

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 657 679**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7125 (2006.01)

C07H 21/00 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.10.2009 PCT/US2009/060922**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.04.2010 WO10045509**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.10.2009 E 09821293 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.11.2017 EP 2379084**

54 Título: **Modulación del factor de expresión 11**

30 Prioridad:

15.10.2008 US 105772 P

30.04.2009 US 174461 P

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

06.03.2018

73 Titular/es:

IONIS PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)

2855 Gazelle Court

Carlsbad, CA 92010, US

72 Inventor/es:

FREIER, SUSAN, M.;

MONIA, BRETT, P.;

ZHANG, HONG;

ZHAO, CHENGUANG;

CROSBY, JEFFREY, R. y

SIWKOWSKI, ANDREW, M.

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 657 679 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 del factor de expresión 11**Descripción****5 Campo de la invención**

En el presente documento se describen métodos, compuestos y composiciones para reducir la expresión del ARNm y la proteína del Factor 11 en un animal. Tales métodos, compuestos y composiciones son útiles para tratar, prevenir o mejorar las complicaciones tromboembólicas.

10

Antecedentes de la invención

El sistema circulatorio requiere mecanismos que eviten la pérdida de sangre, así como aquellos que contrarrestan las obstrucciones intravasculares inapropiadas. Generalmente, la coagulación comprende una cascada de reacciones que culmina en la conversión de fibrinógeno soluble en un gel de fibrina insoluble. Las etapas de la cascada implican la conversión de un zimógeno inactivo en una enzima activada. La enzima activa luego después la siguiente etapa en la cascada,

15

Cascada de coagulación

20

La cascada de coagulación puede iniciarse a través de dos ramas, la vía del factor tisular (también "vía extrínseca"), que es la ruta primaria, y la vía de activación de contacto (también "vía intrínseca").

25

La vía del factor tisular es iniciada por el factor tisular receptor de la superficie celular (TF, también denominado factor III), que se expresa constitutivamente en células extravasculares (pericitos, cardiomiocitos, células del músculo liso y queratinocitos) y se expresa en monocitos vasculares y células endoteliales tras la inducción por citocinas inflamatorias o endotoxinas. (Drake et al., Am J Pathol 1989, 134:1087–1097). El TF es el receptor celular de alta afinidad para el factor de coagulación VIIa, una serina proteasa. En ausencia de TF, el VIIa tiene una actividad catalítica muy baja, y la unión a TF es necesaria para hacer que el VIIa sea funcional a través de un mecanismo alostérico. (Drake et al., Am J Pathol 1989, 134:1087–1097.) El complejo TF-VIIa activa el factor X a Xa. A su vez, Xa se asocia con su cofactor factor Va en un complejo de protrombinasa que a su vez activa la protrombina (también conocida como factor II o factor 2) a trombina (también conocida como factor IIa o factor 2a). La trombina activa las plaquetas, convierte el fibrinógeno en fibrina y promueve la reticulación de la fibrina activando el factor XIII, formando así un tapón estable en los sitios donde el TF está expuesto en las células extravasculares. Además, la trombina refuerza la respuesta en cascada de la coagulación activando los factores V y VIII.

30

35

La vía de activación de contacto se desencadena por la activación del factor XII a XIIa. El factor XIIa convierte XI en XIa, y XIa convierte IX en IXa. IXa se asocia con su cofactor VIIIa para convertir X en Xa. Las dos vías convergen en este punto cuando el factor Xa asocia el factor Va para activar la protrombina (factor II) en trombina (factor IIa).

40

Inhibición de la coagulación

Al menos tres mecanismos mantienen la cascada de coagulación bajo control, a saber, la acción de la proteína C activada, la antitrombina y el inhibidor de la vía del factor tisular. La proteína C activada es una serina proteasa que degrada los cofactores Va y VIIIa. La proteína C se activa por la trombina con trombomodulina y requiere la coenzima Proteína S para funcionar. La antitrombina es un inhibidor de la serina proteasa (serpina) que inhibe las serina proteasas: trombina, Xa, XIIa, XIa y IXa. El inhibidor de la vía del factor tisular inhibe la acción de Xa y el complejo TF-VIIa. (Schwartz AL et al., Trends Cardiovasc Med. 1997; 7:234–239.)

45

50

Enfermedad

La trombosis es el desarrollo patológico de los coágulos de sangre y se produce una embolia cuando un coágulo de sangre migra a otra parte del cuerpo e interfiere con la función del órgano. La tromboembolia puede causar afecciones tales como trombosis venosa profunda, embolia pulmonar, infarto de miocardio y accidente cerebrovascular. Significativamente, la tromboembolia es una causa importante de morbilidad que afecta a más de 2 millones de estadounidenses cada año. (Adcock et al. American Journal of Clinical Pathology. 1997;108:434–49). Si bien la mayoría de los casos de trombosis se deben a problemas extrínsecos adquiridos, por ejemplo, cirugía, cáncer e inmovilidad, algunos casos se deben a una predisposición genética, por ejemplo, el síndrome antifosfolípido y la afección autosómica dominante, Factor V Leiden. (Bertina RM et al. Nature 1994; 369:64–67.)

55

60

Tratamiento

Los anticoagulantes usados más habitualmente warfarina, heparina y heparina de bajo peso molecular (HBPM) poseen todos inconvenientes significativos.

65

La warfarina se usa generalmente para tratar a pacientes que sufren fibrilación auricular. El fármaco interacciona con

los factores de coagulación dependientes de vitamina K que incluyen los factores II, VII, IX y X. Las proteínas anticoagulantes C y S también son inhibidas por la warfarina. El tratamiento farmacológico con warfarina se complica aún más por el hecho de que la warfarina interacciona con otros medicamentos, incluidos los fármacos usados para tratar la fibrilación auricular, como la amiodarona. Debido a que el tratamiento con warfarina es difícil de predecir, se debe monitorizar con cuidado a los pacientes para detectar cualquier signo de hemorragia anómala.

La heparina funciona activando la antitrombina que inhibe tanto la trombina como el factor X. (Bjork I, Lindahl U. Mol Cell Biochem. 1982 48: 161–182.) El tratamiento con heparina puede causar una reacción inmunológica que hace que las plaquetas se agreguen dentro de los vasos sanguíneos, lo que puede conducir a trombosis. Este efecto secundario se conoce como trombocitopenia inducida por heparina (TIH) y requiere monitorización del paciente. El tratamiento prolongado con heparina también puede provocar osteoporosis. La HBPM también puede inhibir el Factor 2, pero en menor grado que la heparina no fraccionada (HNF). La HBPM ha estado implicada en el desarrollo de HIT.

Por lo tanto, los agentes anticoagulantes actuales carecen de predictibilidad y especificidad y, por lo tanto, requieren una monitorización cuidadosa del paciente para prevenir efectos secundarios adversos, tales como complicaciones hemorrágicas. Actualmente no hay anticoagulantes dirigidos solo a la vía intrínseca o extrínseca.

Sumario de la invención

La invención proporciona un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que consiste en de 18 a 24 nucleósidos unidos y que comprende una secuencia de bases nucleotídicas que comprende una porción de al menos 8 bases nucleotídicas contiguas 100 % complementarias a una porción de igual longitud de bases nucleotídicas 1275 a 1318 de SEQ ID NO: 1, en la que la secuencia de bases nucleotídicas del oligonucleótido modificado es 100 % complementaria a una porción de igual longitud de SEQ ID NO: 11, y en la que el compuesto es capaz de inhibir la expresión del factor 11 humano.

La invención también proporciona una composición que comprende un compuesto de acuerdo con la invención o una sal del mismo y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

La invención también proporciona un compuesto o una composición de acuerdo con la invención para su uso en terapia.

La invención también proporciona un compuesto o una composición de acuerdo con la invención para su uso en:

- (i) tratar o prevenir una complicación tromboembólica, en el que opcionalmente la complicación tromboembólica se selecciona de trombosis venosa profunda, embolia pulmonar, infarto de miocardio y accidente cerebrovascular; o
- (ii) tratar un trastorno de coagulación.

La invención también proporciona un oligonucleótido modificado monocatenario que consiste en 20 nucleósidos unidos y que tiene una secuencia de bases nucleotídicas que comprende 20 bases nucleotídicas contiguas de SEQ ID NO: 223 o 217, y en la que el oligonucleótido modificado comprende:

- un segmento separador que consiste en diez desoxinucleósidos unidos;
- un segmento del ala en 5' que consiste en cinco nucleósidos unidos;
- un segmento del ala en 3' que consiste en cinco nucleósidos unidos;

en el que el segmento separador está situado inmediatamente adyacente a y entre el segmento del ala 5' y el segmento del ala 3', en el que cada nucleósido de cada segmento de ala comprende un azúcar 2'-O-metoxietilo, en el que cada enlace internucleosídico es un enlace fosforotioato y cada citosina es una 5-metilcitosina.

Sumario de la divulgación

En el presente documento se describen métodos, compuestos y composiciones para modular la expresión del ARNm y la proteína del Factor 11 en un animal. Los inhibidores específicos del Factor 11 pueden modular la expresión del ARNm y la proteína del Factor 11. Los inhibidores específicos del factor 11 pueden ser ácidos nucleicos, proteínas o moléculas pequeñas.

La modulación puede ocurrir en una célula o tejido. La célula o el tejido pueden estar en un animal. El animal puede ser un ser humano. Los niveles de ARNm del factor 11 pueden reducirse. Los niveles de proteína del factor 11 pueden reducirse. Tal reducción puede ocurrir de una manera dependiente del tiempo o de una manera dependiente de la dosis.

También se divulgan métodos, compuestos y composiciones útiles para prevenir, tratar y mejorar enfermedades, trastornos y afecciones. Dichas enfermedades, trastornos y afecciones pueden ser complicaciones

tromboembólicas. Tales complicaciones tromboembólicas incluyen las categorías de trombosis, embolia y tromboembolia. Tales complicaciones tromboembólicas incluyen trombosis venosa profunda, embolia pulmonar, infarto de miocardio y accidente cerebrovascular.

5 Dichas enfermedades, trastornos y afecciones pueden tener uno o más factores de riesgo, causas o resultados en común. Ciertos factores de riesgo y causas para el desarrollo de una complicación tromboembólica incluyen inmovilidad, cirugía (particularmente cirugía ortopédica), malignidad, embarazo, edad avanzada, uso de anticonceptivos orales, fibrilación auricular, complicación tromboembólica previa, enfermedad inflamatoria crónica y trastornos de la coagulación protrombótica hereditaria o adquirida. Ciertos resultados asociados con el desarrollo de
10 una complicación tromboembólica incluyen disminución del flujo sanguíneo a través de un vaso afectado, muerte del tejido y muerte.

Los métodos de tratamiento pueden incluir administrar un inhibidor específico del Factor 11 a un individuo que lo necesite.

15

Descripción detallada

Debe entenderse que tanto la descripción general anterior como la descripción detallada siguiente son ejemplos y explicaciones únicamente y no son restrictivas de la invención reivindicada. En el presente documento, el uso del singular incluye el plural a menos que específicamente se indique lo contrario. Como se usa en el presente documento, "o" significa "y/o", a menos que se indique lo contrario. Además, el uso del término "que incluye", así como otras formas, tales como "incluye" e "incluido" no es limitante. Asimismo, términos tales como "elemento" o "componente" abarcan tanto elementos como componentes que comprenden una unidad y elementos y componentes que comprenden más de una subunidad, menos que específicamente se indique lo contrario.

25

Los títulos de las secciones usadas en el presente documento son sólo para propósitos de organización y no deben interpretarse como una limitación del objeto descrito.

Definiciones

30

A menos que se proporcionen definiciones específicas, la nomenclatura usada en relación con la química analítica, la química orgánica sintética y la química medicinal y farmacéutica descritas en el presente documento y los procedimientos y técnicas de las mismas descritos en el presente documento son los bien conocidos y usados habitualmente en la técnica. Se pueden usar técnicas estándar para síntesis química y análisis químico.

35

A menos que se especifique lo contrario, los siguientes términos tienen los significados siguientes:

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

40

"Nucleótido 2'-O-metoxietilo" significa un nucleótido que comprende un resto de azúcar modificado con 2'-O-metoxietilo.

45

"5-metilcitosina" significa una citosina modificada con un grupo metilo unido a la posición 5'. Una 5-metilcitosina es una base nucleotídica modificada.

50

"Agente farmacéutico activo" significa la sustancia o sustancias en una composición farmacéutica que proporcionan un beneficio terapéutico cuando se administran a un individuo. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, un oligonucleótido antisentido dirigido al Factor 11 es un agente farmacéutico activo.

"Región diana activa" o "región diana" significa una región a la que se dirigen uno o más compuestos antisentido activos. "Compuestos antisentido activos" significa compuestos antisentido que reducen los niveles de ácido nucleico diana o los niveles de proteína.

55

"Administrado de forma concomitante" se refiere a la administración conjunta de dos agentes de cualquier manera en la que los efectos farmacológicos de ambos se manifiesten en el paciente al mismo tiempo. La administración concomitante no requiere que ambos agentes se administren en una única composición farmacéutica, en la misma forma de dosificación, o por la misma vía de administración. Los efectos de ambos agentes no necesitan manifestarse al mismo tiempo. Los efectos solo necesitan superponerse durante un período de tiempo y no necesitan ser coextensos,

60

"Administrar" significa proporcionar un agente farmacéutico a un individuo e incluye, entre otros, la administración por un profesional médico y la autoadministración.

65 "Mejoría" se refiere a una disminución de al menos un indicador, signo o síntoma de una enfermedad, trastorno o afección asociada. La gravedad de los indicadores se puede determinar mediante medidas subjetivas u objetivas

que son conocidas para los expertos en la técnica.

"Animal" se refiere a un animal humano o no humano, incluidos, entre otros, ratones, ratas, conejos, perros, gatos, cerdos y primates no humanos, incluidos, entre otros, monos y chimpancés.

5 "Compuesto antídoto" se refiere a un compuesto capaz de disminuir la intensidad o la duración de cualquier actividad mediada por antisentido.

10 "Oligonucleótido antídoto" significa un compuesto antídoto que comprende un oligonucleótido que es complementario y capaz de hibridarse con un compuesto antisentido.

"Proteína antídoto" significa un compuesto antídoto que comprende un péptido.

15 "Anticuerpo" se refiere a una molécula caracterizada por reaccionar específicamente con un antígeno de alguna manera, en el que el anticuerpo y el antígeno se definen cada uno en términos del otro. El anticuerpo puede referirse a una molécula de anticuerpo completa o a cualquier fragmento o región de la misma, tal como la cadena pesada, la cadena ligera, la región Fab y la región Fc.

20 "Actividad antisentido" significa cualquier actividad detectable o medible atribuible a la hibridación de un compuesto antisentido con su ácido nucleico diana. En ciertas realizaciones, la actividad antisentido es una disminución en la cantidad o expresión de un ácido nucleico diana o proteína codificada por dicho ácido nucleico diana.

25 "Compuesto antisentido" significa un compuesto oligomérico que es capaz de sufrir hibridación con un ácido nucleico diana a través de enlaces de hidrógeno.

"Inhibición antisentido" significa reducción de niveles de ácido nucleico diana o niveles de proteína diana en presencia de un compuesto antisentido complementario de un ácido nucleico diana en comparación con niveles de ácido nucleico diana o niveles de proteína diana en ausencia del compuesto antisentido.

30 "Oligonucleótido antisentido" significa un oligonucleótido monocatenario que tiene una secuencia de bases nucleotídicas que permite la hibridación a una región o segmento correspondiente de un ácido nucleico diana.

35 "Azúcar bicíclico" significa un anillo de furosilo modificado por el puente de dos átomos en el anillo no geminal. Un azúcar bicíclico es un azúcar modificado.

"Ácido nucleico bicíclico" o "BNA" se refiere a un nucleósido o nucleótido en el que la porción de furanosa del nucleósido o nucleótido incluye un puente que conecta dos átomos de carbono en el anillo de furanosa, formando así un sistema de anillo bicíclico.

40 "Estructura de caperuza" o "resto de caperuza terminal" significa modificaciones químicas, que se han incorporado en cualquiera de los extremos de un compuesto antisentido.

45 "Región químicamente distinta" se refiere a una región de un compuesto antisentido que de alguna manera es químicamente diferente de otra región del mismo compuesto antisentido. Por ejemplo, una región que tiene 2'-O-metoxietil nucleótidos es químicamente distinta de una región que tiene nucleótidos sin modificaciones de 2'-O-metoxietilo.

50 "Compuesto antisentido quimérico" significa un compuesto antisentido que tiene al menos dos regiones químicamente distintas.

55 "Co-administración" significa la administración de dos o más agentes farmacéuticos a un individuo. Los dos o más agentes farmacéuticos pueden estar en una única composición farmacéutica o pueden estar en composiciones farmacéuticas distintas. Cada uno de los dos o más agentes farmacéuticos puede administrarse por la misma vía de administración o por vías diferentes. La coadministración abarca la administración en paralelo o secuencial.

60 "Factor de coagulación" significa cualquiera de los factores I, II, III, IV, V, VII, VIII, IX, X, XI, XII, XIII o TAFI en la cascada de la coagulación sanguínea. "Ácido nucleico del factor de coagulación" significa cualquier ácido nucleico que codifica un factor de coagulación. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, un ácido nucleico del factor de coagulación incluye, sin limitación, una secuencia de ADN que codifica un factor de coagulación (incluyendo ADN genómico que comprende intrones y exones), una secuencia de ARN transcrita de ADN que codifica un factor de coagulación y una secuencia de ARNm que codifica un factor de coagulación. "ARNm del factor de coagulación" significa un ARNm que codifica una proteína del factor de coagulación.

65 "Complementariedad" significa la capacidad de apareamiento entre bases nucleotídicas de un primer ácido nucleico y un segundo ácido nucleico.

"Bases nucleotídicas contiguas" significa bases nucleotídicas inmediatamente adyacentes entre sí.

"Diluyente" significa un ingrediente en una composición que carece de actividad farmacológica, pero es farmacéuticamente necesario o deseable. Por ejemplo, el diluyente en una composición inyectada puede ser un líquido, por ejemplo, solución salina.

"Dosis" significa una cantidad especificada de un agente farmacéutico proporcionada en una sola administración, o en un período de tiempo específico. En ciertas realizaciones, una dosis se puede administrar en uno, dos o más bolos, comprimidos o inyecciones. Por ejemplo, en ciertas realizaciones en las que se desea la administración subcutánea, la dosis deseada requiere un volumen no acomodado fácilmente por una única inyección, por lo tanto, se pueden usar dos o más inyecciones para alcanzar la dosis deseada. En ciertas realizaciones, el agente farmacéutico se administra por infusión durante un período prolongado de tiempo o continuamente. Las dosis se pueden indicar como la cantidad de agente farmacéutico por hora, día, semana o mes.

"Cantidad eficaz" significa la cantidad de agente farmacéutico activo suficiente para efectuar un resultado fisiológico deseado en un individuo que necesita el agente. La cantidad efectiva puede variar entre individuos dependiendo de la salud y la condición física del individuo a tratar, el grupo taxonómico de los individuos a tratar, la formulación de la composición, la evaluación de la afección médica del individuo y otros factores relevantes.

"Ácido nucleico del factor 11" o "ácido nucleico del factor XI" o "ácido nucleico de F 11" o "ácido nucleico de F XI" significan cualquier ácido nucleico que codifica el Factor 11. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, un ácido nucleico del Factor 11 incluye una secuencia de ADN que codifica el Factor 11, una secuencia de ARN transcrita a partir del ADN que codifica el Factor 11 (que incluye ADN genómico que comprende intrones y exones) y una secuencia de ARNm que codifica el Factor 11. "ARNm del Factor 11" significa un ARNm que codifica una proteína del Factor 11.

"Inhibidor específico del Factor 11" se refiere a cualquier agente capaz de inhibir específicamente la expresión del ARNm del Factor 11 y/o la proteína del Factor 11 a nivel molecular. Por ejemplo, los inhibidores específicos del Factor 11 incluyen ácidos nucleicos (que incluyen compuestos antisentido), péptidos, anticuerpos, moléculas pequeñas y otros agentes capaces de inhibir la expresión del ARNm del Factor 11 y/o la proteína del Factor 11. En ciertas realizaciones, modulando específicamente la expresión de ARNm del Factor 11 y/o la expresión de proteína del Factor 11, los inhibidores específicos del Factor 11 pueden afectar a otros componentes de la cascada de coagulación, incluidos componentes aguas abajo. De forma similar, en ciertas realizaciones, los inhibidores específicos del Factor 11 pueden afectar otros procesos moleculares en un animal.

"Antídoto inhibidor específico del Factor 11" significa un compuesto capaz de disminuir el efecto de un inhibidor específico del Factor 11. En ciertas realizaciones, un antídoto inhibidor específico del Factor 11 se selecciona de un péptido del Factor 11; un oligonucleótido antídoto del Factor 11, incluyendo un compuesto antídoto del Factor 11 complementario a un compuesto antisentido del Factor 11; y cualquier compuesto o proteína que afecte a la vía de coagulación intrínseca o extrínseca.

"Completamente complementario" o "100% complementario" significa que cada base nucleotídica de un primer ácido nucleico tiene una base nucleotídica 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.

"Gapmer" significa un compuesto antisentido quimérico en el que una región interna que tiene una pluralidad de nucleósidos que soportan la escisión de ARNasa H está situada entre regiones externas que tienen uno o más nucleósidos, en el que los nucleósidos que comprenden la región interna son químicamente distintos del nucleósido o nucleósidos que comprenden las regiones externas. La región interna se puede denominar "segmento separador" y las regiones externas se pueden denominar "segmentos del ala".

"Ampliado por separador" significa un compuesto antisentido quimérico que tiene un segmento separador de 12 o más 2'-desoxirribonucleósidos contiguos situados entre e inmediatamente adyacentes a los segmentos del ala en 5' y 3' que tienen de uno a seis nucleósidos.

"Hibridación" significa la reunión de moléculas de ácido nucleico complementarias. En ciertas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico complementarias incluyen un compuesto antisentido y un ácido nucleico diana.

"Identificar un animal en riesgo de complicaciones tromboembólicas" significa identificar un animal al que se ha diagnosticado una complicación tromboembólica o identificar un animal predispuesto a desarrollar una complicación tromboembólica. Los individuos predispuestos a desarrollar una complicación tromboembólica incluyen aquellos que tienen uno o más factores de riesgo de complicaciones tromboembólicas que incluyen inmovilidad, cirugía (particularmente cirugía ortopédica), malignidad, embarazo, edad avanzada, uso de anticonceptivos orales y trastornos de la coagulación protrombóticos heredados o adquiridos. Dicha identificación se puede lograr mediante cualquier método, incluida la evaluación del historial médico de un individuo y las pruebas o evaluaciones clínicas estándar.

- "Inmediatamente adyacente" significa que no hay elementos intermedios entre los elementos inmediatamente adyacentes.
- 5 "Individuo" significa un animal humano o no humano seleccionado para tratamiento o terapia.
- Enlace internucleosídico" se refiere al enlace químico entre nucleósidos.
- "Nucleósidos unidos" significa nucleósidos adyacentes que están unidos entre sí.
- 10 "Apareamiento erróneo" o "base nucleotídica no complementaria" se refiere al caso en el que una base nucleotídica de un primer ácido nucleico no es capaz de aparearse con la base nucleotídica correspondiente de un segundo ácido nucleico diana.
- Enlace internucleosídico modificado" se refiere a una sustitución o cualquier cambio de un enlace internucleosídico de origen natural (es decir, un enlace internucleosídico fosfodiéster).
- 15 "Base nucleotídica modificada" se refiere a cualquier base nucleotídica que no sea adenina, citosina, guanina, timidina o uracilo. Una "base nucleotídica no modificada" significa las bases de purina adenina (A) y guanina (G), y las bases pirimidínicas timina (T), citosina (C) y uracilo (U).
- 20 "Nucleótido modificado" significa un nucleótido que tiene, independientemente, un resto de azúcar modificado, un enlace internucleosídico modificado o una base nucleotídica modificada. Un "nucleósido modificado" significa un nucleótido que tiene, independientemente, un resto de azúcar modificado o una base nucleotídica modificada.
- 25 "Oligonucleótido modificado" significa un oligonucleótido que comprende un enlace internucleosídico modificado, un azúcar modificado o una base nucleotídica modificada.
- "Azúcar modificado" se refiere a una sustitución o cambio de un azúcar natural.
- 30 "Motivo" significa el patrón de regiones químicamente distintas en un compuesto antisentido.
- "Enlace internucleosídico que se produce de forma natural" significa un enlace fosfodiéster de 3'a 5'.
- "Resto de azúcar natural" significa un azúcar que se encuentra en el ADN (2'-H) o ARN (2'-OH).
- 35 "Ácido nucleico" se refiere a moléculas compuestas de nucleótidos monoméricos. Un ácido nucleico incluye ácidos ribonucleicos (ARN), ácidos desoxirribonucleicos (ADN), ácidos nucleicos monocatenarios, ácidos nucleicos bicatenarios, ácidos ribonucleicos pequeños de interferencia (ARNip) y microARN (miARN).
- 40 "Base nucleotídica" significa un resto heterocíclico capaz de aparearse con una base de otro ácido nucleico.
- "Secuencia de bases nucleotídicas" significa el orden de las bases nucleotídicas contiguas independientemente de cualquier modificación de azúcares, enlaces o bases nucleotídicas.
- 45 "Nucleósido" significa una base nucleotídica unida a un azúcar.
- "Mimético de nucleósido" incluye 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 nucleósidos miméticos que tienen morfolino, ciclohexenilo, ciclohexilo, tetrahidropiraniolo, biciclo o triciclo miméticos de azúcar, por ejemplo unidades de azúcar sin furanosa. Mimético de nucleótido incluye aquellas estructuras usadas 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). El sustituto de azúcar se superpone con el término mimético de nucleósido ligeramente más amplio, pero está destinado a indicar el reemplazo de la unidad de azúcar (anillo de furanosa) solamente. Los anillos de tetrahidropiraniolo proporcionados en el presente documento son ilustrativos de un ejemplo de un sustituto de azúcar en el que el grupo de azúcar de furanosa se ha reemplazado por un sistema de anillo de tetrahidropiraniolo.
- 50 "Nucleótido" significa un nucleósido que tiene un grupo fosfato unido covalentemente a la porción de azúcar del nucleósido.
- 60 "Compuesto oligomérico" u "oligómero" significa un polímero de subunidades monoméricas unidas que es capaz de hibridar con al menos una región de una molécula de ácido nucleico.
- 65 "Oligonucleótido" significa un polímero de nucleósidos unidos cada uno de los cuales puede ser modificado o no modificado, uno independiente del otro.

- 5 "Administración parenteral" significa la administración a través de inyección o infusión. La administración parenteral incluye administración subcutánea, administración intravenosa, administración intramuscular, administración intraarterial, administración intraperitoneal o administración intracraneal, por ejemplo, administración intratecal o intracerebroventricular.
- 10 "Péptido" significa una molécula formada uniendo al menos dos aminoácidos por enlaces amida. Péptido se refiere a polipéptidos y proteínas.
- 15 "Composición farmacéutica" significa una mezcla de sustancias adecuadas para administrar a un individuo. Por ejemplo, una composición farmacéutica puede comprender agentes farmacéuticos activos y una solución acuosa estéril.
- 20 "Sales farmacéuticamente aceptables" significa sales fisiológica y farmacéuticamente aceptables de compuestos antisentido, es decir, sales que retienen la actividad biológica deseada del oligonucleótido precursor y no imparten efectos toxicológicos indeseados a los mismos.
- 25 "Enlace de fosforotioato" significa un enlace entre nucleósidos en el el enlace fosfodiéster se modifica reemplazando uno de los átomos de oxígeno que no forman un puente por un átomo de azufre. Un enlace fosforotioato (P = S) es un enlace internucleosídico modificado.
- 30 "Porción" significa un número definido de bases nucleotídicas contiguas (es decir, unidas) de un ácido nucleico. En ciertas realizaciones, una porción es un número definido de bases nucleotídicas contiguas de un ácido nucleico diana. En ciertas realizaciones, una porción es un número definido de bases nucleotídicas contiguas de un un compuesto antisentido.
- 35 "Prevenir" se refiere a retrasar o prevenir el inicio o desarrollo de una enfermedad, trastorno o afección durante un período de tiempo de minutos a indefinidamente. Prevenir también significa reducir el riesgo de desarrollar una enfermedad, trastorno o afección.
- 40 "Profármaco" significa un agente terapéutico que se preparar en forma inactiva que se convierte en una forma activa dentro del cuerpo o las células del mismo por acción de enzimas endógenas u otros productos químicos y/o condiciones.
- 45 ""Efectos secundarios" significa respuestas fisiológicas atribuibles a un tratamiento diferente a los efectos deseados. En ciertas realizaciones, los efectos secundarios incluyen reacciones en el sitio de la inyección, anomalías en las pruebas de función hepática, anomalías en la función renal, toxicidad hepática, toxicidad renal, anomalías en el sistema nervioso centra, miopatías y malestar general. Por ejemplo, incrementos en los niveles de aminotransferasas en suero pueden indicar toxicidad hepática o anomalías en la función hepática. Por ejemplo, incrementos en los niveles de bilirrubina pueden indicar toxicidad hepática o anomalías en la función hepática.
- 50 "Oligonucleótido monocatenario" significa un oligonucleótido que no está hibridado con una cadena complementaria.
- 55 "Específicamente hibridable" se refiere a un compuesto antisentido que tiene un grado suficiente de complementariedad entre un oligonucleótido antisentido y un ácido nucleico diana para inducir un efecto deseado, mientras que exhibe efectos mínimos o nulos sobre ácidos nucleicos no diana en condiciones en las que se desea unión específica, es decir, en condiciones fisiológicas en el caso de ensayos in vivo y tratamientos terapéuticos.
- 60 "De dirección" o "dirigido" significa el proceso de diseño y selección de un compuesto antisentido que se hibridará específicamente con un ácido nucleico diana e inducirá un efecto deseado.
- 65 "Ácido nucleico diana", "ARN diana" y "transcrito de ARN diana" se refieren todos a un ácido nucleico capaz de ser el objetivo de los compuestos antisentido.
- "Segmento diana" significa la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico diana al que se dirige un compuesto antisentido. El "sitio diana en 5'" se refiere al nucleótido más en 5' de un segmento diana. El "sitio diana en 3'" se refiere al nucleótido más en 3' de un segmento diana.
- "Cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad de un agente farmacéutico que proporciona un beneficio terapéutico a un individuo.
- "Complicación tromboembólica" significa cualquier enfermedad, trastorno o afección que involucra una embolia causada por un trombo. Los ejemplos de tales enfermedades, trastornos y afecciones incluyen las categorías de trombosis, embolia y tromboembolia. En ciertas realizaciones, tales trastornos y afecciones de la enfermedad incluyen trombosis venosa profunda, embolia pulmonar, infarto de miocardio y apoplejía.
- "Tratar" se refiere a administrar una composición farmacéutica para efectuar una alteración o mejora de una

enfermedad, trastorno o afección.

"Nucleótido no modificado" significa un nucleótido compuesto por bases nucleotídicas naturales, restos de azúcar y enlaces internucleosídicos. En ciertas realizaciones, un nucleótido no modificado es un nucleótido de ARN (es decir, β -D-ribonucleósidos) o un nucleótido de ADN (es decir, β -D-desoxirribonucleósido).

Ciertas realizaciones

En el presente documento se describen métodos, compuestos y composiciones para disminuir la expresión del ARNm y la proteína del Factor 11.

En el presente documento se describen métodos, compuestos y composiciones para el tratamiento, prevención o mejora de enfermedades, trastornos y afecciones asociados con el Factor 11 en un individuo que lo necesite. También se contemplan métodos y compuestos para la preparación de un medicamento para el tratamiento, prevención o mejora de una enfermedad, trastorno o afección asociada con el Factor 11. Las enfermedades, trastornos y afecciones asociadas al Factor 11 incluyen complicaciones tromboembólicas, tales como trombosis, embolia, tromboembolia, trombosis venosa profunda, embolia pulmonar, infarto de miocardio y accidente cerebrovascular.

En el presente documento se divulga un inhibidor específico del factor 11 para su uso en el tratamiento, prevención o mejora de una enfermedad asociada al factor 11. Los inhibidores específicos del factor 11 pueden ser ácidos nucleicos (incluyendo compuestos antisentido), péptidos, anticuerpos, moléculas pequeñas y otros agentes capaces de inhibir la expresión del ARNm del factor 11 y/o la proteína del factor 11.

Los inhibidores específicos del factor 11 pueden ser péptidos o proteínas, tales como, entre otros, inhibidores de proteasa alfa 1, antitrombina III, inhibidores de C1 e inhibidores de plasmina alfa 2 como se describe en J Clin Invest 1982, 69:844-852; alfa 1 antitripsina (alfa 1AT) como se describe en Thromb Res 1987, 48:145-151; inhibidores peptídicos del Factor 11 como se describe en USPPN 2008/021998 y Blood 1998, 92:4198-206; MAP4-RGKWC como se describe en Thromb Res 2001, 104:451-465; beta 2 GPI como se describe en Proc Natl Acad Sci 2004, 101:3939-44; *Lentinus* inhibidor de proteinasa como se describe en Eur J Biochem 1999, 262:915-923; inhibidor del dominio Kunitz precursor de la beta proteína amiloidea/nexina-2 proteasa (APPI) y antitrombina (AT) como se describe en J Biol Chem 2004, 279:29485-29492; y aprotinina como se describe en J Biol Chem 2005, 280:23523-30.

Los inhibidores específicos del factor 11 pueden ser anticuerpos, tales como, sin limitaciones, Winston-Salem (IgG3 kappa) y Baltimore (IgG1 kappa), tal como se describe en Blood 1988, 72:1748-54; 5F4, 3C1, y 1F1 como se describe en J Biol Chem 1985, 260: 10714-719; anticuerpos monoclonales como se describe en Thromb Haemost 1990, 63:417-23; XI-5108 como se describe en J Thromb Haem 2006, 4:1496-1501; anticuerpos monoclonales 4-1 como se describe en Thromb Res 1986, 42:225-34; y anticuerpo abciximab como se describe en el Ejemplo 19 de USPN 6.566.140.

Los inhibidores específicos del Factor 11 pueden ser moléculas pequeñas, tales como, pero sin limitaciones, fluorofosfatos de diisopropilo (DFP); los inhibidores de molécula pequeña como se describe en los Ejemplos 1-7 de USPPN 2004/0180855; y p-aminobenzamida (pAB) como se describe en J Biol Chem 2005, 280:23523-30.

En el presente documento se describe un inhibidor específico del factor 11, como se describe en el presente documento, para su uso en el tratamiento, prevención o mejora de complicaciones tromboembólicas tales como trombosis, embolia, tromboembolismo, trombosis venosa profunda, embolia pulmonar, infarto de miocardio y apoplejía.

En el presente documento se describe el uso de inhibidores específicos del Factor 11 como se describe en el presente documento en la fabricación de un medicamento para tratar, mejorar o prevenir una complicación tromboembólica tal como trombosis, embolia, tromboembolismo, trombosis venosa profunda, embolia pulmonar, infarto de miocardio y apoplejía.

Se divulga en el presente documento un inhibidor específico del Factor 11 como se describe en el presente documento para su uso en el tratamiento, prevención o mejora de una complicación tromboembólica como se describe en el presente documento mediante terapia de combinación con un agente o terapia adicional como se describe en el presente documento. Los agentes o terapias pueden administrarse o administrarse de forma concomitante.

Se divulga en el presente documento el uso un inhibidor específico del Factor 11 como se describe en el presente documento en la fabricación de un medicamento para el tratamiento, prevención o mejora de una complicación tromboembólica como se describe en el presente documento mediante terapia de combinación con un agente o terapia adicional como se describe en el presente documento. Los agentes o terapias pueden administrarse o administrarse de forma concomitante.

5 Se divulga en el presente documento el uso un inhibidor específico del Factor 11 como se describe en el presente documento en la fabricación de un medicamento para el tratamiento, prevención o mejora de una complicación tromboembólica como se describe en el presente documento en un paciente al que se administra posteriormente un agente o terapia adicional como se describe en el presente documento.

En el presente documento se divulga un kit para tratar, prevenir o mejorar una complicación tromboembólica como se describe en la presente, en donde el kit comprende:

- 10 i) un inhibidor específico de Factor 11 como se describe en el presente documento; y, como alternativa
(ii) un agente o terapia adicional como se describe en el presente documento.

15 Un kit de la divulgación puede incluir además instrucciones para usar el kit para tratar, prevenir o mejorar una complicación tromboembólica como se describe en el presente documento mediante terapia de combinación como se describe en el presente documento.

20 En el presente documento se divulgan compuestos antisentido dirigidos a un ácido nucleico del Factor 11. En ciertas realizaciones, el ácido nucleico del Factor 11 es cualquiera de las secuencias indicadas en el número de acceso en GENBANK NM_000128.3 (incorporado en el presente documento como SEQ ID NO: 1), número de acceso en GENBANK NT_022792.17, truncado de 19598000 a 19624000, (incorporado en el presente documento como SEQ ID NO: 2), número de acceso en GENBANK NM_028066.1 (incorporado en el presente documento como SEQ ID NO: 6), exones 1-15 número de acceso en GENBANK NM_028066.1 (incorporado en el presente documento como SEQ ID NO: 274).

25 En el presente documento se describe un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado. El compuesto puede comprender un oligonucleótido modificado que consiste en 12 a 30 nucleósidos unidos.

30 El compuesto de la divulgación puede comprender un oligonucleótido modificado que comprende una secuencia de bases nucleotídicas 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% complementarias a una porción de igual longitud de SEQ ID NO: 1. El compuesto puede comprender un oligonucleótido modificado que comprende una secuencia de bases nucleotídicas 100% complementaria a una porción de igual longitud de SEQ ID NO: 1.

35 En el presente documento se describe un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que comprende una secuencia de bases nucleotídicas complementaria a al menos una porción de bases nucleotídicas 656 a 676 de la SEQ ID NO: 1. Dicho oligonucleótido modificado puede comprender al menos 8, al menos 10, al menos 12, al menos 14, al menos 16, al menos 18 o 20 bases nucleotídicas contiguas complementarias a una porción de igual longitud de bases nucleotídicas 656 a 676 de la SEQ ID NO: 1. Dicho oligonucleótido modificado puede comprender una secuencia de bases nucleotídicas al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96
40 %, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99% complementarias a una porción de igual longitud de SEQ ID NO: 1. Dicho oligonucleótido modificado puede comprender una secuencia de bases nucleotídicas 100% complementaria a una porción de igual longitud de SEQ ID NO: 1. Dicho oligonucleótido modificado puede alcanzar al menos un 80% de inhibición de los niveles de ARNm humano determinados usando un método de ensayo RT-PCR, opcionalmente en células HepG2 (por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 3).

45 En el presente documento se describe un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que comprende una secuencia de bases nucleotídicas complementaria a al menos una porción de bases nucleotídicas 665 a 687 de la SEQ ID NO: 1. Dicho oligonucleótido modificado puede comprender al menos 8, al menos 10, al menos 12, al menos 14, al menos 16, al menos 18 o 20 bases nucleotídicas contiguas complementarias a una porción de igual longitud de bases nucleotídicas 665 a 687 de la SEQ ID NO: 1. Dicho oligonucleótido modificado puede comprender una secuencia de bases nucleotídicas al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96
50 %, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99% complementarias a una porción de igual longitud de SEQ ID NO: 1. Dicho oligonucleótido modificado puede comprender una secuencia de bases nucleotídicas 100% complementaria a una porción de igual longitud de SEQ ID NO: 1. Dicho oligonucleótido modificado puede alcanzar al menos un 50% de inhibición de los niveles de ARNm humano determinados usando un método de ensayo RT-PCR, opcionalmente en células HepG2 (por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 3)-

60 En el presente documento se describe un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que comprende una secuencia de bases nucleotídicas complementaria a al menos una porción de bases nucleotídicas 675 a 704 de la SEQ ID NO: 1. Dicho oligonucleótido modificado puede comprender al menos 8, al menos 10, al menos 12, al menos 14, al menos 16, al menos 18 o 20 bases nucleotídicas contiguas complementarias a una porción de igual longitud de bases nucleotídicas 675 a 704 de la SEQ ID NO: 1. Dicho oligonucleótido modificado puede comprender una secuencia de bases nucleotídicas al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96
65 %, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99% complementarias a una porción de igual longitud de SEQ ID NO: 1. Dicho oligonucleótido modificado puede comprender una secuencia de bases nucleotídicas 100% complementaria a una porción de igual longitud de SEQ ID NO: 1. Dicho oligonucleótido modificado puede alcanzar

secuencia de bases nucleotídicas seleccionada de entre las secuencias de bases nucleotídicas enumeradas en las SEQ ID NO: 15 a 241.

5 En el presente documento se divulgan compuestos que comprenden un oligonucleótido modificado que consiste en de 12 a 30 nucleósidos unidos y que tienen una secuencia de bases nucleotídicas que comprende al menos 8, al menos 10, al menos 12, al menos 14, al menos 16, al menos 18 o 20 bases nucleotídicas contiguas de una secuencia de bases nucleotídicas seleccionada de entre las secuencias de bases nucleotídicas enumeradas en las SEQ ID NO: 15 a 269.

10 En el presente documento se divulgan compuestos que comprenden un oligonucleótido modificado que consiste en de 12 a 30 nucleósidos unidos y que tienen una secuencia de bases nucleotídicas que comprende al menos 8, al menos 10, al menos 12, al menos 14, al menos 16, al menos 18 o 20 bases nucleotídicas contiguas de una secuencia de bases nucleotídicas seleccionada de entre las secuencias de bases nucleotídicas enumeradas en las SEQ ID NO: 242 a 269.

15 El oligonucleótido modificado puede comprender al menos 8, al menos 10, al menos 12, al menos 14, al menos 16 o al menos 18 bases nucleotídicas de una secuencia de bases nucleotídicas seleccionada de las SEQ ID NO: 22, 31, 32, 34, 36 para 38, 40, 41, 43, 51 a 53, 55, 56, 59, 60, 64, 66, 71, 73, 75, 96, 98 a 103, 105 a 109, 113 a 117, 119, 124, 127, 129, 171, 172, 174, 176, 178, 179, 181 a 197, 199 a 211 y 213 a 232. El oligonucleótido modificado puede comprender una secuencia de bases nucleotídicas seleccionada de las SEQ ID NO: 22, 31, 32, 34, 36 para 38, 40, 20 41, 43, 51 a 53, 55, 56, 59, 60, 64, 66, 71, 73, 75, 96, 98 a 103, 105 a 109, 113 a 117, 119, 124, 127, 129, 171, 172, 174, 176, 178, 179, 181 a 197, 199 a 211 y 213 a 232. El oligonucleótido modificado puede consistir en una secuencia de bases nucleotídicas seleccionada de las SEQ ID NO: 22, 31, 32, 34, 36 a 38, 40, 41, 43, 51 a 53, 55, 56, 59, 60, 64, 66, 71, 73, 75, 96, 98 a 103, 105 a 109, 113 a 117, 119, 124, 127, 129, 171, 172, 174, 176, 178, 179, 25 181 a 197, 199 a 211, y 213 a 232. Dicho oligonucleótido modificado puede alcanzar al menos un 70 % de inhibición de los niveles de ARNm humano como se determina usando un método de ensayo de RT-PCR, opcionalmente en células HepG2 (por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 3).

30 El oligonucleótido modificado puede comprender al menos 8, al menos 10, al menos 12, al menos 14, al menos 16 o al menos 18 bases nucleotídicas de una secuencia de bases nucleotídicas seleccionada de las SEQ ID NO: 22, 31, 34, 37, 40, 43, 51 a 53, 60, 98, 100 a 102, 105 a 109, 114, 115, 119, 171, 174, 176, 179, 181, 186, 188 a 193, 195, 196, 199 a 210 y 213 a 232. El oligonucleótido modificado puede comprender una secuencia de bases nucleotídicas seleccionada de las SEQ ID NO: 22, 31, 34, 37, 40, 43, 51 a 53, 60, 98, 100 a 102, 105 a 109, 114, 115, 119, 171, 174, 176, 179, 181, 186, 188 a 193, 195, 196, 199 a 210 y 213 a 232. El oligonucleótido modificado puede consistir 35 en una secuencia de bases nucleotídicas seleccionada de las SEQ ID NO: 22, 31, 34, 37, 40, 43, 51 a 53, 60, 98, 100 a 102, 105 a 109, 114, 115, 119, 171, 174, 176, 179, 181, 186, 188 a 193, 195, 196, 199 a 210, y 213 a 232. Dicho oligonucleótido modificado puede alcanzar al menos un 80 % de inhibición de los niveles de ARNm humano como se determina usando un método de ensayo de RT-PCR, opcionalmente en células HepG2 (por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 3).

40 El oligonucleótido modificado puede comprender al menos 8, al menos 10, al menos 12, al menos 14, al menos 16 o al menos 18 bases nucleotídicas de una secuencia de bases nucleotídicas seleccionada de las SEQ ID NO: 31, 37, 100, 105, 179, 190 a 193, 196, 202 a 207, 209, 210, 214 a 219, 221 a 224, 226, 227, 229, y 231. El oligonucleótido modificado puede comprender una secuencia de bases nucleotídicas seleccionada de las SEQ ID NO: 31, 37, 100, 45 105, 179, 190 a 193, 196, 202 a 207, 209, 210, 214 a 219, 221 a 224, 226, 227, 229, y 231. El oligonucleótido modificado puede consistir en una secuencia de bases nucleotídicas seleccionada de las SEQ ID NO: 31, 37, 100, 105, 179, 190 a 193, 196, 202 a 207, 209, 210, 214 a 219, 221 a 224, 226, 227, 229, y 231. Dicho oligonucleótido modificado puede alcanzar al menos un 90 % de inhibición de los niveles de ARNm humano como se determina usando un método de ensayo de RT-PCR, opcionalmente en células HepG2 (por ejemplo, como se describe en el 50 Ejemplo 3).

El oligonucleótido modificado puede comprender al menos 8, al menos 10, al menos 12, al menos 14, al menos 16 o al menos 18 bases nucleotídicas de una secuencia de bases nucleotídicas seleccionada de las SEQ ID NO: 34, 52, 53, 114, 115, 190, 213 a 232, 242 a 260 y 262 a 266. El oligonucleótido modificado puede comprender una 55 secuencia de bases nucleotídicas seleccionada de las SEQ ID NO: 34, 52, 53, 114, 115, 190, 213 a 232, 242 a 260 y 262 a 266. El oligonucleótido modificado puede consistir en una secuencia de bases nucleotídicas seleccionada de las SEQ ID NO: 34, 52, 53, 114, 115, 190, 213 a 232, 242 a 260, y 262 a 266. Dichos oligonucleótidos modificados pueden alcanzar al menos un 70 % de inhibición de los niveles de ARNm humano como se determina usando un método de ensayo de RT-PCR, opcionalmente en células HepG2 (por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 30).

60 El oligonucleótido modificado puede comprender al menos 8, al menos 10, al menos 12, al menos 14, al menos 16 o al menos 18 bases nucleotídicas de una secuencia de bases nucleotídicas seleccionada de las SEQ ID NO: 34, 52, 53, 114, 115, 190, 213 a 216, 218 a 226, 243 a 246, 248, 249, 252 a 259, 264 y 265. El oligonucleótido modificado puede comprender una secuencia de bases nucleotídicas seleccionada de las SEQ ID NO: 34, 52, 53, 114, 115, 65 190, 213 a 216, 218 a 226, 243 a 246, 248, 249, 252 a 259, 264 y 265. El oligonucleótido modificado puede consistir en una secuencia de bases nucleotídicas seleccionada de las SEQ ID NO: 34, 52, 53, 114, 115, 190, 213 a 216, 218

a 226, 243 a 246, 248, 249, 252 a 259, 264 y 265. Dichos oligonucleótidos modificados pueden alcanzar al menos un 80 % de inhibición de los niveles de ARNm humano como se determina usando un método de ensayo de RT-PCR, opcionalmente en células HepG2 (por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 30).

5 El oligonucleótido modificado puede comprender al menos 8, al menos 10, al menos 12, al menos 14, al menos 16 o al menos 18 bases nucleotídicas de una secuencia de bases nucleotídicas seleccionada de las SEQ ID NO: 34, 190, 215, 222, 223, 226, 246, y 254. El oligonucleótido modificado puede comprender una secuencia de bases nucleotídicas seleccionada de las SEQ ID NOs: 34, 190, 215, 222, 223, 226, 246, y 254. El oligonucleótido modificado puede consistir en una secuencia de bases nucleotídicas seleccionada de las SEQ ID NOs: 34, 190, 215, 222, 223, 226, 246 y 254. Dichos oligonucleótidos modificados pueden alcanzar al menos un 90 % de inhibición de los niveles de ARNm humano como se determina usando un método de ensayo de RT-PCR, opcionalmente en células HepG2 (por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 30).

15 En ciertas realizaciones, el compuesto consiste en un oligonucleótido modificado monocatenario.

En ciertas realizaciones, el oligonucleótido modificado consiste en 20 nucleósidos unidos.

20 La secuencia de bases nucleotídicas del oligonucleótido modificado puede ser 100 % complementaria de una secuencia de bases nucleotídicas de SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 6 o la SEQ ID NO: 274.

En ciertas realizaciones, el compuesto tiene al menos un enlace internucleosídico modificado. En ciertas realizaciones, el enlace internucleosídico es un enlace internucleosídico fosforotioato.

25 En ciertas realizaciones, el compuesto tiene al menos un nucleósido que comprende un azúcar modificado. En ciertas realizaciones, el al menos un azúcar modificado es un azúcar bicíclico. En ciertas realizaciones, el al menos un azúcar modificado comprende un 2'-O-metoxietilo.

