 18
 50 <210> 49
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 49
 60 gtatcagaaa cccctgta 18
 <210> 50
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65 <220>

<223> Oligonucleótido sintético
 <400> 50
 gctcgagat ggtatcag 18
 5
 <210> 51
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 51
 15 gcagggctcg cagatggt 18
 <210> 52
 <211> 18
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 25 <400> 52
 tgggcagggc tcgagat 18
 <210> 53
 <211> 18
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 35 <400> 53
 gactgggcag ggctcgca 18
 <210> 54
 40 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 45 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 54
 cattggagaa gaagccga 18
 50 <210> 55
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 55
 60 gatgacacat tggagaag 18
 <210> 56
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65 <220>

<223> Oligonucleótido sintético
 <400> 56
 gcagatgaca cattggag 18
 5
 <210> 57
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 57
 15 tcgaaagcag atgacaca 18
 <210> 58
 <211> 18
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 25 <400> 58
 gtccaagggt gacatttt 18
 <210> 59
 <211> 18
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 35 <400> 59
 cacagcttgt ccaagggt 18
 <210> 60
 40 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 45 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 60
 ttggtcac agctgtc 18
 50 <210> 61
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 61
 60 caggtcttgg gtctcaca 18
 <210> 62
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65 <220>

<223> Oligonucleótido sintético
 <400> 62
 ctgttgacaca accaggtc 18
 5
 <210> 63
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 63
 15 gtttgcct gcctgttg 18
 <210> 64
 <211> 18
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 25 <400> 64
 gtctgttg tgctgcc 18
 <210> 65
 <211> 18
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 35 <400> 65
 ccacagacaa catcagtc 18
 <210> 66
 40 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 45 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 66
 ctggggacca cagacaac 18
 50 <210> 67
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 67
 60 tcagccgatc ctggggac 18
 <210> 68
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65 <220>

<223> Oligonucleótido sintético
 <400> 68
 caccaccagg gctctcag 18
 5
 <210> 69
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 69
 15 gggatcacca ccagggct 18
 <210> 70
 <211> 18
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 25 <400> 70
 gaggatggca aacaggat 18
 <210> 71
 <211> 18
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 35 <400> 71
 accagcacca agaggatg 18
 <210> 72
 40 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 45 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 72
 ttttgataaa gaccagca 18
 50 <210> 73
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 73
 60 tattggttgg cttcttgg 18
 <210> 74
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65 <220>

<223> Oligonucleótido sintético
 <400> 74
 gggtcctgc tggggtg 18
 5
 <210> 75
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 75
 15 gtcgggaaaa ttgatctc 18
 <210> 76
 <211> 18
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 25 <400> 76
 gatcgtcggg aaaattga 18
 <210> 77
 <211> 18
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 35 <400> 77
 ggagccagga agatcgtc 18
 <210> 78
 40 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 45 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 78
 tggagccagg aagatcgt 18
 50 <210> 79
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 79
 60 tggagcagca gtgttga 18
 <210> 80
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65 <220>

<223> Oligonucleótido sintético
 <400> 80
 gtaaagtctc ctgcactg 18
 5
 <210> 81
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 81
 15 tggcatccat gtaaagtc 18
 <210> 82
 <211> 18
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 25 <400> 82
 cggttggcat ccatgtaa 18
 <210> 83
 <211> 18
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 35 <400> 83
 ctcttgcca tcctcctg 18
 <210> 84
 40 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 45 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 84
 ctgtctctcc tgactga 18
 50 <210> 85
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 85
 60 ggtgcagcct cactgtct 18
 <210> 86
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65 <220>

<223> Oligonucleótido sintético
 <400> 86
 aactgcctgt tgcccac 18
 5
 <210> 87
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 87
 15 ctctgcctg caccctg 18
 <210> 88
 <211> 18
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 25 <400> 88
 actgactggg catagctc 18
 <210> 89
 <211> 18
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 35 <400> 89
 gccccagagg acgcactg 18
 <210> 90
 40 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 45 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 90
 agcagcccca gaggacgc 18
 50 <210> 91
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 91
 60 agcaagcagc cccagagg 18
 <210> 92
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65 <220>