30 En el presente documento se divulgan compuestos que comprenden un oligonucleótido modificado que consiste en de 12 a 30 nucleósidos unidos y que tienen una secuencia de bases nucleotídicas que comprende al menos 8, al menos 10, al menos 12, al menos 14, al menos 16, al menos 18 o 20 bases nucleotídicas contiguas de una secuencia de bases nucleotídicas seleccionada de entre las secuencias de bases nucleotídicas enumeradas en las SEQ ID NO: 15 a 241, SEQ ID NO: 15 a 269, o SEQ ID NO: 242 a 269, en el que al menos un nucleósido comprende un azúcar modificado.

35 En ciertas realizaciones, dicho al menos un al menos un azúcar modificado es un azúcar bicíclico.

En ciertas realizaciones, dicho al menos un azúcar bicíclico comprende un puente 4'-(CH₂)_n-O-2', en el que n es 1 o 2.

40 En ciertas realizaciones, dicho al menos un azúcar bicíclico comprende un puente 4'-CH(CH₃)-O-2'.

En ciertas realizaciones, dicho al menos un azúcar modificado comprende un grupo 2'-O-metoxietilo.

45 En el presente documento se divulgan compuestos que comprenden un oligonucleótido modificado que consiste en de 12 a 30 nucleósidos unidos y que tienen una secuencia de bases nucleotídicas que comprende al menos 8, al menos 10, al menos 12, al menos 14, al menos 16, al menos 18 o 20 bases nucleotídicas contiguas de una secuencia de bases nucleotídicas seleccionada de entre las secuencias de bases nucleotídicas enumeradas en las SEQ ID NO: 15 a 241, SEQ ID NO: 15 a 269, o SEQ ID NO: 242 a 269, que comprende al menos un nucleósido modificado con tetrahidropirano en el que un anillo de tetrahidropirano reemplaza el anillo de furanosa.

50 En ciertas realizaciones, dicho al menos un nucleósido modificado con tetrahidropirano tiene la estructura:



En ciertas realizaciones, el compuesto tiene al menos un nucleósido que comprende una base nucleotídica modificada. En ciertas realizaciones, la base nucleotídica modificada es una 5-metilcitosina.

65 En ciertas realizaciones, el oligonucleótido modificado del compuesto comprende:

- (i) un segmento separador que consiste en desoxinucleósidos unidos;
- (ii) un segmento del ala en 5' que consiste en nucleósidos unidos;
- (iii) un segmento de ala 3' que consiste en nucleósidos unidos, en el que el segmento separador está situado inmediatamente adyacente a y 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 algunas de tales realizaciones, cada citosina en el oligonucleótido modificado es una 5-metilcitosina.

En ciertas realizaciones, el oligonucleótido modificado del compuesto comprende:

- (i) un segmento separador que consiste en diez desoxinucleósidos unidos;
- (ii) un segmento del ala en 5' que consiste en cinco nucleósidos unidos;
- (iii) un segmento de ala 3' que consiste en cinco nucleósidos unidos, en el que el segmento separador está situado inmediatamente adyacente a y 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 2'-O-metoxietil-azúcar; y en el que cada enlace internucleosídico es un enlace fosforotioato. En algunas de tales realizaciones, cada citosina en el oligonucleótido modificado es una 5-metilcitosina.

En ciertas realizaciones, el oligonucleótido modificado del compuesto comprende:

- (i) un segmento separador que consiste en catorce desoxinucleósidos unidos;
- (ii) un segmento del ala en 5' que consiste en tres nucleósidos unidos;
- (iii) un segmento de ala 3' que consiste en tres nucleósidos unidos, en el que el segmento separador está situado inmediatamente adyacente a y 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 2'-O-metoxietil-azúcar; y en el que cada enlace internucleosídico es un enlace fosforotioato. En algunas de tales realizaciones, cada citosina en el oligonucleótido modificado es una 5-metilcitosina.

En ciertas realizaciones, el oligonucleótido modificado del compuesto comprende:

- (i) un segmento separador que consiste en trece desoxinucleósidos unidos;
- (ii) un segmento del ala en 5' que consiste en dos nucleósidos unidos;
- (iii) un segmento de ala 3' que consiste en cinco nucleósidos unidos, en el que el segmento separador está situado inmediatamente adyacente a y 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 2'-O-metoxietil-azúcar; y en el que cada enlace internucleosídico es un enlace fosforotioato. En algunas de tales realizaciones, cada citosina en el oligonucleótido modificado es una 5-metilcitosina.

En el presente documento se divulga una composición que comprende un oligonucleótido modificado que consiste en de 12 a 30 nucleósidos unidos y que tiene una secuencia de bases nucleotídicas que comprende al menos 12 bases nucleotídicas contiguas de una secuencia de bases nucleotídicas seleccionada entre las secuencias de bases nucleotídicas enumeradas en las SEQ ID NO: 15 a 241 o una sal de las mismas y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

En el presente documento se divulga una composición que comprende un oligonucleótido modificado que consiste en de 12 a 30 nucleósidos unidos y que tiene una secuencia de bases nucleotídicas que comprende al menos 12 bases nucleotídicas contiguas de una secuencia de bases nucleotídicas seleccionada entre las secuencias de bases nucleotídicas enumeradas en las SEQ ID NO: 15 a 269 o una sal de las mismas y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

En el presente documento se divulga una composición que comprende un oligonucleótido modificado que consiste en de 12 a 30 nucleósidos unidos y que tiene una secuencia de bases nucleotídicas que comprende al menos 12 bases nucleotídicas contiguas de una secuencia de bases nucleotídicas seleccionada entre las secuencias de bases nucleotídicas enumeradas en las SEQ ID NO: 241 a 269 o una sal de las mismas y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

En el presente documento se divulgan métodos que comprenden administrar a un animal un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que consiste en de 12 a 30 nucleósidos unidos y que tiene una secuencia de bases nucleotídicas que comprende al menos 8 bases nucleotídicas contiguas de una secuencia de bases nucleotídicas seleccionada entre las secuencias de bases nucleotídicas enumeradas en las SEQ ID NO: 15 a 241.

En el presente documento se divulgan métodos que comprenden administrar a un animal un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que consiste en de 12 a 30 nucleósidos unidos y que tiene una secuencia de bases nucleotídicas que comprende al menos 8 bases nucleotídicas contiguas de una secuencia de bases nucleotídicas seleccionada entre las secuencias de bases nucleotídicas enumeradas en las SEQ ID NO: 15 a 269.

En el presente documento se divulgan métodos que comprenden administrar a un animal un compuesto que

comprende un oligonucleótido modificado que consiste en de 12 a 30 nucleósidos unidos y que tiene una secuencia de bases nucleotídicas que comprende al menos 8 bases nucleotídicas contiguas de una secuencia de bases nucleotídicas seleccionada entre las secuencias de bases nucleotídicas enumeradas en las SEQ ID NO: 241 a 269.

5 El animal puede ser un ser humano.

La administración puede prevenir la trombosis venosa profunda o la embolia pulmonar.

10 El compuesto se puede coadministrar con cualquiera del grupo seleccionado de entre aspirina, clopidogrel, dipiridamol, heparina, lepirudina, ticlopidina, warfarina, apixabán, rivaroxabán y LOVENOX.

El compuesto se puede coadministrar con cualquier inhibidor del Factor Xa.

15 El inhibidor del Factor Xa puede ser cualquiera de rivaroxabán, LY517717, YM150, apixabán, PRT054021 y DU-176b.

El compuesto se puede administrar concomitantemente con cualquiera del grupo seleccionado de entre aspirina, clopidogrel, dipiridamol, heparina, lepirudina, ticlopidina, warfarina, apixabán, rivaroxabán y LOVENOX se administran de forma concomitante.

20 La administración puede ser administración parenteral. La administración parenteral puede ser cualquier administración subcutánea o intravenosa.

25 En el presente documento se divulgan métodos que comprenden identificar un animal en riesgo de desarrollar complicaciones tromboembólicas y administrar al animal en riesgo una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que consiste en de 12 a 30 nucleósidos unidos, en el que el oligonucleótido modificado es complementario de un ácido nucleico del Factor 11.

30 La complicación tromboembólica puede ser trombosis venosa profunda, embolia pulmonar o una combinación de las mismas.

35 En el presente documento se divulgan métodos que comprenden identificar un animal que tiene un trastorno de la coagulación mediante la administración al animal en riesgo una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que consiste en de 12 a 30 nucleósidos unidos, en el que el oligonucleótido modificado es complementario de un ácido nucleico del Factor 11.

El compuesto se puede coadministrar con cualquiera del grupo seleccionado de entre aspirina, clopidogrel, dipiridamol, heparina, lepirudina, ticlopidina, warfarina, apixabán, rivaroxabán y LOVENOX.

40 El compuesto se puede administrar concomitantemente con cualquiera del grupo seleccionado de entre aspirina, clopidogrel, dipiridamol, heparina, lepirudina, ticlopidina, warfarina, apixabán, rivaroxabán y LOVENOX se administran de forma concomitante.

45 En el presente documento se divulgan métodos que comprenden reducir el riesgo de complicaciones tromboembólicas en un animal mediante la administración al animal de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que consiste en de 12 a 30 nucleósidos unidos, en el que el oligonucleótido modificado es complementario de un ácido nucleico del Factor 11.

50 En el presente documento se divulgan métodos que comprenden tratar un trastorno de la coagulación en un animal mediante la administración al animal en riesgo una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que consiste en de 12 a 30 nucleósidos unidos, en el que el oligonucleótido modificado es complementario de un ácido nucleico del Factor 11.

55 En el presente documento se divulgan métodos que comprenden inhibir la expresión del factor 11 en un animal mediante la administración al animal en riesgo una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que consiste en de 12 a 30 nucleósidos unidos, en el que el oligonucleótido modificado es complementario de un ácido nucleico del Factor 11.

La inhibición del Factor 11 en el animal puede revertirse administrando un antídoto al oligonucleótido modificado.

60 El antídoto puede ser un oligonucleótido complementario del oligonucleótido modificado.

Compuestos antisentido

65 Los compuestos oligoméricos incluyen, entre otros, oligonucleótidos, oligonucleósidos, análogos de oligonucleótidos, miméticos de oligonucleótidos, compuestos antisentido, oligonucleótidos antisentido y ARNip. Un compuesto

oligomérico puede ser "antisentido" de un ácido nucleico diana, lo que significa que es capaz de sufrir hibridación con un ácido nucleico diana mediante enlaces de hidrógeno.

5 En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido tiene una secuencia de bases nucleotídicas que, cuando se escribe en la dirección 5' a 3', comprende el complementario inverso del segmento diana de un ácido nucleico diana al que está dirigido. En ciertas de estas realizaciones, un oligonucleótido antisentido tiene una secuencia de bases nucleotídicas que, cuando se escribe en la dirección 5' a 3', comprende el complementario inverso del segmento diana de un ácido nucleico diana al que está dirigido.

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

20 Los oligonucleótidos antisentido dirigidos a un ácido nucleico del Factor 11 pueden acortarse o truncarse. Por ejemplo, una sola subunidad puede eliminarse del extremo 5' (truncamiento en 5'), o, alternativamente, del extremo 3' (truncamiento en 3'). Un compuesto antisentido acortado o truncado dirigido a un ácido nucleico del Factor 11 puede tener dos subunidades delecionadas del extremo 5' o, alternativamente, puede tener dos subunidades eliminadas del extremo 3', del compuesto antisentido. Como alternativa, los nucleósidos delecionados se pueden dispersar por todo el compuesto antisentido, por ejemplo, en un compuesto antisentido que tiene un nucleósido delecionado del extremo 5' y un nucleósido eliminado del extremo 3'.

30 Cuando está presente una única subunidad adicional en un compuesto antisentido alargado, la subunidad adicional puede localizarse en el extremo 5' o 3' del compuesto antisentido. Cuando están presentes dos o más subunidades adicionales, las subunidades añadidas pueden estar adyacentes entre sí, por ejemplo, en un compuesto antisentido que tiene dos subunidades añadidas al extremo 5' (adición en 5') o, como alternativa, al extremo 3' (adición en 3'), del compuesto antisentido. Como alternativa, las subunidades añadidas se pueden dispersar por todo el compuesto antisentido, por ejemplo, en un compuesto antisentido que tiene una subunidad añadida al extremo 5' y una subunidad añadida al extremo 3'.

35 Es posible aumentar o disminuir la longitud de un compuesto antisentido, tal como un oligonucleótido antisentido, y/o introducir bases apareadas erróneamente sin eliminar la actividad. Por ejemplo, en Woolf y col. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7305-7309, 1992), se analizó una serie de oligonucleótidos antisentido de 13-25 bases nucleotídicas de longitud su capacidad para inducir la escisión de un ARN diana en un modelo de inyección de oocitos. Los oligonucleótidos antisentido de 25 bases nucleotídicas de longitud con 8 u 11 apareamientos erróneos de bases cerca de los extremos de los oligonucleótidos antisentido fueron capaces de dirigir la escisión específica del ARNm diana, aunque en menor medida que los oligonucleótidos antisentido que no contenían apareamientos erróneos. De un modo similar, se consiguió una escisión específica de la diana usando oligonucleótidos antisentido de 13 bases nucleotídicas, incluidos aquellos con 1 o 3 apareamientos erróneos.

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

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

Motivos de compuestos antisentido

60 En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido dirigidos a un ácido nucleico del Factor 11 tienen subunidades químicamente modificadas dispuestas en patrones, o motivos, para conferir a los compuestos antisentido propiedades tales como potenciación de la actividad inhibitoria, afinidad de unión incrementada por un ácido nucleico diana o resistencia a la degradación por nucleasas *in vivo*.

65 Los compuestos antisentido quiméricos normalmente contienen al menos una región modificada de modo que confieren un incremento de la resistencia a la degradación por nucleasas, incremento de la captación celular y/o incremento de la afinidad de unión por el ácido nucleico diana y/o una actividad inhibitoria incrementada. Una

segunda región de un compuesto antisentido químérico puede servir opcionalmente como sustrato para la endonucleasa ARNasa H celular, que escinde la cadena de ARN de un dúplex de ARN:ADN.

5 Los compuestos antisentido que tienen un motivo gapmer se consideran compuestos antisentido químicos. En un gapmer, una región interna que tiene una pluralidad de nucleótidos que soporta la escisión de ARNasaH se coloca 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 gapmer, el segmento separador generalmente sirve como sustrato para la escisión con endonucleasa, mientras que los segmentos de ala comprenden nucleósidos modificados. En ciertas realizaciones, las regiones de un gapmer se diferencian por los tipos de restos de azúcar que comprenden cada región distinta. Los tipos de restos de azúcar que se usan para diferenciar las regiones de un gapmer pueden, en algunas realizaciones, incluir β -D-ribonucleósidos, β -D-desoxirribonucleósidos, nucleósidos modificados en 2' (tales nucleósidos modificados en 2' pueden incluir 2'-MOE y 2'-O-CH₃, entre otros), y los nucleósidos modificados con azúcar bicíclico (tales nucleósidos modificados con azúcar bicíclico 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 azúcar uniformes. El motivo de ala-separador-ala se describe con frecuencia como "X-Y-Z", en el que "X" representa la longitud de la región del ala en 5', "Y" representa la longitud de la región separadora y "Z" representa la longitud de la región del ala en 3'. Como se usa en el presente documento, un gapmer descrito como "X-Y-Z" tiene una configuración tal que el segmento separador se coloca inmediatamente adyacente a cada uno del segmento de ala en 5' y el segmento de ala en 3'. Por lo tanto, no existen nucleótidos intermedios entre el segmento de ala en 5' y el segmento separador o el segmento separador y el segmento de ala en 3'. Cualquiera de los compuestos antisentido descritos en el presente documento puede tener un motivo de gapmer. En algunas realizaciones, X y Z son iguales, en otras realizaciones son diferentes. En una realización preferida, Y está 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 gapmeros de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo 5-10-5, 4-8-4, 4-12-3, 4-12-4, 3-14-3, 2-13-5, 2-16-2, 1-18-1, 3-10-3, 2-10-2, 1-10-1, 2-8-2, 5-8-5, o 6-8-6.

30 En ciertas realizaciones, el compuesto antisentido tiene un motivo de "wingmer" que tiene una configuración de ala-separador o separador-ala, es decir, una configuración X-Y o Y-Z como se ha descrito anteriormente para la configuración de gapmer. Por lo tanto, las configuraciones de las alas de la presente invención incluyen, entre otras, por ejemplo 5-10, 8-4, 4-12, 12-4, 3-14, 16-2, 18-1, 10-3, 2-10, 1-10, 8-2, 2-13, 5-13, 5-8 o 6-8.

35 En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido dirigidos a un ácido nucleico del Factor 11 poseen un motivo gapmer 5-10-5.

En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido dirigidos a un ácido nucleico del Factor 11 poseen un motivo gapmer 3-14-3.

40 En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido dirigidos a un ácido nucleico del Factor 11 poseen un motivo gapmer 2-13-5.

En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido dirigidos a un ácido nucleico del Factor 11 poseen un motivo gapmer 5-8-5.

45 En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido dirigidos a un ácido nucleico del Factor 11 poseen un motivo gapmer 6-8-6.

50 En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico del factor 11 tiene un ensanchado por separador.

55 En ciertas realizaciones, un oligonucleótido antisentido ensanchado por separador dirigido a un ácido nucleico del Factor 11 tiene un segmento separador de catorce 2'-desoxirribonucleótidos posicionados inmediatamente adyacentes a y entre segmentos de ala de tres nucleósidos modificados químicamente. En ciertas realizaciones, la modificación química comprende una modificación de 2'-azúcar. En otra realización, la modificación química comprende una modificación de 2'-MOE azúcar.

60 En ciertas realizaciones, un oligonucleótido antisentido ensanchado por separador dirigido a un ácido nucleico del Factor 11 tiene un segmento separador de trece 2'-desoxirribonucleótidos posicionados inmediatamente adyacentes a y entre un segmento de ala en 5' de dos nucleósidos modificados químicamente y un segmento de ala en 3' de cinco nucleósidos químicamente modificados. En ciertas realizaciones, la modificación química comprende una modificación de 2'-azúcar. En otra realización, la modificación química comprende una modificación de 2'-MOE azúcar.

65 *Ácidos nucleicos diana, regiones diana y secuencias de nucleótidos*

Las secuencias de nucleótidos que codifican el Factor 11 incluyen, sin limitación, las siguientes: N.º de acceso en

GENBANK NM_000128.3, primero depositado en GENBANK el 24 de marzo de 1999, incorporado en el presente documento como SEQ ID NO: 1; NT_022792.17, truncado de 19598000 a 19624000, primero depositado en GENBANK el 29 de noviembre de 2000, e incorporado en el presente documento SEQ ID NO: 2; N.º de acceso en GENBANK NM_028066.1, primero depositado en GENBANK el 2 de junio de 2002, incorporado en el presente documento como SEQ ID NO: 6; y los exones 1-15 de N.º de acceso en GENBANK NW_001118167.1, primero depositado en GENBANK el 28 de marzo de 2006, incorporado en el presente documento como SEQ ID NO: 274.

Se entiende que la secuencia indicada en cada SEQ ID NO en los Ejemplos contenidos en el presente documento es independiente de cualquier modificación de un resto azúcar, un enlace internucleosídico o una base nucleotídica. Como tales, los compuestos antisentido definidos por una SEQ ID NO pueden comprender, de forma independiente, una o más modificaciones en un resto azúcar, un enlace internucleosídico o una base nucleotídica. Los compuestos antisentido descritos por el número Isis (n.º Isis) indican una combinación de secuencia de bases nucleotídicas y motivo.

En ciertas realizaciones, una región diana es una región estructuralmente definida del ácido nucleico diana. Por ejemplo, una región diana puede abarcar una 3' UTR, una 5' UTR, un exón, un intrón, una unión exón/intrón, una región codificadora, una región de inicio de la traducción, una región de terminación de la traducción u otra región de ácido nucleico definida. Las regiones estructuralmente definidas para el Factor 11 pueden obtenerse por número de acceso de bases de datos de secuencias, tales como NCBI. En ciertas realizaciones, una región diana puede abarcar la secuencia desde un sitio diana en 5' de un segmento diana dentro de la región diana hasta un sitio diana en 3' de otro segmento diana dentro de la misma región diana.

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

Una región diana puede contener uno o más segmentos diana. Múltiples segmentos diana dentro de una región diana pueden estar superpuestos. Como alternativa, pueden no superponerse. En ciertas realizaciones, los segmentos diana dentro de una región diana están separados en no más de aproximadamente 300 nucleótidos. En ciertas realizaciones, los segmentos diana dentro de una región diana están separados por un número de nucleótidos que es, es aproximadamente, no es más que, no es más que aproximadamente, 250, 200, 150, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 o 10 nucleótidos en el ácido nucleico diana, o es un intervalo definido por dos cualesquiera de los valores precedentes. En ciertas realizaciones, los segmentos diana dentro de una región diana están separados por no más de, o no más de aproximadamente, 5 nucleótidos en el ácido nucleico diana. En ciertas realizaciones, los segmentos diana son contiguos. Se contemplan las regiones diana definidas por un intervalo que tiene un ácido nucleico de partida que es cualquiera de los sitios diana en 5' o los sitios diana en 3' enumerados en el presente documento.

Se pueden encontrar segmentos diana adecuados dentro de una UTR 5', una región de codificación, una 3' UTR, un intrón, un exón o una unión exón/intrón. Los segmentos diana que contienen un codón de iniciación o un codón de terminación también son segmentos diana adecuados. Un segmento diana adecuado puede excluir específicamente una cierta región definida estructuralmente, tal como el codón de iniciación o el codón de terminación.

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

Puede haber variación en la actividad (por ejemplo, como se define por el porcentaje de reducción de los niveles de ácido nucleico diana) de los compuestos antisentido dentro de una región diana activa. En ciertas realizaciones, las reducciones en los niveles de ARNm del Factor 11 son indicativas de la inhibición de la expresión del Factor 11. Las reducciones en los niveles de una proteína del Factor 11 también son indicativas de la inhibición de la expresión del ARNm diana. Además, los cambios fenotípicos son indicativos de la inhibición de la expresión del Factor 11. Por ejemplo, un tiempo aPTT prolongado puede ser indicativo de la inhibición de la expresión del Factor 11. En otro ejemplo, el tiempo aPTT prolongado junto con un tiempo de PT normal puede ser indicativo de la inhibición de la expresión del Factor 11. En otro ejemplo, una cantidad disminuida del Factor de plaquetas 4 (PF-4) puede ser indicativo de la inhibición de la expresión del Factor 11. En otro ejemplo, la formación reducida de trombo o el aumento del tiempo para la formación de trombos pueden ser indicativos de la inhibición de la expresión del Factor 11.

Hibridación

En algunas realizaciones, la hibridación se produce entre un compuesto antisentido descrito en el presente

documento y un ácido nucleico del Factor 11. El mecanismo más común de hibridación implica enlaces de hidrógeno (por ejemplo, enlaces de Watson-Crick, Hoogsteen o enlaces de hidrógeno invertidos de Hoogsteen) entre bases nucleotídicas complementarias de las moléculas de ácido nucleico.

- 5 La hibridación se puede producir en diferentes condiciones. Las condiciones rigurosas dependen de la secuencia y están determinadas por la naturaleza y la composición de las moléculas de ácido nucleico a hibridar.

Los métodos para determinar si una secuencia es específicamente hibridable con un ácido nucleico diana son bien conocidos en la técnica. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido descritos en el presente documento son específicamente hibridables con un ácido nucleico del Factor 11.

Complementariedad

15 Un compuesto antisentido y un ácido nucleico diana son complementarios entre sí cuando un número suficiente de bases nucleotídicas del compuesto antisentido puede unirse por hidrógeno con las bases nucleotídicas correspondientes del ácido nucleico diana, de modo que se producirá un efecto deseado (por ejemplo, inhibición antisentido de un ácido nucleico diana, tal como un ácido nucleico del Factor 11).

20 Las bases nucleotídicas no complementarias entre un compuesto antisentido y un ácido nucleico del Factor 11 se pueden tolerar a condición de que el compuesto antisentido permanezca capaz de hibridar específicamente con un ácido nucleico diana. Además, un compuesto antisentido puede hibridarse sobre uno o más segmentos de un ácido nucleico del Factor 11 de manera que los segmentos intermedios o adyacentes no están implicados en el acontecimiento de hibridación (por ejemplo, una estructura de bucle, apareamiento erróneo o estructura en horquilla).

25 En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido descritos en el presente documento, o una porción específica de los mismos, son, o son al menos, 70 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % complementarios de un ácido nucleico del Factor 11, una región diana, segmento diana, o una porción especificada de los mismos. El porcentaje de complementariedad de un compuesto antisentido con un ácido nucleico diana puede determinarse usando métodos rutinarios. Por ejemplo, un compuesto antisentido en el que 18 de 20 bases nucleotídicas del compuesto antisentido son complementarias de una región diana, y, por lo tanto, hibridarán específicamente, representarían un 90 por ciento de complementariedad. En este ejemplo, las bases nucleotídicas no complementarias restantes pueden agruparse o intercalarse con bases nucleotídicas complementarias y no necesitan ser contiguas entre sí o con bases nucleotídicas complementarias. Como tal, un compuesto antisentido que tiene una longitud de 18 bases nucleotídicas que tiene 4 (cuatro) bases nucleotídicas no complementarias que están flanqueadas por dos regiones de complementariedad completa con el ácido nucleico diana, tendría un 77,8 % de complementariedad global con el ácido nucleico diana. El porcentaje de complementariedad de un compuesto antisentido con una región de un ácido nucleico diana se puede determinar rutinariamente usando programas BLAST (herramientas de búsqueda de alineación local básica) y programas PowerBLAST conocidos en la técnica (Altschul et al., J. Mol. Biol., 1990, 215, 403-410; Zhang y Madden, Genome Res., 1997, 7, 649-656). El porcentaje de homología, identidad de secuencia o complementariedad, puede determinarse mediante, por ejemplo, el programa Gap (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison Wis.), utilizando la configuración predeterminada, que utiliza el algoritmo de Smith y Waterman (Adv. Appl. Math., 1981, 2, 482-489).

45 En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido descritos en el presente documento, o partes específicas de los mismos, son completamente complementarios (es decir, 100 % complementarios) de un ácido nucleico diana, o una parte específica de los mismos. Por ejemplo, el compuesto antisentido puede ser completamente complementario de un ácido nucleico del Factor 11, o una región diana, o un segmento diana o una secuencia diana del mismo. Como se usa en el presente documento, "completamente complementario" significa que cada base nucleotídica de un compuesto antisentido es capaz de aparearse con bases nucleotídicas correspondientes de un ácido nucleico diana. Por ejemplo, un compuesto antisentido de 20 bases nucleotídicas es completamente complementario a una secuencia diana que tiene una longitud de 400 bases nucleotídicas, siempre que haya una porción correspondiente de 20 bases nucleotídicas del ácido nucleico diana que sea completamente complementaria del compuesto antisentido. Completamente complementario también puede usarse en referencia a una porción especificada del primero y/o el segundo ácido nucleico. Por ejemplo, una porción de 20 bases nucleotídicas de un compuesto antisentido de 30 bases nucleotídicas puede ser "completamente complementaria" de una secuencia diana que tiene una longitud de 400 bases nucleotídicas. La porción de 20 bases nucleotídicas del oligonucleótido de 30 bases nucleotídicas es completamente complementaria de la secuencia diana si la secuencia diana tiene una porción de 20 bases nucleotídicas correspondiente en la que cada base nucleotídica es complementaria de la porción de 20 bases nucleotídicas del compuesto antisentido. Al mismo tiempo, el compuesto antisentido de 30 bases nucleotídicas completo puede o no ser completamente complementario de la secuencia diana, dependiendo de si las 10 bases nucleotídicas restantes del compuesto antisentido también son complementarias a la secuencia diana.

65 La ubicación de una base nucleotídica no complementaria puede estar en el extremo 5' o en el extremo 3' del

compuesto antisentido. Como alternativa, la base nucleotídica o bases nucleotídicas no complementarias puede estar en una posición interna del compuesto antisentido. Cuando dos o más bases nucleotídicas no complementarias están presentes, pueden ser contiguas (es decir, unidas) o no contiguas. Una base nucleotídica no complementaria puede estar localizada en el segmento de ala de un oligonucleótido antisentido de gapmer.

5 Los compuestos antisentido que tienen una longitud de hasta 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 bases nucleotídicas comprenden no más de 4, no más de 3, no más de 2, o no más de 1 base nucleotídica (s) no complementaria (s) con respecto a un ácido nucleico diana, tal como un ácido nucleico del Factor 11, o una porción especificada de los mismos.

10 Los compuestos antisentido que tienen una longitud de hasta 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 bases nucleotídicas comprenden no más de 6, no más de 5, no más de 4, o no más de 3, no más de 2 o o más de 1 base(s) nucleotídica(s) no complementaria(s) con respecto a un ácido nucleico diana, tal como un ácido nucleico del Factor 11, o una porción especificada de los mismos.

15 Los compuestos antisentido proporcionados en el presente documento también incluyen aquellos que son complementarios a una porción de un ácido nucleico diana. Como se usa en el presente documento, "porción" se refiere a un número definido de bases nucleotídicas contiguas (es decir, unidas) dentro de una región o segmento de un ácido nucleico diana. Una "porción" también se puede referir a un número definido de bases nucleotídicas contiguas de un compuesto antisentido. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido son complementarios de al menos una porción de 8 bases nucleotídicas de un segmento diana. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido son complementarios de al menos una porción de 12 bases nucleotídicas de un segmento diana. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido son complementarios de al menos una porción de 15 bases nucleotídicas de un segmento diana. También se contemplan compuestos antisentido que son complementarios a al menos 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, o más porciones de base nucleotídica de un segmento diana, o un intervalo definido por cualquiera de estos dos valores.

Identidad

30 Los compuestos antisentido proporcionados en el presente documento también pueden tener un porcentaje de identidad definido para una secuencia de nucleótidos en particular, SEQ ID NO, o compuesto representado por un número Isis específico, o una porción del mismo. Como se usa en el presente documento, un compuesto antisentido es idéntico a la secuencia divulgada en el presente documento si tiene la misma capacidad de apareamiento de bases nucleotídicas. Por ejemplo, un ARN que contiene uracilo en lugar de timidina en una secuencia de ADN divulgada se consideraría idéntico a la secuencia de ADN, ya que tanto el uracilo como la timidina se aparean con adenina. Se contemplan versiones acortadas y alargadas de los compuestos antisentido descritos en el presente documento, así como también compuestos que tienen bases no idénticas en relación con los compuestos antisentido proporcionados en el presente documento. Las bases no idénticas pueden estar adyacentes o dispersas por el oligonucleótido por todo el compuesto antisentido. El porcentaje de identidad de un compuesto antisentido se calcula de acuerdo con el número de bases que tienen idéntico apareamiento de bases con respecto a la secuencia con la que se está comparando.

45 En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido, o porciones de los mismos, son al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idénticos de uno o más de los compuestos antisentido o las SEQ ID NOs, o una porción de los mismos, divulgados en el presente documento.

50 En ciertas realizaciones, una porción del compuesto antisentido se compara con una porción de igual longitud del ácido nucleico diana. En ciertas realizaciones, se compara una porción de base nucleotídica de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 con una porción de igual longitud del ácido nucleico diana.

55 En ciertas realizaciones, una porción del oligonucleótido antisentido se compara con una porción de igual longitud del ácido nucleico diana. En ciertas realizaciones, se compara una porción de base nucleotídica de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 con una porción de igual longitud del ácido nucleico diana.

Modificaciones

60 Un nucleósido es una combinación de base-azúcar. La porción de bases nucleotídicas (también conocida como base) del nucleósido es, normalmente, un resto de base heterocíclica. Los nucleótidos son nucleósidos que incluyen además un grupo fosfato unido covalentemente a la porción azúcar del nucleósido. Para los nucleósidos que incluyen un azúcar de pentofuranosilo, el grupo fosfato se puede unir al resto hidroxilo en 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 del oligonucleótido, normalmente se hace referencia a los grupos fosfato como formadores de los enlaces internucleosídicos del oligonucleótido.

65 Las modificaciones de los compuestos antisentido abarcan sustituciones o cambios en los enlaces internucleosídicos, restos de azúcar o bases nucleotídicas. Los compuestos antisentido modificados a menudo se

prefieren sobre las formas nativas debido a propiedades deseables tales como, por ejemplo, captación celular potenciada, afinidad potenciada por el diana de ácido nucleico, estabilidad aumentada en presencia de nucleasas o actividad inhibidora incrementada.

- 5 Los nucleósidos modificados químicamente también pueden emplearse 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 antisentido más cortos que tienen tales nucleósidos modificados químicamente.

10 *Enlaces internucleosídicos modificados*

Enlace internucleosídico de origen natural de ARN y ADN es un enlace fosfodiéster 3' a 5'. Los compuestos antisentido que tienen uno o más enlaces internucleosídicos modificados, es decir, no naturales se seleccionan a menudo sobre compuestos antisentido que tienen enlaces internucleosídicos naturales debido a las propiedades deseables tales como, por ejemplo, captación celular potenciada, afinidad potenciada por ácidos nucleicos diana y aumento de la afinidad estabilidad en presencia de nucleasas.

15 Los oligonucleótidos que tienen enlaces internucleosídicos modificados incluyen enlaces internucleosídicos que retienen un átomo de fósforo así como enlaces internucleosídicos que no tienen un átomo de fósforo. Enlaces internucleosídicos representativos que contienen fósforo incluyen, entre otros, fosforodiesteres, fosforotriésteres, metilfosfonatos, fosforoamidato y fosfortioatos. Los métodos de preparación de enlaces que contienen fósforo y que no contienen fósforo son bien conocidos.

20 En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido dirigidos a un ácido nucleico del Factor 11 comprenden uno o más enlaces internucleosídicos modificados. En ciertas realizaciones, los enlaces internucleosídicos modificados son enlaces fosfortioato. En ciertas realizaciones, cada enlace internucleosídico de un compuesto antisentido es un enlace internucleosídico fosfortioato.

25 *Restos de azúcar modificada*

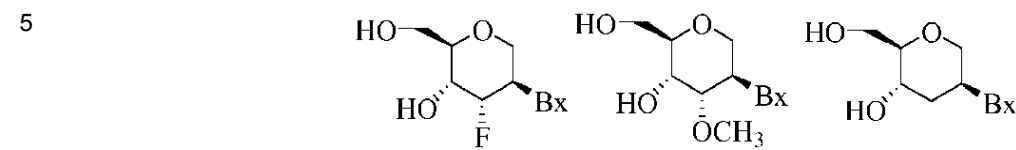
30 Los compuestos antisentido de la invención pueden contener, opcionalmente, uno o más nucleósidos en los que el grupo azúcar ha sido modificado. Dichos nucleósidos modificados con azúcar pueden impartir estabilidad de nucleasa potenciada, afinidad de unión aumentada o alguna otra propiedad biológica beneficiosa a los compuestos antisentido. En ciertas realizaciones, los nucleósidos comprenden restos de anillo de ribofuranosa modificados químicamente. Los ejemplos de anillos de ribofuranosa modificados químicamente incluyen sin limitación, la adición de grupos sustituyentes (incluyendo grupos sustituyentes 5' y 2', puente de átomos del anillo no geminales para formar ácidos nucleicos bicíclicos (BNA), reemplazo del átomo de oxígeno del anillo ribosilo con S, N (R) o C (R1) (R) 2 (R = H, alquilo C1-C12 o un grupo protector) y combinaciones de los mismos. Ejemplos de azúcares químicamente modificados incluyen nucleósido 2'-F-5'-metilo sustituido (véase la solicitud internacional de PCT WO 2008/101157 publicado el 21/08/08 para otros nucleósidos 5',2'-bis sustituidos divulgados) o sustitución del átomo de oxígeno del anillo de ribosilo por S con sustitución adicional en la posición 2' (véase la solicitud de patente de Estados Unidos publicada US2005-0130923, publicada el 16 de junio de 2005) o, como alternativa, sustitución en 5'n de un BNA (solicitud de patente internacional PCT WO 2007/134181 publicada el 22/11/07 en la que el LNA está sustituido con, por ejemplo, un grupo 5'-metilo o un grupo 5'-vinilo).

45 Los ejemplos de nucleósidos que tienen restos de azúcar modificados incluyen, sin limitación, nucleósidos que comprenden grupos sustituyentes 5'-vinilo, 5'-metilo (R o S), 4'-S, 2'-F, 2'-OCH₃ y 2'-O (CH₂)₂OCH₃ grupos sustituyentes. El sustituyente en la posición 2' también se puede seleccionar de alilo, amino, azido, tio, O-alilo, O-alquilo C₁-C₁₀, -OCF₃, O-(CH₂)₂-O-CH₃, 2'-O(CH₂)₂SCH₃, O-(CH₂)₂-O-N(R_m)(R_n), y O-CH₂-C(=O)-N(R_m)(R_n), en las que cada R_m y R_n es, de forma independiente, H o alquilo C₁-C₁₀ sustituido o no sustituido.

50 Los ejemplos de ácidos nucleicos bicíclicos (BNA) incluyen, sin limitación, nucleósidos que comprenden un puente entre los átomos del anillo ribosilo 4' y 2'. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido proporcionados en el presente documento incluyen uno o más nucleósidos de BNA en los 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' (see PCT/US2008/068922); 4'-CH(CH₃)-O-2' y 4'-C-H(CH₂OCH₃)-O-2' (véase la patente de Estados Unidos 7.399.845, expedida el 15 de julio de 2008); 4'-CH₂-N(OCH₃)-2' (véase PCT/US2008/ 064591); 4'-CH₂-O-N(CH₃)-2' (véase la solicitud de patente de Estados Unidos publicada US2004-0171570, publicada el 2 de septiembre de 2004); 4'-CH₂-N(R)-O-2' (véase la 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 el que R es, independientemente, H, alquilo C₁-C₁₂ o un grupo protector. Cada uno de los BNA anteriores incluye varias configuraciones estereoquímicas de azúcar que incluyen, por ejemplo, α-L-ribofuranosa y β-D-ribofuranosa (véase la solicitud internacional PCT). PCT/DK98/00393, publicada el 25 de marzo de 1999 como el documento WO 99/14226).

65 En ciertas realizaciones, los nucleósidos se modifican mediante la sustitución del anillo de ribosilo por un sustituto de

azúcar. Dicha modificación incluye, sin limitación, la sustitución del anillo de ribosilo por un sistema de anillo sustituto (a veces denominado análogos de ADN), tal como un anillo morfolino, un anillo ciclohexenilo, un anillo ciclohexilo o un anillo tetrahidropiraniilo tal como uno que tiene uno de la fórmula:



También se conocen en la técnica muchos otros sistemas de anillo sustituto de azúcar biciclo y triciclo que pueden usarse para modificar nucleósidos para la incorporación en compuestos antisentido (véase, por ejemplo, el artículo de revisión: Leumann, J. C, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2002, 10, 841–854). Dichos sistemas de anillos pueden sufrir varias sustituciones adicionales para mejorar la actividad.

Los procedimientos para las preparaciones de los azúcares modificados son bien conocidos para los expertos en la técnica.

20 En los nucleótidos que tienen restos de azúcar modificados, los restos de bases nucleotídicas (naturales, modificados o una combinación de los mismos) se mantienen para la hibridación con un diana de ácido nucleico apropiada.

25 En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido dirigidos a un ácido nucleico del Factor 11 comprenden uno o más nucleótidos que tienen restos de azúcar modificados. En ciertas realizaciones, el resto de azúcar modificado es 2'-MOE. En ciertas realizaciones, los nucleótidos modificados con 2'-MOE están dispuestos en un motivo gapper.

Bases nucleotídicas modificadas

30 Las modificaciones o sustituciones de bases nucleotídicas (o bases) son estructuralmente distinguibles, aunque funcionalmente intercambiables, de las bases nucleotídicas naturales o sintéticas no modificadas. Las bases nucleotídicas naturales y modificadas son capaces de participar en enlaces de hidrógeno. Tales modificaciones de bases nucleotídicas pueden impartir estabilidad de nucleasa, afinidad de unión aumentada o alguna otra propiedad biológica beneficiosa a los compuestos antisentido. Las bases nucleotídicas modificadas incluyen bases nucleotídicas sintéticas y naturales tales como, por ejemplo, 5-metilcitosina (5-me-C). Ciertas sustituciones de bases nucleotídicas, que incluyen sustituciones de 5-metilcitosina, son particularmente útiles para aumentar la afinidad de unión de un compuesto antisentido por un ácido nucleico diana. Por ejemplo, se ha demostrado que las sustituciones de 5-metilcitosina aumentan la estabilidad dúplex del ácido nucleico en 0,6-1,2 °C (Sanghvi, Y.S., Crooke, S.T. and Lebleu, B., eds., *Antisense Research and Applications*, CRC Press, Boca Raton, 1993, pág. 276–278).

45 Las bases nucleotídicas modificadas adicionales incluyen 5-hidroximetil citosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metil y otros derivados alquílicos de adenina y guanina, 2-propilo y otros derivados alquílicos de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracilo y citosina, 5-propinilo (-C≡C-CH₃) uracilo y citosina y otros derivados alquílicos de bases de pirimidina, 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 5-sustituidos uracilos y citosinas, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 2-F-adenina, 2-aminoadenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-deazaguanina y 7-deazaadenina y 3-deazaguanina y 3-deazaadenina.

50 Los restos de bases heterocíclicas también pueden incluir aquellos en los que la base de purina o pirimidina se reemplaza con otros heterociclos, por ejemplo 7-deaza-adenina, 7-deazaguanosina, 2-aminopiridina y 2-piridona. Las bases nucleotídicas que son particularmente útiles para aumentar la afinidad de unión de los compuestos antisentido incluyen pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y purinas N-2, N-6 y O-6 sustituidas, que incluyen 2 aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina.

60 En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido dirigidos a un ácido nucleico del Factor 11 comprenden uno o más bases nucleotídicas modificadas. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido ensanchados por separador dirigidos a un ácido nucleico del Factor comprenden uno o más bases nucleotídicas modificadas. En ciertas realizaciones, la base nucleotídica modificada es una 5-metilcitosina. En ciertas realizaciones, cada citosina es una 5-metilcitosina.

Composiciones y métodos para formular composiciones farmacéuticas

65 Los oligonucleótidos antisentido pueden mezclarse con sustancias activas o inertes farmacéuticamente aceptables para la preparación de composiciones farmacéuticas o formulaciones. Las composiciones y métodos para la

formulación de composiciones farmacéuticas dependen de una serie de criterios, que incluyen, pero no se limitan a, la vía de administración, la extensión de la enfermedad o la dosis a administrar.

5 Un compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico del Factor 11 se puede utilizar en composiciones farmacéuticas combinando el compuesto antisentido con un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado. Un diluyente farmacéuticamente aceptable incluye solución salina tamponada con fosfato (PBS). PBS es un diluyente adecuado para usar en composiciones que se administran por vía parenteral. Por consiguiente, en una realización, se emplea en los métodos descritos en el presente documento una composición farmacéutica que comprende un compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico del Factor 11 y un diluyente farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones, el diluyente farmacéuticamente aceptable es PBS. En ciertas realizaciones, el compuesto antisentido es un oligonucleótido antisentido.

15 Las composiciones farmacéuticas que comprenden compuestos antisentido abarcan cualquier sal, éster o sales de dichos ésteres farmacéuticamente aceptables, o cualquier otro oligonucleótido que, tras la administración a un animal, incluido un ser humano, puede proporcionar (directa o indirectamente) el metabolito biológicamente activo o un residuo del mismo. De acuerdo con esto, por ejemplo, la divulgación también se extiende a sales farmacéuticamente aceptables de compuestos antisentido, profármacos, sales farmacéuticamente aceptables de dichos profármacos, y otros bioequivalentes. Las sales farmacéuticamente aceptables adecuadas incluyen, pero sin limitación, sales de sodio y potasio.

20 Un profármaco puede incluir la incorporación de nucleósidos adicionales en uno o ambos extremos de un compuesto antisentido que se escinden mediante nucleasas endógenas dentro del cuerpo, para formar el compuesto antisentido activo.

25 *Compuestos antisentido conjugados*

Los compuestos antisentido se pueden unir covalentemente a uno o más restos o conjugados que potencian la actividad, distribución celular o captación celular de los oligonucleótidos antisentido resultantes. Los grupos conjugados típicos incluyen restos de colesterol y restos lipídicos. Los grupos conjugados adicionales incluyen carbohidratos, fosfolípidos, biotina, fenazina, folato, fenantridina, antraquinona, acridina, fluoresceínas, rodaminas, cumarinas y colorantes.

35 Los compuestos antisentido también pueden modificarse para que tengan uno o más grupos estabilizadores que están generalmente unidos a uno o a ambos extremos de compuestos antisentido para potenciar propiedades tales como, por ejemplo, estabilidad de nucleasas. Incluidas en los grupos estabilizadores se encuentran las estructuras de caperuza. Estas modificaciones terminales protegen el compuesto antisentido que tiene ácido nucleico terminal de la degradación por exonucleasa, y pueden ayudar a la administración y/o localización dentro de una célula. La caperuza puede estar presente en el extremo 5' (5'-caperuza), o en el extremo 3' (3'-caperuza), o puede estar presente en ambos extremos. Las estructuras de caperuza son bien conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, caperuzas desoxiabásicas invertidas. Adicionalmente, los grupos estabilizadores 3' y 5' que pueden usarse para cubrir uno o ambos extremos de un compuesto antisentido para impartir estabilidad a la nucleasa incluyen los divulgados en el documento WO 03/004602 publicado el 16 de enero de 2003.

45 *Cultivo celular y tratamiento con compuestos antisentido*

Los efectos de los compuestos antisentido sobre el nivel, la actividad o la expresión de los ácidos nucleicos del Factor 11 pueden probarse *in vitro* en diversos tipos de células. Los tipos de células utilizadas para tales análisis están disponibles en proveedores comerciales (por ejemplo, la Colección americana de cultivos tipo, Manassus, VA; Zen-Bio, Inc., Research Triangle Park, Carolina del Norte; Clonetics Corporation, Walkersville, MD) y se cultivan de acuerdo con las instrucciones del proveedor utilizando reactivos disponibles en el mercado (por ejemplo, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). Los tipos de células ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, células HepG2, células Hep3B y hepatocitos primarios.

55 *Prueba in vitro de oligonucleótidos antisentido*

En el presente documento se divulgan métodos para el tratamiento de células con oligonucleótidos antisentido, que se pueden modificar de forma apropiada para el tratamiento con otros compuestos antisentido.

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

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

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

Otra técnica utilizada para introducir oligonucleótidos antisentido en células cultivadas incluye electroporación.

Las células se tratan con oligonucleótidos antisentido por métodos de rutina. Las células se recogen típicamente 16-24 horas después del tratamiento con oligonucleótidos antisentido, momento en el que se miden los niveles de ARN o proteína de los ácidos nucleicos diana mediante métodos conocidos en la técnica y descritos en el presente documento. En general, cuando los tratamientos se realizan en múltiples repeticiones, los datos se presentan como el promedio de los tratamientos duplicados.

La concentración del oligonucleótido antisentido usado varía de una línea celular a otra línea celular. Los métodos para determinar la concentración óptima de oligonucleótidos antisentido para una línea celular particular son bien conocidos en la técnica. Los oligonucleótidos antisentido se usan típicamente a concentraciones que varían de 1 nM a 300 nM cuando se transfectan con LIPOFECTAMINE. Los oligonucleótidos antisentido se usan a concentraciones más altas que varían de 625 a 20,000 nM cuando se transfectan usando electroporación.

Aislamiento de ARN

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

Análisis de la inhibición de niveles o expresión diana

La inhibición de los niveles o la expresión de un ácido nucleico del Factor 11 se pueden analizar de varias maneras conocidas en la técnica. Por ejemplo, los niveles de ácido nucleico diana se pueden cuantificar mediante, por ejemplo, análisis de transferencia de tipo Northern, reacción en cadena de la polimerasa competitiva (PCR) o PCR cuantitativa en tiempo real. El análisis del ARN se puede realizar sobre ARN celular total o poli(A) + ARNm. Los métodos de aislamiento de ARN son bien conocidos en la técnica. El análisis de transferencia de tipo Northern también es una rutina en la técnica. La PCR cuantitativa en tiempo real se puede llevar a cabo convenientemente usando el sistema de detección de secuencia ABI PRISM 7600, 7700 o 7900 disponible comercialmente, disponible en PE-Applied Biosystems, Foster City, CA y utilizado de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Análisis con PCR cuantitativa en tiempo real de los niveles de ARNm diana

La cuantificación de los niveles de ARN diana se realizó mediante PCR cuantitativa en tiempo real usando el sistema de detección de secuencias ABI PRISM® 7600, 7700, o 7900 (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los métodos de PCR cuantitativa en tiempo real son bien conocidos en la técnica.

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 luego se usa como sustrato para la amplificación por PCR en tiempo real. Las reacciones de RT y PCR en tiempo real se realizan secuencialmente en la misma muestra. La RT y los reactivos de PCR en tiempo real se obtienen en Invitrogen (Carlsbad, CA). Las reacciones de PCR en tiempo real con RT se llevan a cabo por métodos bien conocidos por los expertos en la técnica.

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

Las sondas y los cebadores están diseñados para hibridar con un ácido nucleico del Factor 11. 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 tal como PRIMER EXPRESS Software (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Análisis de los niveles de proteína

La inhibición antisentido de ácidos nucleicos del Factor 11 puede evaluarse midiendo los niveles de proteína del

Factor 11. Los niveles de proteína del Factor 11 pueden evaluarse o cuantificarse de diversas formas bien conocidas en la técnica, tales como inmunoprecipitación, análisis de transferencia de tipo Western (inmunotransferencia), ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), ensayos cuantitativos de proteínas, ensayos de actividad de proteínas (para ejemplo, ensayos de actividad de caspasa), inmunohistoquímica, inmunocitoquímica o clasificación celular activada por fluorescencia (FACS). Los anticuerpos dirigidos a un diana pueden identificarse y obtenerse a partir de diversas fuentes, tales como el catálogo de anticuerpos MSRS (Aerie Corporation, Birmingham, MI) o pueden prepararse por métodos convencionales de generación de anticuerpos monoclonales o policlonales bien conocidos en la técnica. Los anticuerpos útiles para la detección de factor 11 de ratón, rata, mono y humano están disponibles comercialmente.