<223> Oligonucleótido sintético
 <400> 92
 gcggtcagca agcagccc 18
 5
 <210> 93
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 93
 15 gttctgat ggacagcg 18
 <210> 94
 <211> 18
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 25 <400> 94
 agtgggtgt tctggatg 18
 <210> 95
 <211> 18
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 35 <400> 95
 gcactgactg ttattag 18
 <210> 96
 40 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 45 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 96
 ggcacaaaga acagcact 18
 50 <210> 97
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 97
 60 tgtcctggct ggcacaaa 18
 <210> 98
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65 <220>

<223> Oligonucleótido sintético
 <400> 98
 cagtttctgt cctggctg 18
 5
 <210> 99
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 99
 15 gtcactcacc agtttctg 18
 <210> 100
 <211> 18
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 25 <400> 100
 aaggcattcc gtttcagt 18
 <210> 101
 <211> 18
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 35 <400> 101
 cttcaccgc aaggaagg 18
 <210> 102
 40 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 45 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 102
 tgtgtctctc tgtccag 18
 50 <210> 103
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 103
 60 gtggcagtgt gtctctct 18
 <210> 104
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65 <220>

<223> Oligonucleótido sintético
 <400> 104
 cccttctgct ggaccgga 18
 5
 <210> 105
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 105
 15 tgaggtgccc ttctgctg 18
 <210> 106
 <211> 18
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 25 <400> 106
 tctgtttctg aggtgccc 18
 <210> 107
 <211> 18
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 35 <400> 107
 gatggtgtct gtttctga 18
 <210> 108
 40 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 45 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 108
 aaaccctgt agcaatct 18
 50 <210> 109
 <211> 18
 ADN <212>
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 109
 60 cgcagatggt atcagaaa 18
 <210> 110
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65 <220>

<223> Oligonucleótido sintético
 <400> 110
 ggcagggctc gcagatgg 18
 5
 <210> 111
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 111
 15 gagaagaagc cgactggg 18
 <210> 112
 <211> 18
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 25 <400> 112
 tggagaagaa gccgactg 18
 <210> 113
 <211> 18
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 35 <400> 113
 attgagaag aagccgac 18
 <210> 114
 40 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 45 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 114
 acattggaga agaagccg 18
 50 <210> 115
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 115
 60 acacattgga gaagaagc 18
 <210> 116
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65 <220>

<223> Oligonucleótido sintético
 <400> 116
 tgacacattg gagaagaa 18
 5
 <210> 117
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 117
 15 atgacacatt ggagaaga 18
 <210> 118
 <211> 18
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 25 <400> 118
 aaagcagatg acacattg 18
 <210> 119
 <211> 18
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 35 <400> 119
 aggtcttgg tctcacag 18
 <210> 120
 40 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 45 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 120
 ttgcacaacc aggtcttt 18
 50 <210> 121
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 121
 ttgtttgtgc ctgcctgt 18
 60 <210> 122
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65 <220>

<223> Oligonucleótido sintético
 <400> 122
 tctgtttgt gctgcct 18
 5
 <210> 123
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 123
 15 agtcttggtt gtcctgc 18
 <210> 124
 <211> 18
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 25 <400> 124
 cagtctggtt tggcctg 18
 <210> 125
 <211> 18
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 35 <400> 125
 tcagtctgtt ttggcct 18
 <210> 126
 40 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 45 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 126
 catcagtctt gttgtgc 18
 50 <210> 127
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 127
 gaccacagac aacatcag 18
 60 <210> 128
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65 <220>

<223> Oligonucleótido sintético
 <400> 128
 gggaccacag acaacatc 18
 5
 <210> 129
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 129
 15 tcaccaccag ggctctca 18
 <210> 130
 <211> 18
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 25 <400> 130
 gatcaccacc agggctct 18
 <210> 131
 <211> 18
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 35 <400> 131
 agaggatggc aaacagga 18
 <210> 132
 40 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 45 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 132
 aagaggatgg caaacagg 18
 50 <210> 133
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 133
 60 caagaggatg gcaaacag 18
 <210> 134
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65 <220>

<223> Oligonucleótido sintético
 <400> 134
 gaccagcacc aagaggat 18
 5
 <210> 135
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 135
 15 aagaccagca ccaagagg 18
 <210> 136
 <211> 18
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 25 <400> 136
 taaagaccag caccaaga 18
 <210> 137
 <211> 18
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 35 <400> 137
 tgataaagac cagcacca 18
 <210> 138
 40 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 45 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 138
 tttgataaag accagcac 18
 50 <210> 139
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 139
 actctctttg cccatcct 18
 60 <210> 140
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65 <220>