Pruebas in vivo de compuestos antisentido

Los compuestos antisentido, por ejemplo, oligonucleótidos antisentido, se prueban en animales para evaluar su capacidad para inhibir la expresión del Factor 11 y producir cambios fenotípicos, tales como, aPTT prolongado, tiempo de aPTT prolongado junto con un PT normal, disminución de la cantidad de Factor de Plaquetas 4 (PF-4), y formación reducida de trombos o tiempo aumentado para la formación de trombos. Las pruebas se pueden realizar en animales normales o en modelos experimentales de enfermedades. Para la administración a animales, los oligonucleótidos antisentido se formulan en un diluyente farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina tamponada con fosfato. La administración incluye rutas de administración parenteral, tales como intraperitoneal, intravenosa y subcutánea. El cálculo de la dosificación de oligonucleótidos antisentido y la frecuencia de dosificación está dentro de las capacidades de los expertos en la técnica y depende de factores tales como la ruta de administración y el peso corporal del animal. Después de un período de tratamiento con oligonucleótidos antisentido, se aísla el ARN del tejido hepático y se miden los cambios en la expresión del ácido nucleico del Factor 11. Los cambios en los niveles de proteína del Factor 11 también se miden usando un ensayo de generación de trombina. Además, los efectos en los tiempos de coágulos, por ejemplo, PT y aPTT, se determinan usando plasma de animales tratados.

Tolerabilidad

En ciertas realizaciones, los compuestos proporcionados en la presente muestran efectos secundarios mínimos. Los efectos secundarios incluyen respuestas a la administración del compuesto antisentido que típicamente no están relacionadas con el factor 11 como diana, tal como una respuesta inflamatoria en el animal. En ciertas realizaciones, los compuestos son bien tolerados por el animal. El aumento de la tolerabilidad puede depender de varios factores, que incluyen, pero no se limitan a los mismos, la secuencia de nucleótidos del compuesto antisentido, modificaciones químicas a los nucleótidos, el motivo en particular de nucleósidos no modificados y modificados en el compuesto antisentido, o combinaciones de los mismos. La tolerabilidad puede estar determinada por una serie de factores. Tales factores incluyen peso corporal, peso del órgano, función hepática, función renal, recuento de plaquetas, recuento de glóbulos blancos.

En ciertas realizaciones, los compuestos proporcionados en el presente documento demuestran efectos secundarios mínimos sobre el peso de órgano. En ciertas realizaciones, los compuestos demuestran menos de un aumento de 7 veces, 6 veces, 5 veces, 4 veces, 3 veces, 2 veces o ningún aumento significativo en el peso del bazo y/o el hígado.

En ciertas realizaciones, los compuestos proporcionados en el presente documento demuestran efectos secundarios mínimos sobre la función hepática. Los factores para la evaluación de la función hepática incluyen los niveles de ALT, los niveles de AST, los niveles de bilirrubina en plasma y los niveles de albúmina en plasma. En ciertas realizaciones, los compuestos proporcionados en el presente documento demuestran menos de 7 veces, menos de 6 veces, menos de 5 veces, menos de 4 veces, menos de 3 veces o menos de 2 veces o ningún aumento significativo de los niveles de ALT o AST. En ciertas realizaciones, los compuestos proporcionados en la presente documento demuestran menos de 3 veces, menos de 2 veces o ningún aumento significativo en los niveles de bilirrubina en plasma.

En ciertas realizaciones, los compuestos proporcionados en el presente documento demuestran efectos secundarios mínimos sobre la función renal. En ciertas realizaciones, los compuestos proporcionados en la presente documento demuestran menos de 3 veces, menos de 2 veces o ningún aumento significativo en las concentraciones en plasma de nitrógeno ureico en sangre (BUN). En ciertas realizaciones, los compuestos proporcionados en la presente demuestran menos de un aumento de 6 veces, 5 veces, 4 veces, 3 veces, 2 veces o ningún aumento significativo en la proporción de proteína de orina a creatinina.

En ciertas realizaciones, los compuestos proporcionados en el presente documento demuestran efectos secundarios mínimos sobre factores hematológicos. En ciertas realizaciones, los compuestos proporcionados en el presente documento demuestran menos de un 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 % o 5 % de disminución en el recuento de plaquetas. En ciertas realizaciones, los compuestos proporcionados en la presente documento demuestran menos de 4 veces, menos de 3 veces, menos de 2 veces o ningún aumento significativo en el recuento de monocitos.

En ciertas realizaciones, los compuestos muestran adicionalmente una farmacocinética favorable. En ciertas

realizaciones, los compuestos antisentido exhiben semividas relativamente altas en fluidos o tejidos biológicos relevantes.

5 En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones muestran adicionalmente una viscosidad favorable. En ciertas realizaciones, la viscosidad del compuesto o composición no es superior a 40cP a una concentración de 165-185 mg/ml.

10 En otras realizaciones, los compuestos muestran combinaciones de las características anteriores y reducen la expresión del ARNm del factor 11 en un modelo animal con alta eficacia.

10 *Ciertas indicaciones*

15 En En el presente documento se divulgan se divulgan procedimientos de tratar a un individuo, que comprende administrar una o más composiciones farmacéuticas que de la presente invención. El individuo puede tener una complicación tromboembólica. El individuo puede estar en riesgo de un trastorno de la coagulación de la sangre, que incluye, pero no se limita a, infarto, trombosis, embolia, tromboembolia, tal como trombosis venosa profunda, embolia pulmonar, infarto de miocardio y accidente cerebrovascular. Esto incluye individuos con un problema, enfermedad o trastorno adquirido que conduce a un riesgo de trombosis, por ejemplo, cirugía, cáncer, inmovilidad, sepsis, fibrilación auricular aterosclerosis, así como predisposición genética, por ejemplo, síndrome antifosfolípido y el síndrome autosómico dominante, Factor V Leiden. .El individuo puede haber sido identificado como en necesidad de terapia anticoagulante. Los ejemplos de tales individuos incluyen, pero no se limitan a los mismos, los sometidos a cirugía ortopédica mayor (por ejemplo, cirugía de reemplazo de cadera/rodilla o fractura de cadera) y pacientes que necesitan tratamiento crónico, tales como aquellos que padecen fibrilación arterial, para prevenir el accidente cerebrovascular. En el presente documento se divulgan métodos para reducir profilácticamente la expresión de Factor 11 en un individuo. Se incluye el tratamiento de un individuo que lo necesita administrando a un individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico del Factor 11.

30 En una realización, la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico del Factor 11 está acompañada de la monitorización de los niveles de Factor 11 en el suero de 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 la utiliza un médico para determinar la cantidad y la duración de la intervención terapéutica.

35 En ciertas realizaciones, la administración de un compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico del Factor 11 da como resultado la reducción de la expresión del Factor 11 en al menos 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 99 %, o un intervalo definido por cualquiera de estos dos valores. En ciertas realizaciones, la administración de un compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico del Factor 11 da como resultado un cambio en una medida de la coagulación sanguínea medida mediante una prueba estándar, por ejemplo, pero no de forma limitada, prueba del tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT), el tiempo de trombina (TCT), el tiempo de hemorragia el dímero D. En ciertas realizaciones, la administración de un compuesto antisentido del factor 11 aumenta la medida en al menos 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 99 %, o un intervalo definido por cualquiera de estos dos valores. En algunas realizaciones, la administración de un compuesto antisentido del factor 11 disminuye la medida en al menos 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 99 %, o un intervalo definido por cualquiera de estos dos valores.

45 En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto antisentido dirigido al Factor 11 se usan para la preparación de un medicamento para tratar un paciente que padece una complicación tromboembólica o es susceptible a sufrirla.

50 *Ciertas terapias de combinación*

55 En ciertas realizaciones, una o más composiciones farmacéuticas de la presente invención se administran conjuntamente con uno o más agentes farmacéuticos distintos. En ciertas realizaciones, dichos uno o más agentes farmacéuticos distintos están diseñados para tratar la misma enfermedad, trastorno o afección distinta a la de las una o más composiciones farmacéuticas de la presente invención. En ciertas realizaciones, dichos uno o más agentes farmacéuticos distintos están diseñados para tratar otra enfermedad, trastorno o afección distinta a la de las una o más composiciones farmacéuticas de la presente invención. En ciertas realizaciones, dichos uno o más agentes farmacéuticos distintos están diseñados para tratar un efecto secundario indeseado de las una o más composiciones farmacéuticas de la presente invención. En ciertas realizaciones, una o más composiciones farmacéuticas de la presente invención se administran conjuntamente con otro agente farmacéutico para tratar un efecto indeseado de dicho otro agente farmacéutico. En ciertas realizaciones, una o más composiciones farmacéuticas de la presente invención se administran conjuntamente con otro agente farmacéutico para producir un efecto combinado. En ciertas realizaciones, una o más composiciones farmacéuticas de la presente invención se administran conjuntamente con otro agente farmacéutico para producir un efecto sinérgico.

65 En ciertas realizaciones, una o más composiciones farmacéuticas de la presente invención y uno o más agentes

farmacéuticos distintos se administran al mismo tiempo. En ciertas realizaciones, una o más composiciones farmacéuticas de la presente invención y uno o más agentes farmacéuticos distintos se administran en momentos diferentes. En ciertas realizaciones, una o más composiciones farmacéuticas de la presente invención y uno o más agentes farmacéuticos distintos preparan juntos en una única formulación. En ciertas realizaciones, una o más composiciones farmacéuticas de la presente invención y uno o más agentes farmacéuticos distintos se preparan por separado.

En ciertas realizaciones, los agentes farmacéuticos que se pueden administrar de forma conjunta con una composición farmacéutica de la presente invención incluyen agentes anticoagulantes o antiagregantes plaquetarios.

En ciertas realizaciones, los agentes farmacéuticos que se pueden administrar de forma conjunta con una composición farmacéutica de la presente invención incluyen AINE/inhibidores de la ciclooxigenasa, tales como, aspirina. En ciertas realizaciones, los agentes farmacéuticos que se pueden administrar de forma conjunta con una composición farmacéutica de la presente invención incluyen adenosina difosfato (ADP), tales como, clopidogrel (PLAVIX) y ticlopidina (TICLID). En ciertas realizaciones, los agentes farmacéuticos que se pueden administrar de forma conjunta con una composición farmacéutica de la presente invención incluyen inhibidores de fosfodiesterasa, tales como cilostazol (PLETAL). En ciertas realizaciones, los agentes farmacéuticos que se pueden administrar de forma conjunta con una composición farmacéutica de la presente invención incluyen inhibidores de glicoproteína IIB/IIIA, tales como abciximab (REOPRO), eptifibatida (INTEGRILIN), tirofiban (AGGRASTAT) y defibrotida. En ciertas realizaciones, los agentes farmacéuticos que se pueden administrar de forma conjunta con una composición farmacéutica de la presente invención incluyen inhibidores de la recaptación de adenosina, tales como, a dipiridamol (PERSANTINE). En ciertas realizaciones, los agentes farmacéuticos que se pueden coadministrar con una composición farmacéutica de la presente invención incluyen, pero sin limitación, warfarina (y cumarinas relacionadas), heparina, inhibidores directos de la trombina (tales como lepirudina, bivalirudina), apixabán, LOVENOX y pequeños compuestos moleculares que interfieren directamente con la acción enzimática de factores de coagulación particulares (por ejemplo, rivaroxaban, que interfiere con el Factor Xa). En ciertas realizaciones, los agentes farmacéuticos que se pueden coadministrar con un inhibidor específico del Factor 11 de la presente invención incluyen, pero sin limitación, un inhibidor adicional del Factor 11. En ciertas realizaciones, el agente anticoagulante o antiagregante plaquetario se administra antes de la administración de una composición farmacéutica de la presente invención. En ciertas realizaciones, el agente anticoagulante o antiagregante plaquetario se administra después de la administración de una composición farmacéutica de la presente invención. En ciertas realizaciones, el agente anticoagulante o antiagregante plaquetario se administra al mismo tiempo que la composición farmacéutica de la presente invención. En ciertas realizaciones, la dosis de un agente anticoagulante o antiagregante plaquetario coadministrado es la misma que la dosis que se administraría si el agente anticoagulante o antiagregante plaquetario se administrara solo. En ciertas realizaciones, la dosis de un agente anticoagulante o antiagregante plaquetario coadministrado es inferior a la dosis que se administraría si el agente anticoagulante o antiagregante plaquetario se administrara solo. En ciertas realizaciones, la dosis de un agente anticoagulante o antiagregante plaquetario coadministrado es superior a la dosis que se administraría si el agente anticoagulante o antiagregante plaquetario se administrara solo.

En ciertas realizaciones, la administración conjunta de un segundo compuesto potencia el efecto anticoagulante de un primer compuesto, de manera que la administración conjunta de los compuestos da como resultado un efecto anticoagulante que es mayor que el efecto de administrar el primer compuesto solo. En otras realizaciones, la administración conjunta da como resultado efectos anticoagulantes que son aditivos de los efectos de los compuestos cuando se administran solos. En ciertas realizaciones, la administración conjunta da como resultado efectos anticoagulantes que son supraaditivos de los efectos de los compuestos cuando se administran solos. En ciertas realizaciones, la administración conjunta de un segundo compuesto aumenta la actividad antitrombótica sin un mayor riesgo de hemorragia. En ciertas realizaciones, el primer compuesto es un compuesto antisentido. En ciertas realizaciones, el segundo compuesto es un compuesto antisentido.

En ciertas realizaciones, se administra un antídoto en cualquier momento después de la administración de un inhibidor específico del Factor 11. En ciertas realizaciones, se administra un antídoto en cualquier momento después de la administración de un oligonucleótido antisentido dirigido al Factor 11. En ciertas realizaciones, el antídoto se administra minutos, horas, días, semanas o meses después de la administración de un compuesto antisentido dirigido al Factor 11. En ciertas realizaciones, el antídoto es complementario (por ejemplo, la cadena sentido) al compuesto antisentido dirigido al Factor 11. En ciertas realizaciones, el antídoto es una proteína del Factor 7, Factor 7a, Factor 11 o Factor 11^a. En ciertas realizaciones, la proteína Factor 7, Factor 7a, Factor 11 o Factor 11a es un factor humano 7, factor 7a humano, factor humano 11 o proteína del factor 11a humano. En ciertas realizaciones, la proteína Factor 7 es NOVOSEVEN.

60 *Ciertas terapias antiagregantes plaquetarios coadministradas*

En ciertas realizaciones, los inhibidores del Factor 11 se combinan con terapias antiagregantes plaquetarias. En ciertas realizaciones, la administración de un inhibidor del Factor 11 en combinación con una terapia antiagregante plaquetaria da como resultado un aumento poco apreciable o detectable del riesgo de hemorragia en comparación con la terapia antiagregante plaquetaria sola. En ciertas realizaciones, el perfil de riesgo o las indicaciones de riesgo no cambian con respecto a la terapia antiagregante plaquetaria sola.

La combinación de terapia antiagregante plaquetaria y anticoagulante se usa en la práctica clínica con mayor frecuencia en pacientes diagnosticados con, por ejemplo, tromboembolia, fibrilación auricular, un trastorno de la válvula cardíaca, enfermedad cardíaca valvular, accidente cerebrovascular, CAD y en pacientes que tienen una válvula mecánica. El beneficio de la terapia dual se relaciona con el probable efecto aditivo de la supresión de las actividades de plaquetas y factores de coagulación. El riesgo de terapia dual es la posibilidad de un aumento del sangrado (Dowd, M. Plenary Sessions/Thrombosis Research 123 (2008)).

Se ha demostrado que las combinaciones anteriores de antiagregantes plaquetarios y anticoagulantes aumentan el riesgo de hemorragia en comparación con el tratamiento anticoagulante o antiagregante plaquetario solo. Dichas combinaciones incluyen inhibidores de FXa (por ejemplo, apixiban y rivaroxaban) con inhibidores de receptor de ADP/P2Y₁₂ (tienopiridinas tales como clopidogrel, también conocido como PLAVIX) y AINE (por ejemplo, aspirina y naproxeno) (Kubitza, D. et al., Br. J. Clin. Pharmacol. 63:4 (2006); Wong, P.C. et al. Journal of Thrombosis and Haemostasis 6 (2008); FDA Advisory Committee Briefing Document for New Drug Application 22-406 (2009)). Por ejemplo, Wong informa que la adición de ciertas dosis de apixaban a la aspirina y a la aspirina más clopidogrel produjo un aumento significativo en el tiempo de sangrado en comparación con la aspirina sola y la aspirina más clopidogrel. Kubitza informa que la administración combinada de rivaroxaban y naproxeno aumentó significativamente el tiempo de hemorragia en comparación con el naproxeno solo..

EJEMPLOS

Divulgación no limitante

Aunque en el presente documento se han descrito ciertos compuestos, composiciones y procedimientos con especificidad de acuerdo con ciertas realizaciones, los ejemplos siguientes sólo sirven para ilustrar los compuestos descritos en el presente documento y no se pretende que limiten la misma.

Ejemplo 1: Inhibición antisentido de factor 11 humano en células HepG2

Los oligonucleótidos antisentido dirigidos a un ácido nucleico del Factor 11 se probaron para determinar sus efectos sobre el ARNm del Factor 11 *in vitro*. Las células HepG2 cultivadas a una densidad de 10.000 células por pocillo se transfectaron usando reactivo lipofectina con oligonucleótido antisentido 75 nM. Tras un periodo de tratamiento de aproximadamente 24 horas se aisló el ARN de las células y se midieron los niveles de ARNm del factor 11 mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Los niveles de ARNm del factor 11 se ajustaron de acuerdo con un contenido de ARN total medido mediante RIBOGREEN. Los resultados se presentan en forma del porcentaje de inhibición del factor 11 respecto a las células control sin tratar.

Los oligonucleótidos antisentido quiméricos en las Tablas 1 y 2 se diseñaron como gapmeros 5-10-5 MOE. Los gapmeros tienen una longitud de 20 nucleótidos, en los que el segmento separador central está compuesto por 10 2'-desoxinucleótidos y está flanqueado en ambos lados (en las direcciones 5' y 3') por alas que comprenden 5 nucleótidos cada una. Cada nucleótido en el segmento de ala en 5' y cada nucleótido en el segmento de ala 3' tiene una modificación de 2'-MOE. Los enlaces internucleosídicos a lo largo de cada gapmer son enlaces fosforotioato (P = S). Todos los residuos de citidina a lo largo de cada gapmer son 5-metilcitidinas. El "sitio de inicio diana" indica el nucleótido más 5'al al que se dirige el gapmer.. El "sitio de terminación diana" indica el nucleótido más 3'al al que se dirige el gapmer.. cada marcador enumerado en la Tabla 2 está dirigido a la SEQ ID NO: 1 (N.º de acceso GENBANK NM_000128,3) y cada gapmer enumerado en la Tabla 2 está dirigido a SEQ ID NO: 2 (N.º de acceso en GENBANK NT_022792,17, truncado de 19598000 a 19624000).

Tabla 1

Inhibición de los niveles de ARNm del Factor 11 humano por oligonucleótidos antisentido quiméricos que tienen alas 5–10–5 MOE y separación de desoxi dirigida a la SEQ ID NO: 1						
ID del oligo	Sitio de inicio diana	Sitio de terminación diana	Secuencia	% de inhibición	SEQ ID NO	
5	412187	38	57	TTCAAACAAGTGACATACAC	21	15
	412188	96	115	TGAGAGAATTGCTTGCTTTC	21	16
	412189	106	125	AAATATACCTTGAGAGAATT	8	17
	412190	116	135	AGTATGTCAGAAATATACCT	24	18
10	412191	126	145	TTAAATCTTAGTATGTCAG	14	19
	412192	146	165	CAGCATATTTGTGAAAGTCCG	44	20
	412193	222	241	TGTGTAGGAAATGGTCACTT	38	21
	412194	286	305	TGCAATTCTTAATAAGGGTG	80	22
	412195	321	340	AAATCATCCTGAAAAGACCT	22	23
15	412196	331	350	TGATATAAGAAAATCATCCT	25	24
	412197	376	395	ACACATTCACCAGAACTGA	45	25
	412198	550	569	TTCAGGACACAAGTAAACCA	21	26
	412199	583	602	TTCACTCTTGGCAGTGTTTC	66	27
	412200	612	631	AAGAATACCCAGAAATCGCT	59	28
20	412201	622	641	CATTGCTTGAAAGAATACCC	66	29
	412202	632	651	TTGGTGTGAGCATTGCTTGA	65	30
	412203	656	675	AATGTCTTTGTTGCAAGCGC	91	31
	412204	676	695	TTCATGTCTAGGTCCACATA	74	32
	412205	686	705	GTTTATGCCCTTCATGTCTA	69	33
25	412206	738	757	CCGTGCATCTTTCTTGGCAT	87	34
	412207	764	783	CGTGAAAAGTGGCAGTGGA	64	35
	412208	811	830	AGACAAATGTTACGATGCTC	73	36
	412209	821	840	GTGCTTCAGTAGACAAATGT	91	37
	412210	896	915	TGCACAGGATTTTCAAGTAAA	73	38
30	412211	906	925	GATTAGAAAAGTGCACAGGAT	64	39
	412212	1018	1037	CCGGGATGATGAGTGCAGAT	88	40
	412213	1028	1047	AAACAAGCAACCGGGATGAT	71	41
	412214	1048	1067	TCCTGGGAAAAGAAGGTAAA	58	42
35	412215	1062	1081	ATTCTTTGGGCCATTCCTGG	81	43
	412216	1077	1096	AAAGATTTCTTTGAGATTCT	43	44
	412217	1105	1124	AATCCACTCTCAGATGTTTT	47	45
	412218	1146	1165	AACCAGAAAGAGCTTTGCTC	27	46
40	412219	1188	1207	GGCAGAACTGGGATGCTG	56	47
	412220	1204	1223	TGGTAAAATGAAGAATGGCA	58	48
	412221	1214	1233	ATCAGTGCATGGTAAAATG	48	49
	412222	1241	1263	AACAATATCCAGTTCTTCTC	5	50
	412223	1275	1294	ACAGTTTCTGGCAGGCCTCG	84	51
45	412224	1285	1304	GCATTGGTGCACAGTTTCTG	87	52
	412225	1295	1314	GCAGCGGACGGCATTGGTGC	86	53
	412226	1371	1390	TTGAAGAAAGCTTTAAGTAA	17	54
	412227	1391	1410	AGTATTTTAGTTGGAGATCC	75	55
	412228	1425	1444	ATGTGTATCCAGAGATGCCT	71	56
50	412229	1456	1475	GTACACTCATTATCCATTTT	64	57
	412230	1466	1485	GATTTTGGTGGTACTCAT	52	58
	412231	1476	1495	TCCTGGGCTTGATTTTGGTG	74	59
	412232	1513	1532	GGCCACTCACCACGAACAGA	80	60
55	412233	1555	1574	TGTCTCTGAGTGGGTGAGGT	64	61
	412234	1583	1602	GTTTCCAATGATGGAGCCTC	60	62
	412235	1593	1612	ATATCCACTGGTTTCCAATG	57	63
	412236	1618	1637	CCATAGAAACAGTGAGCGGC	72	64
	412237	1628	1647	TGACTCTACCCCATAGAAAC	48	65
60	412238	1642	1661	CGCAAAATCTTAGGTGACTC	71	66
	412239	1673	1692	TTCAGATTGATTTAAAATGC	43	67
	412240	1705	1724	TGAACCCCAAAGAAAGATGT	32	68
	412241	1715	1734	TATTATTTCTTGAACCCCAA	41	69
	412242	1765	1784	AACAAGGCAATATCATACCC	49	70
65	412243	1775	1794	TTCCAGTTTCAACAAGGCAA	70	71

ES 2 657 679 T3

(continúa)

5	412244	1822	1841	GAAGGCAGGCATATGGGTCCG	53	72
	412245	1936	1955	GTCACATAAGGGTATCTTGCC	75	73
	412246	1992	2011	AGATCATCTTATGGGTATT	68	74
	412247	2002	2021	TAGCCGGCACAGATCATCTT	75	75
	412248	2082	2101	CCAGATGCCAGACCTCATTG	53	76
10	412249	2195	2214	CATTCACACTGCTTGAGTTT	55	77
	412250	2268	2287	TGGCACAGTGAACCTAACAC	63	78
	412251	2326	2345	CTAGCATTTTCTTACAAACA	58	79
	412252	2450	2469	TTATGGTAATTCTTGGACTC	39	80
	412253	2460	2479	AAATATTGCCTTATGGTAAT	20	81
15	412254	2485	2504	TATCTGCCTATATAGTAATC	16	82
	412255	2510	2529	GCCACTACTTGGTTATTTTC	38	83
	412256	2564	2583	AACAAATCTATTTATGGTGG	39	84
	412257	2622	2641	CTGCAAAATGGTGAAGACTG	57	85
	412258	2632	2651	GTGTAGATTCCTGCAAAATG	44	86
20	412259	2882	2901	TTTTCAGGAAAAGTGTATCTT	37	87
	412260	2892	2911	CACAAATCATTTTTTCAGGAA	27	88
	412261	2925	2944	TCCCAAGATATTTTAAATAA	3	89
	412262	3168	3187	AATGAGATAAATATTTGCAC	34	90
	412263	3224	3243	TGAAAGCTATGTGGTGACAA	33	91
25	412264	3259	3278	CACACTTGATGAATTGTATA	27	92
	413460	101	120	TACCTTGAGAGAATTGCTTG	40	93
	413461	111	130	GTCAGAAATATACCTTGAGA	39	94
	413462	121	140	ATCTTAGTATGTCAGAAATA	12	95
	413463	381	400	GAGTCACACATTCACCAGAA	74	96
30	413464	627	646	GTGAGCATTGCTTGAAAGAA	42	97
	413465	637	656	CTTATTTGGTGTGAGCATTG	80	98
	413466	661	680	ACATAAATGTCTTTGTTGCA	79	99
	413467	666	685	GGTCCACATAAATGTCTTTG	91	100
35	413468	671	690	GTCTAGGTCCACATAAATGT	84	101
	413469	681	700	TGCCCTTCATGTCTAGGTCC	84	102
	413470	692	711	GTTATAGTTTATGCCCTTCA	72	103
	413471	816	835	TCAGTAGACAAATGTTACGA	67	104
	413472	826	845	TGGGTGTGCTTCAGTAGACA	99	105
40	413473	911	930	AGCCAGATTAGAAAGTGCAC	80	106
	413474	1023	1042	AGCAACCGGGATGATGAGTG	84	107
	413475	1053	1072	GCCATTCCTGGGAAAAGAAG	80	108
	413476	1067	1086	TTGAGATTCTTTGGGCCATT	88	109
	413477	1151	1170	ACTGAAACCAGAAAGAGCTT	54	110
45	413478	1193	1212	AGAATGGCAGAACACTGGGA	53	111
	413479	1209	1228	TGTCATGGTAAAATGAAGAA	40	112
	413480	1219	1238	AAGAAATCAGTGTATGGTA	71	113
	413481	1280	1299	GGTGCACAGTTTCTGGCAGG	86	114
	413482	1290	1309	GGACGGCATTGGTGCACAGT	85	115
50	413483	1300	1319	AACTGGCAGCGGACGGCATT	78	116
	413484	1430	1449	CCTTAATGTGTATCCAGAGA	74	117
	413485	1461	1480	TGGTGGTACACTCATTATCC	68	118
	413486	1471	1490	GGCTTGATTTTGGTGGTACA	83	119
55	413487	1481	1500	AACGATCCTGGGCTTGATTT	57	120
	413488	1560	1579	ACAGGTGTCTCTGAGTGGGT	49	121
	413489	1588	1607	CACTGGTTTCCAATGATGGA	68	122
	413490	1623	1642	CTACCCCATAGAAACAGTGA	57	123
	413491	1633	1652	TTAGGTGACTCTACCCATA	73	124
60	413492	1647	1666	AGACACGCAAAATCTTAGGT	68	125
	413493	1710	1729	TTTCTTGAACCCCAAAGAAA	65	126
	413494	1780	1799	GTGGTTTCCAGTTTCAACAA	70	127
	413495	1921	1940	TTGGCTTTCTGGAGAGTATT	58	128
	413496	1997	2016	GGCACAGATCATCTTATGGG	72	129
65	413497	2627	2646	GATTCCTGCAAAATGGTGAA	39	130
	413498	2637	2656	GCAGAGTGTAGATTCCTGCA	60	131
	413499	2887	2906	ATCATTTTTTCAGGAAAGTGT	52	132

Tabla 2

Inhibición de los niveles de ARNm del Factor 11 humano por oligonucleótidos antisentido quiméricos que tienen alas 5–10–5 MOE y separación de desoxi dirigida a la SEQ ID NO: 2					
ID del oligo	Sitio de inicio diana	Sitio de terminación diana	Secuencia	% de inhibición	SEQ ID NO
413500	1658	1677	GTGAGACAAATCAAGACTTC	15	133
413501	2159	2178	TTAGTTTACTGACACTAAGA	23	134
413502	2593	2612	CTGCTTTATGAAAAACCAAC	22	135
413503	3325	3344	ATACCTAGTACAATGTAAAT	29	136
413504	3548	3567	GGCTTGTGTGTGGTCAATAT	54	137
413505	5054	5073	TGGGAAAGCTTTCAATATTC	57	138
413506	6474	6493	ATGGAATTGTGCTTATGAGT	57	139
413507	7590	7609	TTTCAAGCTCAGGATGGGAA	55	140
413508	7905	7924	GTTGGTAAAATGCAACCAA	64	141
413509	8163	8182	TCAGGACACAAGTAAACCTG	66	142
413510	9197	9216	TGCAAGCTGGAAATAAAAGC	17	143
413511	9621	9640	TGCCAATTTAAAAGTGTAGC	43	144
413512	9800	9819	ATATTTCAAATCCAGTATG	39	145
413513	9919	9938	TTCTGAATATACAAATTAAT	27	146
413514	9951	9970	TTTACTATGAAAATCTAAAT	5	147
413515	11049	11068	GGTATCCTGAGTGAGATCTA	36	148
413516	11269	11288	CCAGCTATCAGGAAAATTCC	50	149
413517	12165	12184	AAAGCTATTGGAGACTCAGA	51	150
413518	12584	12603	ATGGAATCTCTTCATTTTCAT	49	151
413519	12728	12747	ATGGAGACATTCATTTCCAC	59	152
413520	13284	13303	GCTCTGAGAGTTCCAATTCA	52	153
413521	14504	14523	CTGGGAAGGTGAATTTTTAG	62	154
413522	14771	14790	TCAAGAGTCTTCATGCTACC	42	155
413523	15206	15225	TCAGTTTACCTGGGATGCTG	61	156
413524	15670	15689	GACATTATACTCACCATTAT	7	157
413525	15905	15924	GTATAAATGTGTCAAATTAA	43	158
413526	16482	16501	GTAAAGTTTTACCTTAACCT	47	159
413527	17298	17317	CCATAATGAAGAAGGAAGGG	52	160
413528	17757	17776	TTAAGTTACATTGTAGACCA	48	161
413529	18204	18223	TGTGTGGGTCTGAAATTCT	52	162
413530	18981	19000	ATCTTGTAATTACACACCCC	27	163
413531	19174	19193	GTACACTCTGCAACAGAAGC	47	164
413532	19604	19623	AGGGAATAACATGAAGGCC	32	165
413533	20936	20955	ATCCAGTTCACCATTGGAGA	48	166
413534	21441	21460	TTTTCCAGAAGAGACTCTTC	31	167
413535	21785	21804	GTCACATTTAAAATTTCCAA	41	168
413536	23422	23441	TTAATATACTGCAGAGAACC	37	169
413537	25893	25912	AGAAATATCCCAGACAGAG	16	170

50 Example 2: Inhibición antisentido dependiente de la dosis del factor 11 humano en células HepG2

Doce gapmer, exhibiendo más del 84 por ciento o más de inhibición in vitro del factor 11 humano se analizaron a diversas dosis en células HepG2. Las células se sembraron a una densidad de 10.000 células por pocillo y se transfectoron usando reactivo de lipofectina con 9,375 nM, 18,75 nM, 37,5 nM, 75 nM, y concentraciones 150 nM de oligonucleótido antisentido, como se especifica en la Tabla 3. Conjunto de sonda de cebador de Factor 11 humano RTS 2966 (secuencia directa: CAGCCTGGAGCATCGTAACA, incorporada en el presente documento como SEQ ID NO: 3; secuencia inversa: TTTATCGAGCTTCGTTATTCTGGTT, incorporada en el presente documento como SEQ ID NO: 4; secuencia de la sonda: TTGTCTACTGAAGCACACCCAAACAGGGAX, incorporada en el presente documento como SEQ ID NO: 5) se usó para medir los niveles de ARNm. Los niveles de ARNm del factor 11 se ajustaron de acuerdo con un contenido de ARN total medido mediante RIBOGREEN. Los resultados se presentan en forma del porcentaje de inhibición del factor 11 respecto a las células control sin tratar. Como se ilustra en la Tabla 3, los niveles de ARNm del Factor 11 se redujeron de una manera dependiente de la dosis en células tratadas con oligonucleótidos antisentido.

65

Tabla 3

Inhibición antisentido dependiente de la dosis del factor 11 humano en células HepG2								
	9.375 nM	18,75 nM	37,5 nM	75 nM	150 nM	IC ₅₀ (nM)	SEQ ID No.	
5	412203	29	15	61	77	82	33	31
	412206	28	44	68	80	89	22	34
	412212	28	45	59	73	88	25	40
	412223	33	48	62	76	81	21	51
	412224	24	45	57	70	81	28	52
10	412225	32	42	65	78	73	23	53
	413467	2	35	49	61	47	43	100
	413468	14	34	56	78	75	35	101
	413469	24	33	53	70	84	33	102
	413476	26	44	64	73	82	25	109
15	413481	22	38	56	67	83	32	114
	413482	26	39	59	74	82	28	115

Ejemplo 3: Inhibición antisentido del Factor 11 humano en células HepG2 por oligonucleótidos diseñados por microwalk

Se diseñaron gapmeros adicionales basados en los gapmeros presentados en la Tabla 3. Estos gapmeros se diseñaron creando gapmeros desplazados ligeramente aguas arriba y aguas abajo (es decir, "microwalk") de los gapmeros originales de la Tabla 3. También se crearon gapmeros con diversos motivos, por ejemplo, 5-10-5 MOE, 3-14-3 MOE y 2-13-5 MOE. Estos gapmeros se analizaron *in vitro*. Las células HepG2 cultivadas a una densidad de 10.000 células por pocillo se transfectaron usando reactivo lipofectina con oligonucleótido antisentido 75 nM. Tras un periodo de tratamiento de aproximadamente 24 horas se aisló el ARN de las células y se midieron los niveles de ARNm del factor 11 mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Los niveles de ARNm del factor 11 se ajustaron de acuerdo con un contenido de ARN total medido mediante RIBOGREEN. Los resultados se presentan en forma del porcentaje de inhibición del factor 11 respecto a las células control sin tratar.

Los datos de inhibición *in vitro* para los gapmeros diseñados por microwalk se compararon después con los datos de inhibición *in vitro* para los gapmeros de la Tabla 3, como se indica en las Tablas 4, 5, 6, 7 y 8. Los oligonucleótidos se muestran de acuerdo con la región del ARNm humano (número de acceso en GENBANK NM_000128.3) al que se asignan.

Los oligonucleótidos antisentido quiméricos en la Tabla 4 se diseñaron como gapmeros 5-10-5 MOE, 3-14-3 MOE y 2-13-5 MOE. Los primeros gapmeros enumerados en la Tabla 4 son los gapmeros originales (véase la Tabla 3) a partir de los cuales los gapmeros restantes se diseñaron a través de microwalk y se designaron con un asterisco. Los gapmeros 5-10-5 tienen una longitud de 20 nucleótidos, en los que el segmento separador central está compuesto por 10 2'-desoxinucleótidos y está flanqueado en ambos lados (en las direcciones 5' y 3') por alas que comprenden 5 nucleótidos cada una. Los gapmeros 3-14-3 tienen una longitud de 20 nucleótidos, en los que el segmento separador central está compuesto por 14 2'-desoxinucleótidos y está flanqueado en ambos lados (en las direcciones 5' y 3') por alas que comprenden 3 nucleótidos cada una. Los gapmeros 2-13-5 tienen una longitud de 20 nucleótidos, en los que el segmento separador central está compuesto por 13 2'-desoxinucleótidos. El separador central está flanqueado en el extremo 5' con un ala que comprende 2 nucleótidos y en el extremo 3' con un ala que comprende 5 nucleótidos. Para cada uno de los motivos (5-10-5, 3-14-3 y 2-13-5), cada nucleótido en el segmento de ala en 5' y cada nucleótido en el segmento de ala 3' tiene una modificación de 2'-MOE. Los enlaces internucleosídicos a lo largo de cada gapmer son enlaces fosforotioato (P = S). Todos los residuos de citidina a lo largo de cada gapmer son 5-metilcitidinas. El "sitio de inicio diana" indica el nucleótido más 5'al al que se dirige el gapmer.. El "sitio de terminación diana" indica el nucleótido más 3'al al que se dirige el gapmer.. Cada gapmer enumerado en la Tabla 2 está dirigido a la SEQ ID NO: 1 (n.º de acceso en GENBANK NM_000128,3).

Como se muestra en la Tabla 4, todos los gapmeros 5-10-5 MOE, los gapmeros 3-14-3 MOE y los gapmeros 2-13-5 MOE dirigidos a la región diana que comienza en el sitio de inicio diana 656 y termina en la parada diana. el sitio 704 (es decir, las bases nucleotídicas 656-704) de la SEQ ID NO: muestra al menos un 20 % de inhibición del ARNm del Factor 11. Muchos de los gapmeros exhiben al menos 60 % de inhibición. Varios de los gapmer exhiben al menos 80 % de inhibición, incluyendo números ISIS: 416806, 416809, 416811, 416814, 416821, 416825, 416826, 416827, 416828, 416868, 416869, 416878, 416879, 416881, 416883, 416890, 416891, 416892, 416893, 416894, 416895, 416896, 416945, 416946, 416969, 416970, 416971, 416972, 416973, 412203, 413467, 413468, and 413469. Los siguientes números de ISIS exhibieron al menos 90 % de inhibición: 412203, 413467, 416825, 416826, 416827, 416868, 416878, 416879, 416892, 416893, 416895, 416896, 416945, 416972, y 416973. Los siguientes números de ISIS exhibieron al menos 95 % de inhibición: 416878, 416892, 416895 y 416896: 416878, 416892, 416895 y 416896.

Tabla 4

Inhibición de los niveles de ARNm del Factor 11 humano por oligonucleótidos antisentido quiméricos dirigidos a las bases nucleotídicas 656 a 704 de la SEC ID N°: 1 (N.º de acceso en GENBANK NM_000128.3) 1 (n.º de acceso en GENBANK NM_000128,3).							
Nº ISIS	Target Start Site	Target Stop Site	Sequence (5' to 3')	% inhibition	Motif	SEQ ID No.	
5	*412203	656	675	AATGTCTTTGTTGCAAGCGC	97	5-10-5	31
	*413467	666	685	GGTCCACATAAATGTCTTTG	92	5-10-5	100
	*413468	671	690	GTCTAGGTCCACATAAATGT	83	5-10-5	101
	*413469	681	700	TGCCCTTCATGTCTAGGTCC	86	5-10-5	102
10	416868	656	675	AATGTCTTTGTTGCAAGCGC	93	3-14-3	31
	416945	656	675	AATGTCTTTGTTGCAAGCGC	94	2-13-5	31
	416806	657	676	AAATGTCTTTGTTGCAAGCG	86	5-10-5	171
	416869	657	676	AAATGTCTTTGTTGCAAGCG	81	3-14-3	171
	416946	657	676	AAATGTCTTTGTTGCAAGCG	86	2-13-5	171
15	416807	658	677	TAAATGTCTTTGTTGCAAGC	51	5-10-5	172
	416870	658	677	TAAATGTCTTTGTTGCAAGC	76	3-14-3	172
	416947	658	677	TAAATGTCTTTGTTGCAAGC	62	2-13-5	172
	416808	659	678	ATAAATGTCTTTGTTGCAAG	55	5-10-5	173
20	416871	659	678	ATAAATGTCTTTGTTGCAAG	28	3-14-3	173
	416948	659	678	ATAAATGTCTTTGTTGCAAG	62	2-13-5	173
	416809	660	679	CATAAATGTCTTTGTTGCAA	86	5-10-5	174
	416872	660	679	CATAAATGTCTTTGTTGCAA	20	3-14-3	174
	416949	660	679	CATAAATGTCTTTGTTGCAA	64	2-13-5	174
25	416873	661	680	ACATAAATGTCTTTGTTGCA	51	3-14-3	99
	416950	661	680	ACATAAATGTCTTTGTTGCA	71	2-13-5	99
	416810	662	681	CACATAAATGTCTTTGTTGC	68	5-10-5	175
	416874	662	681	CACATAAATGTCTTTGTTGC	49	3-14-3	175
	416951	662	681	CACATAAATGTCTTTGTTGC	48	2-13-5	175
30	416811	663	682	CCACATAAATGTCTTTGTTG	84	5-10-5	176
	416875	663	682	CCACATAAATGTCTTTGTTG	75	3-14-3	176
	416952	663	682	CCACATAAATGTCTTTGTTG	51	2-13-5	176
	416812	664	68	TCCACATAAATGTCTTTGTT	59	5-10-5	177
	416876	664	683	TCCACATAAATGTCTTTGTT	37	3-14-3	177
35	416953	664	683	TCCACATAAATGTCTTTGTT	45	2-13-5	177
	416813	665	684	GTCCACATAAATGTCTTTGT	70	5-10-5	178
	416877	665	684	GTCCACATAAATGTCTTTGT	51	3-14-3	178
	416954	665	684	GTCCACATAAATGTCTTTGT	61	2-13-5	178
40	416878	666	685	GGTCCACATAAATGTCTTTG	95	3-14-3	100
	416955	666	685	GGTCCACATAAATGTCTTTG	75	2-13-5	100
	416814	667	686	AGGTCCACATAAATGTCTTT	83	5-10-5	179
	416879	667	686	AGGTCCACATAAATGTCTTT	92	3-14-3	179
	416956	667	686	AGGTCCACATAAATGTCTTT	61	2-13-5	179
45	416815	668	687	TAGGTCCACATAAATGTCTT	63	5-10-5	180
	416880	668	687	TAGGTCCACATAAATGTCTT	66	3-14-3	180
	416957	668	687	TAGGTCCACATAAATGTCTT	59	2-13-5	180
	416816	669	688	CTAGGTCCACATAAATGTCT	79	5-10-5	181
	416881	669	688	CTAGGTCCACATAAATGTCT	81	3-14-3	181
50	416958	669	688	CTAGGTCCACATAAATGTCT	43	2-13-5	181
	416817	670	689	TCTAGGTCCACATAAATGTC	74	5-10-5	182
	416882	670	689	TCTAGGTCCACATAAATGTC	60	3-14-3	182
	416959	670	689	TCTAGGTCCACATAAATGTC	25	2-13-5	182
55	416883	671	690	GTCTAGGTCCACATAAATGT	82	3-14-3	101
	416960	671	690	GTCTAGGTCCACATAAATGT	60	2-13-5	101
	416818	672	691	TGTCTAGGTCCACATAAATG	76	5-10-5	183
	416884	672	691	TGTCTAGGTCCACATAAATG	69	3-14-3	183
	416961	672	691	TGTCTAGGTCCACATAAATG	40	2-13-5	183
60	416819	673	692	ATGTCTAGGTCCACATAAAT	56	5-10-5	184
	416885	673	692	ATGTCTAGGTCCACATAAAT	67	3-14-3	184
	416962	673	692	ATGTCTAGGTCCACATAAAT	77	2-13-5	184
	416820	674	693	CATGTCTAGGTCCACATAAA	77	5-10-5	185
	416886	674	693	CATGTCTAGGTCCACATAAA	74	3-14-3	185
65	416963	674	693	CATGTCTAGGTCCACATAAA	48	2-13-5	185

(continúa)

5	416821	675	694	TCATGTCTAGGTCCACATAA	84	5-10-5	186
	416964	675	694	TCATGTCTAGGTCCACATAA	69	2-13-5	186
	412204	676	695	TTCATGTCTAGGTCCACATA	76	5-10-5	32
	416888	676	695	TTCATGTCTAGGTCCACATA	76	3-14-3	32
	416965	676	695	TTCATGTCTAGGTCCACATA	53	2-13-5	32
	416822	677	696	CTTCATGTCTAGGTCCACAT	76	5-10-5	187
10	416889	677	696	CTTCATGTCTAGGTCCACAT	60	3-14-3	187
	416966	677	696	CTTCATGTCTAGGTCCACAT	64	2-13-5	187
	416823	678	697	CCTTCATGTCTAGGTCCACA	77	5-10-5	188
	416890	678	697	CCTTCATGTCTAGGTCCACA	87	3-14-3	188
	416967	678	697	CCTTCATGTCTAGGTCCACA	75	2-13-5	188
15	416824	679	698	CCCTTCATGTCTAGGTCCAC	64	5-10-5	189
	416891	679	698	CCCTTCATGTCTAGGTCCAC	81	3-14-3	189
	416968	679	698	CCCTTCATGTCTAGGTCCAC	73	2-13-5	189
	416825	680	699	GCCCTTCATGTCTAGGTCCA	92	5-10-5	190
	416892	680	699	GCCCTTCATGTCTAGGTCCA	100	3-14-3	190
20	416969	680	699	GCCCTTCATGTCTAGGTCCA	80	2-13-5	190
	416893	681	700	TGCCCTTCATGTCTAGGTCC	90	3-14-3	102
	416970	681	700	TGCCCTTCATGTCTAGGTCC	88	2-13-5	102
	416826	682	701	ATGCCCTTCATGTCTAGGTC	94	5-10-5	191
	416894	682	701	ATGCCCTTCATGTCTAGGTC	85	3-14-3	191
25	416971	682	701	ATGCCCTTCATGTCTAGGTC	83	2-13-5	191
	416827	683	702	TATGCCCTTCATGTCTAGGT	93	5-10-5	192
	416895	683	702	TATGCCCTTCATGTCTAGGT	95	3-14-3	192
	416972	683	702	TATGCCCTTCATGTCTAGGT	90	2-13-5	192
	416828	684	703	TTATGCCCTTCATGTCTAGG	87	5-10-5	193
30	416896	684	703	TTATGCCCTTCATGTCTAGG	95	3-14-3	193
	416973	684	703	TTATGCCCTTCATGTCTAGG	92	2-13-5	193
	416829	685	704	TTTATGCCCTTCATGTCTAG	72	5-10-5	194
	416897	685	704	TTTATGCCCTTCATGTCTAG	66	3-14-3	194
35	416974	685	704	TTTATGCCCTTCATGTCTAG	73	2-13-5	194

Los oligonucleótidos antisentido quiméricos en la Tabla 5 se diseñaron como gapmeros 5-10-5 MOE, 3-14-3 MOE y 2-13-5 MOE. El primer gapmer enumerado en la Tabla 5 es el gapmer original (véase la Tabla 3) a partir del cual los gapmeros restantes se diseñaron a través de microwalk y se designa con un asterisco. Los gapmeros 5-10-5 tienen una longitud de 20 nucleótidos, en los que el segmento separador central está compuesto por 10 2'-desoxinucleótidos y está flanqueado en ambos lados (en las direcciones 5' y 3') por alas que comprenden 5 nucleótidos cada una. Los gapmeros 3-14-3 tienen una longitud de 20 nucleótidos, en los que el segmento separador central está compuesto por 14 2'-desoxinucleótidos y está flanqueado en ambos lados (en las direcciones 5' y 3') por alas que comprenden 3 nucleótidos cada una. Los gapmeros 2-13-5 tienen una longitud de 20 nucleótidos, en los que el segmento separador central está compuesto por 13 2'-desoxinucleótidos. El separador central está flanqueado en el extremo 5' con un ala que comprende 2 nucleótidos y en el extremo 3' con un ala que comprende 5 nucleótidos. Para cada uno de los motivos (5-10-5, 3-14-3 y 2-13-5), cada nucleótido en el segmento de ala en 5' y cada nucleótido en el segmento de ala 3' tiene una modificación de 2'-MOE. Los enlaces internucleosídicos a lo largo de cada gapmer son enlaces fosforotioato (P = S). Todos los residuos de citidina a lo largo de cada gapmer son 5-metilcitidinas. El "sitio de inicio diana" indica el nucleótido más 5'al al que se dirige el gapmer.. El "sitio de terminación diana" indica el nucleótido más 3'al al que se dirige el gapmer.. Cada gapmer enumerado en la Tabla 5 está dirigido a la SEQ ID NO: 1 (n.º de acceso en GENBANK NM_000128,3).

Como se muestra en la Tabla 5, todos los gapmeros 5-10-5 MOE, los gapmeros 3-14-3 MOE y los gapmeros 2-13-5 MOE dirigidos a la región diana que comienza en el sitio de inicio diana 738 y termina en la parada diana. el sitio 762 (es decir, las bases nucleotídicas 738-762) de la SEQ ID NO: muestra al menos un 45 % de inhibición del ARNm del Factor 11. La mayoría de los gapmeros exhiben al menos 60 % de inhibición. Varios de los gapmer exhiben al menos 80 % de inhibición, incluyendo números ISIS: 412206, 416830, 416831, 416898, 416899, 416900, 416903, 416975, 416976, 416977 y 416980. Los siguientes números de ISIS exhibieron al menos 90 % de inhibición: 412206, 416831 y 416900.