<223> Oligonucleótido sintético
 <400> 140
 cgactctctt tgcccatc 18
 5
 <210> 141
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 141
 15 atgcgactct cttgccc 18
 <210> 142
 <211> 18
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 25 <400> 142
 aaatgcgact ctcttgc 18
 <210> 143
 <211> 18
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 35 <400> 143
 ctgaaatgcg actctctt 18
 <210> 144
 40 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 45 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 144
 aactgaaatg cgactctc 18
 50 <210> 145
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 145
 cttcactgtc tctccctg 18
 60 <210> 146
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65 <220>

<223> Oligonucleótido sintético
 <400> 146
 ccttcactgt ctctccct 18
 5
 <210> 147
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 147
 15 aaccttact gtctctcc 18
 <210> 148
 <211> 18
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 25 <400> 148
 gatcaccaca ggctctca 18
 <210> 149
 <211> 18
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 35 <400> 149
 tgataagaca gcaccaag 18
 <210> 150
 40 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 45 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 150
 ggtagttctt gccacttt 18
 50 <210> 151
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 151
 60 gggcctatgg gtagttct 18
 <210> 152
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65 <220>

<223> Oligonucleótido sintético
 <400> 152
 attatctctg ggtctgct 18
 5
 <210> 153
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 153
 15 actgacacat ttgagcag 18
 <210> 154
 <211> 18
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 25 <400> 154
 gactccctac tgacacat 18
 <210> 155
 <211> 18
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 35 <400> 155
 caaagagcgg ttctccac 18
 <210> 156
 40 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 45 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 156
 aattctcaa agagcgg 18
 50 <210> 157
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 157
 60 tcttgacatc cttttcat 18
 <210> 158
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65 <220>

<223> Oligonucleótido sintético
 <400> 158
 cccacctatc ttgacatc 18
 5
 <210> 159
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 159
 15 aggccgagag tcaaaat 18
 <210> 160
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 25 <400> 160
 ccagcaattc accgcgagg 20
 <210> 161
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 35 <400> 161
 tgcagaggca gacgaacct 20
 <210> 162
 40 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 45 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 162
 cagaggacgc actgcagagg 20
 50 <210> 163
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 163
 aagcagcccc agaggacgca 20
 60 <210> 164
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65 <220>

<223> Oligonucleótido sintético
 <400> 164
 cagcggtcag caagcagccc 20
 5
 <210> 165
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 165
 15 ctcacagcgg tcagcaagca 20
 <210> 166
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 25 <400> 166
 gctggcaagg agatgataac 20
 <210> 167
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 35 <400> 167
 aggttgaac acccaagata 20
 <210> 168
 40 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 45 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 168
 ggagaaacc ctggttctc 20
 50 <210> 169
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 169
 60 tcattcctgc ccaggctca 20
 <210> 170
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65 <220>

<223> Oligonucleótido sintético
 <400> 170
 tcaggtgaaa gtaaagctg 20
 5
 <210> 171
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 171
 15 taccatcttc aaacacatga 20
 <210> 172
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 25 <400> 172
 ttacccaaaa tgggaaagga 20
 <210> 173
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 35 <400> 173
 gaaagaatac atgtatatgg 20
 <210> 174
 40 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 45 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 174
 agagtcagac agctttagac 20
 50 <210> 175
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 175
 60 gtaccacca tgctattaat 20
 <210> 176
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65 <220>

<223> Oligonucleótido sintético
 <400> 176
 acagtgacag agtccaaatg 20
 5
 <210> 177
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 177
 15 aatgtaaagc tggaaggga 20
 <210> 178
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 25 <400> 178
 gggctatgtt tagcacttgg 20
 <210> 179
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 35 <400> 179
 gggcttgatg cctgagtcac 20
 <210> 180
 40 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 45 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 180
 tgaagtgcaa gtcaaacac 20
 50 <210> 181
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 181
 60 gcaattgaa gggatcttga 20
 <210> 182
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65 <220>

<223> Oligonucleótido sintético
 <400> 182
 catgcagtg ggtgtctg 20
 5
 <210> 183
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 183
 15 gttttctct gcatgcagtg 20
 <210> 184
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 25 <400> 184
 gctggcaca agaacagcac 20
 <210> 185
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 35 <400> 185
 cactaaccac acaatgatca 20
 <210> 186
 40 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 45 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 186
 tgtgcagtca ctaccagtt 20
 50 <210> 187
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 187
 gtctaggaat tcgcttcac 20
 60 <210> 188
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65 <220>

<223> Oligonucleótido sintético
 <400> 188
 caggtgtcta ggaattcgct 20
 5
 <210> 189
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 189
 15 gtcgcagtat ttgtgctggt 20
 <210> 190
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 25 <400> 190
 acccgaagcc ctaggtctga 20
 <210> 191
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 35 <400> 191
 ctggaccgga agccctaggt 20
 <210> 192
 40 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 45 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 192
 ttctgctgga cccgaagccc 20
 50 <210> 193
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 193
 60 ctcttcaca ggtgcagatg 20
 <210> 194
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65 <220>

<223> Oligonucleótido sintético
 <400> 194
 agccagtggc caggcaggac 20
 5
 <210> 195
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 195
 15 gaagaagccg actgggcagg 20
 <210> 196
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 25 <400> 196
 ttgagaaga agccgactgg 20
 <210> 197
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 35 <400> 197
 gatgacacat tggagaagaa 20
 <210> 198
 40 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 45 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 198
 tgtctattac ctcaaagaga 20
 50 <210> 199
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 199
 60 acagtgtgtt cagaggattg 20
 <210> 200
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65 <220>

<223> Oligonucleótido sintético
 <400> 200
 acaatacact ttacatggtt 20
 5
 <210> 201
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 201
 15 attgtgtctt tagaaccaga 20
 <210> 202
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 25 <400> 202
 gggccctaaa ggatgtaaaa 20
 <210> 203
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 35 <400> 203
 cagtcttggt tgtgcctgcc 20
 <210> 204
 40 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 45 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 204
 tgtccaggac tcaccacaga 20
 50 <210> 205
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 205
 tatggcacct tcttaaatat 20
 60 <210> 206
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65 <220>

<223> Oligonucleótido sintético
 <400> 206
 tgcttttgg atagaagagt 20
 5
 <210> 207
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 207
 15 aaatgtggct ggcagatgc 20
 <210> 208
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 25 <400> 208
 gtcagagctc atctacatca 20
 <210> 209
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 35 <400> 209
 ctgataaaga ccagcaccaa 20
 <210> 210
 40 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 45 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 210
 aggactcact gataaagacc 20
 50 <210> 211
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 211
 cagactctga atcagtttta 20
 60 <210> 212
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65 <220>

<223> Oligonucleótido sintético
 <400> 212
 cagtcccaaa ttctgctgcc 20
 5
 <210> 213
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 213
 15 ccagtgttag gctctgccag 20
 <210> 214
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 25 <400> 214
 gaatgccagg aaaggagtga 20
 <210> 215
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 35 <400> 215
 cagccccaag gcccaaagat 20
 <210> 216
 40 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 45 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 216
 ctgcactgga gcagcagtgt 20
 50 <210> 217
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 217
 accggttggc atccatgtaa 20
 60 <210> 218
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>

<223> Oligonucleótido sintético
 <400> 218
 cctgggtgac cggtggcat 20
 5
 <210> 219
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 219
 15 caagttggga gactggatg 20
 <210> 220
 <211> 20
 ADN <212>
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 25 <400> 220
 cttaataca agttgggaga 20
 <210> 221
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 35 <400> 221
 tcggaaggtc tggggat 20
 <210> 222
 40 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 45 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 222
 tgggcaccaa actgctggat 20
 50 <210> 223
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 223
 60 tatggcttc tgggcgagg 20
 <210> 224
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>

<223> Oligonucleótido sintético
 <400> 224
 aatgctgcaa tgggcatctg 20
 5
 <210> 225
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 225
 15 gtcactatc acaaacaatg 20
 <210> 226
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 25 <400> 226
 cagttaagca gctccagtt 20
 <210> 227
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 35 <400> 227
 aatthtatt agccagctc 20
 <210> 228
 40 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 45 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 228
 gttgtataaa tatattctaa 20
 50 <210> 229
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 229
 60 acagtgtttt tgagattctg 20
 <210> 230
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>