65

Tabla 5

Inhibición de los niveles de ARNm del Factor 11 humano por oligonucleótidos antisentido quiméricos dirigidos a las bases nucleotídicas 738 a 762 de la SEC ID N°: 1 (N.º de acceso en GENBANK NM_000128.3) 1 (n.º de acceso en GENBANK NM_000128,3).						
Nº ISIS	Sitio de inicio diana	Sitio de terminación diana	Secuencia (5' a 3')	% de inhibición	Motivo	SEQ ID No.
*412206	738	757	CCGTGCATCTTTCTTGGCAT	93	5-10-5	34
416898	738	757	CCGTGCATCTTTCTTGGCAT	88	3-14-3	34
416975	738	757	CCGTGCATCTTTCTTGGCAT	87	2-13-5	34
416830	739	758	TCCGTGCATCTTTCTTGGCA	81	5-10-5	195
416899	739	758	TCCGTGCATCTTTCTTGGCA	86	3-14-3	195
416976	739	758	TCCGTGCATCTTTCTTGGCA	83	2-13-5	195
416831	740	759	ATCCGTGCATCTTTCTTGGC	91	5-10-5	196
416900	740	759	ATCCGTGCATCTTTCTTGGC	90	3-14-3	196
416977	740	759	ATCCGTGCATCTTTCTTGGC	82	2-13-5	196
416832	741	760	CATCCGTGCATCTTTCTTGG	79	5-10-5	197
416901	741	760	CATCCGTGCATCTTTCTTGG	65	3-14-3	197
416978	741	760	CATCCGTGCATCTTTCTTGG	76	2-13-5	197
416833	742	761	TCATCCGTGCATCTTTCTTG	65	5-10-5	198
416902	742	761	TCATCCGTGCATCTTTCTTG	46	3-14-3	198
416979	742	761	TCATCCGTGCATCTTTCTTG	63	2-13-5	198
416834	743	762	GTCATCCGTGCATCTTTCTT	58	5-10-5	199
416903	743	762	GTCATCCGTGCATCTTTCTT	88	3-14-3	199
416980	743	762	GTCATCCGTGCATCTTTCTT	87	2-13-5	199

Los oligonucleótidos antisentido quiméricos en la Tabla 6 se diseñaron como gapmeros 5-10-5 MOE, 3-14-3 MOE y 2-13-5 MOE. Los primeros gapmeros enumerados en la Tabla 6 son los gapmeros originales (véase la Tabla 3) a partir de los cuales los gapmeros restantes se diseñaron a través de microwalk y se designaron con un asterisco. Los gapmeros 5-10-5 tienen una longitud de 20 nucleótidos, en los que el segmento separador central está compuesto por 10 2'-desoxinucleótidos y está flanqueado en ambos lados (en las direcciones 5' y 3') por alas que comprenden 5 nucleótidos cada una. Los gapmeros 3-14-3 tienen una longitud de 20 nucleótidos, en los que el segmento separador central está compuesto por 14 2'-desoxinucleótidos y está flanqueado en ambos lados (en las direcciones 5' y 3') por alas que comprenden 3 nucleótidos cada una. Los gapmeros 2-13-5 tienen una longitud de 20 nucleótidos, en los que el segmento separador central está compuesto por 13 2'-desoxinucleótidos. El separador central está flanqueado en el extremo 5' con un ala que comprende 2 nucleótidos y en el extremo 3' con un ala que comprende 5 nucleótidos. Para cada uno de los motivos (5-10-5, 3-14-3 y 2-13-5), cada nucleótido en el segmento de ala en 5' y cada nucleótido en el segmento de ala 3' tiene una modificación de 2'-MOE. Los enlaces internucleosídicos a lo largo de cada gapmer son enlaces fosforotioato (P = S). Todos los residuos de citidina a lo largo de cada gapmer son 5-metilcitidinas. El "sitio de inicio diana" indica el nucleótido más 5'al al que se dirige el gapmer.. El "sitio de terminación diana" indica el nucleótido más 3'al al que se dirige el gapmer.. Cada gapmer enumerado en la Tabla 6 está dirigido a la SEQ ID NO: 1 (n.º de acceso en GENBANK NM_000128,3).

Como se muestra en la Tabla 6, todos los gapmeros 5-10-5 MOE, los gapmeros 3-14-3 MOE y los gapmeros 2-13-5 MOE dirigidos a la región diana que comienza en el sitio de inicio diana 1018 y termina en la parada diana. el sitio 1042 (es decir, las bases nucleotídicas 1018-1042) de la SEQ ID NO: muestra al menos un 80 % de inhibición del ARNm del Factor 11. Los siguientes números de ISIS exhibieron al menos 90 % de inhibición: 413474, 416837, 416838, 416904, 416907 y 416908.

Tabla 6

Inhibición de los niveles de ARNm del Factor 11 humano por oligonucleótidos antisentido quiméricos dirigidos a las bases nucleotídicas 1018 a 1042 de la SEC ID N°: 1 (N.º de acceso en GENBANK NM_000128.3) 1 (n.º de acceso en GENBANK NM_000128,3).						
N° ISIS	Sitio de inicio diana	Sitio de terminación diana	Secuencia (5' a 3')	% % de inhibición	Motivo	SEQ ID No.
*41221 2	1018	1037	CCGGGATGATGAGTGCAGA T	89	5-10-5	40
416904	1018	1037	CCGGGATGATGAGTGCAGA T	90	3-14-3	40
416981	1018	1037	CCGGGATGATGAGTGCAGA T	87	2-13-5	40
416835	1019	1038	ACCGGGATGATGAGTGCAG A	83	5-10-5	200
416905	1019	1038	ACCGGGATGATGAGTGCAG A	85	3-14-3	200
416982	1019	1038	ACCGGGATGATGAGTGCAG A	84	2-13-5	200
416836	1020	1039	AACCGGGATGATGAGTGCA G	89	5-10-5	201
416906	1020	1039	AACCGGGATGATGAGTGCA G	88	3-14-3	201
416983	1020	1039	AACCGGGATGATGAGTGCA G	86	2-13-5	201
416837	1021	1040	CAACCGGGATGATGAGTGC A	90	5-10-5	202
416907	1021	1040	CAACCGGGATGATGAGTGC A	90	3-14-3	202
416984	1021	1040	CAACCGGGATGATGAGTGC A	89	2-13-5	202
416838	1022	1041	GCAACCGGGATGATGAGTG C	94	5-10-5	203
416908	1022	1041	GCAACCGGGATGATGAGTG C	98	3-14-3	203
416985	1022	1041	GCAACCGGGATGATGAGTG C	88	2-13-5	203
413474	1023	1042	AGCAACCGGGATGATGAGT G	93	5-10-5	107

Los oligonucleótidos antisentido quiméricos en la Tabla 7 se diseñaron como gapmeros 5-10-5 MOE, 3-14-3 MOE y 2-13-5 MOE. El primer gapmer enumerado en la Tabla 7 es el gapmer original (véase la Tabla 3) a partir del cual los gapmeros restantes se diseñaron a través de microwalk y se designa con un asterisco. Los gapmeros 5-10-5 tienen una longitud de 20 nucleótidos, en los que el segmento separador central está compuesto por 10 2'-desoxinucleótidos y está flanqueado en ambos lados (en las direcciones 5' y 3') por alas que comprenden 5 nucleótidos cada una. Los gapmeros 3-14-3 tienen una longitud de 20 nucleótidos, en los que el segmento separador central está compuesto por 14 2'-desoxinucleótidos y está flanqueado en ambos lados (en las direcciones 5' y 3') por alas que comprenden 3 nucleótidos cada una. Los gapmeros 2-13-5 tienen una longitud de 20 nucleótidos, en los que el segmento separador central está compuesto por 13 2'-desoxinucleótidos. El separador central está flanqueado en el extremo 5' con un ala que comprende 2 nucleótidos y en el extremo 3' con un ala que comprende 5 nucleótidos. Para cada uno de los motivos (5-10-5, 3-14-3 y 2-13-5), cada nucleótido en el segmento de ala en 5' y cada nucleótido en el segmento de ala 3' tiene una modificación de 2'-MOE. Los enlaces internucleosídicos a lo largo de cada gapmer son enlaces fosforotioato (P = S). Todos los residuos de citidina a lo largo de cada gapmer son 5-metilcitidinas. El "sitio de inicio diana" indica el nucleótido más 5'al al que se dirige el gapmer.. El "sitio de terminación diana" indica el nucleótido más 3'al al que se dirige el gapmer.. Cada gapmer enumerado en la Tabla 7 está dirigido a la SEQ ID NO: 1 (n.º de acceso en GENBANK NM_000128,3).

Como se muestra en la Tabla 7, todos los gapmeros 5-10-5 MOE, los gapmeros 3-14-3 MOE y los gapmeros 2-13-5 MOE dirigidos a la región diana que comienza en el sitio de inicio diana 1062 y termina en la parada diana. el sitio 1091 (es decir, las bases nucleotídicas 1062-1091) de la SEQ ID NO: muestra al menos un 20 % de inhibición del ARNm del Factor 11. Muchos de los gapmeros exhiben al menos 50 % de inhibición, incluyendo: 412215, 413476, 413476, 416839, 416840, 416841, 416842, 416843, 416844, 416845, 416846, 416847, 416909, 416910, 416911, 416912, 416913, 416914, 416915, 416916, 416917, 416918, 416918, 416986, 416987, 416988, 416989, 416990, 416991, 416992, 416993, 416994, 416995. Los siguientes números de ISIS exhibieron al menos 80 % de inhibición: 412215, 413476, 413476, 416839, 416840, 416841, 416842, 416843, 416844, 416845, 416910, 416911, 416912, 416913, 416914, 416916, 416917, 416986, 416987, 416989, 416991, 416992, 416993, and 416994. Los siguientes números

de ISIS exhibieron al menos 90 % de inhibición: 413476, 413476, 416842, 416844, 416910, 416911, 416912, 416913, 416916, 416917 y 416993.

5

Tabla 7

10

15

20

25

30

35

40

45

Inhibición de los niveles de ARNm del Factor 11 humano por oligonucleótidos antisentido quiméricos dirigidos a las bases nucleotídicas 1062 a 1091 de la SEC ID N°: 1 (N.º de acceso en GENBANK NM_000128.3) 1 (n.º de acceso en GENBANK NM_000128,3).						
Nº ISIS	Sitio de inicio diana	Sitio de terminación diana	Secuencia (5' a 3')	% de inhibición	Motivo	SEQ ID No.
*413476	1067	1086	TTGAGATTCTTTGGGCCATT	93	5-10-5	109
412215	1062	1081	ATTCTTTGGGCCATTCCTGG	82	5-10-5	43
416909	1062	1081	ATTCTTTGGGCCATTCCTGG	78	3-14-3	43
416986	1062	1081	ATTCTTTGGGCCATTCCTGG	88	2-13-5	43
416839	1063	1082	GATTCTTTGGGCCATTCCTG	89	5-10-5	204
416910	1063	1082	GATTCTTTGGGCCATTCCTG	90	3-14-3	204
416987	1063	1082	GATTCTTTGGGCCATTCCTG	80	2-13-5	204
416840	1064	1083	AGATTCTTTGGGCCATTCCT	85	5-10-5	205
416911	1064	1083	AGATTCTTTGGGCCATTCCT	90	3-14-3	205
416988	1064	1083	AGATTCTTTGGGCCATTCCT	76	2-13-5	205
416841	1065	1084	GAGATTCTTTGGGCCATTCC	87	5-10-5	206
416912	1065	1084	GAGATTCTTTGGGCCATTCC	92	3-14-3	206
416989	1065	1084	GAGATTCTTTGGGCCATTCC	88	2-13-5	206
416842	1066	1085	TGAGATTCTTTGGGCCATTC	94	5-10-5	207
416913	1066	1085	TGAGATTCTTTGGGCCATTC	93	3-14-3	207
416990	1066	1085	TGAGATTCTTTGGGCCATTC	76	2-13-5	207
413476	1067	1086	TTGAGATTCTTTGGGCCATT	93	5-10-5	109
416914	1067	1086	TTGAGATTCTTTGGGCCATT	87	3-14-3	109
416991	1067	1086	TTGAGATTCTTTGGGCCATT	87	2-13-5	109
416843	1068	1087	TTTGAGATTCTTTGGGCCAT	89	5-10-5	208
416915	1068	1087	TTTGAGATTCTTTGGGCCAT	79	3-14-3	208
416992	1068	1087	TTTGAGATTCTTTGGGCCAT	84	2-13-5	208
416844	1069	1088	CTTTGAGATTCTTTGGGCCA	90	5-10-5	209
416916	1069	1088	CTTTGAGATTCTTTGGGCCA	91	3-14-3	209
416993	1069	1088	CTTTGAGATTCTTTGGGCCA	91	2-13-5	209
416845	1070	1089	TCTTTGAGATTCTTTGGGCC	86	5-10-5	210
416917	1070	1089	TCTTTGAGATTCTTTGGGCC	92	3-14-3	210
416994	1070	1089	TCTTTGAGATTCTTTGGGCC	83	2-13-5	210
416846	1071	1090	TTCTTTGAGATTCTTTGGGC	72	5-10-5	211
416918	1071	1090	TTCTTTGAGATTCTTTGGGC	63	3-14-3	211
416995	1071	1090	TTCTTTGAGATTCTTTGGGC	64	2-13-5	211
416847	1072	1091	TTTCTTTGAGATTCTTTGGG	50	5-10-5	212
416919	1072	1091	TTTCTTTGAGATTCTTTGGG	27	3-14-3	212
416996	1072	1091	TTTCTTTGAGATTCTTTGGG	22	2-13-5	212

50

55

60

65

Los oligonucleótidos antisentido quiméricos en la Tabla 8 se diseñaron como gapmeros 5-10-5 MOE, 3-14-3 MOE y 2-13-5 MOE. Los primeros gapmeros enumerados en la Tabla 8 son los gapmeros originales (véase la Tabla 3) a partir de los cuales los gapmeros restantes se diseñaron a través de microwalk y se designaron con un asterisco. Los gapmeros 5-10-5 tienen una longitud de 20 nucleótidos, en los que el segmento separador central está compuesto por 10 2'-desoxinucleótidos y está flanqueado en ambos lados (en las direcciones 5' y 3') por alas que comprenden 5 nucleótidos cada una. Los gapmeros 3-14-3 tienen una longitud de 20 nucleótidos, en los que el segmento separador central está compuesto por 14 2'-desoxinucleótidos y está flanqueado en ambos lados (en las direcciones 5' y 3') por alas que comprenden 3 nucleótidos cada una. Los gapmeros 2-13-5 tienen una longitud de 20 nucleótidos, en los que el segmento separador central está compuesto por 13 2'-desoxinucleótidos. El separador central está flanqueado en el extremo 5' con un ala que comprende 2 nucleótidos y en el extremo 3' con un ala que comprende 5 nucleótidos. Para cada uno de los motivos (5-10-5, 3-14-3 y 2-13-5), cada nucleótido en el segmento de ala en 5' y cada nucleótido en el segmento de ala 3' tiene una modificación de 2'-MOE. Los enlaces internucleosídicos a lo largo de cada gapmer son enlaces fosforotioato (P = S). Todos los residuos de citidina a lo largo de cada gapmer son 5-metilcitidinas. El "sitio de inicio diana" indica el nucleótido más 5'al al que se dirige el gapmer.. El "sitio de terminación diana" indica el nucleótido más 3'al al que se dirige el gapmer.. Cada gapmer enumerado en la Tabla 8 está dirigido a la SEQ ID NO: 1 (n.º de acceso en GENBANK NM_000128,3).

Como se muestra en la Tabla 8, todos los gapmeros 5-10-5 MOE, los gapmeros 3-14-3 MOE y los gapmeros 2-13-5

MOE dirigidos a la región diana que comienza en el sitio de inicio diana 1275 y termina en la parada diana. el sitio 1318 (es decir, las bases nucleotídicas 1275-1318) de la SEQ ID NO: muestra al menos un 70 % de inhibición del ARNm del Factor 11. Muchos de los gapmeros exhiben al menos 80 % de inhibición, incluyendo: 412223, 412224, 412225, 413482, 416848, 416849, 416850, 416851, 416852, 416853, 416854, 416855, 416856, 416857, 416858, 416859, 416860, 416861, 416862, 416863, 416864, 416865, 416866, 416867, 416920, 416921, 416922, 416923, 416924, 416925, 416926, 416927, 416928, 416929, 416930, 416931, 416932, 416933, 416934, 416935, 416936, 416937, 416938, 416939, 416940, 416941, 416942, 416943, 416944, 416997, 416998, 416999, 417000, 417001, 417002, 417003, 417004, 417006, 417007, 417008, 417009, 417010, 417011, 417013, 417014, 417015, 417016, 417017, 417018, 417019, y 417020. The Los siguientes números de ISIS exhibieron al menos 90 % de inhibición: : 412224, 416850, 416853, 416856, 416857, 416858, 416861, 416862, 416864, 416922, 416923, 416924, 416925, 416926, 416928, 416932, 416933, 416934, 416935, 416937, 416938, 416940, 416941, 416943, 416999, 417002, 416854, y 416859.

Tabla 8

Inhibición de los niveles de ARNm del Factor 11 humano por oligonucleótidos antisentido quiméricos dirigidos a las bases nucleotídicas 1275 a 1318 de la SEC ID N°: 1 (N.º de acceso en GENBANK NM_000128.3) 1 (n.º de acceso en GENBANK NM_000128.3).						
Nº ISIS	Sitio de inicio diana	Sitio de terminación diana	Secuencia (5' a 3')	% de inhibición	Motivo	SEQ ID No.
*412223	1275	1294	ACAGTTTCTGGCAGGCCTCG	85	5-10-5	51
*412224	1285	1304	GCATTGGTGCACAGTTTCTG	93	5-10-5	52
*413482	1290	1309	GGACGGCATTGGTGCACAGT	89	5-10-5	115
*412225	1295	1314	GCAGCGGACGGCATTGGTGC	86	5-10-5	53
416920	1275	1294	ACAGTTTCTGGCAGGCCTCG	88	3-14-3	51
416997	1275	1294	ACAGTTTCTGGCAGGCCTCG	84	2-13-5	51
416848	1276	1295	CACAGTTTCTGGCAGGCCTC	86	5-10-5	213
416921	1276	1295	CACAGTTTCTGGCAGGCCTC	88	3-14-3	213
416998	1276	1295	CACAGTTTCTGGCAGGCCTC	88	2-13-5	213
416849	1277	1296	GCACAGTTTCTGGCAGGCCT	88	5-10-5	214
416922	1277	1294	GCACAGTTTCTGGCAGGCCT	94	3-14-3	214
416999	1277	1296	GCACAGTTTCTGGCAGGCCT	92	2-13-5	214
416850	1278	1297	TGCACAGTTTCTGGCAGGCC	93	5-10-5	215
416923	1278	1297	TGCACAGTTTCTGGCAGGCC	96	3-14-3	215
417000	1278	1297	TGCACAGTTTCTGGCAGGCC	89	2-13-5	215
416851	1279	1298	GTGCACAGTTTCTGGCAGGC	88	5-10-5	216
416924	1279	1298	GTGCACAGTTTCTGGCAGGC	96	3-14-3	216
417001	1279	1298	GTGCACAGTTTCTGGCAGGC	83	2-13-5	216
416925	1280	1299	GGTGCACAGTTTCTGGCAGG	98	3-14-3	114
417002	1280	1299	GGTGCACAGTTTCTGGCAGG	92	2-13-5	114
416852	1281	1300	TGGTGCACAGTTTCTGGCAG	84	5-10-5	217
416926	1281	1300	TGGTGCACAGTTTCTGGCAG	93	3-14-3	217
417003	1281	1300	TGGTGCACAGTTTCTGGCAG	89	2-13-5	217
416853	1282	1301	TTGGTGCACAGTTTCTGGCA	91	5-10-5	218
416927	1282	1301	TTGGTGCACAGTTTCTGGCA	87	3-14-3	218
417004	1282	1301	TTGGTGCACAGTTTCTGGCA	86	2-13-5	218
416854	1283	1302	ATTGGTGCACAGTTTCTGGC	90	5-10-5	219
416928	1283	1302	ATTGGTGCACAGTTTCTGGC	91	3-14-3	219
417005	1283	1302	ATTGGTGCACAGTTTCTGGC	79	2-13-5	219
416855	1284	1303	CATTGGTGCACAGTTTCTGG	87	5-10-5	220
416929	1284	1303	CATTGGTGCACAGTTTCTGG	83	3-14-3	220
417006	1284	1303	CATTGGTGCACAGTTTCTGG	81	2-13-5	220
416930	1285	1304	GCATTGGTGCACAGTTTCTG	87	3-14-3	52
417007	1285	1304	GCATTGGTGCACAGTTTCTG	82	2-13-5	52
416856	1286	1305	GGCATTGGTGCACAGTTTCT	95	5-10-5	221
416931	1286	1305	GGCATTGGTGCACAGTTTCT	96	3-14-3	221
417008	1286	1305	GGCATTGGTGCACAGTTTCT	82	2-13-5	221
416857	1287	1306	CGGCATTGGTGCACAGTTTC	92	5-10-5	222
416932	1287	1306	CGGCATTGGTGCACAGTTTC	92	3-14-3	222
417009	1287	1306	CGGCATTGGTGCACAGTTTC	85	2-13-5	222

(continúa)

5	416858	1288	1307	ACGGCATTGGTGCACAGTTT	93	5-10-5	223
	416933	1288	1307	ACGGCATTGGTGCACAGTTT	92	3-14-3	223
	417010	1288	1307	ACGGCATTGGTGCACAGTTT	81	2-13-5	223
	416859	1289	1308	GACGGCATTGGTGCACAGTT	90	5-10-5	224
	416934	1289	1308	GACGGCATTGGTGCACAGTT	90	3-14-3	224
10	417011	1289	1308	GACGGCATTGGTGCACAGTT	86	2-13-5	224
	416935	1290	1309	GGACGGCATTGGTGCACAGT	92	3-14-3	115
	417012	1290	1309	GGACGGCATTGGTGCACAGT	72	2-13-5	115
	416860	1291	1310	CGGACGGCATTGGTGCACAG	88	5-10-5	225
	416936	1291	1310	CGGACGGCATTGGTGCACAG	89	3-14-3	225
15	417013	1291	1310	CGGACGGCATTGGTGCACAG	86	2-13-5	225
	416861	1292	1311	GCGGACGGCATTGGTGCACA	92	5-10-5	226
	416937	1292	1311	GCGGACGGCATTGGTGCACA	93	3-14-3	226
	417014	1292	1311	GCGGACGGCATTGGTGCACA	87	2-13-5	226
	416862	1293	1312	AGCGGACGGCATTGGTGCAC	90	5-10-5	227
20	416938	1293	1312	AGCGGACGGCATTGGTGCAC	90	3-14-3	227
	417015	1293	1312	AGCGGACGGCATTGGTGCAC	87	2-13-5	227
	416863	1294	1313	CAGCGGACGGCATTGGTGCA	83	5-10-5	228
	416939	1294	1313	CAGCGGACGGCATTGGTGCA	88	3-14-3	228
	417016	1294	1313	CAGCGGACGGCATTGGTGCA	85	2-13-5	228
25	416940	1295	1314	GCAGCGGACGGCATTGGTGC	92	3-14-3	53
	417017	1295	1314	GCAGCGGACGGCATTGGTGC	82	2-13-5	53
	416864	1296	1315	GGCAGCGGACGGCATTGGTG	93	5-10-5	229
	416941	1296	1315	GGCAGCGGACGGCATTGGTG	95	3-14-3	229
	417018	1296	1315	GGCAGCGGACGGCATTGGTG	82	2-13-5	229
30	416865	1297	1316	TGGCAGCGGACGGCATTGGT	88	5-10-5	230
	416942	1297	1316	TGGCAGCGGACGGCATTGGT	85	3-14-3	230
	417019	1297	1316	TGGCAGCGGACGGCATTGGT	84	2-13-5	230
	416866	1298	1317	CTGGCAGCGGACGGCATTGG	88	5-10-5	231
35	416943	1298	1317	CTGGCAGCGGACGGCATTGG	92	3-14-3	231
	417020	1298	1317	CTGGCAGCGGACGGCATTGG	84	2-13-5	231
	416867	1299	1318	ACTGGCAGCGGACGGCATTG	83	5-10-5	232
	416944	1299	1318	ACTGGCAGCGGACGGCATTG	83	3-14-3	232
40	417021	1299	1318	ACTGGCAGCGGACGGCATTG	74	2-13-5	232

Example 4: Inhibición antisentido dependiente de la dosis del factor 11 humano en células HepG2

Gapmeros del Ejemplo 3 (véanse las Tablas 4, 5, 6, 7 y 8), que exhiben inhibición in vitro del factor 11 humano, se analizaron a diversas dosis en células HepG2. Las células se sembraron a una densidad de 10.000 células por pocillo y se transfectaron usando reactivo de lipofectina con concentraciones de 9,375 nM, 18,75 nM, 37,5 nM y 75 nM del oligonucleótido antisentido, como se especifica en la Tabla 9. El conjunto de sonda de cebador Factor 11 humano, RTS 2966, se usó para medir los niveles de ARNm. Los niveles de ARNm del factor 11 se ajustaron de acuerdo con un contenido de ARN total medido mediante RIBOGREEN. Los resultados se presentan en forma del porcentaje de inhibición del factor 11 respecto a las células control sin tratar. Como se ilustra en la Tabla 9, los niveles de A.RNm del Factor 11 se redujeron de una manera dependiente de la dosis en células tratadas con oligonucleótidos antisentido.

55

60

65

Tabla 9

Inhibición antisentido dependiente de la dosis del factor 11 humano en células HepG2 a través de la transfección de oligonucleótidos con lipofectin								
	9,375 nM	18,75 nM	37,5 nM	75 nM	Motif	IC ₅₀ (nM)	SEQ ID No.	
5	412203	33	40	62	74	5-10-5	24	31
	412206	24	47	69	86	5-10-5	21	34
	413467	35	51	62	69	5-10-5	20	100
	413474	29	44	57	67	5-10-5	28	107
	413476	24	58	62	77	5-10-5	21	109
10	416825	23	52	73	92	5-10-5	20	190
	416826	8	36	58	84	5-10-5	29	191
	416827	31	42	62	77	5-10-5	23	192
	416838	31	51	64	86	5-10-5	19	203
	416842	18	33	62	71	5-10-5	31	207
15	416850	4	30	67	84	5-10-5	29	215
	416856	21	45	58	74	5-10-5	27	221
	416858	0	28	54	82	5-10-5	33	223
	416864	18	43	62	78	5-10-5	26	229
20	416878	22	34	60	82	5-10-5	27	100
	416892	16	50	70	85	3-14-3	23	190
	416895	39	57	66	71	3-14-3	15	192
	416896	22	39	57	81	3-14-3	27	193
	416908	36	57	67	76	3-14-3	16	203
25	416922	14	25	49	75	3-14-3	36	214
	416923	36	47	60	67	3-14-3	23	215
	416924	25	38	56	59	3-14-3	36	216
	416925	13	38	59	75	3-14-3	30	114
	416926	31	43	63	82	3-14-3	22	217
30	416931	44	39	57	71	3-14-3	22	221
	416941	33	54	63	78	3-14-3	19	229
	416945	34	45	62	65	2-13-5	24	31
	416969	17	39	61	76	2-13-5	28	190
	416972	32	40	60	69	2-13-5	26	192
35	416973	60	75	85	87	2-13-5	3	193
	416984	26	50	62	81	2-13-5	22	202
	416985	17	30	47	57	2-13-5	49	203
	416989	18	41	62	83	2-13-5	26	206
	416993	15	37	50	68	2-13-5	36	209
40	416999	24	37	55	73	2-13-5	30	214
	417000	35	47	58	70	2-13-5	23	215
	417002	35	52	67	70	2-13-5	19	114
	417003	26	44	60	56	2-13-5	33	217

45 Los gapmeros también se transtectaron mediante electroporación y se midió su inhibición dependiente de la dosis del ARNm del Factor 11 humano. Las células se sembraron a una densidad de 20.000 células por pocillo y se transfectaron mediante electroporación con concentraciones de oligonucleótido antisentido de 0,7 µM, 2,2 µM, 6,7 µM y 20 µM, como se especifica en la Tabla 10. Después de un período de tratamiento de aproximadamente 16 horas, el ARN aislado de las células y los niveles de ARNm del Factor 11 se midieron mediante PCR cuantitativa en tiempo real. El conjunto de sonda de cebador Factor 11 humano, RTS 2966, se usó para medir los niveles de ARNm. Los niveles de ARNm del factor 11 se ajustaron de acuerdo con un contenido de ARN total medido mediante RIBOGREEN. Los resultados se presentan en forma del porcentaje de inhibición del factor 11 respecto a las células control sin tratar. Como se ilustra en la Tabla 10, los niveles de A.RNm del Factor 11 se redujeron de una manera dependiente de la dosis en células tratadas con oligonucleótidos antisentido.

60

65

Tabla 10

Inhibición antisentido dependiente de la dosis del factor 11 humano en células HepG2 a través de la transfección de oligonucleótidos con electroporación							
	0,7 μ M	2,2 μ M	6,7 μ M	20 μ M	CI ₅₀ (μ M)	SEQ ID No.	
5	412203	11	60	70	91	2,7	31
	412206	22	39	81	94	2,7	34
	413467	5	31	65	89	4,2	100
10	413474	0	5	52	81	6,9	107
	413476	40	69	88	93	0,9	109
	416825	27	74	92	98	1,3	190
	416826	2	47	86	82	3,2	191
	416827	37	68	87	92	1,1	192
15	416838	5	30	55	83	5,1	203
	416842	0	10	66	92	5,0	207
	416850	14	25	81	91	3,4	215
	416856	0	29	47	93	5,1	221
	416858	5	20	56	86	5,3	223
20	416864	32	65	78	90	1,4	229
	416878	1	26	75	85	4,3	100
	416892	14	52	82	92	2,5	190
	416895	0	62	70	91	3,0	192
	416896	12	35	81	89	3,2	193
25	416908	7	58	74	89	2,8	203
	416922	35	51	77	91	1,7	214
	416923	15	30	60	90	4,0	215
	416924	22	40	63	70	4,1	216
	416925	0	40	76	80	3,9	114
30	416926	47	71	91	94	0,6	217
	416931	7	24	60	82	5,1	221
	416941	16	38	79	89	3,0	229
	416945	48	70	81	88	0,6	31
35	416969	25	34	86	92	2,5	190
	416972	25	30	48	88	4,3	192
	416973	20	48	86	93	2,3	193
	416984	43	54	88	90	1,1	202
	416985	12	48	45	69	5,8	203
40	416989	32	65	88	94	1,3	206
	416993	22	48	87	92	2,2	209
	416999	20	42	77	88	2,8	214
	417000	46	73	76	89	0,6	215
	417002	32	38	82	91	2,2	114
45	417003	0	34	75	89	3,9	217

Ejemplo 5: Selección y confirmación de la inhibición de antisentido dependiente de la dosis eficaz del Factor 11 humano en células HepG2

Se seleccionaron gapmeros que exhibían una inhibición significativa dependiente de la dosis del Factor 11 humano en el Ejemplo 4 y se analizaron a diversas dosis en células HepG2. Las células se sembraron a una densidad de 10.000 células por pocillo y se transfectaron usando reactivo de lipofectin con concentraciones de 9,34 nM, 4,69 nM, 9,375 nM, 18,75 nM, 37,5 nM, y 75 nM del oligonucleótido antisentido, como se especifica en la Tabla 11. Después de un período de tratamiento de aproximadamente 16 horas, se aisló ARN de las células y los niveles de ARNm del Factor 11 humano se midieron mediante PCR cuantitativa en tiempo real. El conjunto de sonda de cebador Factor 11 humano, RTS 2966, se usó para medir los niveles de ARNm. Los niveles de ARNm del factor 11 se ajustaron de acuerdo con un contenido de ARN total medido mediante RIBOGREEN. Los resultados se presentan en forma del porcentaje de inhibición del factor 11 humano respecto a las células control sin tratar. Como se ilustra en la Tabla 11, los niveles de A.RNm del Factor 11 se redujeron de una manera dependiente de la dosis en células tratadas con oligonucleótidos antisentido en comparación con el control.

Tabla 11

Inhibición antisentido dependiente de la dosis del factor 11 humano en células HepG2 a través de la transfección de oligonucleótidos con lipofectin										
	2,34 nM	4,69 nM	9,375 nM	18,75 nM	37,5 nM	75 nM	Motif	IC50 (nM)	SEQ ID No.	
5	416825	4	22	39	57	79	89	5-10-5	13	190
	416826	15	22	32	54	76	90	5-10-5	15	191
	416838	21	37	50	63	74	83	5-10-5	10	203
	416850	24	31	49	55	70	77	5-10-5	13	215
	416858	11	35	46	61	75	77	5-10-5	11	223
10	416864	13	34	42	65	68	80	5-10-5	15	229
	416892	14	34	49	70	84	93	3-14-3	9	190
	416925	24	34	45	56	67	72	3-14-3	13	114
	416999	10	26	42	62	72	80	2-13-5	14	214
	417002	17	26	49	61	81	84	2-13-5	12	114
15	417003	6	29	48	64	73	82	2-13-5	11	217

Los gapmeros también se transfectaron mediante electroporación y se midió su inhibición dependiente de la dosis del ARNm del Factor 11 humano. Las células se sembraron a una densidad de 20.000 células por pocillo y se transfectaron mediante electroporación con concentraciones de 625 nM, 1250 nM, 2500 nM, 5.000 nM, 10.000 nM, y 20.000 nM del oligonucleótido antisentido, como se especifica en la Tabla 11. Después de un período de tratamiento de aproximadamente 16 horas, se aisló ARN de las células y los niveles de ARNm del Factor 12 humano se midieron mediante PCR cuantitativa en tiempo real. El conjunto de sonda de cebador Factor 11 humano, RTS 2966, se usó para medir los niveles de ARNm. Los niveles de ARNm del factor 11 se ajustaron de acuerdo con un contenido de ARN total medido mediante RIBOGREEN. Los resultados se presentan en forma del porcentaje de inhibición del factor 11 humano respecto a las células control sin tratar. Como se ilustra en la Tabla 12, los niveles de A.RNm del Factor 11 se redujeron de una manera dependiente de la dosis en células tratadas con oligonucleótidos antisentido en comparación con el control.

Tabla 12

Inhibición antisentido dependiente de la dosis del factor 11 humano en células HepG2 a través de la transfección de oligonucleótidos con electroporación									
	625 nM	1250 nM	2500 nM	5000 nM	10000 nM	20000 nM	CI ₅₀ (µM)	SEQ ID No.	
35	416825	69	84	91	94	96	97	19	190
	416826	67	82	89	92	95	97	33	191
	416838	66	79	87	90	93	96	43	203
	416850	69	80	87	90	93	96	25	215
	416858	65	77	87	89	93	93	44	223
40	416864	45	74	84	87	92	94	338	229
	416892	66	86	96	97	100	100	31	190
	416925	64	80	88	91	95	96	51	114
	416999	61	82	89	94	94	97	67	214
	417002	59	72	86	90	94	96	156	114
45	417003	60	74	86	90	95	95	123	217

Ejemplo 6: Selección y confirmación de la inhibición de antisentido dependiente de la dosis eficaz del Factor 11 humano en hepatocitos primarios con ciano

Gapmeros del ejemplo 4 que exhiben una inhibición *in vitro* dependiente de una dosis significativa del factor 11 humano también se analizaron a diversas dosis en hepatocitos primarios ciano. Las células se sembraron a una densidad de 35.000 células por pocillo y se transfectaron mediante electroporación con concentraciones de 0,74 nM, 2,2 nM, 6,7 nM, 20 nM, 60 nM, y 180 nM del oligonucleótido antisentido, como se especifica en la Tabla 11. Después de un período de tratamiento de aproximadamente 16 horas, se aisló ARN de las células y los niveles de ARNm del Factor 13 humano se midieron mediante PCR cuantitativa en tiempo real. El conjunto de sonda de cebador Factor 11 humano, RTS 2966, se usó para medir los niveles de ARNm. Los niveles de ARNm del factor 11 se ajustaron de acuerdo con un contenido de ARN total medido mediante RIBOGREEN. Los resultados se presentan en forma del porcentaje de inhibición del factor 11 humano respecto a las células control sin tratar. Como se ilustra en la Tabla 13, los niveles de A.RNm del Factor 11 se redujeron de una manera dependiente de la dosis en células tratadas con oligonucleótidos antisentido en comparación con el control.

Tabla 13

Inhibición antisentido dependiente de la dosis del factor 11 humano en hepatocitos primarios ciano									
	0,74 nM	2,2 nM	6,7 nM	20 nM	60 nM	180 nM	CI ₅₀ (μM)	SEQ ID No.	
5	416825	5	22	51	61	77	84	1,0	190
	416826	13	24	34	67	69	71	1,3	191
	416838	0	0	21	34	48	62	6,9	203
	416850	2	20	24	65	69	67	1,6	215
10	416858	2	13	22	44	63	68	3,7	223
	416864	0	1	15	23	47	64	7,7	229
	416892	20	20	43	62	88	92	1,0	190
	416925	0	9	1	48	55	76	4,4	114
	416999	3	40	36	62	67	82	1,3	214
15	417002	32	16	28	38	55	71	4,0	114
	417003	12	18	19	39	58	74	4,1	217

Ejemplo 7: Selección y confirmación de la inhibición de antisentido dependiente de la dosis eficaz del Factor 11 humano en células HepB3 por gapmeros

Los gapmeros que exhiben inhibición *in vitro* del Factor 11 humano en el Ejemplo 4 se analizaron a diversas dosis en células HepB3 humanas. Las células se sembraron a una densidad de 4.000 células por pocillo y se transfectaron usando reactivo de lipofectin con concentraciones de 2,3 nM, 4,7 nM, 9,4 nM, 18,75 nM, 37,5 nM, y 75 nM del oligonucleótido antisentido, como se especifica en la Tabla 14. Después de un período de tratamiento de aproximadamente 16 horas, se aisló ARN de las células y los niveles de ARNm del Factor 11 humano se midieron mediante PCR cuantitativa en tiempo real. El conjunto de sonda de cebador Factor 11 humano, RTS 2966, se usó para medir los niveles de ARNm. Los niveles de ARNm del factor 11 se ajustaron de acuerdo con un contenido de ARN total medido mediante RIBOGREEN. Los resultados se presentan en forma del porcentaje de inhibición del factor 11 respecto a las células control sin tratar. Como se ilustra en la Tabla 14, los niveles de A.RNm del Factor 11 se redujeron de una manera dependiente de la dosis en células tratadas con oligonucleótidos antisentido en comparación con el control.

Tabla 14

Inhibición antisentido dependiente de la dosis del factor 11 humano en células HepB3									
N° ISIS	2,3 nM	4,7 nM	9,4 nM	18,75 nM	37,5 nM	75 nM	CI ₅₀ (nM)	SEQ ID No.	
35	416825	0	15	34	36	53	59	35	190
	416826	16	28	38	55	64	66	16	191
40	416838	23	34	43	59	71	56	11	203
	416850	22	32	43	56	75	60	13	215
	416858	17	34	43	57	74	62	12	223
	416864	24	37	42	66	76	63	9	229
45	416892	28	34	50	68	82	72	9	190
	416925	26	33	45	59	72	60	12	114
	416999	19	33	42	60	71	59	12	214
	417002	24	30	46	57	71	65	13	114
50	417003	11	28	40	40	63	58	17	217

Los gapmeros también se transfectaron mediante electroporación y se midió su inhibición dependiente de la dosis del ARNm del Factor 11 humano. Las células se sembraron a una densidad de 20.000 células por pocillo y se transfectaron mediante electroporación con concentraciones de 41,15 nM, 123,457 nM, 370,37 nM, 1111,11 nM, 3333,33 nM, y 10.000nM del oligonucleótido antisentido, como se especifica en la Tabla 11. Después de un período de tratamiento de aproximadamente 16 horas, se aisló ARN de las células y los niveles de ARNm del Factor 15 humano se midieron mediante PCR cuantitativa en tiempo real. El conjunto de sonda de cebador Factor 11 humano, RTS 2966, se usó para medir los niveles de ARNm. Los niveles de ARNm del factor 11 se ajustaron de acuerdo con un contenido de ARN total medido mediante RIBOGREEN. Los resultados se presentan en forma del porcentaje de inhibición del factor 11 humano respecto a las células control sin tratar. Como se ilustra en la Tabla 15, los niveles de A.RNm del Factor 11 se redujeron de una manera dependiente de la dosis en células tratadas con oligonucleótidos antisentido en comparación con el control.

Tabla 15

Inhibición antisentido dependiente de la dosis del factor 11 humano en células HepB3									
	41,15 nM	123.457 nM	370,37 nM	1111,11 nM	3333,33 nM	10000 nM	Cl ₅₀ (µM)	SEQ ID No.	
5	416825	32	40	48	75	90	92	0,16	190
	416826	0	0	34	61	87	92	0,78	191
	416838	12	9	28	40	77	88	1,20	203
	416850	26	38	51	73	90	95	0,30	215
	416858	23	45	52	64	87	92	0,30	223
	416864	4	3	6	35	75	87	2,20	229
10	416892	9	12	28	65	89	98	0,61	190
	416925	27	39	50	73	88	96	0,20	114
	416999	31	45	62	78	94	97	0,16	214
	417002	19	0	31	47	86	93	1,20	114
15	417003	31	0	15	43	84	92	1,50	217

Ejemplo 8: Inhibición antisentido del factor 11 murino en hepatocitos de ratón primarios

Los oligonucleótidos antisentido quiméricos dirigidos al factor 11 murino se diseñaron como gapmeros 5-10-5 MOE dirigidos al Factor 11 murino (número de acceso en GENBANK NM_028066.1, incorporado en el presente documento como SEQ ID NO: 6). Los gapmeros tienen una longitud de 20 nucleótidos, en los que el segmento separador central está compuesto por 10 2'-desoxinucleótidos y está flanqueado en ambos lados (en las direcciones 5' y 3') por alas que comprenden 5 nucleótidos cada una. Cada nucleótido en cada segmento de ala tiene una modificación 2'-MOE. Los enlaces internucleosídicos a lo largo de cada gapmer son enlaces fosforotioato (P = S). Todos los residuos de citidina a lo largo de cada gapmer son 5-metilcitidinas. Los oligonucleótidos antisentido se evaluaron en cuanto a su capacidad para reducir el ARNm de Factor 11 murino en hepatocitos de ratón primarios.

Los hepatocitos de ratón primarios se trataron con oligonucleótidos antisentido a 6,25 nM, 12,5 nM, 25 nM, 50 nM, 100 nM y 200 nM durante un período de aproximadamente 24 horas. Se aisló el ARN de las células y se midieron los niveles de ARNm de Factor 11 murino mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Se utilizó el conjunto de sonda de cebador del Factor 11 murino RTS 2898 (secuencia directa ACATGACAGGCGCGATCTCT, incorporada en el presente documento como SEQ ID NO: 7; secuencia inversa TCTAGGTTACGTACACATCTTTGC, incorporada en el presente documento como SEQ ID NO: 8; secuencia de la sonda TTCCTTCAAGCAATGCCCTCAGCAATX, incorporada en el presente documento como SEQ ID NO: 9) se usó para medir los niveles de ARNm. Los niveles de ARNm del factor 11 se ajustaron de acuerdo con un contenido de ARN total medido mediante RIBOGREEN. Varios de los oligonucleótidos antisentido murinos redujeron los niveles de ARNm del Factor 11 de una manera dependiente de la dosis.

Ejemplo 9: Inhibición antisentido de reacción cruzada del factor 11 murino en hepatocitos de ratón primarios

Los oligonucleótidos antisentido dirigidos a un ácido nucleico del Factor 11 murino se probaron para determinar sus efectos sobre el ARNm del Factor 11 *in vitro*. Los hepatocitos de ratón primarios cultivados a una densidad de 10.000 células por pocillo se trataron con oligonucleótido antisentido 100 nM. Tras un período de tratamiento de aproximadamente 24 horas se aisló el ARN de las células y se midieron los niveles de ARNm del factor 11 de ratón mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Los niveles de ARNm del factor 11 se ajustaron de acuerdo con un contenido de ARN total medido mediante RIBOGREEN. Los resultados se presentan en forma del porcentaje de inhibición del factor 11 respecto a las células control sin tratar.

Los oligonucleótidos antisentido quiméricos en la Tablas 16 se diseñaron como gapmeros 5-10-5 MOE. Los gapmeros tienen una longitud de 20 nucleótidos, en los que el segmento separador central está compuesto por 10 2'-desoxinucleótidos y está flanqueado en ambos lados (en las direcciones 5' y 3') por alas que comprenden 5 nucleótidos cada una. Cada nucleótido en el segmento de ala en 5' y cada nucleótido en el segmento de ala 3' tiene una modificación de 2'-MOE. Los enlaces internucleosídicos a lo largo de cada gapmer son enlaces fosforotioato (P = S). Todos los residuos de citidina a lo largo de cada gapmer son 5-metilcitidinas. El "sitio de inicio diana de ratón" indica el nucleótido más 5'al al que se dirige el gapmer. El "sitio de terminación diana de ratón" indica el nucleótido más 3'al al que se dirige el gapmer. Todos los oligonucleótidos de ratón enumerados muestran reactividad cruzada entre el ARNm del Factor 11 de ratón (número de acceso GENBANK NM_028066.1), incorporado en el presente documento como SEQ ID NO: 6 y el ARNm del Factor 11 humano (número de acceso GENBANK NM_000128.3), incorporado en el presente documento como SEQ ID NO: 1. "Sitio de inicio diana humano" indica el nucleótido más en 5' en el ARNm humano (número de acceso en GENBANK NM_000128.3) al que se dirige el oligonucleótido antisentido. "Sitio de terminación diana humano" indica el nucleótido más en 3' en el ARNm humano (número de acceso en GENBANK NM_000128.3) al que se dirige el oligonucleótido antisentido. El "número de apareamientos erróneos" indica los apareamientos erróneos entre el oligonucleótido de ratón y la secuencia de ARNm humano.

Tabla 16

Inhibición de los niveles de ARNm del Factor 11 de ratón por oligonucleótidos antisentido quiméricos que tienen alas 5–10–5 MOE y separación de desoxi dirigida a la SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 6								
N.º ISIS	Sitio de inicio diana de ratón	Sitio de terminación diana de ratón	Secuencia (5' a 3')	% de inhibición	SEQ ID No.	Sitio de inicio diana humano	Sitio de terminación diana humano	Nº de apareamientos erróneos
404050	379	398	TGCTTGAAGGAATATCCAGA	82	233	619	638	2
404054	448	467	TAGTTCATGCCCTTCATGTC	45	234	688	707	1
404055	453	472	TGTTATAGTTCATGCCCTTC	27	235	693	712	1
404066	686	705	AATGTCCCTGATACAAGCCA	37	236	926	945	1
404067	691	710	GGGAAAATGTCCTGATACA	39	237	931	950	1
404083	1299	1318	TGTGCAGAGTCACCTGCCAT	47	238	1533	1552	2
404087	1466	1485	TTCTTGAACCCTGAAGAAAG	29	239	1709	1728	2
404089	1477	1496	TGAATTATCATTCTTGAAC	6	240	1720	1739	2
404090	1483	1502	TGATCATGAATTATCATTTTC	42	241	1726	1745	2

Ejemplo 10: inhibición antisentido *in vivo* del factor 11 murino

Se evaluaron varios oligonucleótidos antisentido dirigidos al ARNm del factor 11 murino (número de acceso GENBANK . NM_028066,1) incorporado en el presente documento como SEQ ID NO: 6) que muestran una inhibición dependiente de la dosis estadísticamente significativa *n vivo*. Se trató a ratones BALB/c con ISIS 404057 (TCCTGGCATTCTCGAGCATT, sitio de inicio diana 487, incorporado en el presente documento como SEQ ID NO: 10) and ISIS 404071 (TGGTAATCCACTTTCAGAGG, sitio de inicio diana 869, incorporado en el presente documento como SEQ ID NO: 11).

Tratamiento

En ratones BALB/c se inyectaron 5 mg/kg, 10 mg/kg, 25 mg/kg o 50 mg/kg de ISIS 404057 o ISIS 404071 dos veces a la semana durante 3 semanas. A un grupo de control de ratones se inyectó solución salina tamponada con fosfato (PBS) dos veces por semana durante 3 semanas. Se sacrificó a los ratones 5 días después de recibir la última dosis. Se recogió el hígado entero para el análisis de ARN y se recolectó el plasma para el análisis de coagulación (PT y aPTT) y el análisis de proteínas.

Análisis de ARN

Se extrajo el ARN del tejido hepático para el análisis de PCR en tiempo real del Factor 11. Como se muestra en la Tabla 17, los oligonucleótidos antisentido lograron una reducción dependiente de la dosis del Factor 11 murino sobre el control de PBS. Los resultados se presentan en forma del porcentaje de inhibición del factor 11 en relación con el control.

Tabla 17

Inhibición antisentido dependiente de la dosis de ARNm de factor 11 murino en ratones BALB/c		
	mg/kg	% de inhibición
404057	5	40
	10	64
	25	85
	50	95
404071	5	72
	10	82
	25	93
	50	96

Ensayo de PT y aPTT

El tiempo de protrombina (PT) y el tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT) se midieron utilizando plasma pobre en plaquetas (PPP) de ratones tratados con ISIS 404057 e ISIS 404071. Los valores de PT y aPTT proporcionados en la tabla 18 se informan como valores del índice internacional normalizado (INR). Los valores de INR para PT y aPTT se determinaron dividiendo el valor de PT o aPTT para cada grupo experimental (es decir, 5

mg/kg, 10 mg/kg, 25 mg/kg y 50 mg/kg de tratamiento con ISIS 404057 o ISIS 404071) mediante el PT o aPTT para el grupo tratado con PBS. Esta relación se elevó a la potencia del Índice de Sensibilidad Internacional (ISI) del factor tisular utilizado. Como se muestra en la Tabla 18, el PT no se prolongó significativamente en ratones tratados con ISIS 404057 o ISIS 404071. Sin embargo, el aTTP se prolongó de forma dependiente de la dosis en ratones tratados con ISIS 404057 e ISIS 404071. Estos datos sugieren que la reducción antisentido del Factor 11 afecta a la vía de activación de contacto, pero no la vía extrínseca de la coagulación sanguínea.

Tabla 18

Efecto de ISIS 404071 y 404057 sobre PT y aPTT en ratones BALB/c			
	Dosis en mg/kg	INR de PT	INR de aPTT
ISIS 404057	5	1,00	1,07
	10	0,94	1,19
	25	1,02	1,27
	50	1,00	1,37
ISIS 404071	5	1,06	1,09
	10	1,08	1,13
	25	1,06	1,35
	50	1,02	2,08

Análisis de proteínas

La proenzima del factor 11 del plasma de ratones tratados con ISIS 404071, se midió usando un ensayo de F11 basado en el tiempo de coagulación. Los tiempos de coagulación se determinaron por duplicado con un instrumento de coagulación semiautomático ST4 (Diagnostica Stago, NJ). Treinta μ l de plasma de muestra citrado diluido a 1/20 en tampón HEPES-NaCl con BSA se incubaron con 30 μ l de reactivo de aPTT (reactivo de Factor 3 de plaquetas más activador de partículas) y 30 μ l de plasma citrado deficiente en factor 11 (congénito humano, George King Bio-Medical Inc.) a 37 °C para iniciar la coagulación. Los resultados se interpolaron en una curva estándar de plasma murino de control citrado diluido en serie.

Como se muestra en la Tabla 19, el tratamiento con ISIS 404071 dio como resultado una reducción significativa dependiente de la dosis de la proteína del Factor 11. Los resultados se presentan en forma del porcentaje de inhibición del factor 11 en relación con el PBS control.

Tabla 19

Inhibición dependiente de la dosis de la proteína del factor 11 murino por ISIS 404071 en ratones BALB/c	
Dosis en mg/kg	% de inhibición
5	39
10	67
25	89
50	96

Ejemplo 11: Efecto in vivo de la inhibición antisentido del factor 11 murino en el modelo de trombosis venosa (TV) inducida con FeCl₃ en comparación con warfarina

Tratamiento

ISIS 404071 y warfarina (COUMADIN) se evaluaron en el modelo de ratón de TV inducida por FeCl₃. Seis grupos de ratones BALB/c se trataron con 1,25 mg/kg, 2,5 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 20 mg/kg o 40 mg/kg de ISIS 404071, administrados por vía subcutánea dos veces a la semana durante 3 semanas. Dos días después de recibir la última dosis de ISIS 404071, se anestesió a los ratones con 150 mg/kg de ketamina mezclada con 10 mg/kg de xilazina administrada por inyección intraperitoneal. Se trataron 6 grupos adicionales de ratones BALB/c con 0,5 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg y 5 mg/kg de warfarina, administrados por vía intraperitoneal diariamente durante 6 días. Cuatro horas después de la última dosis de warfarina, se anestesió a los ratones con 150 mg/kg de ketamina mezclada con 10 mg/kg de xilazina administrada por inyección intraperitoneal. Dos grupos de control de ratones BALB/c se trataron con PBS, administrado por vía subcutánea dos veces por semana durante 3 semanas. Dos días después de la última dosis de PBS, se anestesió a los ratones de ambos grupos con 150 mg/kg de ketamina mezclada con 10 mg/kg de xilazina administrada por inyección intraperitoneal. La formación de trombos se indujo con FeCl₃ en todos los grupos de ratones excepto en el primer grupo de control.

En ratones sometidos a tratamiento con FeCl₃, se indujo la formación de trombos aplicando un trozo de papel de filtro (2 x 4 mm) presaturado con una solución al 10 % de FeCl₃ directamente en la vena cava. Después de 3 minutos

de exposición, se retiró el papel de filtro. Treinta minutos después de la aplicación del papel de filtro, se diseccionó una longitud fija de la vena que contenía el trombo para el análisis de plaquetas. Se extrajo el hígado para el análisis de ARN.

5 *Análisis de ARN*

Se extrajo el ARN del tejido hepático para el análisis de PCR en tiempo real del Factor 11. Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición del Factor 11, en relación con el control con PBS. Como se muestra en la Tabla 20, el tratamiento con ISIS 404071 dio como resultado una reducción significativa dependiente de la dosis del ARNm del Factor 11 en comparación con el control con PBS. Por el contrario, el tratamiento con warfarina no produjo una reducción significativa del factor 11 en comparación con el control de PBS.

Tabla 20

Reducción dependiente de la dosis del ARNm del Factor 11 en el modelo de trombosis venosa inducida con FeCl ₃		
Tratamiento	Dosis en mg/kg	% de inhibición
Warfarina	0,5	0
	1	0
	2	1
	3	5
	4	8
	5	11
ISIS 404071	1,25	0
	2,5	8
	5	62
	10	78
	20	92
	40	96

Cuantificación de la composición plaquetaria

La cuantificación por PCR en tiempo real del factor 4 plaquetario (PF-4) se utilizó para cuantificar las plaquetas en la vena cava como una medida de la formación de trombos. Los resultados se presentan como un porcentaje de PF-4 en ratones tratados con ISIS 404071 o warfarina, en comparación con los dos grupos de control tratados con PBS. Como se muestra en la Tabla 21, el tratamiento con ISIS 404071 dio como resultado una reducción dependiente de la dosis de PF-4 en comparación con el control de PBS para dosis de 5 mg/kg y superiores. El tratamiento con warfarina dio como resultado una reducción de PF-4 en comparación con el control de PBS para dosis de 2 mg/kg y superiores. Por lo tanto, la reducción del Factor 11 mediante los compuestos descritos en el presente documento es útil para inhibir la formación de trombos y coágulos.

Tabla 21

Análisis de la formación de trombos mediante cuantificación con PCR en tiempo real de PF-4 en el modelo de trombosis venosa inducida con FeCl ₃		
	Dosis en mg/kg	PF -4
PBS-FeCl ₃		0
PBS+FeCl ₃		100
Warfarina	0,5	128
	1	124
	2	80
	3	21
	4	12
	5	33
ISIS 404071	1,25	143
	2,5	120
	5	95
	10	21
	20	37
	40	20

Ejemplo 12: Efecto *in vivo* de la inhibición antisentido del factor 11 murino en comparación con warfarina en un ensayo de sangrado de la cola*Tratamiento*

5 Se midió el sangrado de la cola para observar si el tratamiento con ISIS 404071 o warfarina causa hemorragia interna en ratones. ISIS 404071 y warfarina (COUMADIN) se evaluaron en el ensayo de sangrado de la cola. Seis grupos de ratones BALB/c se trataron con 1,25 mg/kg, 2,5 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 20 mg/kg o 40 mg/kg de ISIS 404071, administrados por vía subcutánea dos veces a la semana durante 3 semanas. Se trataron 6 grupos adicionales de ratones BALB/c con 0,5 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg y 5 mg/kg de warfarina, administrados por vía intraperitoneal diariamente durante 6 días. Se trató un grupo de control separado de ratones BALB/c con PBS, administrado por vía subcutánea dos veces por semana durante 3 semanas.

Ensayo de sangrado de la cola

15 Dos días después del tratamiento final de ISIS 404071, warfarina o PBS, se introdujo a los ratones en una cámara de sangrado de la cola. Se anestesió a los ratones en la cámara con isoflurano y se cortó una pequeña porción de cola (aproximadamente a 4 mm de la punta) con tijeras estériles. El la cola cortada se colocó inmediatamente en un tubo Falcon de 15 ml lleno con aproximadamente 10 ml de solución tampón de NaCl al 0,9 % calentada a 37 °C. La sangre se recogió en el transcurso de 40 minutos. Los tubos llenos de solución salina se pesaron antes y después del sangrado. Los resultados se proporcionan en la Tabla 22.

20 El tratamiento con ISIS 404071 no afectó al sangrado en comparación con los ratones tratados con PBS. Sin embargo, la warfarina aumentó el sangrado en ratones en comparación con el control con PBS. El aumento de las dosis de warfarina se correlacionó positivamente con una mayor pérdida de sangre. Estos datos sugieren que el potencial hemorrágico de los compuestos descrito en el presente documento es bajo, especialmente en comparación con warfarina. Estos datos tomados con los resultados proporcionados en el ejemplo 11 sugieren que la inhibición del Factor 11 con los compuestos descritos en el presente documento es útil para proporcionar actividad antitrombótica sin riesgo de hemorragia asociado.

Tabla 22

Ensayo de sangrado de cola en el modelo de trombosis venosa inducida con FeCl ₃		
Tratamiento	Dosis en mg/kg	Sangre (g)
PBS	0	0,01
Warfarina	0,5	0,07
	1	0,35
	2	0,39
	3	0,51
	4	0,52
	5	0,76
ISIS 404071	1,25	0,00
	2,5	0,00
	5	0,03
	10	0,00
	20	0,06
	40	0,03

Ejemplo 13: Efecto *in vivo* de la inhibición antisentido del factor 11 murino en comparación con warfarina sobre PT y aPTT*Tratamiento*

55 PT y aPTT se midieron usando PPP de ratones tratados con ISIS 404071 o warfarina. Seis grupos de ratones BALB/c se trataron con 1,25 mg/kg, 2,5 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 20 mg/kg o 40 mg/kg de ISIS 404071, administrados por vía subcutánea dos veces a la semana durante 3 semanas. Se trataron 6 grupos adicionales de ratones BALB/c con 0,5 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg y 5 mg/kg de warfarina, administrados por vía intraperitoneal diariamente durante 6 días. En un grupo de control, se trataron los ratones BALB/c con PBS , administrado por vía subcutánea dos veces por semana durante 3 semanas. Dos días después de administrar la dosis final, se recogió PPP y se realizaron ensayos de PT y aPTT.

Ensayo de PT y aPTT

Los valores de PT y aPTT proporcionados en la Tabla 16 se indican como valores del índice internacional normalizado (INR). Los valores de INR para PT y aPTT se determinaron dividiendo el valor de PT o aPTT para cada grupo experimental (es decir, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 25 mg/kg y 50 mg/kg de tratamiento con ISIS 404071) mediante el PT o aPTT para el grupo tratado con PBS. Esta relación se elevó a la potencia del Índice de Sensibilidad Internacional (ISI) del factor tisular utilizado. Como se muestra en la Tabla 23, el PT en ratones tratados con warfarina se prolonga significativamente en cada dosificación. El aPTT en ratones tratados con warfarina se prolongó, particularmente a dosis de 1 mg/kg y superiores. ISIS 404071 no afectó significativamente al PT, pero sí prolongó el aPTT; sin embargo, no tan significativamente como en los ratones tratados con warfarina. Estos datos sugieren que ISIS 404071 afecta a la vía de activación de contacto, pero no a la vía extrínseca de la coagulación de la sangre, mientras que la warfarina afecta tanto a la vía de activación de contacto como a la ruta extrínseca de la coagulación sanguínea.

Tabla 23

Efecto de ISIS 404071 y warfarina sobre PT y aPTT en ratones BALB/c			
Tratamiento	Dosis en mg/kg	INR de PT	INR de aPTT
Warfarina	0,5	1,41	1,10
	1	2,03	1,31
	2	2,77	1,54
	3	22,76	2,90
	4	6,74	2,18
ISIS 404071	5	9,20	2,29
	1,25	0,99	0,98
	2,5	1,01	1,03
	5	1,07	1,09
	10	1,08	1,29
	20	1,09	1,32
	40	0,98	1,64

Ejemplo 14: Efecto *in vivo* de la inhibición antisentido del factor 11 murino en el modelo de trombosis venosa (TV) inducida con FeCl₃ en comparación con apixabán

Tratamiento

ISIS 404071 y apixabán se evaluaron en el modelo de ratón de TV inducida por FeCl₃. Seis grupos de ratones BALB/c se trataron con 1,25 mg/kg, 2,5 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 20 mg/kg o 40 mg/kg de ISIS 404071, administrados por vía subcutánea dos veces a la semana durante 3 semanas. Dos días después de recibir la última dosis de ISIS 404071, se anestesió a los ratones con 150 mg/kg de ketamina mezclada con 10 mg/kg de xilazina administrada por inyección intraperitoneal. Se trataron 6 grupos adicionales de ratones BALB/c con 0,5 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg y 5 mg/kg de apixabán administrados por vía subcutánea una vez. Veinte minutos después de recibir apixabán, se anestesió a los ratones con 150 mg/kg de ketamina mezclada con 10 mg/kg de xilazina administrada por inyección intraperitoneal. Dos grupos de control de ratones BALB/c se trataron con PBS, administrado por vía subcutánea dos veces por semana durante 3 semanas. Dos días después de la última dosis de PBS, se anestesió a los ratones de ambos grupos con 150 mg/kg de ketamina mezclada con 10 mg/kg de xilazina administrada por inyección intraperitoneal. La formación de trombos se indujo con FeCl₃ en todos los ratones excepto en el primer grupo de control.

En ratones sometidos tratamiento con a FeCl₃, se indujo la formación de trombos aplicando un trozo de papel de filtro (2 x 4 mm) presaturado con una solución al 10 % de FeCl₃ directamente en la vena cava. Después de 3 minutos de exposición, se retiró el papel de filtro. Treinta minutos después de la aplicación del papel de filtro, se disecó una longitud fija de la vena que contenía el trombo para el análisis de plaquetas. Se extrajo el hígado para el análisis de ARN.

Análisis de ARN

Se extrajo el ARN del tejido hepático para el análisis de PCR en tiempo real del Factor 11. Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición del Factor 11, en relación con el control con PBS. Como se muestra en la Tabla 24, el tratamiento con ISIS 404071 dio como resultado una reducción significativa dependiente de la dosis del ARNm del Factor 11 en comparación con el control con PBS. Por el contrario, el tratamiento con apixabán no produjo una reducción significativa del factor 11 en comparación con el control de PBS.

Tabla 24

Reducción dependiente de la dosis del ARNm del Factor 11 en el modelo de trombosis venosa inducida con FeCl ₃		
	Dosis en mg/kg	% de inhibición
5	Apixabán	0,5
		2
		5
		10
		20
10	ISIS 404071	1,25
		2,5
		5
		10
		25
15		50
		95

Cuantificación de la composición plaquetaria

La cuantificación por PCR en tiempo real del factor 4 plaquetario (PF-4) se utilizó para cuantificar las plaquetas en la vena cava como una medida de la formación de trombos. Como se muestra en la Tabla 24, el tratamiento con ISIS 404071 dio como resultado una reducción de PF-4 comparación con el control con PBS. El tratamiento con apixabán también produjo una reducción de PF-4, en comparación con el control de PBS. Los resultados se presentan como un porcentaje de PF-4 en ratones tratados con ISIS 404071 o apixabán, en comparación con los dos grupos de control tratados con PBS.

Tabla 25

Análisis de la formación de trombos mediante cuantificación con PCR en tiempo real de PF-4 en el modelo de trombosis venosa inducida con FeCl ₃		
Tratamiento	Dosis en mg/kg	PF -4
PBS-FeCl ₃		0
PBS+FeCl ₃		100
35	Apixabán	0,5
		2
		5
		10
		20
40	ISIS 404071	1,25
		2,5
		5
		10
		25
45		50
		4

Ejemplo 15: Efecto *in vivo* de la inhibición antisentido del factor 11 murino en comparación con apixabán en un ensayo de sangrado de la cola*Tratamiento*

Se midió el sangrado de la cola para observar si el tratamiento con ISIS 404071 o warfarina causa hemorragia interna en ratones. ISIS 404071 y apixabán se evaluaron en el modelo de sangrado de la cola. Seis grupos de ratones BALB/c se trataron con 1,25 mg/kg, 2,5 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 20 mg/kg o 40 mg/kg de ISIS 404071, administrados por vía subcutánea dos veces a la semana durante 3 semanas. Se trataron 6 grupos adicionales de ratones BALB/c con 0,5 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg y 5 mg/kg de apixabán administrados en una sola dosis subcutánea. Se trató un grupo de control separado de ratones BALB/c con PBS, administrado por vía subcutánea dos veces por semana durante 3 semanas.

Ensayo de sangrado de la cola

Dos días después del tratamiento final de ISIS 404071, apixabán o PBS, se introdujo a los ratones en una cámara de sangrado de la cola. Se anestesió a los ratones en la cámara y se cortó una pequeña porción de cola (aproximadamente a 4 mm de la punta) con tijeras estériles. La cola cortada se colocó inmediatamente en un tubo Falcon de 15 ml lleno con aproximadamente 10 ml de solución tampón de NaCl al 0,9 % calentada a 37 °C. La

sangre se recogió en el transcurso de 40 minutos. Los tubos llenos de solución salina se pesaron antes y después del sangrado.

Como se muestra en la Tabla 26, el tratamiento con ISIS 404071 no afectó al sangrado en comparación con los ratones tratados con PBS. Sin embargo, apixabán aumentó el sangrado en ratones en comparación con el control con PBS. El aumento de las dosis de apixabán se correlacionó positivamente con una mayor pérdida de sangre. Estos datos sugieren que el potencial hemorrágico de los compuestos descrito en el presente documento es bajo, especialmente en comparación con apixabán. Estos datos tomados con los resultados proporcionados en el ejemplo 14 sugieren que la inhibición del Factor 11 con los compuestos descritos en el presente documento es útil para proporcionar actividad antitrombótica sin riesgo de hemorragia asociado.

Tabla 26

Ensayo de sangrado de la cola en ratones BALB/c		
	mg/kg	Sangre (g)
PBS	0	0,06
Apixabán	0,5	0,03
	2	0,34
	5	0,37
	10	0,40
	20	0,52
ISIS 404071	1,25	0,00
	2,5	0,03
	5	0,00
	10	0,04
	25	0,01
	50	0,01

Ejemplo 16: Efecto ex vivo de la inhibición antisentido del Factor 11 murino en combinación con LOVENOX

Tratamiento

Tres grupos de ratones BALB/c se trataron con 10 mg/kg, 20 mg/kg, or 40 mg/kg de ISIS 404071, administrados por vía subcutánea dos veces a la semana durante 3 semanas. Un grupo control de ratón se trató con PBS, administrado dos veces por semana durante 3 semanas. Cinco días después de la última dosis, se sacrificó a los ratones y se recogió el plasma. La heparina de bajo peso molecular (LMW), LOVENOX, se administró al plasma ex vivo a concentraciones variables de 0 µg/ml, 22,5 µg/ml, 5,0µg/ml, and 7,5µg/ml. Se midieron el PT y el aPTT 20 minutos después de que se administró LOVENOX.

Ensayo de PT y aPTT

Como se muestra en la Tabla 27, el tratamiento con LOVENOX aumenta el PT de una manera dependiente de la dosis. El tratamiento con ISIS 404071 no aumenta significativamente el PT. El PT no se ve significativamente afectado por el tratamiento con ISIS 404071. No hay evidencia de un efecto combinatorio en el PT en plasma tratado con ISIS 404071 y LOVENOX.

Tabla 27

Efecto de la combinación de ISIS 404071 y LOVENOX sobre PT INR en plasma murino				
ISIS 404071 (mg/kg)	LOVENOX (mg/ml)			
	0	2,5	5,0	7,5
0	1,00	1,02	1,10	1,12
10	0,97	1,07	1,10	1,12
20	1,00	1,10	1,07	1,10
40	0,97	1,02	1,07	1,10

Como se muestra en la Tabla 28, el tratamiento con LOVENOX aumenta el aPTT de una manera dependiente de la dosis. El tratamiento con ISIS 404071 también aumenta el aPTT de una manera dependiente de la dosis. Además, el tratamiento combinado de ISIS 404071 y LOVENOX parece tener un efecto sinérgico sobre el aPTT.

Tabla 28

Efecto de la combinación de ISIS 404071 y LOVENOX sobre aPTT INR en plasma murino				
ISIS 404071 mg/kg	LOVENOX (mg/ml)			
	0	2,5	5,0	7,5
0	1,00	1,53	2,10	2,70
10	1,14	1,76	2,39	3,20
20	1,28	1,95	2,83	3,65
40	1,52	2,66	n.d.	4,78
n.d.= sin datos				

15 **Ejemplo 17: Efecto in vivo de la inhibición antisentido del factor 11 murino en combinación con LOVENOX en el modelo de trombosis venosa (TV) inducida con FeCl₃**

Tratamiento

20 La combinación de ISIS 404071 y LOVENOX se evaluaron en el modelo de ratón de TV inducida por FeCl₃. Se trataron cuatro grupos de ratones BALB/c con 15 mg/kg, 30 mg/kg, 45 mg/kg o 60 mg/kg de LOVENOX, administrados por vía subcutánea una vez al día durante 3 días. Se trataron 4 grupos adicionales de ratones BALB/c con 20 mg/kg de ISIS 404071, administrados por vía subcutánea dos veces por semana durante 3 semanas. Después de la última dosis de ISIS 404071, se trató a los ratones con 15 mg/kg, 30 mg/kg, 45 mg/kg o 60 mg/kg de LOVENOX, administrados por vía subcutánea una vez al día durante 3 días. Dos grupos de control de ratones BALB/c se trataron con PBS, administrado por vía subcutánea dos veces por semana durante 3 semanas. La formación de trombos se indujo con FeCl₃ en todos los ratones excepto en el primer grupo de control. Se anestesió a todos los ratones con 150 mg/kg de ketamina mezclada con 10 mg/kg de oxilazina administrada por inyección intraperitoneal.

30 En ratones sometidos tratamiento con a FeCl₃, se indujo la formación de trombos aplicando un trozo de papel de filtro (2 x 4 mm) presaturado con una solución al 10 % de FeCl₃ directamente en la vena cava. Después de 3 minutos de exposición, se retiró el papel de filtro. Treinta minutos después de la aplicación del papel de filtro, se disecó una longitud fija de la vena que contenía el trombo para el análisis de plaquetas.

Cuantificación de la composición plaquetaria

35 La cuantificación por PCR en tiempo real de PF-4 se utilizó para cuantificar las plaquetas en la vena cava como una medida de la formación de trombos. Como se muestra en la Tabla 29, el tratamiento con LOVENOX dio como resultado una reducción de PF-4 comparación con el control con PBS. El tratamiento con LOVENOX en combinación con ISIS 404071 dio como resultado una mayor reducción de PF-4 en comparación con LOVENOX solo.

Tabla 29

Análisis de la formación de trombos mediante cuantificación con PCR en tiempo real de PF-4 en el modelo de trombosis venosa inducida con FeCl ₃		
Tratamiento	mg/kg	PF -4
PBS-FeCl ₃		0
PBS+FeCl ₃		100
LOVENOX	15	57
	30	33
	45	10
	60	5
LOVENOX (+ ISIS 404071)	15	0
	30	0
	45	11
	60	5

60 **Ejemplo 18: Efecto ex vivo de la inhibición antisentido del Factor 11 murino en combinación con LOVENOX sobre el sangrado**

Tratamiento

Se midió el sangrado de la cola para observar si el tratamiento con ISIS 404071 y LOVENOX causa hemorragia interna en ratones. Se administró ISIS 404071 por vía subcutánea a una dosis de 20 mg/kg dos veces por semana durante 3 semanas a 4 grupos de ratones BALB/c, y se administró LOVENOX por vía subcutánea en dosis variables de 15 mg/kg, 30 mg/kg, 45 mg/kg y 60 mg/kg una vez al día en los últimos tres días del tratamiento con ISIS 404071.

5 En un quinto grupo, se administró ISIS 404071 por vía subcutánea a ratones BALB/c a una dosis de 20 mg/kg dos veces a la semana durante 3 semanas. En un sexto grupo, se administró PBS por vía subcutánea dos veces a la semana durante tres semanas a ratones BALB/c, como control.

10 *Ensayo de sangrado de la cola*

Dos días después de recibir su tratamiento final, los ratones se colocaron en una cámara de sangrado de la cola. Se anestesió a los ratones en la cámara con isoflurano y se cortó una pequeña porción de cola (aproximadamente a 4 mm de la punta) con tijeras estériles. La cola cortada se colocó inmediatamente en un tubo Falcon de 15 ml lleno con aproximadamente 10 ml de solución tampón de NaCl al 0,9 % calentada a 37 °C. La sangre se recogió en el transcurso de 40 minutos. Los tubos llenos de solución salina se pesaron antes y después del sangrado.

15 Como se muestra en la Tabla 30, LOVENOX aumentó el sangrado en ratones en comparación con los ratones tratados con PBS. El aumento de las dosis de LOVENOX se correlacionó positivamente con una mayor pérdida de sangre. ISIS 404071 combinado con LOVENOX no aumentó significativamente el sangrado más allá del aumento de la pérdida de sangre que se muestra en los ratones tratados únicamente con LOVENOX.

25 **Tabla 30**

Ensayo de sangrado de cola que compara LOVENOX y la combinación de LOVENOX e ISIS 404071		
	Dosis en mg/kg	Sangre (g)
PBS		0,05
LOVENOX	15	0,11
	30	0,20
	45	0,27
	60	0,47
LOVENOX (+ISIS 404071)	15	0,14
	30	0,19
	45	0,36
	60	0,61

35 **Ejemplo 19: Efecto ex vivo de la inhibición antisentido del Factor 11 murino en combinación con LOVENOX sobre PT y aPTT**

40 *Tratamiento*

PT y aPTT se midieron usando PPP de ratones tratados con ISIS 404071 en combinación con LOVENOX. En la primera cohorte, se administró ISIS 404071 por vía subcutánea a ratones BALB/c a una dosis de 25 mg/kg dos veces a la semana durante 3 semanas. Se recogió plasma de estos ratones 5 días después de recibir la última dosis de ISIS 40407. En la segunda cohorte, se administró LOVENOX por vía subcutánea a ratones BALB/c a una dosis de 20 mg/kg una vez al día durante tres días. Se recogió plasma de estos ratones 4 horas después de recibir la última dosis de LOVENOX. En la tercera cohorte, se administró ISIS 404071 por vía subcutánea a ratones BALB/c a una dosis de 20 mg/kg dos veces a la semana durante 3 semanas, y 2 días después de recibir la última dosis de ISIS 404071, se administró LOVENOX por vía subcutánea a una dosis de 20 mg/kg una vez al día. Se recogió plasma de estos ratones 4 horas después de la última dosis de LOVENOX. En una cuarta cohorte, se administró PBS por vía subcutánea dos veces a la semana durante tres semanas, como control. Se recogió plasma de estos ratones 5 días después de la última dosis.

55 *Ensayo de PT y aPTT*

Los valores de PT y aPTT proporcionados en la Tabla 31 se indican como valores del índice internacional normalizado (INR). Como se muestra en la Tabla 31, el PT no se ve significativamente afectado por el tratamiento con ISIS 404071, LOVENOX o el tratamiento con ISIS 40471 combinado con LOVENOX. Estos datos sugieren que no existe un efecto combinatorio en el PT por ISIS 404071 combinado con LOVENOX. También se muestra en la Tabla 31, el tratamiento con LOVENOX y el tratamiento con ISIS 404071 combinado con LOVENOX aumentan el aPTT. Estos datos sugieren que el tratamiento combinado de ISIS 404071 y LOVENOX tiene un efecto aditivo sobre aPTT.

Tabla 31

Efecto de la combinación de ISIS 404071 y LOVENOX sobre PT y aPTT en plasma murino		
	INR de PT	INR de aPTT
ISIS 404071	0,95	1,31
LOVENOX	1,04	2,04
404071+LOVENOX	1,04	2,58

5

10 **Ejemplo 20: Efecto ex vivo de la inhibición antisentido del Factor 11 murino en combinación con apixabán sobre PT y aPTT**

Tratamiento

15 PT y aPTT se midieron usando PPP de ratones tratados con ISIS 404071 en combinación con apixabán. En la primera cohorte, se administró ISIS 404071 por vía subcutánea a ratones BALB/c a una dosis de 25 mg/kg dos veces a la semana durante 3 semanas. Se recogió plasma de estos ratones 5 días después de recibir la última dosis de ISIS 404071. En la segunda cohorte, se administró apixabán por vía subcutánea a ratones BALB/c a una dosis de 6 mg/kg dos veces al día durante tres días. Se recogió plasma de estos ratones 20 minutos después de recibir la última dosis de apixabán. En la tercera cohorte, se administró ISIS 404071 por vía subcutánea a ratones BALB/c a una dosis de 20 mg/kg dos veces a la semana durante 3 semanas, y se administró apixabán por vía subcutánea a una dosis de 6 mg/kg dos veces al día en los últimos tres días del tratamiento ISIS 404071. Se recogió plasma de estos ratones 20 minutos después de recibir la última dosis de apixabán. En una cuarta cohorte, se administró PBS por vía subcutánea dos veces a la semana durante tres semanas, como control. El plasma se recogió 5 días después de la última dosis de PBS.

25

Ensayo de PT y aPTT

30 Los valores de PT y aPTT proporcionados en la Tabla 32 se indican como valores del índice internacional normalizado (INR). Como se muestra en la Tabla 32, el PT no se ve significativamente afectado por el tratamiento con ISIS 404071. Sin embargo, apixabán y apixabán combinado con ISIS 404071 aumentaron el PT. También se muestra en la Tabla 32, apixabán, ISIS 404071 e ISIS 404071 combinados con apixabán aumentan el aPTT.

35

Tabla 32

Efecto de la combinación de ISIS 404071 y Apixabán sobre PT y aPTT en plasma murino		
	INR de PT	INR de aPTT
ISIS 404071	0,95	1,31
Apixabán	3,25	1,44
404071+Apixabán	3,50	2,26

40

45 **Ejemplo 21: Efecto ex vivo de la inhibición antisentido del Factor 11 murino en combinación con warfarina sobre PT y aPTT**

Tratamiento

50 PT y aPTT se midieron usando PPP de ratones tratados con ISIS 404071 en combinación con warfarina. Dos grupos de ratones BALB/c se trataron con 25 mg/kg o 50 mg/kg de ISIS 404071, administrados por vía subcutánea dos veces a la semana durante 3 semanas. Se recogió plasma de cada grupo 5 días después de la última dosis. En un tercer grupo, se trató a los ratones BALB/c con 2 mg/kg de warfarina una vez al día durante 5 días. El plasma se recogió 6 horas después de la última dosis de warfarina. Se trató a dos grupos adicionales de ratones BALB/c con 25 mg/kg o 50 mg/kg de ISIS 404071, administrados por vía subcutánea dos veces por semana durante 3 semanas y warfarina administrada por vía subcutánea a una dosis de 2 mg/kg una vez al día en los últimos 5 días de tratamiento con ISIS 404071. Se recolectó plasma de cada grupo 6 horas después del último tratamiento con warfarina. En un grupo final de ratones BALB/c, se administró PBS por vía subcutánea dos veces a la semana durante tres semanas como control. El plasma se recogió 5 días después del último tratamiento con PBS.

60 *Ensayo de PT y aPTT*

Los valores de PT y aPTT proporcionados en la Tabla 33 se indican como valores del índice internacional normalizado (INR). Como se muestra en la Tabla 33, la PT no se ve afectada por el tratamiento con PBS o ISIS 404071 en ninguna de las dosificaciones. Sin embargo, el tratamiento con 2 mg/kg de warfarina, 25 mg/kg de ISIS 404071 en combinación con 2 mg/kg de warfarina y 50 mg/kg de ISIS 404071 en combinación con 2 mg/kg de warfarina aumenta el PT. Estos datos sugieren que el tratamiento combinado de ISIS 404071 y warfarina tiene un

65

efecto aditivo sobre el PT. También se muestra en la Tabla 33, el aPTT se ve afectado por el tratamiento con ISIS 404071 y warfarina. La combinación de ISIS 404071 y warfarina muestra un aumento en el aPTT mayor que cualquier fármaco solo. Estos datos sugieren que el tratamiento combinado de ISIS 404071 y warfarina tiene un efecto sinérgico sobre aPTT. tiene un efecto aditivo sobre aPTT.

5

Tabla 33

Efecto de la combinación de ISIS 404071 y warfarina sobre PT y aPTT en plasma murino			
	Dosis en mg/kg	INR de PT	INR de aPTT
ISIS 404071	25	0,98	1,37
	50	0,93	1,49
Warfarina	2	21,33	2,52
ISIS 404071(+Warfarina)	25	25,77	4,45
	50	36,33	4,75

10

15

Ejemplo 22: Efecto antitrombótico in vivo de la inhibición antisentido del factor 11 murino en la trombosis de la vena mesentérica en ratones

20

Tratamiento

En una primera cohorte, se administró ISIS 404071 por vía subcutánea a ratones C57BL/6 dos veces a la semana durante tres semanas a una dosis de 50 mg/kg. En una segunda cohorte, se administró un oligonucleótido de control, ISIS 405277 (AAGGACCTACACTATGGAAT, oligonucleótido antisentido para el Factor 2), incorporado En el presente documento como SEQ ID NO: 12 por vía subcutánea a ratones C57B1/6 dos veces por semana durante tres semanas a una dosis de 50 mg/kg.

25

Preparación de plaquetas

30

recolectó sangre del plexo venoso retroorbital de ratones C57BL/6 vírgenes mediante punción y se recogió en tubos de polipropileno que contenían 300 μ l de heparina (30 U/ml). Se obtuvo plasma rico en plaquetas (PRP) por centrifugación a 1000 rpm durante 5 min. Se obtuvo plasma rico en plaquetas (PRP) por centrifugación a 1000 rpm durante 5 min. El PRP se transfirió a tubos frescos que contenían 2 μ l de prostaglandina I₂ (IGP₂) (2 μ g/ml) y se incubaron a 37 °C durante 5 min. Después de la centrifugación a 2600 rpm, los sedimentos se resuspendieron en 1 ml de tampón Tyrode-HEPES modificado (NaCl 137 mM, Na 0,3 mM₂HPO₄, KCl 2 mM, NaHCO 12 mM₃, HEPES 5 mM, glucosa 5 mM, BSA al 0,35 %, pH 7,2) que contiene 2 μ l de IGP₂ y se incubaron a 37 ° C durante 5 min. El sedimento suspendido se centrifugó a 2600 rpm durante 5 minutos. Para eliminar la IGP₂, la etapa de lavado se repitió dos veces y las plaquetas se marcaron fluorescentemente con calceína AM 2,5 μ g/ml (Molecular Probes, Eugene, OR) durante 10 minutos a temperatura ambiente.

35

40

Microscopia intravital para la trombosis

Se inyectó plaquetas marcadas fluorescentemente por vía intravenosa en ratones C57BL/6 tratados con ISIS 404071 y tratados con oligonucleótidos control. Se anestesió a los ratones con avertina al 2,5 % y se realizó una incisión a través de la pared abdominal para exponer venas mesentéricas de 250-300 μ m de diámetro y con una velocidad de cizalladura de aproximadamente 150 s.⁻¹. El mesenterio expuesto se mantuvo húmedo durante todo el experimento mediante perfusión periódica con PBS calentado (37 ° C). El mesenterio se transluminó con una fuente estabilizada de 12V, 100W, DC. Las venas se visualizaron usando un microscopio invertido Axiovert 135 de Zeiss (Alemania) (Diana 32X) conectado a un grabador de video SVHS (AG-6730; Panasonic, Tokio, Japón) usando una cámara de video CCD (Hamamatsu Photonic Systems, Hamamatsu City, Japón). Velocidad de los eritrocitos en la línea central (V_{rbc}) se midió utilizando un velocímetro Doppler óptico (Microcirculation Research Institute, Texas A & M College of Medicine, College Station, TX). Velocidad de los eritrocitos en la línea central (V_{rbc}) se midió utilizando un velocímetro Doppler óptico (Microcirculation Research Institute, Texas A & M College of Medicine, College Station, TX). La velocidad de cizallamiento venular (τ) se calculó con base en la Ley de Poiseuille para un fluido newtoniano, $\tau = 8 (V_{media}/RE_v)$, donde D_v es el diámetro de la vénula y V_{media} se estima a partir de la $V_{media,rbc}$ utilizando la correlación empírica $V_{media} = V_{rbc}/1.6$.

45

50

55

Resultados del análisis

60

La trombosis de la vena mesentérica se realizó dos días después de la última inyección de oligonucleótido antisentido. Se indujo trombosis aplicando papel Whatman empapado en FeCl al 10 %₃ solución durante 5 minutos en la vena mesentérica. La vena se controló durante 40 minutos o hasta la oclusión. Se observó el tiempo transcurrido antes del primer trombo de 30-50 μ m de diámetro y el tiempo transcurrido antes de que la sangre dejara de fluir durante 30 segundos.

65

Se produjo formación de trombos (30 μm de diámetro) en ratones tratados con ISIS 404071 a $14,8 \pm 1,7$ minutos. . La formación de trombos (30 μm de diámetro) se produjo en ratones control a $8,9 \pm 0,6$ minutos. Los trombos oclusivos se formaron en ratones control a los $19,3 \pm 0,8$ minutos y todas las vénulas lesionadas se ocluyeron. Por el contrario, la mayoría de las venas en ratones tratados con ISIS 404071 no se ocluyeron cuando la observación se terminó 40 minutos después de la lesión y aquellas venas que mostraban oclusión. La única vena que muestra oclusión en los ratones tratados con ISIS 404071 ocluyó a los 29,5 minutos y se volvió a abrir después de 5 minutos, antes del final del estudio.

10 Ejemplo 23: Antídoto-oligonucleótido sentido *In vivo* para la inhibición de antisentido del factor 11 murino en ratones BALB/c

Tratamiento

15 El efecto del oligonucleótido con sentido específico para ISIS 404071 como antídoto se probó en ratones BALB/c. En una primera cohorte, se administró ISIS 404071 por vía subcutánea a ratones BALB/c dos veces a la semana durante tres semanas a una dosis de 40 mg/kg. En una segunda cohorte, se administró ISIS 404057 por vía subcutánea a ratones BALB/c dos veces por semana durante tres semanas a una dosis de 40 mg/kg. El antídoto específico ISIS 404071, ISIS 418026 (CCTCTGAAAGTGGATTACCA, complementario a ISIS 404071), incorporado en el presente documento como SEQ ID NO: 13, se administró a ambas cohortes por vía subcutánea en una única inyección de 90 mg/kg 48 horas después del tratamiento final de ISIS 404071 o 404057. En una tercera cohorte, se administró ISIS 404071 por vía subcutánea a ratones BALB/c dos veces a la semana durante tres semanas a una dosis de 40 mg/kg. Después del último tratamiento de ISIS 404071, se inyectó a los ratones por vía subcutánea PBS. En una cuarta cohorte, se administró ISIS 404057 por vía subcutánea a ratones BALB/c dos veces por semana durante tres semanas a una dosis de 40 mg/kg. Después del último tratamiento de ISIS 404057, se inyectó a los ratones por vía subcutánea PBS. Después de la administración del antídoto, se sacrificó un grupo de 4 ratones de cada cohorte a las 12 horas, 1 día, 2 días, 3 días, 7 días y 14 días. Se extrajo el hígado completo para el análisis de ARN y se recogió PPP para el análisis de aPTT.

30 Análisis de ARN

Se extrajo el ARN del tejido hepático para el análisis de PCR en tiempo real del Factor 11. Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición del Factor 11, en relación con el control con PBS. Como se muestra en la Tabla 34, los ratones tratados con ISIS 404071 sin antídoto mostraron una disminución progresiva de la inhibición durante el período de observación de 14 días. Sin embargo, los ratones tratados con ISIS 404071 y antídoto mostraron una disminución acelerada de la inhibición durante el período de observación de 14 días en comparación con los ratones que no recibieron antídoto. También se muestra en la Tabla 34, el tratamiento con ISIS 418026 no tuvo ningún efecto sobre la inhibición de la expresión del ARNm del Factor 11 en ratones tratados con ISIS 404057.

Tabla 34

Porcentaje de inhibición del ARNm del factor 11 de ratón en comparación con el control de PBS						
	12 horas	1 días	2 días	3 días	7 días	14 días
ISIS 404071	93	90	89	88	81	67
ISIS 404071 + ISIS 418026	90	87	72	66	57	31
ISIS 404057	n.d.	n.d.	n.d.	95	n.d.	n.d.
ISIS 404057 + ISIS 418026	n.d.	n.d.	n.d.	97	n.d.	n.d.
n.d.= no data						

Ensayo de aPTT

55 Como se muestra en la Tabla 35, los ratones tratados con ISIS 404071 y antídoto (ISIS 418026) mostraron una disminución progresiva de aPTT durante el período de observación de 14 días en comparación con los ratones tratados con ISIS 404071 sin antídoto.

Tabla 35

Efecto del tratamiento antídoto sobre el aPTT INR						
	12 horas	1 días	2 días	3 días	7 días	14 días
ISIS 404071	1,51	1,30	1,35	1,27	1,18	1,05
ISIS 404071 + ISIS 418026	1,45	1,23	1,16	1,15	1,10	0,95

Ejemplo 24: Antídoto-proteína del factor 7a *In vivo* para la inhibición de antisentido del factor 11 murino en ratones BALB/c*Tratamiento*

5 El efecto de la proteína humana Factor 7a (Factor VIIa) como antídoto para ISIS 404071 se probó en ratones BALB/c. Se trataron dos grupos experimentales de ratones BALB/c con 20 mg/kg de ISIS 404071, administrados por vía subcutánea dos veces por semana durante 3 semanas. Dos grupos de control de ratones BALB/c se trataron con PBS , administrado por vía subcutánea dos veces por semana durante 3 semanas. La formación de trombos se indujo con FeCl₃ en todos los ratones excepto en el primer grupo de control. Quince minutos antes del tratamiento con FeCl₃, el primer grupo experimental se trató con 5 µg/kg de antídoto de proteína factor 7a humano (producto nº 407act, American Diagnostica Inc.). Dos días después de su última dosis, se anestesió a los ratones con 150 mg/kg de ketamina mezclada con 10 mg/kg de xilazina administrada por inyección intraperitoneal.

15 En ratones sometidos tratamiento con a FeCl₃, se indujo la formación de trombos aplicando un trozo de papel de filtro (2 x 4 mm) presaturado con una solución al 10 % de FeCl₃ directamente en la vena cava. Después de 3 minutos de exposición, se retiró el papel de filtro. Treinta minutos después de la aplicación del papel de filtro, se disecó una longitud fija de la vena que contenía el trombo para el análisis de plaquetas.

20 *Cuantificación de la composición plaquetaria*

La cuantificación por PCR en tiempo real del factor 4 plaquetario (PF-4) se utilizó para cuantificar las plaquetas en la vena cava como una medida de la formación de trombos. Los resultados se presentan como un porcentaje de PF-4 en ratones tratados y no tratados con antídoto PF-4, en comparación con los dos grupos de control tratados con PBS. . Como se muestra en la Tabla 36, los animales tratados con antídoto de proteína factor 7a humano expresaron más PF-4 en comparación con los animales tratados con ISIS 404071 solo. Estos datos indican que el Factor 7a humano tiene éxito en el rescate del efecto de la inhibición de oligonucleótidos antisentido.

Tabla 36

Análisis de la formación de trombos mediante cuantificación con PCR en tiempo real de PF-4 en el modelo de trombosis venosa inducida con FeCl ₃	
Tratamiento	PF -4
PBS-FeCl ₃	0
PBS+FeCl ₃	100
ISIS 404071	18
ISIS 404071+hFV7a	68

Ejemplo 25: Inhibición antisentido *in vivo* del factor 11 murino en el modelo de hemorragia intracerebral inducida por colagenasa*Tratamiento*

45 ISIS 404071 and warfarin (COUMADIN) were examined in the collagenase-induced intracerebral hemorrhage model. En una primera cohorte, se administró ISIS 404071 por vía subcutánea a ratones BALB/c dos veces a la semana durante tres semanas a una dosis de 40 mg/kg. En una segunda cohorte, se administró warfarina por vía subcutánea a ratones BALB/c dos veces por semana durante tres semanas a una dosis de 2 mg/kg. En una tercera cohorte, antídoto específico ISIS 11, ISIS 8 (CCTCTGAAAGTGGATTACCA, complementario a ISIS 404071), incorporado se en el presente documento como SEQ ID NO: 14) se administró por vía subcutánea a ratones BALB/c dos veces a la semana durante dos semanas a una dosis de 40 mg/kg. En una cuarta cohorte, se administró PBS a ratones BALB/c dos veces a la semana durante dos semanas..

55 Dos días después de recibir su dosis final, todos los ratones en todas las cohortes fueron anestesiados con 5 µg/g de Avertin. ontinuación, los ratones se inyectaron a -1 mm AP, 1 mm R ML, -4 mm DV del bregma plano cráneo con una jeringa Hamilton 10 l que contenía 0.075 U colagenasa (150 U/ml).. Se administró clagenasa durante 5 minutos y la aguja se mantuvo en su lugar para 5 minutos adicionales para prevenir el reflujo. Se administraron dos dosis de PLAVIX a los ratones el primer día y se administró una dosis de PLAVIX el día dos, dos horas antes de la cirugía.

60 La Tabla 37 presenta el volumen de hemorragia detectado en ratones después del tratamiento con colagenasa, la Tabla 38 presenta la puntuación de déficit neurológico de los ratones, y la Tabla 39 presenta la tasa de mortalidad de los ratones. El déficit neurológico se mide mediante un sistema de puntaje estándar en el que ninguna deficiencia es cero y el déficit severo es cinco. Colectivamente, los datos sugieren que ISIS 404071 no tuvo un efecto significativo sobre el tamaño hemorrágico, el puntaje de déficit neurológico o la mortalidad de los ratones. Por lo tanto, el riesgo de hemorragia intracerebral (un factor de riesgo para individuos tratados con warfarina) se reduce

significativamente en ratones tratados con ISIS 404071 en comparación con ratones tratados con warfarina.

Tabla 37

Volumen hemorrágico después del tratamiento con colagenasa	
	Volumen (mm ³)
PBS	51
ISIS 421208	41
ISIS 404071	38

Tabla 38

Puntuación del déficit neurológico después del tratamiento con colagenasa	
	Score
PBS	2,4
ISIS 421208	2,0
ISIS 404071	3,8

Tabla 39

Mortalidad después del tratamiento con colagenasa	
	% Mortalidad
PBS	0
ISIS 421208	0
ISIS 404071	20
Warfarina	80

Ejemplo 26: Efecto in vivo de la inhibición antisentido del factor 11 murino en combinación con PLAVIX en el modelo de trombosis venosa (TV) inducida con FeCl₃

Tratamiento

La combinación de ISIS 404071 y LOVENOX se evaluaron en el modelo de ratón de TV inducida por FeCl₃. La combinación de ISIS 404071 y PLAVIX se evaluó en el FeCl₃ modelo de ratón inducido VT. Cuatro grupos de ocho ratones BALB/c, que pesaban aproximadamente 25 g cada uno, se trataron con 6,25 mg/kg, 12,50 mg/kg, 25,00 mg/kg o 50,00 mg/kg de PLAVIX. Los ratones recibieron dos dosis de PLAVIX el primer día y una dosis de PLAVIX el día dos, dos horas antes de la cirugía.

Se trataron 4 grupos adicionales de ratones BALB/c con aproximadamente 25 g cada uno, 20 mg/kg de ISIS 404071, administrados por vía subcutánea dos veces por semana durante 3 semanas. Después de la última dosis de ISIS 404071, se trató a los ratones con 6,25 mg/kg, 12,50 mg/kg, 25,00 mg/kg o 50,00 mg/kg de LOVENOX, administrados PLAVIX-. Los ratones recibieron dos dosis de PLAVIX el primer día y una dosis de PLAVIX el día dos, dos horas antes de la cirugía.

Two control groups of eight BALB/c mice, weighing approximately 25 g each, were not treated with ISIS 404071 or PLAVIX. Se trataron dos grupos adicionales de ratones BALB/c con aproximadamente 25 g cada uno, 20 mg/kg de ISIS 404071, administrados por vía subcutánea dos veces por semana durante 3 semanas, pero no se trataron con PLAVIX. La formación de trombos se indujo con FeCl₃ en todos los ratones excepto en el primer o y tercer grupo de control. Se anestesió a todos los ratones con 150 mg/kg de ketamina mezclada con 10 mg/kg de oxilazina administrada por inyección intraperitoneal.

En ratones sometidos tratamiento con a FeCl₃, se indujo la formación de trombos aplicando un trozo de papel de filtro (2 x 4 mm) presaturado con una solución al 16 % de FeCl₃ directamente en la vena cava inferior. Después de 3 minutos de exposición, se retiró el papel de filtro. Treinta minutos después de la aplicación del papel de filtro, se disecó una longitud fija de la vena que contenía el trombo para el análisis de plaquetas.

Cuantificación de la composición plaquetaria

La cuantificación por PCR en tiempo real de PF-4 se utilizó para cuantificar las plaquetas en la vena cava como una medida de la formación de trombos. Como se muestra en la Tabla 40, el tratamiento con PLAVIX dio como resultado una reducción de PF-4 comparación con el control con PBS. El tratamiento con PLAVIXn combinación con ISIS 404071 dio como resultado una mayor reducción de PF-4 en comparación con PLAVIX solo. Por lo tanto, la combinación de terapia antiplaquetaria con Factor 11 ASO aumenta la actividad antitrombótica. Los datos se

presentan como porcentaje del ARNm de PF-4 en comparación con el PBS + FeCl₃ controlar.