<223> Oligonucleótido sintético
 <400> 230
 ctcaggaccc agagtgagga 20
 5
 <210> 231
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 231
 15 tgggtaaac ctcacctcga 20
 <210> 232
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 25 <400> 232
 attaggtccc aaagtcccc 20
 <210> 233
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 35 <400> 233
 ggcagacgaa ccatggcgag 20
 <210> 234
 40 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 45 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 234
 gtagcaatct gcttgacccc 20
 50 <210> 235
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 235
 gaccacagac aacatcagtc 20
 60 <210> 236
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65 <220>

ES 2 641 290 T3

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 236
ccacctttt gataaagacc 20

5

<210> 237
<211> 1570
<212> ADN
<213> H. sapiens

10

<400> 237

15

```

ggcaggggag tcagcagagg cctcgctcgg gcgcccagtg gtcctgccc gctggtctcac 60
ctcgccatgg ttcgtctgcc tctgcagtgc gtcctctggg gctgcttgct gaccgctgtc 120
catccagaac caccactgct atgcagagaa aaacagtacc taataaacag tcagtgtgt 180
tctttgtgcc agccaggaca gaaactgggt agtgactgca cagagttcac tgaaacggaa 240
tgccttcctt gcggtgaaa gcaattccta gacacctgga acagagagac acacttcac 300
cagcacaat actgcgaccc caacctaggg cttcgggtcc agcagaaggg cacctcagaa 360
    
```

20

25

```

acagacacca tctgcacctg tgaagaaggc tggcactgta cgagtgaggc ctgtgagagc 420
tgtgtcctgc accgctcatg ctgcccggc tttggggca agcagattga catctgccag 480
ccacatttcc ccaaggaccg cggtttgaac cttctgatgt agatgagctc tgacattgga 540
agattctgga gtctgacaag tcacagcagg ttgagggtag ggagaaactg caggtgaggg 600
gtgcatgctg aagtcctgat ttctccaggf ccccaggatc ggctgagagc cctgggtggtg 660
atccccatca tcttcgggat cctgtttgcc atcctcttgg tgctggtctt tatcaaaaag 720
gtggccaaga agccaacca taaggcccc caccccaagc aggaaccca ggagatcaat 780
ttcccagcg atcttcctgg ctccaacact gctgctccag tgcaggagac tttacatgga 840
tgccaaccgg tcaccacagg ggatggcaaa gagagtgcga tctcagtgca ggagagacag 900
tgaggctgca cccaccagg agtgggcca cgtgggcaaa caggcagttg gccagagagc 960
ctgggtgctg tgctgctgtg gcgtgagggf gaggggctgg cactgactgg gcatagctcc 1020
ccgcttctgc ctgcaccctt gcagtttaga caggagacct ggcactggat gcagaaacag 1080
ttcaccttga agaacctctc acttcaccct ggagcccatc cagtctcca acttgtatta 1140
aagacagagg cagaagtttg gtggtggtgg tgttgggta tggttagta atatccacca 1200
gaccttccga tccagcagtt tgggtgccag agaggcata tggtggcttc cctgcgcccc 1260
ggaagccata tacacagatg cccattgcag cattgtttgt gatagtgaac aactggaagc 1320
tgcttaactg tccatcagca ggagactggc taaataaaat tagaatatat ttatacaaca 1380
gaatctcaaa aacactgttg agtaaggaaa aaaaggcatg ctgctgaatg atgggtatgg 1440
aactttttaa aaaagtacat gcttttatgt atgtatattg cctatggata tatgtataaa 1500
tacaatatgc atcatatatt gataaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1560
aaaaaaaaaa 1570
    
```