Tabla 40

Análisis de la formación de trombos mediante cuantificación con PCR en tiempo real de PF-4 en el modelo de trombosis venosa inducida con FeCl ₃			
Tratamiento	ISIS 404071 mg/kg	PLAVIX mg/kg	PF -4
PBS-FeCl ₃	0	0	29
PBS+ FeCl ₃	0	0	100
Solo PLAVIX	0	6,25	59
	0	12,50	37
	0	25,00	30
	0	50,00	30
ISIS 404071-FeCl ₃	20	0	27
ISIS 404071+FeCl ₃	20	0	40
PLAVIX (+ ISIS 404071)	20	6,25	35
	20	12,50	38
	20	25,00	25
	20	50,00	35

Ejemplo 27: Efecto in vivo de la inhibición antisentido del factor 11 murino en combinación con PLAVIX sobre el sangrado

Tratamiento

Se midió la hemorragia de cola para observar si el tratamiento con ISIS 404071 en combinación con PLAVIX causa un aumento en la tendencia al sangrado. ISIS 404071 se administró por vía subcutánea a una dosis de 20 mg/kg dos veces por semana durante 3 semanas a 5 grupos de ocho ratones BALB/c. Después de la última dosis de ISIS 404071, los ratones se trataron con 0 mg/kg, 6,25 mg/kg, 12,50 mg/kg, 25,00 mg/kg o 50,00 mg/kg de PLAVIX. Se administraron dos dosis de PLAVIX a los ratones el primer día y se administró una dosis de PLAVIX el día dos, dos horas antes del sangrado.

Se trataron de forma similar 5 grupos adicionales de 8 ratones BABL/c, excepto que no recibieron inyecciones ISIS 404071.

Ensayo de sangrado de la cola

Dos horas después de recibir su tratamiento final, los ratones se colocaron en una cámara de sangrado de la cola. Se anestesió a los ratones en la cámara con isoflurano y se cortó una pequeña porción de cola (aproximadamente a 4 mm de la punta) con tijeras estériles. El corte de la cola se colocó inmediatamente en un tubo Falcon de 15 ml lleno con aproximadamente 10 ml de solución tampón de NaCl al 0,9 % calentada a 37 °C. La sangre se recogió en el transcurso de 40 minutos. Los tubos llenos de solución salina se pesaron antes y después del sangrado.

Tomados con los resultados del Ejemplo 26, estos datos muestran que la combinación de terapia antiplaquetaria con Factor 11 ASO aumenta la actividad antitrombótica sin aumentar el riesgo de sangrado.

Tabla 41

Ensayo de sangrado de cola que compara PLAVIX y la combinación de PLAVIX e ISIS 404071			
Tratamiento	ISIS 404071 mg/kg	PLAVIX mg/kg	Sangre (g)
sin tratamiento	0	0	0,040
Solo PLAVIX	0	6,25 mg/kg	0,075
	0	12,50 mg/kg	0,205
	0	25,00 mg/kg	0,524
	0	50,00 mg/kg	0,628
Solo ISIS 404071	20 mg/kg	0	0
PLAVIX (+ ISIS 404071)	20 mg/kg	6,25 mg/kg	0,065
	20 mg/kg	12,50 mg/kg	0,300
	20 mg/kg	25,00 mg/kg	0,401
	20 mg/kg	50,00 mg/kg	0,577

Example 28: Efecto in vivo de un inhibidor de molécula pequeña del Factor Xa en combinación con PLAVIX en el sangrado*Tratamiento*

Se midió el sangrado de la cola para observar si el tratamiento con una molécula pequeña del Factor 10a en combinación con PLAVIX causa un aumento en la tendencia al sangrado. Se trataron cinco grupos de ocho ratones BALB/c con 0 mg/kg, 6,25 mg/kg, 12,50 mg/kg, 25,00 mg/kg o 50,00 mg/kg de PLAVIX. Los ratones recibieron dos dosis de PLAVIX el primer día y una dosis de PLAVIX el día dos, dos horas antes del sangrado.

Se trataron cinco grupos adicionales de ocho ratones BALB/c con 0 mg/kg, 6,25 mg/kg, 12,50 mg/kg, 25,00 mg/kg o 50,00 mg/kg de PLAVIX. Los ratones recibieron dos dosis de PLAVIX el primer día y una dosis de PLAVIX el día dos, dos horas antes del sangrado. Estos ratones también se trataron con 0,5 mg/kg de Apixabán, un inhibidor del factor 10a de molécula pequeña, por vía intraperitoneal, una vez, 20 minutos antes del sangrado.

Ensayo de sangrado de la cola

Dos horas después de recibir su tratamiento final, los ratones se colocaron en una cámara de sangrado de la cola. Se anestesió a los ratones en la cámara con isoflurano y se cortó una pequeña porción de cola (aproximadamente a 4 mm de la punta) con tijeras estériles. El corte de la cola se colocó inmediatamente en un tubo Falcon de 15 ml lleno con aproximadamente 10 ml de solución tampón de NaCl al 0,9 % calentada a 37 °C. La sangre se recogió en el transcurso de 40 minutos. Los tubos llenos de solución salina se pesaron antes y después del sangrado.

Como se muestra a continuación en la Tabla 42, estos datos muestran que la combinación de terapia antiplaquetaria con un inhibidor del factor 10a de molécula pequeña, como Apixabán, aumenta el riesgo de hemorragia. Por lo tanto, el tratamiento con la combinación de terapia antiplaquetaria con Factor 11 ASO proporciona un mejor perfil de seguridad en comparación con el perfil de seguridad de una combinación de terapia antiplaquetaria con un inhibidor de factor 10a de molécula pequeña.

Tabla 42

Ensayo de sangrado de cola que compara PLAVIX, Apixabán y la combinación de PLAVIX y Apixabán			
Tratamiento	Apixabán mg/kg	PLAVIX mg/kg	Sangre (g)
sin tratamiento	0	0	0,002
Solo PLAVIX	0	6,25 mg/kg	0,061
	0	12,50 mg/kg	0,149
	0	25,00 mg/kg	0,246
	0	50,00 mg/kg	0,258
Solo apixabán	0,5 mg/kg	0	0,004
PLAVIX (+ Apixabán)	0,5 mg/kg	6,25 mg/kg	0,258
	0,5 mg/kg	12,50 mg/kg	0,252
	0,5 mg/kg	25,00 mg/kg	0,361
	0,5 mg/kg	50,00 mg/kg	0,363

Ejemplo 29: curso de tiempo de la reducción mediada por antisentido in vivo del Factor 11 murino y la correspondiente anticoagulación en sangre*Tratamiento*

Se observó el curso temporal de la reducción mediada por antisentido del ARNm de Factor 11 murino en ratones BALB/c. Se administró una dosis de 50 mg/kg de ISIS 404071 por vía subcutánea a ratones BALB/c. Después de la administración de ISIS 404071, se sacrificaron los ratones a las 12 horas, 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 7 días, 14 días, 28 días y 56 días. Se recogió hígado completo para el análisis de ARN y se recogió PPP para el análisis de aPTT. Un grupo control de ratones se trató con una dosis subcutánea de PBS.

Análisis de ARN

Se extrajo el ARN del tejido hepático para el análisis de PCR en tiempo real del Factor 11. Los resultados se presentan en relación con el control con PBS. Los ratones recuperaron la expresión completa del ARNm del Factor 11 el día 28 y los resultados del día 56 indican que el ARNm del Factor se mantuvo en niveles previos al tratamiento. Por lo tanto, los ratones tratados con ISIS 404071 no experimentaron un efecto de rebote.

El efecto de rebote se ha observado previamente en la reducción del Factor 11 mediada por anticuerpos (Blood, First Edition Paper, publicado en línea el 22 de octubre de 2008; Prevención de la oclusión del injerto vascular y la generación de trombina asociada al trombo por inhibición del factor XI). Debido a que la sobreexpresión de Factor 11

puede ser perjudicial al conducir a una coagulación aumentada, estos datos sugieren que la inhibición mediada por antisentido del Factor 11 es más segura que la inhibición mediada por anticuerpos del Factor 11 ya que la inhibición mediada por antisentido del Factor 11 no rebota.

5 **Ensayo de aPTT**

Los valores de aPTT proporcionados en la Tabla 43 se indican como valores del índice internacional normalizado (INR). Los valores de INR para aPTT se determinaron dividiendo el valor de aPTT para los ratones tratados con ISIS 404071 por el aPTT para el grupo tratado con PBS. Esta relación se elevó a la potencia del Índice de Sensibilidad Internacional (ISI) del factor tisular utilizado. Como se muestra en la Tabla 43, los ratones tratados con ISIS 404071 mostraron una disminución progresiva de aPTT hasta el día 4 y luego un aumento progresivo hasta los niveles de pretratamiento desde el día 7 hasta el día 28.

15

Tabla 43

Efecto del tratamiento ISIS 404071 sobre el aPTT INR									
	12 horas	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 7	Día 14	Día 28	Día 56
ISIS 404071	0	1,02	1,12	1,29	1,30	1,25	1,11	1,02	0

20

* los valores en la Tabla 43 son aproximados

Ejemplo 30: Inhibición antisentido del Factor 11 humano en células HepG2 por oligonucleótidos diseñados por microwalk

25

Se diseñaron gapmeros adicionales basados en ISIS 416850 e ISIS 416858 (ver la Tabla 8 anterior). Estos gapmeros se desplazaron ligeramente aguas arriba y aguas abajo (es decir, "microwalk") de ISIS 416850 e ISIS 416858. Los gapmeros de microwalk se diseñaron con motivos 5-8-5 MOE o 6-8-6 MOE.

30

Estos gapmeros microwalk fueron probados *in vitro*. Las células HepG2 cultivadas a una densidad de 20.000 células por pocillo se transfectaron usando electroporación con oligonucleótido antisentido 8,000 nM. Después de un período de tratamiento de aproximadamente 24 horas, se aisló ARN de las células y los niveles de ARNm del Factor 11 se midieron mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Los niveles de ARNm del factor 11 se ajustaron de acuerdo con el contenido total de ARN, según lo medido por RIBOGREEN. Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición del Factor 11, con respecto a las células de control no tratadas.

35

ISIS 416850 e ISIS 416858, así como los gapmeros seleccionados de las tablas 1 y 8 (es decir, ISIS 412206, ISIS 412223, ISIS 412224, ISIS 412225, ISIS 413481, ISIS 413482, ISIS 416825, ISIS 416848, ISIS 416849, ISIS 416850, ISIS 416851, ISIS 416852, ISIS 416853, ISIS 416854, ISIS 416855, ISIS 416856, ISIS 416857, ISIS 416858, ISIS 416859, ISIS 416860, ISIS 416861, ISIS 416862, ISIS 416863, ISIS 416864, ISIS 416865, ISIS 416866 e ISIS 416867) fueron reexaminados *in vitro* junto con los gapmeros de microwalk en las mismas condiciones que se describieron anteriormente.

40

Los oligonucleótidos antisentido quiméricos en la Tabla 44 se diseñaron como 5-10-5 MOE, 5-8-5 y 6-8-6 gapers MOE. Los dos primeros gapmeros listados en la Tabla 44 son los gapmeros originales (ISIS 416850 e ISIS 416858) a partir de los cuales ISIS 445493-445543 se diseñaron a través de microwalk, y se designan con un asterisco. Los gapmeros 5-10-5 tienen una longitud de 20 nucleótidos, en los que el segmento separador central está compuesto por diez 2'-desoxinucleótidos y está flanqueado en ambos lados (en las direcciones 5'y 3') por alas que comprenden cinco nucleótidos cada una. Los gapmeros 5-8-5 tienen una longitud de 18 nucleótidos, en los que el segmento separador central está compuesto por ocho 2'-desoxinucleótidos y está flanqueado en ambos lados (en las direcciones 5'y 3') por alas que comprenden cinco nucleótidos cada una. Los gapmeros 6-8-6 tienen una longitud de 20 nucleótidos, en los que el segmento separador central está compuesto por ocho 2'-desoxinucleótidos y está flanqueado en ambos lados (en las direcciones 5'y 3') por alas que comprenden seis nucleótidos cada una. Para cada uno de los motivos (5-10-5, 5-8-5 y 6-8-6), cada nucleótido en el segmento de ala en 5' y cada nucleótido en el segmento de ala 3' tiene una modificación de 2'-MOE. Los enlaces internucleosídicos a lo largo de cada gapmer son enlaces fosforotioato (P = S). Todos los residuos de citidina a lo largo de cada gapmer son 5-metilcitidinas. El "sitio de inicio de diana humano" indica el nucleótido 5'-más al que se dirige el gapmer en la secuencia humana. El "sitio de parada del diana humano" indica el nucleótido más 3'al que se dirige el gapmer en la secuencia humana. Cada gapmer enumerado en la Tabla 44 está dirigido a SEQ ID NO: 1 (GENBANK Accession No. NM_000128.3). Cada gapmer es la Tabla 44 también es totalmente reactivo de forma cruzada con la secuencia del gen del factor 11 del mono rhesus, designada en el presente documento como SEQ ID NO: 274 (exones 1-15 GENBANK N° de registro NW_001118167.1). El 'sitio de inicio del mono Rhesus' indica el nucleótido 5'más al que se dirige el gapmer en la secuencia del mono rhesus. El 'sitio de parada del mono Rhesus' indica el nucleótido 3'más al que se dirige el gapmer a la secuencia del mono rhesus.

65

Como se muestra en la Tabla 44, todos los gapmeros diseñados para microondas dirigidos a la región diana que

ES 2 657 679 T3

comienza en el sitio de inicio 1275 diana y termina en el sitio de detención diana 1317 (es decir, bases nucleotídicas 1275-1317) de SEQ ID NO: 1 exhibieron al menos 60 % inhibición del ARNm del Factor 11. De manera similar, todos los gapmeros re-evaluados de las Tablas 1 y 8 exhibieron al menos 60 % de inhibición.

5 Varios de los gapmeros exhiben al menos 70 % de inhibición, incluyendo números ISIS: ISIS 412206, 412224, 412225, 413481, 413482, 416825, 416848, 416849, 416850, 416851, 416852, 416853, 416854, 416855, 416856, 416857, 416858, 416859, 416860, 416861, 416862, 416863, 416864, 416865, 416866, 416867, 445494, 445495, 445496, 445497, 445498, 445499, 445500, 445501, 445502, 445503, 445504, 445505, 445506, 445507, 445508, 445509, 445510, 445511, 445512, 445513, 445514, 445515, 445516, 445517, 445518, 445519, 445520, 445521, 10 445522, 445523, 445524, 445525, 445526, 445527, 445528, 445529, 445530, 445531, 445532, 445533, 445534, 445535, 445536, 445537, 445538, 445539, 445540, 445541, 445542, y 445543.

Varios de los gapmeros exhiben al menos 80 % de inhibición, incluyendo números ISIS: ISIS 412206, 412224, 412225, 413481, 413482, 416825, 416848, 416849, 416850, 416851, 416852, 416853, 416854, 416855, 416856, 15 416857, 416858, 416859, 416860, 416861, 416862, 416863, 416864, 416865, 416866, 416867, 445494, 445495, 445496, 445497, 445498, 445500, 445501, 445502, 445503, 445504, 445505, 445506, 445507, 445508, 445509, 445510, 445513, 445514, 445519, 445520, 445521, 445522, 445525, 445526, 445529, 445530, 445531, 445532, 445533, 445534, 445535, 445536, 445538, 445541, y 445542.

20 Varios de los gapmeros exhiben al menos 90 % de inhibición, incluyendo números ISIS: ISIS 412206, 416825, 416850, 416857, 416858, 416861, 445522 y 445531.

Tabla 44

Inhibición de los niveles de ARNm del Factor 11 humano por oligonucleótidos antisentido quiméricos dirigidos a las bases nucleotídicas 1018 a 1042 de la SEC ID N°: 1 (N.º de acceso en GENBANK NM_000128.3) 1 (n.º de acceso en GENBANK NM_000128,3).								
N° ISIS	Sitio de inicio humano	Sitio de terminación humano	Secuencia (5' a 3')	Porcentaje de inhibición	Motivo	SEC N° ID	Sitio de inicio en mono rhesus	Sitio de terminación en mono rhesus
*416850	1278	1297	TGCACAGTTT CTGGCAGGCC	91	5-10-5	215	1277	1296
*416858	1288	1307	ACGGCATTGG TGCACAGTTT	90	5-10-5	223	1287	1306
416825	680	699	GCCCTTCATGT CTAGGTCCA	90	5-10-5	190	679	698
412206	738	757	CCGTGCATCTT TCTTGGCAT	91	5-10-5	34	737	756
412223	1275	1294	ACAGTTTCTG GCAGGCCTCG	62	5-10-5	51	1274	1293
445493	1275	1294	ACAGTTTCTG GCAGGCCTCG	69	6-8-6	51	1274	1293
445518	1275	1292	AGTTTCTGGC AGGCCTCG	75	5-8-5	242	1274	1291
416848	1276	1295	CACAGTTTCT GGCAGGCCTC	87	5-10-5	213	1275	1294
445494	1276	1295	CACAGTTTCT GGCAGGCCTC	85	6-8-6	213	1275	1294
445519	1276	1293	CAGTTTCTGG CAGGCCTC	81	5-8-5	243	1275	1292
416849	1277	1296	GCACAGTTTC TGGCAGGCCT	88	5-10-5	214	1276	1295
445495	1277	1296	GCACAGTTTC TGGCAGGCCT	89	6-8-6	214	1276	1295
445520	1277	1294	ACAGTTTCTG GCAGGCCT	82	5-8-5	244	1276	1293
445496	1278	1297	TGCACAGTTT CTGGCAGGCC	87	6-8-6	215	1277	1296
445521	1278	1295	CACAGTTTCT GGCAGGCC	87	5-8-5	245	1277	1294

ES 2 657 679 T3

(continua)

5	416851	1279	1298	GTGCACAGTT TCTGGCAGGC	89	5-10-5	216	1278	1297
	445497	1279	1298	GTGCACAGTT TCTGGCAGGC	81	6-8-6	216	1278	1297
	445522	1279	1296	GCACAGTTTC TGGCAGGC	91	5-8-5	246	1278	1295
10	413481	1280	1299	GGTGCACAGT TTCTGGCAGG	82	5-10-5	114	1279	1298
	445498	1280	1299	GGTGCACAGT TTCTGGCAGG	83	6-8-6	114	1279	1298
15	445523	1280	1297	TGCACAGTTT CTGGCAGG	73	5-8-5	267	1279	1296
	416852	1281	1300	TGGTGCACAG TTTCTGGCAG	87	5-10-5	217	1280	1299
	445499	1281	1300	TGGTGCACAG TTTCTGGCAG	75	6-8-6	217	1280	1299
20	445524	1281	1298	GTGCACAGTT TCTGGCAG	75	5-8-5	247	1280	1297
	416853	1282	1301	TTGGTGCACA GTTTCTGGCA	84	5-10-5	218	1281	1300
25	445500	1282	1301	TTGGTGCACA GTTTCTGGCA	81	6-8-6	218	1281	1300
	445525	1282	1299	GGTGCACAGT TTCTGGCA	85	5-8-5	248	1281	1298
30	416854	1283	1302	ATTGGTGCAC AGTTTCTGGC	86	5-10-5	219	1282	1301
	445501	1283	1302	ATTGGTGCAC AGTTTCTGGC	83	6-8-6	219	1282	1301
	445526	1283	1300	TGGTGCACAG TTTCTGGC	81	5-8-5	249	1282	1299
35	416855	1284	1303	CATTGGTGCA CAGTTTCTGG	85	5-10-5	220	1283	1302
	445502	1284	1303	CATTGGTGCA CAGTTTCTGG	83	6-8-6	220	1283	1302
40	445527	1284	1301	TTGGTGCACA GTTTCTGG	70	5-8-5	250	1283	1300
	412224	1285	1304	GCATTGGTGC ACAGTTTCTG	84	5-10-5	52	1284	1303
45	445503	1285	1304	GCATTGGTGC ACAGTTTCTG	89	6-8-6	52	1284	1303
	445528	1285	1302	ATTGGTGCAC AGTTTCTG	73	5-8-5	251	1284	1301
50	416856	1286	1305	GGCATTGGTG CACAGTTTCT	84	5-10-5	221	1285	1304
	445504	1286	1305	GGCATTGGTG CACAGTTTCT	87	6-8-6	221	1285	1304
	445529	1286	1303	CATTGGTGCA CAGTTTCT	85	5-8-5	252	1285	1302
55	416857	1287	1306	CGGCATTGGT GCACAGTTTC	91	5-10-5	222	1286	1305
	445505	1287	1306	CGGCATTGGT GCACAGTTTC	89	6-8-6	222	1286	1305
60	445530	1287	1304	GCATTGGTGC ACAGTTTC	83	5-8-5	253	1286	1303
	445506	1288	1307	ACGGCATTGG TGCACAGTTT	86	6-8-6	223	1287	1306

65

ES 2 657 679 T3

(continúa)

5	445531	1288	1305	GGCATTGGTG CACAGTTT	90	5-8-5	254	1287	1304
	416859	1289	1308	GACGGCATTG GTGCACAGTT	85	5-10-5	224	1288	1307
	445507	1289	1308	GACGGCATTG GTGCACAGTT	85	6-8-6	224	1288	1307
10	445532	1289	1306	CGGCATTGGT GCACAGTT	89	5-8-5	255	1288	1305
	413482	1290	1309	GGACGGCATT GGTGCACAGT	88	5-10-5	115	1289	1308
15	445508	1290	1309	GGACGGCATT GGTGCACAGT	81	6-8-6	115	1289	1308
	445533	1290	1307	ACGGCATTGG TGCACAGT	87	5-8-5	256	1289	1306
	416860	1291	1310	CGGACGGCAT TGGTGCACAG	89	5-10-5	225	1290	1309
20	445509	1291	1310	CGGACGGCAT TGGTGCACAG	84	6-8-6	225	1290	1309
	445534	1291	1308	GACGGCATTG GTGCACAG	82	5-8-5	257	1290	1307
25	416861	1292	1311	GCGGACGGCA TTGGTGCACA	90	5-10-5	226	1291	1310
	445510	1292	1311	GCGGACGGCA TTGGTGCACA	88	6-8-6	226	1291	1310
	445535	1292	1309	GGACGGCATT GGTGCACA	83	5-8-5	258	1291	1308
30	416862	1293	1312	AGCGGACGGC ATTGGTGCAC	89	5-10-5	227	1292	1311
	445511	1293	1312	AGCGGACGGC ATTGGTGCAC	77	6-8-6	227	1292	1311
35	445536	1293	1310	CGGACGGCAT TGGTGCAC	82	5-8-5	259	1292	1309
	416863	1294	1313	CAGCGGACGG CATTGGTGC	86	5-10-5	228	1293	1312
40	445512	1294	1313	CAGCGGACGG CATTGGTGC	79	6-8-6	228	1293	1312
	445537	1294	1311	GCGGACGGCA TTGGTGCACA	78	5-8-5	260	1293	1310
45	412225	1295	1314	GCAGCGGACG GCATTGGTGC	86	5-10-5	53	1294	1313
	445513	1295	1314	GCAGCGGACG GCATTGGTGC	85	6-8-6	53	1294	1313
	445538	1295	1312	AGCGGACGGC ATTGGTGC	80	5-8-5	261	1294	1311
50	416864	1296	1315	GGCAGCGGAC GGCATTGGTG	88	5-10-5	229	1295	1314
	445514	1296	1315	GGCAGCGGAC GGCATTGGTG	81	6-8-6	229	1295	1314
55	445539	1296	1313	CAGCGGACGG CATTGGTG	79	5-8-5	262	1295	1312
	416865	1297	1316	TGGCAGCGGA CGGCATTGGT	86	5-10-5	230	1296	1315
60	445515	1297	1316	TGGCAGCGGA CGGCATTGGT	75	6-8-6	230	1296	1315
	445540	1297	1314	GCAGCGGACG GCATTGGT	74	5-8-5	263	1296	1313

65

(continúa)

5	416866	1298	1317	CTGGCAGCGG ACGGCATTGG	84	5-10-5	231	1297	1316
	445516	1298	1317	CTGGCAGCGG ACGGCATTGG	79	6-8-6	231	1297	1316
	445541	1298	1315	GGCAGCGGAC GGCATTGG	80	5-8-5	264	1297	1314
10	416867	1299	1318	ACTGGCAGCG GACGGCATTG	85	5-10-5	232	1298	1317
	445517	1299	1318	ACTGGCAGCG GACGGCATTG	74	6-8-6	232	1298	1317
	445542	1299	1316	TGGCAGCGGA CGGCATTG	83	5-8-5	265	1298	1315
15	445543	1300	1317	CTGGCAGCGG ACGGCATT	74	5-8-5	266	1299	1316

Ejemplo 31: Inhibición antisentido dependiente de la dosis del factor 11 humano en células HepG2

Los gapmeros del ejemplo 30 que exhiben inhibición *in vitro* del Factor 11 humano se analizaron a diversas dosis en células HepB2. Las células se sembraron a una densidad de 20.000 células por pocillo y se transfectaron usando electroporación con concentraciones de 123,46 nM, 370,37 nM, 1.111,11 nM, 3.333,33 nM y 10.000 del oligonucleótido antisentido, como se especifica en la Tabla 45. El conjunto de sonda de cebador Factor 11 humano, RTS 2966, se usó para medir los niveles de ARNm. Los niveles de ARNm del factor 11 se ajustaron de acuerdo con un contenido de ARN total medido mediante RIBOGREEN. Los resultados se presentan en forma del porcentaje de inhibición del factor 11 respecto a las células control sin tratar. Como se ilustra en la Tabla 45, los niveles de A.RNm del Factor 11 se redujeron de una manera dependiente de la dosis en células tratadas con oligonucleótidos antisentido

La concentración inhibitoria semimáxima (CI₅₀) de cada oligonucleótido se calculó representando las concentraciones de oligonucleótidos antisentido utilizados frente al porcentaje de inhibición de la expresión del ARNm del Factor 11 logrado en cada concentración, y observando la concentración de oligonucleótido antisentido a la que se logró una inhibición del 50 % de la expresión de ARNm del Factor 11 en comparación con Control PBS. IC₅₀ los valores se presentan en la Tabla 45.

Tabla 45

Inhibición antisentido dependiente de la dosis del factor 11 humano en células HepG2 a través de la transfección de oligonucleótidos con electroporación						
Nº ISIS	123,47 nM	370,37 nM	1.111,11 nM	3.333,33 nM	10.000,0 nM	CI ₅₀ (µM)
416849	5	5	26	57	68	2,7
416850	0	12	36	74	73	2,8
416851	13	35	36	64	72	1,5
416856	12	23	35	59	83	1,6
416857	2	20	35	62	72	2,3
416858	0	27	36	64	70	2,2
416860	0	28	39	41	40	n.d.
416861	0	15	27	66	80	2,0
445498	3	1	27	50	58	4,8
445503	0	0	22	36	60	5,9
445504	8	20	38	53	68	2,7
445505	12	30	39	59	77	1,8
445522	0	0	44	63	74	2,9
445531	8	16	52	61	77	1,8
445532	5	12	39	60	70	2,0
n.d.= sin datos						

Ejemplo 32: Inhibición antisentido dependiente de la dosis del Factor 11 humano en células HepG2 por oligonucleótidos diseñados por microwalk

Se diseñaron gapmeros adicionales basados en ISIS 416850 e ISIS 416858 (ver la Tabla 8 anterior). Estos gapmeros se desplazan ligeramente hacia arriba y hacia abajo (es decir, microalineación) de ISIS 416850 e ISIS

416858. Gapmeros diseñados por microwalk tienen 3-8-3 MOE, 4-8-4 MOE, 2-10-2 MOE, 3-10-3 MOE, o 4-10-4 motivos MOE.

Estos gapmeros se probaron en diversas dosis en células HepG2. Las células se sembraron a una densidad de 20,000 células por pocillo y se transfectoron usando electroporación con 375 nM, 750 nM, 1.500 nM, 3.000 nM, 6.000 nM y concentraciones de oligonucleótido antisentido de 12.000 nM, como se especifica en la Tabla 47. Después de un período de tratamiento de aproximadamente 16 horas, se aisló ARN de las células y los niveles de ARNm del Factor 11 se midieron mediante PCR cuantitativa en tiempo real. El conjunto de sonda de cebador Factor 11 humano, RTS 2966, se usó para medir los niveles de ARNm. Los niveles de ARNm del factor 11 se ajustaron de acuerdo con el contenido total de ARN, según lo medido por RIBOGREEN. Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición del Factor 11, con respecto a las células de control no tratadas.

ISIS 416850, ISIS 416858, ISIS 445522 e ISIS 445531 (consulte la Tabla 45 anterior) se volvieron a probar *in vitro* junto con los gapmeros de microwalk en las mismas condiciones descritas anteriormente.

Los oligonucleótidos antisentido quiméricos en la Tabla 46 se diseñaron como 3-8-3 MOE, 4-8-4 MOE, 2-10-2 MOE, 3-10-3 MOE, o 4-10-4 MOE gapmeros. El gapmer 3-8-3 tiene una longitud de 14 nucleótidos, en el que el segmento separador central está compuesto por ocho 2'-desoxinucleótidos y está flanqueado en ambos lados (en las direcciones 5'y 3') por alas que comprenden tres nucleótidos cada una. El gapmer 4-8-4 tiene una longitud de 16 nucleótidos, en el que el segmento separador central está compuesto por ocho 2'-desoxinucleótidos y está flanqueado en ambos lados (en las direcciones 5'y 3') por alas que comprenden cuatro nucleótidos cada una. El gapmer 2-10-2 tiene una longitud de 14 nucleótidos, en el que el segmento separador central está compuesto por diez 2'-desoxinucleótidos y está flanqueado en ambos lados (en las direcciones 5'y 3') por alas que comprenden dos nucleótidos cada una. El gapmer 3-10-3 tiene una longitud de 16 nucleótidos, en el que el segmento separador central está comprendido a menudo 2'-desoxinucleótidos y está flanqueado en ambos lados (en las direcciones 5'y 3') por alas que comprenden tres nucleótidos cada una. El gapmer 4-10-4 tiene 18 nucleótidos de longitud, en el que el segmento separador central está compuesto por diez 2'-desoxinucleótidos y está flanqueado en ambos lados (en las direcciones 5'y 3') por alas que comprenden cuatro nucleótidos cada una. Para cada uno de los motivos (3-8-3, 4-8-4, 2-10-2, 3-10-3 y 4-10-4), cada nucleótido en el segmento de ala en 5' y cada nucleótido en el segmento de ala en 3' tiene una modificación de 2'-MOE. Los enlaces internucleosídicos a lo largo de cada gapmer son enlaces fosforotioato (P = S). Todos los residuos de citidina a lo largo de cada gapmer son 5-metilcitidinas. El "sitio de inicio de diana humano" indica el nucleótido 5'-más al que se dirige el gapmer en la secuencia humana. El "sitio de parada del diana humano" indica el nucleótido más 3'al que se dirige el gapmer en la secuencia humana. Cada gapmer enumerado en la Tabla 46 está dirigido a SEQ ID NO: 1 (GENBANK N° de Acceso NM_000128.3). Cada gapmer es la Tabla 46 también es totalmente reactivo de forma cruzada con la secuencia del gen del Factor 11 del mono rhesus, designada en el presente documento como SEQ ID NO: 274 (exones 1 - 15 GENBANK N° de Acceso NW_001118167.1). El 'sitio de inicio del mono Rhesus' indica el nucleótido 5'más al que se dirige el gapmer en la secuencia del mono rhesus. El 'sitio de parada del mono Rhesus' indica el nucleótido 3'más al que se dirige el gapmer a la secuencia del mono rhesus.

Tabla 46

Oligonucleótidos antisentido quiméricos dirigidos a la SEQ ID NO: 1 (número de acceso GENBANK NM_000128.3) y diseñados por microwalk de ISIS 416850 e ISIS 416858							
N° ISIS	Sitio de inicio diana humano	Sitio de terminación diana humano	Secuencia (5' a 3')	Motivo	SEQ ID No.	Sitio de inicio en mono rhesus	Sitio de terminación en mono rhesus
449707	1280	1295	CACAGTTT CTGGCAGG	4-8-4	268	1279	1294
449708	1281	1294	ACAGTTT CTGGCAG	3-8-3	269	1280	1293
449709	1279	1296	GCACAGTT TCTGGCAGGC	4-10-4	246	1278	1295
449710	1280	1295	CACAGTTT CTGGCAGG	3-10-3	268	1279	1294
449711	1281	1294	ACAGTTT CTGGCAG	2-10-2	269	1280	1293

Los datos de la inhibición de la dosis-respuesta se dan en la Tabla 47. Como se ilustra en la Tabla 47, los niveles de A.RNm del Factor 11 se redujeron de una manera dependiente de la dosis en células tratadas con oligonucleótidos antisentido. La CI₅₀ de cada oligonucleótido antisentido también se calculó y se presentó en la Tabla 47. Los dos primeros gapmeros enumerados en la Tabla 47 son los gapmeros originales (ISIS 416850 e ISIS 416858) a partir de los cuales los gapmeros restantes se diseñaron a través de microwalk y se designaron con un asterisco.

Tabla 47

Inhibición antisentido dependiente de la dosis del factor 11 humano en células HepG2 a través de la transfección de oligonucleótidos con electroporación							
Nº ISIS	375 nM	750 nM	1,500 nM	3.000 nM	6.000 nM	12.000 nM	CI ₅₀ (µM)
*416850	40	59	69	87	90	95	0,56
*416858	31	35	78	85	90	93	0,83
445522	59	71	83	82	81	92	n.d.
445531	44	64	78	86	91	93	0,44
449707	7	35	63	73	85	91	1,26
449708	0	0	22	33	61	85	4,46
449709	52	71	80	87	92	95	0,38
449710	2	21	52	70	82	87	1,59
449711	6	14	1	7	32	52	11,04
n.d.= sin datos							

Ejemplo 33: : Tolerabilidad de oligonucleótidos antisentido dirigidos al Factor 11 humano en ratones CD1

Los ratones CD1 se trataron con oligonucleótidos antisentido ISIS dirigidos al Factor 11 humano y se evaluaron los cambios en los niveles de diversos marcadores metabólicos.

Tratamiento

Se inyectaron grupos de cinco ratones CD1 por vía subcutánea dos veces por semana durante 2, 4 o 6 semanas con 50 mg/kg de ISIS 416825, ISIS 416826, ISIS 416838, ISIS 416850, ISIS 416858, ISIS 416864, ISIS 416892, ISIS 416925, ISIS 416999, ISIS 417002 o ISIS 417003. Un grupo de control de cinco ratones se inyectó por vía subcutánea con PBS durante 2 semanas. Todos los grupos experimentales (es decir, ratones tratados con ASO a las 2, 4, 6 semanas) se compararon con el grupo control (es decir, PBS, 2 semanas).

Tres días después de que se administró la última dosis a todos los grupos, se sacrificaron los ratones. Se midieron los pesos de los órganos y se recolectó la sangre para un análisis posterior.

Peso del órgano

Se midieron los pesos del hígado, el bazo y el riñón al final del estudio, y se presentan en las tablas 48, 49 y 50 como un porcentaje del control de PBS, normalizado al peso corporal. Esos oligonucleótidos antisentido que no afectaron a más de seis veces los aumentos en el peso del hígado y del bazo por encima de los controles de PBS se seleccionaron para estudios adicionales.

Tabla 48

Cambio porcentual en el peso del hígado de ratones CD1 después del tratamiento con oligonucleótidos antisentido			
Nº ISIS	2 semanas	4 semanas	6 semanas
416825	+5	+22	+13
416826	+10	+32	+33
416838	+8	-6	0
416850	+5	+3	+6
416858	+7	+1	+10
416864	-2	+2	-5
416925	+14	+14	+33
416999	+13	+30	+47
417002	+14	+8	+35
416892	+35	+88	+95
417003	+8	+42	+32

Tabla 49

Cambio porcentual en el peso del bazo de ratones CD1 después del tratamiento con oligonucleótidos antisentido			
Nº ISIS	2 semanas	4 semanas	6 semanas
416825	-12	+19	+21
416826	-12	-5	+22
416838	+21	-8	+9
416850	-4	+6	+48
416858	-2	+8	+28
416864	-10	-2	-6
416925	-7	+33	+78
416999	+7	+22	+38
417002	+29	+26	+108
416892	+24	+30	+65
417003	+12	+101	+98

Tabla 50

Cambio porcentual en el peso del riñón de ratones CD1 después del tratamiento con oligonucleótidos antisentido			
Nº ISIS	2 semanas	4 semanas	6 semanas
416825	-12	-12	-11
416826	-13	-7	-22
416838	-2	-12	-8
416850	-10	-12	-11
416858	+1	-18	-10
416864	-4	-9	-15
416925	-4	-14	-2
416999	-9	-6	-7
417002	+3	-5	-2
416892	+2	-3	+19
417003	-9	-2	-1

35 *Función hepática*

Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS sobre la función hepática, se midieron las concentraciones plasmáticas de transaminasas usando un analizador automático de química clínica (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Las mediciones de alanina transaminasa (ALT) y aspartato transaminasa (AST) se expresan en IU/L y los resultados se presentan en las tablas 51 y 52. Los niveles plasmáticos de bilirrubina y albúmina también se midieron utilizando el mismo analizador químico clínico y se expresaron en mg/dL. Los resultados se presentan en las Tablas 53 y 54. Esos oligonucleótidos antisentido que no afectaron un aumento en los niveles de ALT/AST por encima de siete veces los niveles de control se seleccionaron para estudios adicionales. Esos oligonucleótidos antisentido que no aumentaron los niveles de bilirrubina más del doble de los niveles de control se seleccionaron para estudios adicionales.

Tabla 51

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido en ALT (UI/l) en ratones CD1			
	2 semanas	4 semanas	6 semanas
PBS	36	n.d.	n.d.
ISIS 416825	64	314	507
ISIS 416826	182	126	1954
ISIS 416838	61	41	141
ISIS 416850	67	58	102
ISIS 416858	190	57	216
ISIS 416864	44	33	92
ISIS 416925	160	284	1284
ISIS 416999	61	160	1302
ISIS 417002	71	138	2579
ISIS 416892	66	1526	1939
ISIS 417003	192	362	2214
n.d.= sin datos			

Tabla 52

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido en AST (UI/l) en ratones CD1			
	2 semanas	4 semanas	6 semanas
PBS	68	n.d.	n.d.
ISIS 416825	82	239	301
ISIS 416826	274	156	1411
ISIS 416838	106	73	107
ISIS 416850	72	88	97
ISIS 416858	236	108	178
ISIS 416864	58	46	101
ISIS 416925	144	206	712
ISIS 416999	113	130	671
ISIS 417002	96	87	1166
ISIS 416892	121	1347	1443
ISIS 417003	152	249	839
n.d.= sin datos			

Tabla 53

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido en bilirrubina (UI/l) en ratones CD1			
	2 semanas	4 semanas	6 semanas
PBS	0,28	n.d.	n.d.
ISIS 416825	0,41	0,69	0,29
ISIS 416826	0,39	0,20	0,37
ISIS 416838	0,57	0,24	0,20
ISIS 416850	0,46	0,23	0,22
ISIS 416858	0,57	0,24	0,16
ISIS 416864	0,40	0,26	0,22
ISIS 416925	0,45	0,25	0,25
ISIS 416999	0,48	0,18	0,28
ISIS 417002	0,50	0,25	0,29
ISIS 416892	0,38	2,99	0,50
ISIS 417003	0,33	0,15	0,24
n.d.= sin datos			

Tabla 54

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido en albúmina (UI/l) en ratones CD1			
	2 semanas	4 semanas	6 semanas
PBS	3,7	n.d.	n.d.
ISIS 416825	3,6	3,4	3,5
ISIS 416826	3,3	3,4	3,4
ISIS 416838	3,5	3,8	3,6
ISIS 416850	3,6	3,5	3,1
ISIS 416858	3,4	3,5	2,8
ISIS 416864	3,5	3,6	3,5
ISIS 416925	3,5	3,5	3,2
ISIS 416999	3,4	3,3	3,2
ISIS 417002	3,2	3,4	3,4
ISIS 416892	3,2	4,0	4,4
ISIS 417003	3,4	3,4	3,2
n.d.= sin datos			

Función renal

Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS sobre la función renal, se midieron las concentraciones plasmáticas de nitrógeno ureico en sangre (BUN) y creatinina usando un analizador automático de química clínica (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Los resultados se presentan en las tablas 55 y 56, expresados en mg/dL. Esos oligonucleótidos antisentido que no afectaron más de dos veces el aumento en los niveles de BUN en comparación con el control de PBS se seleccionaron para estudios posteriores.

Tabla 55

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido en BUN (mg/dl) en ratones CD1			
	2 semanas	4 semanas	6 semanas
PBS	30	n.d.	n.d.
ISIS 416825	29	35	31
ISIS 416826	24	34	27
ISIS 416838	25	38	30
ISIS 416850	25	30	23
ISIS 416858	21	29	19
ISIS 416864	22	31	28
ISIS 416925	21	30	17
ISIS 416999	22	27	22
ISIS 417002	19	23	19
ISIS 416892	19	28	23
ISIS 417003	23	26	24
n.d.= sin datos			

Tabla 56

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido en creatinina (mg/dl) en ratones CD1			
	2 semanas	4 semanas	6 semanas
PBS	0,14	n.d.	n.d.
ISIS 416825	0,14	0,21	0,17
ISIS 416826	0,15	0,20	0,15
ISIS 416838	0,09	0,27	0,14
ISIS 416850	0,13	0,22	0,19
ISIS 416858	0,13	0,23	0,10
ISIS 416864	0,11	0,22	0,16
ISIS 416925	0,12	0,25	0,13
ISIS 416999	0,07	0,18	0,13
ISIS 417002	0,06	0,16	0,10
ISIS 416892	0,11	0,20	0,17
ISIS 417003	0,17	0,24	0,18
n.d.= sin datos			

Ensayos hematológicos

La sangre obtenida de todos los grupos de ratones se envió a Antech Diagnostics para el hematocrito (HCT), el volumen corpuscular medio (MCV), la hemoglobina corpuscular media (MCH) y las mediciones y análisis de la concentración de hemoglobina corpuscular (MCHC), así como las mediciones de los diversos células sanguíneas, tales como WBC (neutrófilos, linfocitos y monocitos), RBC y plaquetas, y contenido total de hemoglobina. Los resultados se presentan en las tablas 57-67. Los porcentajes que figuran en las tablas indican el porcentaje del recuento total de células sanguíneas. Esos oligonucleótidos antisentido que no afectaron a una disminución en el recuento de plaquetas de más del 50 % y/o un aumento en el recuento de monocitos de más de tres veces se seleccionaron para estudios adicionales.

Tabla 57

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre HCT (%) en ratones CD 1			
	2 semanas	4 semanas	6 semanas
PBS	50	n.d.	n.d.
ISIS 416825	49	46	40
ISIS 416826	47	41	37
ISIS 416838	42	44	39
ISIS 416850	44	44	38
ISIS 416858	50	45	46
ISIS 416864	50	45	42
ISIS 416925	51	47	47
ISIS 416999	51	42	40
ISIS 417002	44	44	51
ISIS 416892	48	42	45
ISIS 417003	48	41	43
n.d.= sin datos			

Tabla 58

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido en MCV (fl) en ratones CD1			
	2 semanas	4 semanas	6 semanas
PBS	61	n.d.	n.d.
ISIS 416825	58	53	51
ISIS 416826	56	52	53
ISIS 416838	56	54	48
ISIS 416850	57	51	50
ISIS 416858	59	51	50
ISIS 416864	57	52	51
ISIS 416925	61	52	47
ISIS 416999	60	49	48
ISIS 417002	61	50	52
ISIS 416892	59	49	53
ISIS 417003	60	48	45
n.d.= sin datos			

Tabla 59

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido en MCH (pgen ratones CD1			
Nº ISIS	2 semanas	4 semanas	6 semanas
PBS	18	n.d.	n.d.
ISIS 416825	17	16	15
ISIS 416826	17	16	16
ISIS 416838	17	17	15
ISIS 416850	17	16	15
ISIS 416858	17	16	15
ISIS 416864	18	16	16
ISIS 416925	17	16	15
ISIS 416999	17	16	15
ISIS 417002	17	16	16
ISIS 416892	18	16	16
ISIS 417003	17	16	16
n.d.= sin datos			

Tabla 60

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido en MCHC (%) ratones CD1			
	2 semanas	4 semanas	6 semanas
PBS	30	n.d.	n.d.
ISIS 416825	29	31	31
ISIS 416826	29	31	30
ISIS 416838	30	31	32
ISIS 416850	30	31	31
ISIS 416858	30	32	31
ISIS 416864	31	31	31
ISIS 416925	30	32	32
ISIS 416999	27	32	31
ISIS 417002	29	32	31
ISIS 416892	30	32	30
ISIS 417003	29	32	33
n.d.= sin datos			

Tabla 61

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido en el recuento de glóbulos blancos (células/nl) en ratones CD1			
	2 semanas	4 semanas	6 semanas
PBS	6	n.d.	n.d.
ISIS 416825	8	8	6
ISIS 416826	5	6	8
ISIS 416838	4	6	5
ISIS 416850	4	5	5
ISIS 416858	6	7	4
ISIS 416864	7	6	5
ISIS 416925	6	6	11
ISIS 416999	4	9	7
ISIS 417002	8	8	16
ISIS 416892	5	8	9
ISIS 417003	7	9	10
n.d.= sin datos			

Tabla 62

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido en el recuento de glóbulos rojos(células/nl) en ratones CD1			
	2 semanas	4 semanas	6 semanas
PBS	8	n.d.	n.d.
ISIS 416825	9	9	8
ISIS 416826	8	8	7
ISIS 416838	8	8	8
ISIS 416850	8	9	8
ISIS 416858	9	9	9
ISIS 416864	9	9	8
ISIS 416925	9	9	10
ISIS 416999	9	9	8
ISIS 417002	9	9	10
ISIS 416892	7	9	9
ISIS 417003	8	9	10
n.d.= sin datos			

Tabla 63

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre el recuento de neutrófilos (%) ratones CD1			
	2 semanas	4 semanas	6 semanas
PBS	16	n.d.	n.d.
ISIS 416825	15	43	23
ISIS 416826	26	33	23
ISIS 416838	19	33	31
ISIS 416850	15	21	16
ISIS 416858	14	24	27
ISIS 416864	13	27	20
ISIS 416925	12	39	33
ISIS 416999	12	25	22
ISIS 417002	14	31	36
ISIS 416892	19	43	28
ISIS 417003	10	39	24
n.d.= sin datos			

Tabla 64

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre el recuento de linfocitos (%) ratones CD1			
	2 semanas	4 semanas	6 semanas
PBS	81	n.d.	n.d.
ISIS 416825	82	53	71
ISIS 416826	70	61	67
ISIS 416838	76	64	60
ISIS 416850	82	73	76
ISIS 416858	83	73	65
ISIS 416864	84	71	74
ISIS 416925	86	58	57
ISIS 416999	86	72	69
ISIS 417002	83	64	51
ISIS 416892	79	52	64
ISIS 417003	86	54	66
n.d.= sin datos			

Tabla 65

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre el recuento de monocitos (%) ratones CD1			
	2 semanas	4 semanas	6 semanas
PBS	3	n.d.	n.d.
ISIS 416825	2	5	4
ISIS 416826	3	5	8
ISIS 416838	2	2	6
ISIS 416850	3	6	6
ISIS 416858	2	3	7
ISIS 416864	2	2	5
ISIS 416925	2	4	8
ISIS 416999	2	4	8
ISIS 417002	3	4	12
ISIS 416892	3	6	7
ISIS 417003	2	6	8
n.d.= sin datos			

Tabla 66

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido en el recuento de plaquetas (células/nl) en ratones CD1			
	2 semanas	4 semanas	6 semanas
PBS	2126	n.d.	n.d.
ISIS 416825	1689	1229	942
ISIS 416826	1498	970	645
ISIS 416838	1376	1547	1229
ISIS 416850	1264	1302	1211
ISIS 416858	2480	1364	1371
ISIS 416864	1924	1556	933
ISIS 416925	1509	1359	1211
ISIS 416999	1621	1219	1057
ISIS 417002	1864	1245	1211
ISIS 416892	1687	636	1004
ISIS 417003	1309	773	922
n.d.= sin datos			

Tabla 67

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre el contenido de hemoglobina (g/dl) en ratones CD1			
	2 semanas	4 semanas	6 semanas
PBS	15,1	n.d.	n.d.
ISIS 416825	14,5	14,1	12,1
ISIS 416826	13,4	12,8	11,0
ISIS 416838	12,4	13,6	12,6
ISIS 416850	13,1	13,5	11,6
ISIS 416858	14,8	14,2	14,1
ISIS 416864	15,2	13,9	13,0
ISIS 416925	14,9	14,8	15,3
ISIS 416999	14,2	13,3	12,8
ISIS 417002	14,7	14,0	15,7
ISIS 416892	13,0	13,5	13,1
ISIS 417003	13,7	13,4	14,0
n.d.= sin datos			

Ejemplo 34: Medida de la semivida del oligonucleótido antisentido en el hígado de ratones CD1

Los ratones CD1 se trataron con oligonucleótidos antisentido ISIS dirigidos al Factor 11 humano y se evaluó la vida media de los oligonucleótidos así como el tiempo transcurrido para la degradación y eliminación del oligonucleótido del hígado.

Tratamiento

Se inyectaron grupos de quince ratones CD1 cada uno por vía subcutánea dos veces por semana durante 2 semanas con 50 mg/kg de ISIS 416825, ISIS 416826, ISIS 416838, ISIS 416850, ISIS 416858, ISIS 416864, ISIS 416892, ISIS 416925, ISIS 416999, ISIS 417002, o ISIS 417003. Se sacrificaron cinco ratones de cada grupo 3 días, 28 días y 56 días después de la dosis final. Los hígados fueron cosechados para su análisis.

Medida de la concentración de oligonucleótidos

Se midió la concentración del oligonucleótido de longitud completa así como la concentración total de oligonucleótidos (incluida la forma degradada). El método utilizado es una modificación de métodos previamente publicados (Leeds et al., 1996; Geary et al., 1999) que consisten en una extracción de fenol-cloroformo (líquido-líquido) seguido de una extracción en fase sólida. Se añadió un patrón interno (ISIS 355868, un oligonucleótido de fosforotioato modificado con 2'-O-metoxietilo 27-mer, GCGTTTGCTCTTCTTGCGTTTTT, designado En el presente documento como SEQ ID NO: 270) antes de la extracción. Las concentraciones de muestra de tejido se calcularon usando curvas de calibración, con un límite inferior de cuantificación (LLOQ) de aproximadamente 1,14 µg/g. Las vidas medias se calcularon utilizando el software WinNonlin (PHARSIGHT).

Los resultados se presentan en las Tablas 68 y 69, expresados como µg/g de tejido hepático. La vida media de cada oligonucleótido se presenta en la Tabla 70.

Tabla 68

Concentración de oligonucleótidos de longitud completa (µg/g) en el hígado de ratones CD1				
Nº ISIS	Motivo	Día 3	Día 28	Día 56
416825	5-10-5	151	52	7
416826	5-10-5	186	48	8
416838	5-10-5	170	46	10
416850	5-10-5	238	93	51
416858	5-10-5	199	102	18
416864	5-10-5	146	38	25
416999	2-13-5	175	26	0
417002	2-13-5	119	24	1
417003	2-13-5	245	42	4
416925	3-14-3	167	39	5
416892	3-14-3	135	31	6

Tabla 69

Concentración de oligonucleótidos totales (µg/g) en el hígado de ratones CD1				
Nº ISIS	Motivo	Día 3	Día 28	Día 56
416825	5-10-5	187	90	39
416826	5-10-5	212	61	12
416838	5-10-5	216	98	56
416850	5-10-5	295	157	143
416858	5-10-5	273	185	56
416864	5-10-5	216	86	112
416999	2-13-5	232	51	0
417002	2-13-5	206	36	1
417003	2-13-5	353	74	4
416925	3-14-3	280	72	8
416892	3-14-3	195	54	6

Tabla 70

Semivida de los oligonucleótidos antisentido en el hígado de ratones CD1		
Nº ISIS	Motivo	Semivida (días)
416825	5-10-5	16
416826	5-10-5	13
416838	5-10-5	13
416850	5-10-5	18
416858	5-10-5	26
416864	5-10-5	13
416999	2-13-5	9
417002	2-13-5	11
417003	2-13-5	10
416925	3-14-3	12
416892	3-14-3	12

35 Ejemplo 35: Tolerabilidad de oligonucleótidos antisentido dirigidos al Factor 11 humano en ratas Sprague-Dawley

Se trataron ratas Sprague-Dawley con oligonucleótidos antisentido ISIS dirigidas al factor 11 humano y se evaluaron los cambios en los niveles de diversos marcadores metabólicos.

40 *Tratamiento*

Grupos de cuatro ratas Sprague Dawley fueron inyectadas por vía subcutánea dos veces por semana durante 6 semanas con 50 mg/kg de ISIS 416825, ISIS 416826, ISIS 416838, ISIS 416850, ISIS 416858, ISIS 416848, ISIS 416864, ISIS 416892, ISIS 416925, ISIS 416999, ISIS 417002 o ISIS 417003. Un grupo de control de cuatro ratas Sprague Dawley se inyectó por vía subcutánea con PBS dos veces por semana durante 6 semanas. Las mediciones de peso corporal se tomaron antes y durante todo el período de tratamiento. Se tomaron muestras de orina antes del inicio del tratamiento. Tres días después de la última dosis, se tomaron muestras de orina y se sacrificaron las ratas. Se midieron los pesos de los órganos y se recolectó la sangre para un análisis posterior.

50 *Peso corporal y peso del órgano*

Los pesos corporales de las ratas se midieron al inicio del estudio y posteriormente dos veces por semana. Los pesos corporales se presentan en la Tabla 71 y se expresan como un cambio porcentual sobre los pesos tomados al inicio del estudio. Los pesos del hígado, el bazo y el riñón se midieron al final del estudio y se presentan en la Tabla 71 como un porcentaje del control de la solución salina normalizado al peso corporal. Esos oligonucleótidos antisentido que no afectaron más de un aumento de seis veces en el peso del hígado y el bazo por encima del control de PBS se seleccionaron para estudios adicionales.

Tabla 71

Cambio porcentual en el peso del órgano de ratas Sprague Dawley después del tratamiento con oligonucleótidos antisentido				
Nº ISIS	Hígado	Bazo	Riñón	Peso corporal
416825	+20	+245	+25	-18
416826	+81	+537	+44	-40
416838	+8	+212	-0,5	-23
416850	+23	+354	+47	-33
416858	+8	+187	+5	-21
416864	+16	+204	+16	-24
416925	+44	+371	+48	-32
416999	+51	+405	+71	-37
417002	+27	+446	+63	-29
416892	+38	+151	+32	-39
417003	+51	+522	+25	-40

Función hepática

Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS sobre la función hepática, se midieron las concentraciones plasmáticas de transaminasas usando un analizador automático de química clínica (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Las mediciones de alanina transaminasa (ALT) y aspartato transaminasa (AST) se expresan en UI/l y los resultados se presentan en la Tabla 72. Aquellos oligonucleótidos antisentido que no afectaron un aumento en los niveles de ALT/AST por encima de siete veces de control fueron seleccionados para más estudios. Los niveles plasmáticos de bilirrubina y albúmina también se midieron con el mismo analizador clínico y los resultados también se presentan en la Tabla 72, expresados en mg/dl. Aquellos oligonucleótidos antisentido que no afectaron un aumento en los niveles de bilirrubina más del doble de los niveles de control por tratamiento con oligonucleótidos antisentido se seleccionaron para estudios adicionales.

Tabla 72

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre marcadores metabólicos en el hígado de ratas Sprague-Dawley				
	ALT (UI/l)	AST (UI/l)	Bilirrubina (mg/dl)	Albúmina (mg/dl)
PBS	9	5	20	2
ISIS 416825	89	17	4	2
ISIS 416826	611	104	115	6
ISIS 416838	5	2	4	2
ISIS 416850	80	5	1	4
ISIS 416858	13	4	4	2
ISIS 416864	471	68	3	4
ISIS 416925	102	20	13	5
ISIS 416999	92	28	54	5
ISIS 417002	44	11	12	3
ISIS 416892	113	183	1	8
ISIS 417003	138	23	50	6

Función renal

Para evaluar el efecto de la función renal, se midieron las concentraciones plasmáticas de nitrógeno ureico en sangre (BUN) y creatinina usando un analizador automático de química clínica (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Los resultados se presentan en la Tabla 73, expresados en mg/dl. Esos oligonucleótidos antisentido que no afectaron más de dos veces el aumento en los niveles de BUN en comparación con el control de PBS se seleccionaron para estudios posteriores. La relación de proteína urinaria a creatinina en muestras totales de orina también se calculó antes y después del tratamiento con oligonucleótidos antisentido y se presenta en la Tabla 74. Esos oligonucleótidos antisentido que no afectaron más de cinco veces el aumento en las proporciones proteína/creatinina en comparación con el control de PBS se seleccionó para estudios posteriores.

Tabla 73

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre marcadores metabólicos en el riñón de ratas Sprague-Dawley		
	BUN	Creatinina
PBS	4	8
ISIS 416825	7	17
ISIS 416826	25	6
ISIS 416838	4	5
ISIS 416850	5	7
ISIS 416858	8	4
ISIS 416864	5	6
ISIS 416925	7	5
ISIS 416999	2	4
ISIS 417002	11	1
ISIS 416892	188	1
ISIS 417003	9	9

Tabla 74

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre la proporción proteína/creatinina en la orina en ratas Sprague Dawley		
	Antes	Después
PBS	1,2	1,3
416825	1,1	5,4
416826	1,0	11,4
416838	1,2	3,7
416850	1,0	4,0
416858	0,9	4,4
416864	1,2	4,0
416925	1,0	4,3
416999	1,3	9,1
417002	1,0	2,4
416892	0,8	21,3
417003	0,9	4,8

Ensayos hematológicos

La sangre obtenida de todos los grupos de ratas se envió a Antech Diagnostics para mediciones de hematocrito (HCT), volumen corpuscular medio (MCV), hemoglobina corpuscular media (MCHC) y concentración media de hemoglobina corpuscular (MCHC), así como mediciones de diversos tipos de sangre células, tales como WBC (neutrófilos, linfocitos y monocitos), RBC y plaquetas, así como contenido de hemoglobina. Los resultados se presentan en las Tablas 75 y 76. Esos oligonucleótidos antisentido que no afectaron a una disminución en el recuento de plaquetas de más del 50 % y un aumento en el recuento de monocitos de más de tres veces se seleccionaron para estudios adicionales.

Tabla 75

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre el recuento células sanguíneas en ratas Sprague-Dawley						
	WBC (/nl)	RBC (/pl)	Neutrófilos (%)	Linfocitos (%)	Monocitos (%)	Plaquetas (10 ³ /μl)
PBS	21	6	37	7	26	18
ISIS 416825	22	2	25	3	15	6
ISIS 416826	7	5	30	5	7	11
ISIS 416838	13	4	17	3	6	27
ISIS 416850	16	7	48	8	11	26
ISIS 416858	28	2	20	3	10	19
ISIS 416864	15	4	26	2	29	12
ISIS 416925	24	6	20	4	23	8
ISIS 416999	12	5	23	3	20	12
ISIS 417002	23	5	22	4	25	7
ISIS 416892	68	12	92	18	58	66
ISIS 417003	83	11	17	3	6	19

Tabla 76

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre factores hematológicos (% control) en ratas Sprague-Dawley						
	Hemoglobina (g/dl)	HCT (%)	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (%)	
5	PBS	6	4	6	2	4
	ISIS 416825	2	2	4	2	4
	ISIS 416826	7	7	6	3	4
	ISIS 416838	2	5	4	2	5
10	ISIS 416850	4	5	3	4	2
	ISIS 416858	2	3	2	2	1
	ISIS 416864	4	2	4	2	4
	ISIS 416925	6	8	5	2	4
	ISIS 416999	6	5	2	3	1
15	ISIS 417002	5	7	7	3	5
	ISIS 416892	14	13	1	2	0
	ISIS 417003	11	8	6	4	4

20 **Ejemplo 36: Medición de la semivida del oligonucleótido antisentido en hígado y riñón de rata Sprague-Dawley**

Se trataron ratas Sprague Dawley con oligonucleótidos antisentido ISIS dirigidos al Factor 11 humano y se evaluó la vida media de los oligonucleótidos así como el tiempo transcurrido para la degradación y eliminación del oligonucleótido del hígado y el riñón.

Tratamiento

30 Grupos de cuatro ratas Sprague Dawley fueron inyectadas por vía subcutánea dos veces por semana durante 2 semanas con 20 mg/kg de ISIS416825, ISIS 416826, ISIS 416838, ISIS 416850, ISIS 416858, ISIS 416864, ISIS 416892, ISIS 416925, ISIS 416999, ISIS 417002 o ISIS 417003. Tres días después de la última dosis, las ratas se sacrificaron y se recogieron hígados y riñones para su análisis.

Medida de la concentración de oligonucleótidos

35 Se midió la concentración del oligonucleótido de longitud completa así como la concentración total de oligonucleótidos (incluida la forma degradada). El método utilizado es una modificación de métodos previamente publicados (Leeds et al., 1996; Geary et al., 1999) que consisten en una extracción de fenol-cloroformo (líquido-líquido) seguido de una extracción en fase sólida. Se añadió un patrón interno (ISIS 355868, un oligonucleótido de fosforotioato modificado con 2'-O-metoxietilo 27-mer, GCGTTTGCTCTTCTTCTTGCGTTTTT, designado En el presente documento como SEQ ID NO: 270) antes de la extracción. Las concentraciones de muestra de tejido se calcularon usando curvas de calibración, con un límite inferior de cuantificación (LLOQ) de aproximadamente 1,14 µg/g. Los resultados se presentan en las Tablas 77 y 78, expresados como µg/g de tejido hepático o renal. Las vidas medias se calcularon utilizando el software WinNonlin (PHARSIGHT).

Tabla 77

Concentración de oligonucleótidos de longitud completa (µg/g) en el hígado y riñón de ratas Sprague-Dawley				
Nº ISIS	Motivo	Riñón	Hígado	
50	416825	5-10-5	632	236
	416826	5-10-5	641	178
	416838	5-10-5	439	171
	416850	5-10-5	259	292
55	416858	5-10-5	575	255
	416864	5-10-5	317	130
	416999	2-13-5	358	267
	417002	2-13-5	291	118
60	417003	2-13-5	355	199
	416925	3-14-3	318	165
	416892	3-14-3	351	215

Tabla 78

Concentración de oligonucleótidos dtotales (µg/g) en el hígado y riñón de ratas Sprague-Dawley			
Nº ISIS	Motivo	Riñón	Hígado
416825	5-10-5	845	278
416826	5-10-5	775	214
416838	5-10-5	623	207
416850	5-10-5	352	346
416858	5-10-5	818	308
416864	5-10-5	516	209
416999	2-13-5	524	329
417002	2-13-5	490	183
417003	2-13-5	504	248
416925	3-14-3	642	267
416892	3-14-3	608	316

Tabla 79

Semivida (días) de los oligonucleótidos de ISIS en el hígado y el riñón de ratas Sprague-Dawley		
Nº ISIS	Motivo	Semivida
416825	5-10-5	16
416826	5-10-5	13
416838	5-10-5	13
416850	5-10-5	18
416858	5-10-5	26
416864	5-10-5	13
416999	2-13-5	9
417002	2-13-5	11
417003	2-13-5	10
416925	3-14-3	12
416892	3-14-3	12

Ejemplo 37: Tolerabilidad de oligonucleótidos antisentido dirigidos al Factor 11 humano en ratones CD1

Los ratones CD1 se trataron con oligonucleótidos antisentido ISIS dirigidos al Factor 11 humano y se evaluaron los cambios en los niveles de diversos marcadores metabólicos.

Tratamiento

Grupos de cinco ratones CD1 cada uno fueron inyectados por vía subcutánea dos veces por semana durante 6 semanas con 50 mg/kg de ISIS 412223, ISIS 412224, ISIS 412225, ISIS 413481, ISIS 413482, ISIS 416848, ISIS 416849, ISIS 416850, ISIS 416851, ISIS 416852, ISIS 416853, ISIS 416854, ISIS 416855, ISIS 416856, ISIS 416857, ISIS 416858, ISIS 416859, ISIS 416860, ISIS 416861, ISIS 416862, ISIS 416863, ISIS 416864, ISIS 416865, ISIS 416866, o ISIS 416867, o. Un grupo de control de diez ratones CD1 se inyectó por vía subcutánea con PBS dos veces por semana durante 6 semanas. Las mediciones de peso corporal se tomaron antes y durante todo el período de tratamiento. Tres días después de la última dosis, se sacrificaron los ratones, se midieron los pesos de los órganos y se recogió la sangre para un análisis posterior.

Peso corporal y peso de los órganos

El peso corporal se midió al inicio del estudio y posteriormente dos veces por semana. Los pesos corporales de los ratones se presentan en la Tabla 80 y se expresan aumentados en gramos sobre el peso de control de PBS tomado antes del inicio del tratamiento. Se midieron los pesos del hígado, el bazo y el riñón al final del estudio, y también se presentan en la Tabla 80 como porcentaje del peso corporal. Esos oligonucleótidos antisentido que no afectaron a más de seis veces los aumentos en el peso del hígado y el bazo por encima del control de PBS se seleccionaron para estudios adicionales.

Tabla 80

Cambio en el peso corporal y de los órganos de ratones CD1 después del tratamiento con oligonucleótidos antisentido					
	Hígado (%)	Riñón (%)	Bazo (%)	Peso corporal (g)	
5	PBS	5	1,5	0,3	7
	ISIS 416850	6	1,6	0,4	12
	ISIS 416858	7	1,6	0,6	12
	ISIS 416864	5	1,6	0,3	12
10	ISIS 412223	6	1,5	0,4	12
	ISIS 412224	6	1,6	0,5	10
	ISIS 412225	6	1,5	0,4	10
	ISIS 413481	6	1,5	0,5	9
	ISIS 413482	6	1,6	0,5	11
15	ISIS 416848	6	1,5	0,4	11
	ISIS 416849	8	1,5	0,4	8
	ISIS 416851	7	1,5	0,5	11
	ISIS 416852	6	1,5	0,4	10
	ISIS 416853	8	1,5	0,7	13
20	ISIS 416854	7	1,2	0,4	13
	ISIS 416855	8	1,4	0,6	12
	ISIS 416856	6	1,4	0,4	10
	ISIS 416857	7	1,6	0,5	10
25	ISIS 416859	6	1,5	0,4	10
	ISIS 416860	6	1,4	0,4	10
	ISIS 416861	5	1,3	0,4	9
	ISIS 416862	6	1,5	0,4	10
	ISIS 416863	5	1,5	0,4	9
30	ISIS 416865	6	1,5	0,4	8
	ISIS 416866	5	1,6	0,4	10
	ISIS 416867	5	1,4	0,4	9

35 *Función hepática*

Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS sobre la función hepática, se midieron las concentraciones plasmáticas de transaminasas usando un analizador automático de química clínica (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Las mediciones de alanina transaminasa (ALT) y aspartato transaminasa (AST) se expresan en UI/l y los resultados se presentan en la Tabla 81. Aquellos oligonucleótidos antisentido que no afectaron un aumento en los niveles de ALT/AST por encima de siete veces de control fueron seleccionados para más estudios. Los niveles plasmáticos de bilirrubina, colesterol y albúmina también se midieron usando el mismo analizador químico clínico y se presentan en la Tabla 81 expresados en mg/dl. Aquellos oligonucleótidos antisentido que no afectaron un aumento en los niveles de bilirrubina más del doble de los niveles de control por tratamiento con oligonucleótidos antisentido se seleccionaron para estudios adicionales.

Tabla 81

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre marcadores metabólicos en el hígado de ratones CD1						
	ALT (UI/l)	AST (UI/l)	Bilirrubina (mg/dl)	Albúmina (mg/dl)	Colesterol (mg/dl)	
50	PBS	32	68	0,25	3,7	135
	ISIS 416850	75	99	0,21	3,5	142
	ISIS 416858	640	547	0,28	4,4	181
55	ISIS 416864	36	67	0,19	2,6	152
	ISIS 412223	60	125	0,20	3,0	117
	ISIS 412224	214	183	0,19	3,4	114
	ISIS 412225	40	69	0,23	3,3	128
60	ISIS 413481	85	143	0,18	3,2	153
	ISIS 413482	54	77	0,24	3,0	138
	ISIS 416848	153	153	0,19	3,1	151
	ISIS 416849	1056	582	0,22	2,5	109
	ISIS 416851	47	76	0,19	3,1	106
65	ISIS 416852	49	91	0,16	4,9	125

(continúa)

5	ISIS 416853	1023	1087	0,25	3,1	164
	ISIS 416854	1613	1140	0,21	5,5	199
	ISIS 416855	786	580	0,25	4,2	162
	ISIS 416856	130	129	0,23	5,2	109
	ISIS 416857	370	269	0,22	3,7	94
	ISIS 416859	214	293	0,20	4,2	160
10	ISIS 416860	189	160	0,23	3,5	152
	ISIS 416861	38	85	0,27	4,3	133
	ISIS 416862	225	172	0,36	3,9	103
	ISIS 416863	41	101	0,24	3,6	118
	ISIS 416865	383	262	0,27	4,1	95
15	ISIS 416866	36	120	0,29	4,3	113
	ISIS 416867	45	82	0,21	3,3	144

Función renal

20 Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS en la función renal, se midieron las concentraciones plasmáticas de nitrógeno ureico en sangre (BUN) usando un analizador químico clínico automatizado y los resultados se presentan en la Tabla 82 expresada en mg/dl. Esos oligonucleótidos antisentido que no afectaron más de dos veces el aumento en los niveles de BUN en comparación con el control de PBS se seleccionaron para estudios posteriores.

Tabla 82

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre los niveles de BUN (mg/dl) en el riñón de ratones CD1	
	BUN
PBS	22
ISIS 416850	24
ISIS 416858	23
ISIS 416864	24
ISIS 412223	28
ISIS 412224	29
ISIS 412225	23
ISIS 413481	23
ISIS 413482	27
ISIS 416848	23
ISIS 416849	23
ISIS 416851	21
ISIS 416852	21
ISIS 416853	22
ISIS 416854	27
ISIS 416855	23
ISIS 416856	21
ISIS 416857	17
ISIS 416859	18
ISIS 416860	25
ISIS 416861	23
ISIS 416862	21
ISIS 416863	22
ISIS 416865	20
ISIS 416866	22
ISIS 416867	20

Ensayos hematológicos

65 La sangre obtenida de todos los grupos de ratones se envió a Antech Diagnostics para mediciones de hematocrito (HCT), así como mediciones de varias células sanguíneas, como WBC (neutrófilos, linfocitos y monocitos), glóbulos rojos y plaquetas, así como hemoglobina total análisis de contenido. Los resultados se presentan en las Tablas 83 y 84. Esos oligonucleótidos antisentido que no afectaron una disminución en el recuento de plaquetas de más del 50

% y un aumento en el recuento de monocitos de más de tres veces se seleccionaron para estudios adicionales.

Tabla 83

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre factores hematológicos en ratones CD1				
	RBC (10 ⁶ /μl)	Hemoglobina (g/dl)	HCT (%)	WBC (10 ³ /μl)
PBS	10	15	51	7
ISIS 416850	10	15	49	5
ISIS 416858	9	14	50	8
ISIS 416864	10	15	52	5
ISIS 412223	9	15	48	7
ISIS 412224	10	15	50	9
ISIS 412225	9	15	50	7
ISIS 413481	9	13	45	7
ISIS 413482	10	15	50	8
ISIS 416848	9	14	47	7
ISIS 416849	9	14	48	9
ISIS 416851	9	14	47	6
ISIS 416852	9	14	49	5
ISIS 416853	11	17	56	8
ISIS 416854	9	13	43	12
ISIS 416855	9	14	50	6
ISIS 416856	9	14	47	5
ISIS 416857	10	15	53	6
ISIS 416859	10	15	49	6
ISIS 416860	10	15	51	7
ISIS 416861	9	14	48	7
ISIS 416862	9	14	49	6
ISIS 416863	9	14	48	7
ISIS 416865	9	14	50	7
ISIS 416866	9	15	51	6
ISIS 416867	10	14	47	8

Tabla 84

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre el recuento de células sanguíneas ratones CD1				
	Neutrófilos (células/μl)	Linfocitos (células/μl)	Monocitos (células/μl)	Plaquetas (10 ³ /μl)
PBS	1023	6082	205	940
ISIS 416850	1144	4004	156	916
ISIS 416858	2229	5480	248	782
ISIS 416864	973	3921	141	750
ISIS 412223	1756	4599	200	862
ISIS 412224	2107	6284	195	647
ISIS 412225	1547	4969	293	574
ISIS 413481	1904	4329	204	841
ISIS 413482	1958	5584	275	818
ISIS 416848	1264	5268	180	953
ISIS 416849	1522	6967	253	744
ISIS 416851	1619	4162	194	984
ISIS 416852	1241	3646	189	903
ISIS 416853	2040	5184	225	801
ISIS 416854	2082	9375	455	1060
ISIS 416855	1443	4236	263	784
ISIS 416856	1292	3622	151	753
ISIS 416857	1334	3697	215	603
ISIS 416859	1561	4363	229	826
ISIS 416860	1291	4889	161	937
ISIS 416861	1122	5119	219	836
ISIS 416862	1118	4445	174	1007
ISIS 416863	1330	5617	226	1131
ISIS 416865	1227	5148	315	872
ISIS 416866	1201	4621	211	1045
ISIS 416867	1404	6078	188	1006

Ejemplo 38: Medida de la semivida del oligonucleótido antisentido en el hígado de ratón CD1

Quince oligonucleótidos antisentido que se habían evaluado en ratones CD1 (Ejemplo 37) se evaluaron adicionalmente. Los ratones CD1 se trataron con oligonucleótidos antisentido ISIS y se evaluó la vida media de los oligonucleótidos y el tiempo transcurrido para la degradación y eliminación de oligonucleótidos en el hígado.

Tratamiento

Se inyectaron grupos de quince ratones CD1 cada uno por vía subcutánea dos veces por semana durante 2 semanas con 50 mg/kg de ISIS 412223, ISIS 412225, ISIS 413481, ISIS 413482, ISIS 416851, ISIS 416852, ISIS 416856, ISIS 416860, ISIS 416861, ISIS 416863, ISIS 416866, ISIS 416867, ISIS 412224, ISIS 416848 o ISIS 416859. Se sacrificaron cinco ratones de cada grupo 3 días, 28 días y 56 días después de la última dosis, se recogieron los hígados para el análisis.

Medida de la concentración de oligonucleótidos

Se midió la concentración del oligonucleótido de longitud completa. El método utilizado es una modificación de métodos previamente publicados (Leeds et al., 1996; Geary et al., 1999) que consisten en una extracción de fenol-cloroformo (líquido-líquido) seguido de una extracción en fase sólida. Se añadió un patrón interno (ISIS 355868, un oligonucleótido de fosforotioato modificado con 2'-O-metoxietilo 27-mer, GCGTTTGCTCTTCTTCTTGCGTTTTT, designado En el presente documento como SEQ ID NO: 270) antes de la extracción. Las concentraciones de muestra de tejido se calcularon usando curvas de calibración, con un límite inferior de cuantificación (LLOQ) de aproximadamente 1,14 µg/g. Los resultados se presentan en la Tabla 85 expresada como µg/g de tejido hepático. La semivida de cada oligonucleótido también se presentó en la Tabla 85.

Tabla 85

Concentración de oligonucleótidos de longitud completa y semivida en el hígado de ratones CD1					
Nº ISIS	Motivo	Día 3	Día 28	Día 56	Semivida (días)
412223	5-10-5	276	127	52	21,9
412224	5-10-5	287	111	31	16,6
412225	5-10-5	279	91	47	20,7
413481	5-10-5	185	94	31	20,6
413482	5-10-5	262	95	40	19,5
416848	5-10-5	326	147	68	23,5
416851	5-10-5	319	147	68	23,8
416852	5-10-5	306	145	83	28,4
416856	5-10-5	313	115	46	19,2
416859	5-10-5	380	156	55	19,0
416860	5-10-5	216	96	36	20,6
416861	5-10-5	175	59	39	24,5
416863	5-10-5	311	101	48	19,8
416866	5-10-5	246	87	25	16,0
416867	5-10-5	246	87	35	18,9

Ejemplo 39: Tolerabilidad de oligonucleótidos antisentido dirigidos al Factor 11 humano en ratas Sprague-Dawley

Quince oligonucleótidos antisentido que se habían evaluado en ratones CD1 (Ejemplo 37) se evaluaron adicionalmente en ratas Sprague-Dawley para detectar cambios en los niveles de diversos marcadores metabólicos.

Tratamiento

Grupos de cuatro ratas Sprague Dawley fueron inyectados por vía subcutánea dos veces por semana durante 6 semanas con 50 mg/kg de ISIS 412223, ISIS 412224, ISIS 412225, ISIS 413481, ISIS 413482, ISIS 416848, ISIS 416851, ISIS 416852, ISIS 416856, ISIS 416859, ISIS 416860, ISIS 416861, ISIS 416863, ISIS 416866, o ISIS 416867. Un grupo de control de cuatro ratas Sprague Dawley se inyectó por vía subcutánea con PBS dos veces por semana durante 6 semanas. Las mediciones de peso corporal se tomaron antes y durante todo el período de tratamiento. Tres días después de la última dosis, se recogieron muestras de orina y luego se sacrificaron las ratas, se midieron los pesos de los órganos y se recogió la sangre para su posterior análisis.

Peso corporal y peso de los órganos

Los pesos corporales de las ratas se midieron al inicio del estudio y, posteriormente, dos veces por semana. Los pesos corporales se presentan en la Tabla 86 y se expresan como un aumento en gramos sobre el peso de control de PBS tomado antes del inicio del tratamiento. Los pesos del hígado, el bazo y el riñón se midieron al final del estudio, y también se presentan en la Tabla 86 como un porcentaje del peso corporal. Esos oligonucleótidos antisentido que no afectaron a más de seis veces los aumentos en el peso del hígado y el bazo por encima del control de PBS se seleccionaron para estudios adicionales.

Tabla 86

Cambio en el peso corporal y de los órganos de ratas Sprague Dawley después del tratamiento con oligonucleótidos antisentido				
	Peso corporal (g)	Hígado (%)	Riñón (%)	Bazo (%)
PBS	179	4	0,9	0,2
ISIS 412223	126	5	1,0	0,5
ISIS 412224	165	5	1,0	0,5
ISIS 412225	184	4	1,0	0,5
ISIS 413481	147	5	0,9	0,3
ISIS 413482	158	5	1,0	0,6
ISIS 416848	117	5	1,1	0,8
ISIS 416851	169	5	0,9	0,3
ISIS 416852	152	5	1,0	0,4
ISIS 416856	156	5	1,0	0,4
ISIS 416859	128	4	1,0	0,4
ISIS 416860	123	5	1,0	0,5
ISIS 416861	182	5	0,9	0,3
ISIS 416863	197	5	1,0	0,4
ISIS 416866	171	5	1,0	0,5
ISIS 416867	129	5	1,0	0,5

Función hepática

Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS sobre la función hepática, se midieron las concentraciones plasmáticas de transaminasas usando un analizador automático de química clínica (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Las mediciones de alanina transaminasa (ALT) y aspartato transaminasa (AST) se expresan en UI/l y los resultados se presentan en la Tabla 87. Aquellos oligonucleótidos antisentido que no afectaron un aumento en los niveles de ALT/AST por encima de siete veces de control fueron seleccionados para más estudios. Los niveles plasmáticos de bilirrubina y albúmina también se midieron usando el mismo analizador químico clínico y los resultados se presentan en la Tabla 87 y se expresan en mg/dl. Aquellos oligonucleótidos antisentido que no afectaron un aumento en los niveles de bilirrubina más del doble de los niveles de control por tratamiento con oligonucleótidos antisentido se seleccionaron para estudios adicionales.

Tabla 87

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre marcadores metabólicos en el hígado de ratas Sprague-Dawley				
	ALT (UI/l)	AST (UI/l)	Bilirrubina (mg/dl)	Albúmina (mg/dl)
PBS	42	71	0,13	4
ISIS 412223	85	180	0,14	5
ISIS 412224	84	132	0,12	4
ISIS 412225	48	108	0,15	5
ISIS 413481	54	80	0,22	4
ISIS 413482	59	157	0,14	4
ISIS 416848	89	236	0,14	3
ISIS 416851	64	91	0,14	4
ISIS 416852	49	87	0,15	4
ISIS 416856	123	222	0,13	4
ISIS 416859	114	206	0,21	5
ISIS 416860	70	157	0,15	4
ISIS 416861	89	154	0,15	5
ISIS 416863	47	78	0,13	4
ISIS 416866	41	78	0,16	4
ISIS 416867	47	126	0,17	4

Función renal

Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS sobre la función renal, se midieron las concentraciones plasmáticas de nitrógeno ureico en sangre (BUN) y creatinina usando un analizador automático de química clínica (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Los resultados se presentan en la Tabla 88, expresados en mg/dl. Esos oligonucleótidos antisentido que no afectaron más de dos veces el aumento en los niveles de BUN en comparación con el control de PBS se seleccionaron para estudios posteriores. La proteína urinaria total y la proporción de proteína urinaria a creatinina en muestras totales de orina después del tratamiento con oligonucleótidos antisentido se calculó y también se presenta en la Tabla 88. Esos oligonucleótidos antisentido que no afectaron más de cinco veces el aumento de las proporciones proteína/creatinina en la orina al control PBS fueron seleccionados para estudios adicionales.

Tabla 88

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre marcadores metabólicos en el riñón de ratas Sprague-Dawley				
	BUN (mg/dl)	Creatinina (mg/dl)	Proteína total en orina (mg/dl)	Relación proteína en orina/creatinina
PBS	19	38	60	1,7
ISIS 412223	24	46	224	4,6
ISIS 412224	24	44	171	3,8
ISIS 412225	23	58	209	4,0
ISIS 413481	26	45	148	3,6
ISIS 413482	23	34	157	4,8
ISIS 416848	26	64	231	3,9
ISIS 416851	24	70	286	4,0
ISIS 416852	25	60	189	3,0
ISIS 416856	23	48	128	2,7
ISIS 416859	24	44	144	3,3
ISIS 416860	23	58	242	4,6
ISIS 416861	22	39	205	5,1
ISIS 416863	29	73	269	3,8
ISIS 416866	22	85	486	6,2
ISIS 416867	22	70	217	3,1

Ensayos hematológicos

La sangre obtenida de todos los grupos de ratas se envió a Antech Diagnostics para mediciones de hematocrito (HCT), así como mediciones de varias células sanguíneas, como WBC (neutrófilos y linfocitos), glóbulos rojos y plaquetas, y el contenido total de hemoglobina. Los resultados se presentan en las Tablas 89 y 90. Esos oligonucleótidos antisentido que no afectaron a una disminución en el recuento de plaquetas de más del 50 % y un aumento en el recuento de monocitos de más de tres veces se seleccionaron para estudios adicionales.

Tabla 89

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre factores hematológicos en ratas Sprague-Dawley

	RBC (10 ⁶ /ml)	Hemoglobina (g/dl)	HCT (%)	WBC (10 ³ /ml)	
5	PBS	6,9	13,2	42	9
	ISIS 412223	7,2	13,1	41	20
	ISIS 412224	7,4	13,4	42	20
	ISIS 412225	7,4	13,4	42	15
10	ISIS 413481	7,5	14,2	43	14
	ISIS 413482	7,1	13,2	40	13
	ISIS 416848	6,0	11,1	35	17
	ISIS 416851	7,4	13,7	42	11
	ISIS 416852	7,2	13,4	42	13
15	ISIS 416856	7,7	14,1	43	19
	ISIS 416859	7,8	14,0	45	16
	ISIS 416860	7,8	14,1	45	17
	ISIS 416861	7,7	14,6	45	15
	ISIS 416863	7,6	14,1	45	17
20	ISIS 416866	7,8	14,0	44	20
	ISIS 416867	7,8	14,0	45	14

Tabla 90

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre el recuento células sanguíneas en ratas Sprague-Dawley

	Neutrófilos (/ml)	Linfocitos (/ml)	Plaquetas (10 ³ /ml)	
25	PBS	988	7307	485
	ISIS 412223	1826	16990	567
	ISIS 412224	1865	16807	685
30	ISIS 412225	1499	13204	673
	ISIS 413481	1046	12707	552
	ISIS 413482	1125	11430	641
	ISIS 416848	1874	14316	384
35	ISIS 416851	1001	9911	734
	ISIS 416852	836	11956	632
	ISIS 416856	3280	14328	740
	ISIS 416859	1414	14323	853
	ISIS 416860	1841	13986	669
40	ISIS 416861	1813	12865	1008
	ISIS 416863	1720	14669	674
	ISIS 416866	1916	16834	900
	ISIS 416867	3044	10405	705

45 Ejemplo 40: Medición de la semivida del oligonucleótido antisentido en hígado y riñón de ratas Sprague-Dawley

50 Se trataron ratas Sprague Dawley con oligonucleótidos antisentido ISIS dirigidas al Factor 11 humano y se evaluó la vida media de los oligonucleótidos así como el tiempo transcurrido para la degradación y eliminación del oligonucleótido del hígado y el riñón.

Tratamiento

55 Grupos de cuatro ratas Sprague Dawley fueron inyectados por vía subcutánea dos veces por semana durante 2 semanas con 20 mg/kg de ISIS 412223, ISIS 412224, ISIS 412225, ISIS 413481, ISIS 413482, ISIS 416848, ISIS 416851, ISIS 416852, ISIS 416856, ISIS 416859, ISIS 416860, ISIS 416861, ISIS 416863, ISIS 416866, o ISIS 416867. Tres días después de la última dosis, las ratas fueron sacrificadas, y se recogieron hígados y riñones.

60 Medida de la concentración de oligonucleótidos

65 Se midió la concentración del oligonucleótido de longitud completa así como la concentración total de oligonucleótidos (incluida la forma degradada). El método utilizado es una modificación de métodos previamente publicados (Leeds et al., 1996; Geary et al., 1999) que consisten en una extracción de fenol-cloroformo (líquido-líquido) seguido de una extracción en fase sólida. Se añadió un patrón interno (ISIS 355868, un oligonucleótido de

fosforotioato modificado con 2'-O-metoxietilo 27-mer, GCGTTTGCTCTTCTTCTTGCCTTTTTT, designado En el presente documento como SEQ ID NO: 270) antes de la extracción. Las concentraciones de muestra de tejido se calcularon usando curvas de calibración, con un límite inferior de cuantificación (LLOQ) de aproximadamente 1,14 µg/g. Los resultados se presentan en las tablas 91 y 92, expresados como µg/g de tejido hepático o renal. Las vidas medias se calcularon utilizando el software WinNonlin (PHARSIGHT).

Tabla 91

Concentración de oligonucleótidos de longitud completa (µg/g) en el hígado y riñón de ratas Sprague-Dawley			
Nº ISIS	Motivo	Riñón	Hígado
412223	5-10-5	551	97
412224	5-10-5	487	107
412225	5-10-5	202	119
413481	5-10-5	594	135
413482	5-10-5	241	95
416848	5-10-5	488	130
416851	5-10-5	264	193
416852	5-10-5	399	108
416856	5-10-5	378	84
416859	5-10-5	253	117
416860	5-10-5	247	94
416861	5-10-5	187	159
416863	5-10-5	239	82
416866	5-10-5	210	98
416867	5-10-5	201	112

Tabla 92

Concentración de oligonucleótidos dtotales (µg/g) en el hígado y riñón de ratas Sprague-Dawley			
Nº ISIS	Motivo	Riñón	Hígado
412223	5-10-5	395	86
412224	5-10-5	292	78
412225	5-10-5	189	117
413481	5-10-5	366	96
413482	5-10-5	217	91
416848	5-10-5	414	115
416851	5-10-5	204	178
416852	5-10-5	304	87
416856	5-10-5	313	80
416859	5-10-5	209	112
416860	5-10-5	151	76
416861	5-10-5	165	144
416863	5-10-5	203	79
416866	5-10-5	145	85
416867	5-10-5	157	98

Tabla 93

Semivida (días) de los oligonucleótidos de ISIS en el hígado y el riñón de ratas Sprague-Dawley		
Nº ISIS	Motivo	Semivida
412223	5-10-5	22
412224	5-10-5	17
412225	5-10-5	21
413481	5-10-5	21
413482	5-10-5	20
416848	5-10-5	24
416851	5-10-5	24
416852	5-10-5	28
416856	5-10-5	19
416859	5-10-5	19
416860	5-10-5	21
416861	5-10-5	25
416863	5-10-5	20
416866	5-10-5	16
416867	5-10-5	19

Ejemplo 41: Tolerancia de oligonucleótidos antisentido dirigidos al Factor 11 humano en ratones CD1

Los oligonucleótidos ISIS con 6-8-6 MOE y 5-8-5 MOE motivos dirigidos al factor humano 11 se administraron en ratones CD1 evaluados por los cambios en los niveles de varios marcadores metabólicos.

Tratamiento

Grupos de cinco ratones CD1 fueron inyectados por vía subcutánea dos veces por semana durante 6 semanas con 50 mg/kg de ISIS 416850, ISIS 445498, ISIS 445503, ISIS 445504, ISIS 445505, ISIS 445509, ISIS 445513, ISIS 445522, ISIS 445530, ISIS 445531, o ISIS 445532. Un grupo de control de cinco ratones CD1 se inyectó por vía subcutánea con PBS dos veces por semana durante 6 semanas. Las mediciones del peso corporal se tomaron antes y al final del periodo de tratamiento. Tres días después de la última dosis, se sacrificaron los ratones, se midieron los pesos de los órganos y se recogió la sangre para un análisis posterior.

Peso corporal y peso del órgano

Los cambios de peso corporal en los ratones se presentan en la Tabla 94 y se expresan aumento en gramos sobre el peso de control PBS tomado antes del inicio del tratamiento. Los pesos del hígado, el bazo y el riñón se midieron al final del estudio, y también se presentan en la Tabla 94 como porcentaje del peso corporal. Esos oligonucleótidos antisentido que no afectaron a más de seis veces los aumentos en el peso del hígado y el bazo por encima del control de PBS se seleccionaron para estudios adicionales.

Tabla 94

Cambio en el peso corporal y de los órganos de ratones CD1 después del tratamiento con oligonucleótidos antisentido				
	Peso corporal (g)	Hígado (%)	Riñón (%)	Bazo (%)
PBS	10	5	1,6	0,3
ISIS 416850	11	6	1,5	0,4
ISIS 445498	10	6	1,6	0,5
ISIS 445503	9	8	1,4	0,6
ISIS 445504	11	6	1,6	0,4
ISIS 445505	12	6	1,5	0,5
ISIS 445509	10	6	1,6	0,5
ISIS 445513	9	5	1,6	0,4
ISIS 445522	11	6	1,7	0,4
ISIS 445530	11	6	1,5	0,5
ISIS 445531	10	6	1,5	0,5
ISIS 445532	10	6	1,6	0,4

Función hepática

Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS sobre la función hepática, se midieron las concentraciones plasmáticas de transaminasas usando un analizador automático de química clínica (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Las medidas de alanina transaminasa (ALT) y aspartato transaminasa (AST) se expresan en UI/l y los resultados se presentan en la Tabla 95. Aquellos oligonucleótidos antisentido que no afectaron un aumento en los niveles de ALT/AST por encima de siete veces de los niveles de control fueron seleccionados para más estudios. Los niveles plasmáticos de bilirrubina y albúmina también se midieron y los resultados también se presentan en la Tabla 95 y se expresan en mg/dl. Aquellos oligonucleótidos antisentido que no afectaron un aumento en los niveles de bilirrubina más del doble de los niveles de control por tratamiento con oligonucleótidos antisentido se seleccionaron para estudios adicionales.

Tabla 95

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre marcadores metabólicos en el hígado de ratones CD1				
	ALT (UI/l)	AST (UI/l)	Bilirrubina (mg/dl)	Albúmina (mg/dl)
PBS	34	49	0,23	3,6
ISIS 416850	90	115	0,20	3,2
ISIS 445498	66	102	0,24	3,4
ISIS 445503	1314	852	0,28	3,4
ISIS 445504	71	107	0,17	3,4
ISIS 445505	116	153	0,18	3,2
ISIS 445509	80	117	0,17	3,1
ISIS 445513	37	84	0,22	3,1
ISIS 445522	51	110	0,19	3,4
ISIS 445530	104	136	0,18	3,2
ISIS 445531	60	127	0,16	3,2
ISIS 445532	395	360	0,20	2,9

Función renal

Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS sobre la función renal, se midieron las concentraciones plasmáticas de nitrógeno ureico en sangre (BUN) usando un analizador automático de química clínica (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Los resultados se presentan en la Tabla 96, expresados en mg/dl. Esos oligonucleótidos antisentido que no afectaron más de dos veces el aumento en los niveles de BUN en comparación con el control de PBS se seleccionaron para estudios posteriores.

Tabla 96

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre los niveles de BUN (mg/dl) en el riñón de ratones CD1	
	BUN
PBS	29
ISIS 416850	28
ISIS 445498	28
ISIS 445503	29
ISIS 445504	29
ISIS 445505	29
ISIS 445509	29
ISIS 445513	27
ISIS 445522	28
ISIS 445530	26
ISIS 445531	27
ISIS 445532	23

Ensayos hematológicos

La sangre obtenida de todos los grupos de ratones se envió a Antech Diagnostics para las mediciones de hematocrito (HCT), así como las mediciones de las diversas células sanguíneas, como WBC (neutrófilos y linfocitos), RBC y plaquetas, y el contenido total de hemoglobina. Los resultados se presentan en las Tablas 97 y 98. Esos oligonucleótidos antisentido que no afectaron a una disminución en el recuento de plaquetas de más del 50 % y un aumento en el recuento de monocitos de más de tres veces se seleccionaron para estudios posteriores.

Tabla 97

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre factores hematológicos en ratones CD1				
	RBC (10 ⁶ /ml)	Hemoglobina (g/dl)	HCT (%)	WBC (10 ³ /ml)
PBS	9,6	15,0	51	6
ISIS 416850	9,8	14,8	50	6
ISIS 445498	9,4	13,9	47	5
ISIS 445503	9,2	13,6	46	8
ISIS 445504	9,6	14,7	49	5
ISIS 445505	9,6	14,6	49	5
ISIS 445509	10,2	15,3	51	5
ISIS 445513,	9,8	15,0	50	7
ISIS 445522	9,7	14,6	49	5
ISIS 445530	10,0	15,1	50	7
ISIS 445531	9,4	14,5	48	9
ISIS 445532	9,7	14,8	48	7

Tabla 98

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre el recuento de células sanguíneas ratones CD1			
	Neutrófilos (/ml)	Linfocitos (/ml)	Plaquetas (10 ³ /ml)
PBS	1356	4166	749
ISIS 416850	1314	4710	614
ISIS 445498	1197	3241	802
ISIS 445503	1475	6436	309
ISIS 445504	959	3578	826
ISIS 445505	818	3447	725
ISIS 445509	1104	3758	1085
ISIS 445513	959	5523	942
ISIS 445522	698	3997	1005
ISIS 445530	930	5488	849
ISIS 445531	2341	6125	996
ISIS 445532	1116	5490	689

Ejemplo 42: Tolerabilidad de oligonucleótidos antisentido dirigidos al Factor 11 humano en ratas Sprague-Dawley

Ocho oligonucleótidos antisentido que se habían evaluado en ratones CD1 (Ejemplo 41) se evaluaron adicionalmente en ratas Sprague-Dawley para cambios en los niveles de diversos marcadores metabólicos.

Tratamiento

Grupos de cuatro ratas Sprague Dawley fueron inyectadas por vía subcutánea dos veces por semana durante 6 semanas con 50 mg/kg de ISIS 445498, ISIS 445504, ISIS 445505, ISIS 445509, ISIS 445513, ISIS 445522, ISIS 445530 o ISIS 445531. Un grupo de control de ratas Sprague Dawley se inyectaron subcutáneamente con PBS dos veces por semana durante 6 semanas. Las mediciones de peso corporal se tomaron antes y durante todo el período de tratamiento. Tres días después de la última dosis, se recogieron muestras de orina y luego se sacrificaron las ratas, se midieron los pesos de los órganos y se recogió la sangre para su posterior análisis.

Peso corporal y peso del órgano

Los pesos corporales de las ratas se midieron al inicio del estudio y, posteriormente, dos veces por semana. Los pesos corporales se presentan en la Tabla 99 y se expresan como porcentaje de aumento sobre el peso de control de PBS tomado antes del inicio del tratamiento. Los pesos del hígado, el bazo y el riñón se midieron al final del estudio, y también se presentan en la Tabla 99 como un porcentaje del peso corporal. Esos oligonucleótidos antisentido que no afectaron a más de seis veces los aumentos en el peso del hígado y el bazo por encima del control de PBS se seleccionaron para estudios adicionales.

Tabla 99

Cambio en el peso corporal y de los órganos de ratas Sprague Dawley después del tratamiento con oligonucleótidos antisentido (%)					
	Peso corporal	Hígado	Bazo	Riñón	
5	ISIS 445498	-17	+26	+107	-10
	ISIS 445504	-15	+22	+116	+6
	ISIS 445505	-21	+12	+146	+2
	ISIS 445509	-17	+16	+252	+3
	ISIS 445513	-13	+25	+194	+15
10	ISIS 445522	-13	+26	+184	+19
	ISIS 445530	-7	+24	+99	+4
	ISIS 445531	-10	+17	+89	+4

15 *Función hepática*

Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS sobre la función hepática, se midieron las concentraciones plasmáticas de transaminasas usando un analizador automático de química clínica (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Se midieron las concentraciones plasmáticas de ALT (alanina transaminasa) y AST (aspartato transaminasa) y los resultados se presentan en la Tabla 100 expresados en IU/L. Esos oligonucleótidos antisentido que no afectaron un aumento en los niveles de ALT/AST por encima de siete veces los niveles de control se seleccionaron para estudios adicionales. Los niveles plasmáticos de bilirrubina y albúmina también se midieron usando el mismo analizador químico clínico; los resultados se presentan en la Tabla 100 y se expresan en mg/dl. Aquellos oligonucleótidos antisentido que no afectaron un aumento en los niveles de bilirrubina más del doble de los niveles de control por tratamiento con oligonucleótidos antisentido se seleccionaron para estudios adicionales.

Tabla 100

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre marcadores metabólicos en el hígado de ratas Sprague-Dawley					
	ALT (UI/l)	AST (UI/l)	Bilirrubina (mg/dl)	Albúmina (mg/dl)	
30	PBS	102	36	0,13	3,7
	ISIS 445498	417	124	0,14	3,7
	ISIS 445504	206	86	0,11	3,5
35	ISIS 445505	356	243	0,15	3,6
	ISIS 445509	676	291	0,14	3,5
	ISIS 445513	214	91	0,15	3,5
	ISIS 445522	240	138	0,47	3,6
40	ISIS 445530	116	56	0,11	3,7
	ISIS 445531	272	137	0,12	3,7

45 *Función renal*

Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS sobre la función renal, se midieron las concentraciones plasmáticas de nitrógeno ureico en sangre (BUN) y creatinina usando un analizador automático de química clínica (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Los resultados se presentan en la Tabla 101, expresados en mg/dl. Esos oligonucleótidos antisentido que no afectaron más de dos veces el aumento en los niveles de BUN en comparación con el control de PBS se seleccionaron para estudios posteriores. La proteína de orina total y la proporción de proteína urinaria a creatinina en muestras totales de orina después del tratamiento con oligonucleótidos antisentido se calculó y también se presenta en la Tabla 101. Esos oligonucleótidos antisentido que no afectaron más de cinco veces el aumento en las proporciones proteína/creatinina en orina. al control PBS fueron seleccionados para estudios adicionales.