40

45

50

55

60

65

Reivindicaciones

- 5 **1.** Un compuesto antisentido para uso en el tratamiento o prevención de una afección inflamatoria o inmunológica asociada en la que el compuesto antisentido comprende un oligonucleótido modificado de 12 a 30 nucleobases de longitud y que tiene una secuencia de nucleobasas que comprende al menos 8 nucleobases contiguas complementarias a una porción de longitud igual de una región de intrón del gen CD40, en las posiciones 11250-12685 de SEQ ID NO: 4, correspondiente al intrón 6, en el que el oligonucleótido comprende:
- 10 un segmento de separación que consiste en desoxinucleósidos enlazados;
un segmento de ala 5' que consiste en nucleósidos unidos;
un segmento de ala 3' que consiste en nucleósidos unidos;
15 en el que el segmento de separación está situado entre el segmento de ala 5' y el segmento de ala 3' y en el que cada nucleósido de cada segmento de ala comprende un azúcar modificado,
- en el que la secuencia de la nucleobase del compuesto es al menos 98% complementaria a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 4, y
20 en el que el compuesto antisentido es capaz de reducir el ARNm de CD40.
- 2.** El compuesto antisentido para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la secuencia de la nucleobase del compuesto es 100% complementaria a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 4.
- 25 **3.** El compuesto antisentido para uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la secuencia de nucleobase comprende al menos 8 nucleobases contiguas complementarias a una porción de longitud igual de las posiciones 12527-12685 de SEQ ID NO: 4, que es una región que puede ser ya sea parte del intrón 6, o de un exón 7 alternativo, dependiendo del sitio aceptor de empalme seleccionado.
- 30 **4.** El compuesto antisentido para uso según la reivindicación 3, que tiene una secuencia de nucleobases que comprende al menos 8 nucleobases contiguas de la secuencia de nucleobases de SEQ ID NO: 208, en la que la secuencia de nucleobases del compuesto es al menos 98% complementaria a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 4.
- 35 **5.** El compuesto antisentido para uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que al menos un enlace internucleósido es un enlace internucleósido modificado, y en el que cada enlace internucleósido es opcionalmente un enlace fosforotioato internucleósido.
- 6.** El compuesto antisentido para uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que al menos un nucleósido comprende un azúcar modificado.
- 40 **7.** El compuesto antisentido para uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que al menos un azúcar modificado es un azúcar bicíclico, y en el que el al menos un azúcar bicíclico comprende opcionalmente un puente 4'-CH(CH₃)-O-2'.
- 45 **8.** El compuesto antisentido para uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que al menos un azúcar modificado comprende un 2'-O-metoxietilo.
- 9.** El compuesto antisentido para uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que al menos una de dichas nucleobases es una nucleobase modificada, y en la que la nucleobase modificada es opcionalmente una 5-metilcitosina.
- 50 **10.** El compuesto antisentido para uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que el compuesto antisentido es un oligonucleótido de cadena sencilla o de doble cadena.
- 55 **11.** El compuesto antisentido para uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que el oligonucleótido modificado:
- (i) es 15 a 30, 18 a 24, 19 a 22, o 20 nucleobases de longitud; o
60 (ii) es 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ó 30 nucleobases de longitud.
- 12.** El compuesto antisentido para uso de acuerdo con la reivindicación 1, que es un oligonucleótido antisentido 20 nucleobases de longitud que tiene la secuencia de nucleobases como se establece en SEQ ID NO: 208, en donde cada citosina es una 5-metilcitosina, cada enlace internucleósido es un enlace fosforotioato, los nucleótidos 1 - 5 y 16 - 20 son nucleótidos 2'-O-metoxietilo, y los nucleótidos 6-15 son 2'-desoxinucleótidos.
- 65 **13.** Una sal farmacéuticamente aceptable de un compuesto antisentido, para uso en el tratamiento o prevención de

una afección inflamatoria o inmune asociada, en la que el compuesto antisentido es un compuesto antisentido como se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1-12, y en el que la sal farmacéuticamente aceptable está opcionalmente una sal sódica o potásica.

5 **14.** Una composición para uso en el tratamiento o prevención de una afección inflamatoria o inmunológica asociada, en la que la composición comprende un compuesto antisentido según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 12 o una sal del mismo como se describe en la reivindicación 13 y un vehículo farmacéuticamente aceptable o diluyente.

10 **15.** El compuesto antisentido, su sal o composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en el que la afección inflamatoria o inmune asociada se selecciona del grupo que consiste en rechazo de injerto, enfermedad de injerto contra huésped, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, asma, enfermedad inflamatoria intestinal, psoriasis o tiroiditis, Morbus Crohn y Colitis ulcerosa.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65