55

60

65

Tabla 101

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre marcadores metabólicos en el riñón de ratas Sprague-Dawley			
	BUN (mg/dl)	Creatinina (mg/dl)	Relación proteína en orina/creatinina
PBS	18	0,4	1,4
ISIS 445498	25	0,5	3,1
ISIS 445504	26	0,4	4,3
ISIS 445505	24	0,4	3,8
ISIS 445509	27	0,5	4,0
ISIS 445513	24	0,4	4,6
ISIS 445522	25	0,4	6,4
ISIS 445530	22	0,4	4,2
ISIS 445531	23	0,4	3,4

Ensayos hematológicos

La sangre obtenida de todos los grupos de ratas se envió a Antech Diagnostics para mediciones de hematocrito (HCT), así como a mediciones de varias células sanguíneas, como WBC (neutrófilos, linfocitos y monocitos), RBC y plaquetas, y el contenido total de hemoglobina. Los resultados se presentan en las Tablas 102 y 103. Esos oligonucleótidos antisentido que no afectaron a una disminución en el recuento de plaquetas de más del 50 % y un aumento en el recuento de monocitos de más de tres veces se seleccionaron para estudios adicionales.

Tabla 102

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre factores hematológicos en ratas Sprague-Dawley				
	RBC (/pl)	Hemoglobina (g/dl)	HCT (%)	WBC (/nl)
PBS	8,8	16,0	55	13
ISIS 445498	8,5	14,7	49	13
ISIS 445504	8,9	14,7	50	16
ISIS 445505	9,1	15,0	50	21
ISIS 445509	8,4	14,1	47	17
ISIS 445513	7,8	13,0	44	17
ISIS 445522	7,7	13,6	47	18
ISIS 445530	8,9	14,7	50	12
ISIS 445531	8,8	14,8	50	13

Tabla 103

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre el recuento células sanguíneas en ratas Sprague-Dawley				
	Neutrófilos (%)	Linfocitos (%)	Monocitos (%)	Plaquetas (/nl)
PBS	14	82	2,0	1007
ISIS 445498	9	89	2,0	1061
ISIS 445504	10	87	2,0	776
ISIS 445505	10	87	2,5	1089
ISIS 445509	11	84	3,8	1115
ISIS 445513	14	82	3,5	1051
ISIS 445522	13	84	2,8	1334
ISIS 445530	11	87	2,0	1249
ISIS 445531	10	86	2,8	1023

Ejemplo 43: Tolerabilidad de oligonucleótidos antisentido dirigidos al Factor 11 humano en ratones CD1

Los oligonucleótidos ISIS con 4-8-4 MOE, 3-8-3 MOE, 2-10-2 MOE, 3-10-3 MOE y 4-10-4 motivos MOE dirigidos al Factor 11 humano se administraron en ratones CD1 evaluados para cambios en los niveles de varios marcadores metabólicos.

Tratamiento

Grupos de cinco ratones CD1 fueron inyectados por vía subcutánea dos veces por semana durante 6 semanas con 50 mg/kg de ISIS 449707, ISIS 449708, ISIS 449409, ISIS 449710 o ISIS 449711. Un grupo de control de cinco

ratones CD1 se inyectó por vía subcutánea con PBS dos veces por semana durante 6 semanas. Las mediciones del peso corporal se tomaron antes y al final del período de tratamiento. Tres días después de la última dosis, se sacrificaron los ratones, se midieron los pesos de los órganos y se recogió la sangre para un análisis posterior.

5 *Peso corporal y peso del órgano*

Los pesos corporales de los ratones tomados al final del estudio se presentan en la Tabla 104 y se expresan en gramos. Los pesos del hígado, el bazo y el riñón también se midieron al final del estudio y también se presentan en la Tabla 104 como porcentaje del peso corporal. Esos oligonucleótidos antisentido que no afectaron a más de seis veces los aumentos en el peso del hígado y el bazo por encima del control de PBS se seleccionaron para estudios adicionales.

Tabla 104

Cambio en el peso corporal y de los órganos de ratones CD1 después del tratamiento con oligonucleótidos antisentido				
	Peso corporal (g)	Hígado (%)	Bazo (%)	Riñón (%)
PBS	39	–	–	–
ISIS 449707	42	+11	+63	–5
ISIS 449708	40	+17	+66	0
ISIS 449709	40	+15	+62	–14
ISIS 449710	42	+6	+43	–7
ISIS 449711	42	+18	+63	–12

25 *Función hepática*

Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS sobre la función hepática, se midieron las concentraciones plasmáticas de transaminasas usando un analizador automático de química clínica (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Se midieron las concentraciones plasmáticas de ALT (alanina transaminasa) y AST (aspartato transaminasa) y los resultados se presentan en la Tabla 105 expresada en IU/L. Esos oligonucleótidos antisentido que no afectaron un aumento en los niveles de ALT/AST por encima de siete veces los niveles de control se seleccionaron para estudios adicionales. Los niveles plasmáticos de bilirrubina y albúmina también se midieron usando el mismo analizador químico clínico y los resultados se presentan en la Tabla 105 y se expresan en mg/dl. Aquellos oligonucleótidos antisentido que no afectaron un aumento en los niveles de bilirrubina más del doble de los niveles de control por tratamiento con oligonucleótidos antisentido se seleccionaron para estudios adicionales.

Tabla 105

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre marcadores metabólicos en el hígado de ratones CD1				
	ALT (IU/l)	AST (IU/l)	Bilirrubina (mg/dl)	Albúmina (mg/dl)
PBS	39	52	0,22	3,2
ISIS 449707	41	62	0,19	2,3
ISIS 449708	66	103	0,17	2,8
ISIS 449709	62	83	0,18	2,8
ISIS 449710	43	95	0,18	2,8
ISIS 449711	52	83	0,22	2,8

50 *Función renal*

Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS sobre la función renal, se midieron las concentraciones plasmáticas de nitrógeno ureico en sangre (BUN) y creatinina usando un analizador automático de química clínica (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Los resultados se presentan en la Tabla 106, expresada en mg/dl. Esos oligonucleótidos antisentido que no afectaron más de dos veces el aumento en los niveles de BUN en comparación con el control de PBS se seleccionaron para estudios posteriores.

Tabla 106

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre los marcadores metabólicos (mg/dl) en el riñón de ratones CD1		
	BUN	Creatinina
PBS	28	0,3
ISIS 449707	27	0,2
ISIS 449708	28	0,2
ISIS 449709	34	0,3
ISIS 449710	29	0,2
ISIS 449711	26	0,2

Ensayos hematológicos

La sangre obtenida de todos los grupos de ratones se envió a Antech Diagnostics para mediciones de hematocrito (HCT), así como a las mediciones de varias células sanguíneas, como WBC (neutrófilos, linfocitos y monocitos), RBC y plaquetas, y el contenido total de hemoglobina. Los resultados se presentan en las Tablas 107 y 108. Esos oligonucleótidos antisentido que no afectaron a una disminución en el recuento de plaquetas de más del 50 % y un aumento en el recuento de monocitos de más de tres veces se seleccionaron para estudios adicionales.

Tabla 107

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre factores hematológicos en ratones CD1				
	RBC (/pl)	Hemoglobina (g/dl)	Hematocrito (%)	WBC (/nl)
PBS	9,8	14,6	54	6
ISIS 449707	8,4	12,4	45	6
ISIS 449708	9,2	13,2	48	7
ISIS 449709	9,2	13,2	49	5
ISIS 449710	9,1	13,5	48	7
ISIS 449711	9,0	13,3	48	6

Tabla 108

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre el recuento de células sanguíneas ratones CD1				
	Neutrófilos (%)	Linfocitos (%)	Monocitos (%)	Plaquetas (/nl)
PBS	15	80	3	1383
ISIS 449707	11	85	3	1386
ISIS 449708	17	77	5	1395
ISIS 449709	19	76	4	1447
ISIS 449710	15	81	3	1245
ISIS 449711	15	79	6	1225

Ejemplo 44: Tolerabilidad de oligonucleótidos antisentido dirigidos al Factor 11 humano en ratas Sprague-Dawley

Cinco oligonucleótidos antisentido que se habían evaluado en ratones CD1 (Ejemplo 43) se evaluaron adicionalmente en ratas Sprague-Dawley para detectar cambios en los niveles de diversos marcadores metabólicos.

Tratamiento

Grupos de cuatro ratas Sprague Dawley fueron inyectados por vía subcutánea dos veces por semana durante 6 semanas con 50 mg/kg de ISIS 449707, ISIS 449708, ISIS 449709, ISIS 449710 o ISIS 449711. Se inyectó un grupo control de cuatro ratas Sprague Dawley por vía subcutánea con PBS dos veces por semana durante 6 semanas. Las mediciones de peso corporal se tomaron antes y durante todo el período de tratamiento. Tres días después de la última dosis, se recogieron muestras de orina y luego se sacrificaron las ratas, se midieron los pesos de los órganos y se recogió la sangre para su posterior análisis.

Peso corporal y peso del órgano

Los pesos corporales de las ratas se midieron al inicio del estudio y al final del estudio. Los cambios de peso corporal se presentan en la Tabla 109 y se expresan como un aumento en gramos sobre el peso de control de PBS tomado antes del inicio del tratamiento. Los pesos del hígado, el bazo y el riñón se midieron al final del estudio, y también se presentan en la Tabla 109 como un porcentaje del peso corporal. Esos oligonucleótidos antisentido que

no afectaron a más de seis veces los aumentos en el peso del hígado y el bazo por encima del control de PBS se seleccionaron para estudios adicionales.

Tabla 109

Cambio en el peso corporal y de los órganos de ratas Sprague Dawley después del tratamiento con oligonucleótidos antisentido				
	Peso corporal (g)	Hígado (%)	Bazo (%)	Riñón (%)
PBS	478	–	–	–
ISIS 449707	352	+41	+400	+80
ISIS 449708	382	+31	+259	+40
ISIS 449709	376	+8	+231	+19
ISIS 449710	344	+82	+302	+50
ISIS 449711	362	+52	+327	+72

Función hepática

Para evaluar el impacto de los oligonucleótidos ISIS sobre la función hepática, se midieron las concentraciones plasmáticas de ALT y AST usando un analizador químico clínico automatizado (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Se midieron las concentraciones plasmáticas de alanina transaminasa (ALT) y aspartato transaminasa (AST) y los resultados se presentan en la Tabla 110 expresada en IU/L. Esos oligonucleótidos antisentido que no afectaron un aumento en los niveles de ALT/AST por encima de siete veces los niveles de control se seleccionaron para estudios adicionales. Los niveles plasmáticos de bilirrubina y albúmina también se midieron y los resultados se presentan en la Tabla 110 y se expresan en mg/dl. Aquellos oligonucleótidos antisentido que no afectaron un aumento en los niveles de bilirrubina más del doble de los niveles de control por tratamiento con oligonucleótidos antisentido se seleccionaron para estudios adicionales.

Tabla 110

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre marcadores metabólicos en el hígado de ratas Sprague-Dawley				
	ALT (UI/l)	AST (UI/l)	Bilirrubina (mg/dl)	Albúmina (mg/dl)
PBS	41	107	0,1	3,4
ISIS 449707	61	199	0,2	3,1
ISIS 449708	25	90	0,1	3,2
ISIS 449709	63	126	0,2	3,1
ISIS 449710	36	211	0,1	2,9
ISIS 449711	32	163	0,1	2,9

Función renal

Para evaluar el impacto de los oligonucleótidos ISIS en la función renal, se midieron las concentraciones plasmáticas de BUN y creatinina usando un analizador químico clínico automatizado (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Los resultados se presentan en la Tabla 111, expresados en mg/dl. Esos oligonucleótidos antisentido que no afectaron más de dos veces el aumento en los niveles de BUN en comparación con el control de PBS se seleccionaron para estudios posteriores. La proteína urinaria total y la proporción de proteína urinaria a creatinina en muestras totales de orina después del tratamiento con oligonucleótidos antisentido se calculó y también se presenta en la Tabla 111. Esos oligonucleótidos antisentido que no afectaron más de cinco veces el aumento de las proporciones proteína/creatinina en la orina al control PBS fueron seleccionados para estudios adicionales.

Tabla 111

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre marcadores metabólicos en el riñón de ratas Sprague-Dawley			
	BUN (mg/dl)	Creatinina (mg/dl)	Relación proteína en orina/creatinina
PBS	22	0,4	1,5
ISIS 449707	24	0,4	3,2
ISIS 449708	24	0,4	5,7
ISIS 449709	24	0,4	3,4
ISIS 449710	29	0,3	5,9
ISIS 449711	28	0,4	7,3

Ensayos hematológicos

La sangre obtenida de todos los grupos de ratas se envió a Antech Diagnostics para mediciones de hematocrito (HCT), así como a mediciones de varias células sanguíneas, como WBC (neutrófilos, linfocitos y monocitos), RBC y plaquetas, y el contenido total de hemoglobina. Los resultados se presentan en las Tablas 112 y 113. Esos oligonucleótidos antisentido que no afectaron a una disminución en el recuento de plaquetas de más del 50 % y un aumento en el recuento de monocitos de más de tres veces se seleccionaron para estudios adicionales.

Tabla 112

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre factores hematológicos en ratas Sprague-Dawley				
	RBC (/pl)	Hemoglobina (g/dl)	Hematocrito (%)	WBC (/nl)
PBS	8,2	15,1	50	16
ISIS 449707	6,0	12,0	40	20
ISIS 449708	6,6	12,2	40	22
ISIS 449709	6,9	12,6	41	14
ISIS 449710	6,3	12,5	41	13
ISIS 449711	6,4	12,6	43	13

Tabla 113

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre el recuento células sanguíneas en ratas Sprague-Dawley				
	Neutrófilos (%)	Linfocitos (%)	Monocitos (%)	Plaquetas (/nl)
PBS	12	84	2	1004
ISIS 449707	6	91	2	722
ISIS 449708	6	92	2	925
ISIS 449709	5	91	3	631
ISIS 449710	6	91	2	509
ISIS 449711	7	90	2	919

Ejemplo 45: Efecto farmacológico dependiente de la dosis de oligonucleótidos antisentido dirigidos al factor 11 humano en monos cynomolgus

Se analizaron varios oligonucleótidos antisentido en monos cynomolgus para determinar los efectos farmacológicos de los oligonucleótidos sobre la actividad del Factor 11, la anticoagulación y los tiempos de hemorragia, las distribuciones de hígado y riñón y la tolerabilidad. Todos los oligonucleótidos ISIS utilizados en este estudio se dirigen al ARNm del Factor 11 humano y también son completamente reactivos con la secuencia del gen del mono rhesus (véase la Tabla 44). Se espera que los oligonucleótidos de ISIS de mono rhesus sean completamente reactivos de forma cruzada con la secuencia del gen del mono cynomolgus también. En el momento en que se realizó el estudio, la secuencia genómica del mono cynomolgus no estaba disponible en la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI); por lo tanto, la reactividad cruzada con la secuencia del gen del mono cynomolgus no pudo ser confirmada.

Tratamiento

Grupos, cada uno de los cuales consistía en dos monos machos y tres hembras, se inyectaron subcutáneamente con ISIS 416838, ISIS 416850, ISIS 416858, ISIS 416864 o ISIS 417002 en dosis crecientes. Se administró oligonucleótido antisentido a los monos a 5 mg/kg tres veces por semana para la semana 1; 5 mg/kg dos veces por semana durante las semanas 2 y 3; 10 mg/kg tres veces por semana durante la semana 4; 10 mg/kg dos veces por semana durante las semanas 5 y 6; 25 mg/kg tres veces por semana durante la semana 7; y 25 mg/kg dos veces por semana durante las semanas 8, 9, 10, 11 y 12. Un grupo de control, que consiste en dos monos machos y tres hembras, se inyectó por vía subcutánea con PBS de acuerdo con el mismo régimen de dosificación. Un grupo

experimental adicional, que consiste en dos monos machos y tres hembras, se inyectó por vía subcutánea con ISIS 416850 en un régimen de dosis crónica y más baja. Se administró oligonucleótido antisentido a los monos a 5 mg/kg tres veces por semana para la semana 1; 5 mg/kg dos veces por semana durante la semana 2 y 3; 10 mg/kg tres veces por semana durante la semana 4; y 10 mg/kg dos veces por semana durante las semanas 5 a 12. Los pesos corporales se midieron semanalmente. Se tomaron muestras de sangre 14 días y 5 días antes del inicio del tratamiento y posteriormente una vez por semana para el análisis de la actividad proteica del factor 11 en plasma, medición de fibrinógeno, medidas de PT y aPTT, tiempos de sangrado y medición de diversos factores hematológicos. El día 85, los monos se sacrificaron mediante exanguinación bajo anestesia profunda y se recogieron los órganos para su posterior análisis.

Análisis de ARN

El día 85, se extrajo el ARN del tejido hepático para el análisis de PCR en tiempo real del Factor 11 usando el conjunto de sonda de cebador LTS00301 (secuencia de cebador directo ACACGCATTAAAAAGCAAAGC, designada en el presente documento como SEQ ID NO: 271; secuencia de cebador inverso CAGTGTCATGGTAAAAATGAAGAATGG, designada en el presente documento como SEQ ID NO: 272; y secuencia de sonda TGCAGGCACAGCATCCAGTGTCTX, designada en el presente documento como SEQ ID NO: 273). Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición del factor 11, en relación con el control de PBS. Como se muestra en la Tabla 114, el tratamiento con oligonucleótidos de ISIS dio como resultado una reducción significativa del ARNm de Factor 11 en comparación con el control de PBS.

Tabla 114

Inhibición del ARNm del factor 11 en el hígado de mono cynomolgus en relación con el control de PBS	
Nº ISIS	% de inhibición
416838	37
416850	84
416858	90
416864	44
417002	57

Análisis de proteínas

Las muestras de plasma de todos los grupos de monos tomadas en días diferentes se analizaron mediante un ensayo ELISA tipo sándwich (Affinity Biologicals Inc.) usando un anticuerpo policlonal anti-factor 11 purificado por afinidad como el anticuerpo de captura y un anti-factor policlonal conjugado con peroxidasa 11 anticuerpo como el anticuerpo de detección. El plasma de mono se diluyó 1:50 para el ensayo. La actividad de la peroxidasa se expresó por incubación con el sustrato o-fenilendiamina. El color producido se cuantificó usando un lector de microplacas a 490 nm y se consideró que era proporcional a la concentración del Factor 11 en las muestras.

Los resultados se presentan en la Tabla 115, expresada como reducción porcentual en relación con la del control de PBS. El tratamiento con ISIS 416850 e ISIS 416858 dio como resultado una disminución dependiente del tiempo en los niveles de proteína.

Tabla 115

Inhibición de la proteína del factor 11 en el hígado de mono cynomolgus en relación con el control de PBS						
Días	ISIS 416838	ISIS 416850	ISIS 416858	ISIS 416864	ISIS 417002	ISIS 416850*
-14	0	0	0	0	0	0
-5	0	0	0	5	0	1
8	3	8	6	7	0	6
15	4	4	16	9	4	13
22	5	11	23	7	2	12
29	8	15	28	10	8	20
36	11	17	35	9	8	22
43	5	23	39	9	9	24
50	8	42	49	10	13	30
57	10	49	60	7	24	34
64	11	55	68	5	26	37
71	12	57	71	10	30	41
78	10	63	73	9	22	42
85	10	64	78	8	23	34

Ensayo de PT y aPTT

Las muestras de sangre se recogieron en tubos que contienen citrato de sodio. PT y aPTT se determinaron por duplicado con un instrumento de coagulación ACL 9000 (Instrumentation Laboratory, Italia). Los resultados se interpolan en una curva estándar de diluciones en serie de plasma de mono de control citrado probado para dar un resultado informado en porcentaje normal.

El tiempo de protrombina (PT) y el tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT) se midieron utilizando plasma pobre en plaquetas (PPP) de monos tratados con oligonucleótidos ISIS. Los valores de PT y aPTT se proporcionan en las Tablas 116 y 117 y se informan como valores de Relación Internacional Normalizada (INR). Los valores de INR para PT y aPTT se determinaron dividiendo el valor de PT o aPTT para cada grupo experimental por el PT o aPTT para el grupo tratado con PBS. Esta relación se elevó a la potencia del Índice de Sensibilidad Internacional (ISI) del factor tisular utilizado. El oligonucleótido ISIS, ISIS 416850, administrado con el régimen de dosis crónica se distingue de los otros oligonucleótidos con un asterisco (*).

Como se muestra en la Tabla 116, PT no se prolongó significativamente en monos tratados con oligonucleótidos ISIS en el régimen de dosis creciente o en el régimen de dosis crónica. Sin embargo, el TTPa se prolongó de una manera dependiente de la dosis, como se presenta en la Tabla 117. Estos datos sugieren que la reducción antisentido del Factor 11 afecta la vía de activación de contacto, pero no la vía extrínseca de la coagulación sanguínea. Por lo tanto, la reducción antisentido del factor 11 es útil para inhibir la formación de un trombo o coágulo en respuesta a una pared vascular anormal, pero no en respuesta a la lesión tisular.

Tabla 116

Efecto de oligonucleótidos antisentido de ISIS sobre la relación de PT en monos cynomolgus						
día	ISIS 416838	ISIS 416850	ISIS 416858	ISIS 416864	ISIS 417002	ISIS 416850*
-14	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
-5	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
8	1,03	1,00	1,05	1,02	1,02	1,03
15	1,03	1,02	1,07	1,07	1,04	1,06
22	1,07	1,02	1,06	1,03	1,04	1,06
29	1,03	1,03	1,08	1,06	1,01	1,00
36	1,05	1,02	1,07	1,06	1,05	1,06
43	1,03	1,01	1,08	1,04	1,03	1,02
50	1,02	1,02	1,03	1,01	0,99	0,98
57	1,04	1,04	1,09	1,08	1,03	n.d.
64	1,04	1,03	1,09	1,10	1,03	n.d.
71	1,02	1,03	1,07	1,07	0,99	n.d.
78	1,04	1,05	1,10	1,08	1,02	n.d.
85	1,05	1,04	1,07	1,13	1,02	n.d.

n.d.= sin datos

Tabla 117

Efecto de oligonucleótidos antisentido de ISIS sobre la relación de aPTT en monos cynomolgus						
día	ISIS 416838	ISIS 416850	ISIS 416858	ISIS 416864	ISIS 417002	ISIS 416850*
-14	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
-5	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
8	1,07	1,05	1,03	1,05	1,05	1,12
15	1,05	1,05	1,07	1,03	1,03	1,07
22	1,20	1,13	1,18	1,11	1,16	1,21
29	1,19	1,13	1,20	1,13	1,11	1,26
36	1,20	1,26	1,36	1,19	1,18	1,34
43	1,18	1,17	1,28	1,07	1,06	1,22
50	1,25	1,68	1,55	1,26	1,18	1,35
57	1,21	1,59	1,59	1,19	1,22	n.d.
64	1,18	1,64	1,60	1,12	1,11	n.d.
71	1,15	1,76	1,70	1,18	1,16	n.d.
78	1,19	1,88	1,79	1,18	1,18	n.d.
85	1,22	1,99	1,76	1,25	1,20	n.d.

n.d.= sin datos

Análisis de actividad proteica

Se recogieron muestras de sangre en diversos puntos de tiempo y se midió la proenzima del Factor 11 usando un ensayo de F11 basado en el tiempo de coagulación. Los tiempos de coagulación se determinaron por duplicado con

un instrumento de coagulación semiautomático ST4 (Diagnostica Stago, NJ). Treinta μ l de plasma de muestra citrado diluido 1/20 en tampón HEPES-NaCl con BSA se incubaron con 30 μ l de reactivo aPTT (Automated aPTT, Organon Technika, NC) y 30 μ l de citrato deficiente en plasma de Factor 11 (George King Bio-Medical Inc.) a 37 ° C durante 5 min, seguido de la adición de 30 μ l de CaCl 25 mM₂ para iniciar la coagulación. Los resultados se interpolaron en una curva estándar de plasma de control citrado diluido en serie.

Los resultados se presentan en la Tabla 118 como porcentaje de inhibición de la actividad del Factor 11, con relación al control con PBS. El oligonucleótido ISIS, ISIS 416850, administrado con el régimen de dosis crónica se distingue de los otros oligonucleótidos con un asterisco (*).

Tabla 118

Inhibición de la proteína del factor 11 por oligonucleótidos antisentido ISIS administrados en dosis creciente/régimen de dosis crónica en monos cynomolgus						
Días antes/después del tratamiento	ISIS 416838	ISIS 416850	ISIS 416858	ISIS 416864	ISIS 417002	ISIS 416850*
-14	0	0	0	0	0	0
-5	0	0	0	5	0	1
8	3	8	6	7	0	6
15	4	4	16	9	4	13
22	5	11	23	7	2	12
29	8	15	28	10	8	20
36	11	17	35	9	8	24
43	5	23	39	9	9	24
50	8	42	49	10	13	30
57	10	49	60	7	24	n.d.
64	11	55	68	5	26	n.d.
71	12	57	71	10	30	n.d.
78	10	63	73	9	22	n.d.
85	10	64	78	8	23	n.d.

n.d.=no data

Ensayo de fibrinógeno

Se recogieron nueve partes de plasma de mono fresco en una parte de citrato trisódico. Las muestras se evaluaron de contenido de fibrinógeno usando un instrumento de coagulación ACL 9000 (Instrumentation Laboratory, Italia). Los resultados se presentan en la Tabla 119 expresada en mg/dl. El oligonucleótido ISIS, ISIS 416850, administrado con el régimen de dosis crónica se distingue de los otros oligonucleótidos con un asterisco (*).

Tabla 119

Efecto de oligonucleótidos antisentido de ISIS sobre los niveles de fibrinógeno en monos cynomolgus							
Días antes/después del tratamiento	PBS	ISIS 416838	ISIS 416850	ISIS 416858	ISIS 416864	ISIS 417002	ISIS 416850*
-14	296	251	310	277	300	291	274
-5	246	205	261	246	243	222	227
8	245	209	281	246	227	221	232
15	207	198	270	219	210	195	174
22	219	183	243	222	184	199	192
29	231	184	234	220	205	199	192
36	235	182	232	225	202	191	185
43	231	186	219	229	198	187	194
50	251	216	215	259	233	236	204
57	235	190	186	225	200	201	n.d.
64	240	190	190	236	218	236	n.d.
71	233	199	178	239	245	228	n.d.
78	234	189	177	234	250	221	n.d.
85	246	196	187	243	240	224	n.d.

n.d.= sin datos

Ensayo hemorrágico

En días diferentes durante el período de tratamiento, se realizó un ensayo de sangrado usando un dispositivo Surgicutt Jr. (ITC, New Jersey). Monos fueron colocados en una silla de mono con su brazo colocado en un soporte

5 constante. El brazo se rasuró ligeramente y se colocó un esfigmomanómetro en la parte superior del brazo. El
 manguito del esfigmomanómetro se infló a 40 mm Hg y esta presión se mantuvo durante todo el procedimiento. El
 área de la parte superior del brazo que se va a incidir se limpió con un hisopo antiséptico y se utilizó el dispositivo
 Surgicutt Jr para realizar una incisión sobre la superficie lateral del antebrazo, paralela y 5 cm por debajo del pliegue
 antecubital. En el momento exacto en que se realizó la incisión, se inició un cronómetro. Cada 30 segundos, la
 10 sangre de la incisión se borró con un papel secante sin tocar directamente la incisión, por lo que no se alteró la
 formación del tapón de plaquetas. La sangre se borró cada 30 segundos hasta que la sangre ya no manchó el papel.
 El cronómetro se detuvo y se determinó el tiempo de sangrado. El esfigmomanómetro se retiró del brazo del animal,
 el sitio de la incisión se limpió con un hisopo antiséptico y se aplicó una tira de cierre de la herida. Los resultados se
 proporcionan en la Tabla X, expresada en segundos. Los resultados se proporcionan en la Tabla 120. El
 oligonucleótido ISIS, ISIS 416850, administrado con el régimen de dosis crónica se distingue de los otros
 oligonucleótidos con un asterisco (*).

15 Estos datos sugieren que el potencial hemorrágico de los compuestos proporcionados En el presente documento es
 bajo.

Tabla 120

Ensayo de sangrado en monos cynomolgos							
Días antes/después del tratamiento	PBS	ISIS 416838	ISIS 416850	ISIS 416858	ISIS 416864	ISIS 417002	ISIS 416850*
-14	147	200	172	154	166	185	177
-5	153	150	127	149	111	175	93
15	111	167	165	146	153	174	149
22	113	165	151	100	133	194	143
36	174	166	137	206	205	186	221
43	157	120	216	111	146	120	156
57	147	238	195	138	216	206	n.d.
64	113	131	201	113	218	146	n.d.
78	114	145	203	186	170	163	n.d.
85	147	201	201	191	203	182	n.d.

Ensayo de agregación de plaquetas

20 La agregación de plaquetas se inició añadiendo 1 mmol/l de ADP y/o 3 µg de colágeno (dependiendo del día de
 recogida, como se describe en la Tabla 121) a las muestras de plasma, y se dejó que avanzara durante 10 minutos.
 La agregación se caracterizó por registrar el cambio en la resistencia o impedancia eléctrica y el cambio en la
 pendiente inicial de agregación después del cambio de forma de plaquetas. La prueba de agregación se realizó dos
 25 veces por muestra en cada día de recolección y se tomó el valor promedio. El oligonucleótido ISIS, ISIS 416850,
 administrado con el régimen de dosis crónica se distingue de los otros oligonucleótidos con un asterisco (*)

Tabla 121

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre la agregación de plaquetas en monos cynomolgus en Ohmios									
	Día -5 (con colágeno)	Día 15 (con ADP)	Día 36 (con ADP)	Día 43 (con colágeno)	Día 57 (con ADP)	Día 64 (con colágeno)	Día 78 (con ADP)	Día 85 (con ADP)	Día 85 (con colágeno)
PBS	17	15	7	14	16	13	12	16	17
ISIS 416838	15	15	8	16	7	13	11	15	24
ISIS 416850	23	12	16	16	18	17	9	22	26
ISIS 416858	22	19	17	16	11	14	8	18	23
ISIS 416864	27	20	17,8	20	18	17	13	22	28
ISIS 417002	21	16	13,9	19	18	18	18	22	24
ISIS 416850*	21	14	11,6	21	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

n.d.=no data

30 Los pesos corporales se tomaron una vez a la semana durante todo el régimen de dosificación. Las medidas de
 cada grupo se dan en la Tabla 122 expresadas en gramos. Los resultados indican que el tratamiento con los
 oligonucleótidos antisentido no causó ningún cambio adverso en la salud de los animales, lo que puede haber
 producido una alteración significativa en el peso en comparación con el control de PBS. Se tomaron los pesos de los
 órganos después de que se sacrificaron los animales y se recogieron y pesaron hígados, riñones y bazos. Los
 35 resultados se presentan en la Tabla 123 y tampoco muestran una alteración significativa en los pesos en
 comparación con el control de PBS, excepto ISIS 416858, que muestra un aumento en el peso del bazo. El

oligonucleótido ISIS, ISIS 416850, administrado con el régimen de dosis crónica se distingue de los otros oligonucleótidos con un asterisco (*).

Tabla 122

Medicinas corporales de pesos (g de monos cynologomos)							
día	PBS	ISIS 416838	ISIS 416850	ISIS 416858	ISIS 416864	ISIS 417002	ISIS 416850*
1	2780	2720	2572	2912	2890	2640	2665
8	2615	2592	2430	2740	2784	2523	2579
15	2678	2642	2474	2760	2817	2571	2607
22	2715	2702	2514	2800	2857	2617	2661
29	2717	2689	2515	2763	2863	2622	2667
36	2738	2708	2545	2584	3327	2631	2656
43	2742	2700	2544	2607	3355	2630	2670
50	2764	2731	2613	2646	3408	2652	2679
57	2763	2737	2629	2617	3387	2654	n.d.
64	2781	2746	2642	2618	3384	2598	n.d.
71	2945	2869	2769	2865	2942	2727	n.d.
78	2815	2766	2660	2713	2822	2570	n.d.

n.d.=no data

5

Tabla 123

Pesos de órganos (g) de monos cynomolgus después del tratamiento con oligonucleótidos antisentido			
	Hígado	Bazo	Riñón
PBS	46	4	11
ISIS 416838	63	5	12
ISIS 416580	64	4	16
ISIS 416858	60	12	13
ISIS 416864	53	5	14
ISIS 417002	51	5	15

Función hepática

- 10 Para evaluar el impacto de los oligonucleótidos ISIS sobre la función hepática, se midieron las concentraciones plasmáticas de transaminasas usando un analizador químico automatizado (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Se midieron las concentraciones plasmáticas de ALT (alanina transaminasa) y AST (aspartato transaminasa) y los resultados se presentan en las tablas 124 y 125 expresados en IU/L. Esos oligonucleótidos antisentido que no afectaron un aumento en los niveles de ALT/AST por encima de siete veces los niveles de control se seleccionaron para estudios adicionales. Los niveles plasmáticos de bilirrubina también se midieron y los resultados se presentan en la Tabla 126 expresada en mg/dl. Aquellos oligonucleótidos antisentido que no afectaron un aumento en los niveles de bilirrubina más del doble de los niveles de control por tratamiento con oligonucleótidos antisentido se seleccionaron para estudios adicionales. El oligonucleótido ISIS, ISIS 416850, administrado con el régimen de dosis crónica se distingue de los otros oligonucleótidos con un asterisco (*).
- 15
- 20

Table 124

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos en el hígado de monos cynomolgus							
Días antes/después del tratamiento	PBS	ISIS 416838	ISIS 416850	ISIS 416858	ISIS 416864	ISIS 417002	ISIS 416850*
-14	57	76	54	47	54	61	80
22	39	36	41	28	37	36	42
43	36	35	43	36	36	35	41
64	38	40	60	47	43	42	n.d.
85	34	41	75	50	43	116	n.d.

n.d.= sin datos

Tabla 125

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos sobre AST (UI) n el hígado de monos cynomolgus							
Días antes/después del tratamiento	PBS	ISIS 416838	ISIS 416850	ISIS 416858	ISIS 416864	ISIS 417002	ISIS 416850*
-14	71	139	81	58	76	114	100
22	43	39	45	38	41	44	39
43	38	32	50	39	40	42	40

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos sobre AST (UI) n el hígado de monos cynomolgus							
Días antes/después del tratamiento	PBS	ISIS 416838	ISIS 416850	ISIS 416858	ISIS 416864	ISIS 417002	ISIS 416850*
64	35	33	56	50	46	37	n.d.
85	41	30	82.	49	56	50	n.d.
n.d.= sin datos							

Tabla 126

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos sobre bilirrubina (mg/dl) en el hígado de monos cynomolgus							
Días antes/después del tratamiento	PBS	ISIS 416838	ISIS 416850	ISIS 416858	ISIS 416864	ISIS 417002	ISIS 416850*
-14	0,24	0,26	0,21	0,27	0,31	0,26	0,28
22	0,16	0,17	0,13	0,18	0,22	0,20	0,19
43	0,17	0,17	0,13	0,14	0,17	0,21	0,18
64	0,19	0,15	0,14	0,12	0,16	0,14	n.d.
85	0,20	0,13	0,14	0,14	0,17	0,12	n.d.
n.d.= sin datos							

Función renal

5 Para evaluar el impacto de los oligonucleótidos ISIS en la función renal, se recogieron muestras de orina. La relación de proteína urinaria a creatinina en muestras de orina después del tratamiento con oligonucleótidos antisentido se calculó y se presenta en la Tabla 127. Se seleccionaron aquellos oligonucleótidos antisentido que no afectaron más de un aumento de cinco veces en las proporciones proteína/creatinina en orina en comparación con el control PBS para más estudios.

Tabla 127

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre la proporción proteína/creatinina en la orina en monos cinomolgos		
	Día 80	Día 84
PBS	0,09	0,10
ISIS 416838	0,13	0,13
ISIS 416850	0,09	0,12
ISIS 416858	0,10	0,07
ISIS 416864	0,36	0,34
ISIS 417002	0,18	0,24

Determinación de la concentración de oligonucleótidos

15 Se evaluaron la concentración del oligonucleótido de longitud completa así como la degradación y eliminación del oligonucleótido del tiempo transcurrido desde el hígado y el riñón. El método utilizado es una modificación de métodos previamente publicados (Leeds et al., 1996; Geary et al., 1999) que consisten en una extracción de fenol-cloroformo (líquido-líquido) seguido de una extracción en fase sólida. Se añadió un patrón interno (ISIS 355868, un oligonucleótido de fosforotioato modificado con 2'-O-metoxietilo 27-mer, GCGTTTGCTCTTCTTCTTGCGTTTTT, designado En el presente documento como SEQ ID NO: 270) antes de la extracción. Las concentraciones de muestra de tejido se calcularon usando curvas de calibración, con un límite inferior de cuantificación (LLOQ) de aproximadamente 1,14 µg/g. Las vidas medias se calcularon utilizando el software WinNonlin (PHARSIGHT). Los resultados se presentan en las Tablas 128 y 129, expresados como µg/g de tejido hepático o renal.

Tabla 128

Concentración de oligonucleótidos de longitud completa (µg/g) en el hígado y riñón de monos cinomolgos		
N° ISIS	Riñón	Hígado
416838	1339	1087
416850	2845	1225
416858	1772	1061
416864	2093	1275
417002	2162	1248

Tabla 129

Concentración de oligonucleótidos totales ($\mu\text{g/g}$) en el hígado y riñón de monos cinomolgos		
N° ISIS	Riñón	Hígado
416838	1980	1544
416850	3988	1558
416858	2483	1504
416864	3522	1967
417002	3462	1757

Ensayos hematológicos

- 5 La sangre obtenida de todos los grupos de monos se envió al Instituto Coreano de Toxicología (KIT) para análisis de HCT, MCV, MCH y MCHC, así como mediciones de varias células sanguíneas, como WBC (neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos, basófilos, reticulocitos), glóbulos rojos, plaquetas y contenido total de hemoglobina. Los resultados se presentan en las tablas 130-143. Esos oligonucleótidos antisentido que no afectaron una disminución en el recuento de plaquetas de más del 50 % y un aumento en el recuento de monocitos de más de tres veces se seleccionaron para estudios posteriores. El oligonucleótido ISIS, ISIS 416850, administrado con el régimen de dosis crónica se distingue de los otros oligonucleótidos con un asterisco (*).

Tabla 130

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido en el recuento de glóbulos blancos ($\times 10^3/\text{nl}$) en monos cinomolgos							
	PBS	ISIS 416838	ISIS 416850	ISIS 416858	ISIS 416864	ISIS 417002	ISIS 416850*
día -14	14	12	13	14	13	13	15
día -5	13	12	13	14	13	14	15
día 8	10	10	10	12	11	10	13
día 15	10	10	9	11	10	10	16
día 22	12	11	10	11	10	10	15
día 29	11	11	11	12	10	10	14
día 36	10	10	10	12	10	11	16
día 43	10	10	9	11	10	10	15
día 50	12	11	11	13	12	13	15
día 57	11	12	11	13	12	12	n.d.
día 64	11	13	11	12	11	11	n.d.
día 71	15	15	15	13	14	12	n.d.
día 78	10	11	12	11	11	9	n.d.
día 85	10	12	15	11	12	10	n.d.

n.d.= sin datos

15

Tabla 131

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre el recuento de glóbulos rojos ($\times 10^6/\mu\text{l}$) en monos cinomolgos							
	PBS	ISIS 416838	ISIS 416850	ISIS 416858	ISIS 416864	ISIS 417002	ISIS 416850*
día -14	5,7	5,6	5,3	5,6	5,5	5,6	5,5
día -5	5,7	5,6	5,5	5,6	5,6	5,6	5,5
día 8	5,7	5,7	5,4	5,6	5,7	5,6	5,5
día 15	5,6	5,6	5,3	5,4	5,7	5,4	5,3
día 22	5,5	5,4	5	5,3	5,3	5,2	5,1
día 29	5,6	5,3	4,9	5,3	5,3	5,2	5,2
día 36	5,7	5,5	5,3	5,5	5,6	5,4	5,3
día 43	5,7	5,6	5,2	5,5	5,5	5,4	5,2
día 50	5,8	5,5	5,2	5,5	5,6	5,4	5,3
día 57	5,7	5,5	5,2	5,6	5,5	4,9	n.d.
día 64	5,8	5,6	5,4	5,7	5,6	5,4	n.d.
día 71	5,6	5,5	5,4	5,6	5,6	5,5	n.d.
día 78	5,6	5,4	5,3	5,4	5,3	5,4	n.d.
día 85	5,6	5,5	5,5	5,5	5,4	5,4	n.d.

n.d.= sin datos

20

Tabla 132

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre la hemoglobina (g/dl) en monos cinomolgos							
	PBS	ISIS 416838	ISIS 416850	ISIS 416858	ISIS 416864	ISIS 417002	ISIS 416850*
día -14	13,2	12,9	12,4	13,2	12,7	13,0	12,8
día -5	13,1	13,1	12,7	13,2	13,0	13,2	12,8
día 8	13,1	12,9	12,4	12,8	12,7	12,8	12,5
día 15	12,9	12,9	12,1	12,6	12,8	12,3	12,2
día 22	12,7	12,5	11,6	12,4	12,1	12,1	11,7
día 29	12,8	12,4	11,5	12,3	12,1	12,0	12,0
día 36	13,0	12,8	12,2	12,6	12,5	12,5	12,3
día 43	12,9	12,7	11,8	12,4	12,2	12,3	11,8
día 50	12,6	12,3	11,8	12,2	12,1	12,3	11,9
día 57	13,1	12,6	12,1	12,7	12,3	11,3	n.d.
día 64	13,1	12,6	12,3	12,8	12,1	12,2	n.d.
día 71	12,9	12,7	12,3	12,7	12,2	12,5	n.d.
día 78	13,0	12,5	12,2	12,4	11,9	12,4	n.d.
día 85	13,2	12,4	12,7	11,9	12,3	12,2	n.d.

n.d.= sin datos

Tabla 133

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre el hematocrito (%) en monos cinomolgos							
	PBS	ISIS 416838	ISIS 416850	ISIS 416858	ISIS 416864	ISIS 417002	ISIS 416850*
día -14	46	42	41	43	43	44	44
día -5	44	42	43	42	44	45	43
día 8	44	43	43	43	44	44	43
día 15	44	42	40	40	42	40	40
día 22	45	43	41	41	42	41	40
día 29	46	43	41	41	43	42	42
día 36	46	43	42	40	42	42	41
día 43	46	43	40	40	42	41	40
día 50	48	44	42	41	44	43	42
día 57	46	43	42	41	42	38	n.d.
día 64	47	44	43	42	42	41	n.d.
día 71	46	44	43	42	44	43	n.d.
día 78	43	41	41	39	39	40	n.d.
día 85	43	42	42	39	40	41	n.d.

n.d.= sin datos

5

Tabla 134

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido en MCV (fl) en monos cinomolgos							
	PBS	ISIS 416838	ISIS 416850	ISIS 416858	ISIS 416864	ISIS 417002	ISIS 416850*
día -14	81	77	78	77	79	79	81
día -5	78	76	77	75	79	80	78
día 8	77	77	80	77	78	79	79
día 15	78	75	76	74	74	76	75
día 22	84	80	83	77	79	79	79
día 29	83	81	83	78	80	81	82
día 36	81	78	80	75	76	78	76
día 43	80	78	79	74	77	77	77
día 50	84	80	83	76	79	80	80
día 57	82	79	80	74	77	80	n.d.
día 64	81	79	79	73	75	76	n.d.
día 71	84	80	80	75	79	78	n.d.
día 78	78	76	79	72	74	75	n.d.
día 85	77	77	77	72	74	76	n.d.

n.d.= sin datos

10

Tabla 135

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido en MCH (pgl) en monos cinomolgos							
	PBS	ISIS 416838	ISIS 416850	ISIS 416858	ISIS 416864	ISIS 417002	ISIS 416850*
Día -14	23	23	23	24	23	24	24
Día -5	23	23	23	23	23	24	23
Día 8	23	23	23	23	23	23	23
Día 15	23	23	23	23	23	23	23
Día 22	23	23	24	24	23	23	23
Día 29	23	23	23	23	23	23	23
Día 36	23	23	23	23	23	23	23
Día 43	23	23	23	23	22	23	23
Día 50	22	23	23	23	22	23	23
Día 57	23	23	23	22	23	23	n.d.
Día 64	23	23	22	22	23	22	n.d.
Día 71	23	23	23	22	23	23	n.d.
Día 78	23	23	23	23	23	23	n.d.
Día 85	23	23	22	22	23	23	n.d.

n.d.= sin datos

Tabla 136

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre el MCHC(g/dl) en monos cinomolgos							
	PBS	ISIS 416838	ISIS 416850	ISIS 416858	ISIS 416864	ISIS 417002	ISIS 416850*
Día -14	29	30	30	31	29	30	29
Día -5	30	31	30	31	29	30	30
Día 8	30	30	29	30	29	29	29
Día 15	30	31	30	31	30	31	30
Día 22	28	29	28	30	29	29	29
Día 29	28	29	28	30	29	29	28
Día 36	28	30	29	31	30	30	30
Día 43	28	30	29	31	29	30	30
Día 50	26	28	28	30	28	29	29
Día 57	29	29	29	31	29	29	n.d.
Día 64	28	29	29	30	29	30	n.d.
Día 71	28	29	28	30	28	29	n.d.
Día 78	30	30	29	32	30	31	n.d.
Día 85	31	30	30	31	30	30	n.d.

n.d.= sin datos

5

Tabla 137

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido en el recuento de plaquetas (x10 ³ /nl) en monos cinomolgos							
	PBS	ISIS 416838	ISIS 416850	ISIS 416858	ISIS 416864	ISIS 417002	ISIS 416850*
Día -14	349	377	528	419	434	442	387
Día -5	405	425	573	463	456	466	434
Día 8	365	387	548	391	438	435	401
Día 15	375	387	559	400	439	410	396
Día 22	294	319	466	316	364	377	347
Día 29	311	337	475	336	397	410	370
Día 36	326	370	505	371	428	415	379
Día 43	336	365	490	342	351	393	391
Día 50	379	372	487	331	419	389	351
Día 57	345	371	528	333	409	403	n.d.
Día 64	329	358	496	295	383	436	n.d.
Día 71	322	365	465	286	394	490	n.d.
Día 78	309	348	449	262	366	432	n.d.
Día 85	356	344	458	267	387	418	n.d.

n.d.= sin datos

10

Tabla 138

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre los reticulocitos (%) en monos cinomolgos							
	PBS	ISIS 416838	ISIS 416850	ISIS 416858	ISIS 416864	ISIS 417002	ISIS 416850*
Día -14	1,4	1,0	1,7	1,0	0,9	0,9	1,1
Día -5	1,0	0,9	1,2	0,9	0,9	0,8	0,8
Día 8	1,0	1,2	1,2	1,2	0,8	1,1	1,1
Día 15	1,5	1,2	1,9	1,6	0,8	1,1	1,0
Día 22	1,2	1,2	1,9	1,3	0,9	1,2	1,0
Día 29	1,6	1,6	2,5	1,5	1,3	1,6	1,4
Día 36	1,7	1,6	2,2	1,6	1,3	1,3	1,3
Día 43	1,3	1,2	1,6	1,3	1,1	1,1	1,0
Día 50	1,6	1,6	2,7	1,5	1,3	1,6	1,2
Día 57	1,8	1,5	2,0	1,4	1,0	4,6	n.d.
Día 64	1,3	1,3	1,7	1,0	0,8	1,3	n.d.
Día 71	1,6	1,3	1,8	1,3	1,0	1,3	n.d.
Día 78	1,5	1,4	1,8	1,2	1,2	1,3	n.d.
Día 85	1,5	1,5	2,3	1,3	1,5	1,4	n.d.

n.d.= sin datos

Tabla 139

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre neutrófilos (%) en monos cinomolgos							
	PBS	ISIS 416838	ISIS 416850	ISIS 416858	ISIS 416864	ISIS 417002	ISIS 416850*
Día -14	40	36	49	37	53	43	48
Día -5	37	35	52	46	51	43	53
Día 8	54	42	57	51	52	46	53
Día 15	49	43	58	54	59	57	73
Día 22	41	37	57	47	59	55	64
Día 29	44	36	53	43	44	45	42
Día 36	37	39	57	47	58	61	72
Día 43	40	30	50	45	57	57	61
Día 50	36	31	45	46	49	61	62
Día 57	41	32	49	44	57	54	n.d.
Día 64	40	30	41	37	49	55	n.d.
Día 71	38	28	27	26	42	34	n.d.
Día 78	42	35	42	39	48	51	n.d.
Día 85	30	22	60	40	39	36	n.d.

n.d.= sin datos

5

Tabla 140

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre los linfocitos (%) en monos cinomolgos							
	PBS	ISIS 416838	ISIS 416850	ISIS 416858	ISIS 416864	ISIS 417002	ISIS 416850*
Día -14	54	59	47	58	42	53	47
Día -5	56	59	43	49	44	53	43
Día 8	43	54	39	45	45	50	44
Día 15	47	53	38	43	38	40	24
Día 22	54	59	39	49	37	41	33
Día 29	51	59	43	51	51	50	53
Día 36	58	57	39	49	38	35	26
Día 43	55	65	45	51	39	39	36
Día 50	59	64	49	48	46	34	35
Día 57	55	63	45	51	39	40	n.d.
Día 64	56	64	53	56	46	39	n.d.
Día 71	56	65	61	66	52	59	n.d.
Día 78	53	60	51	54	46	41	n.d.
Día 85	63	72	34	52	54	56	n.d.

n.d.= sin datos

Tabla 141

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre los eosinófilos (%) en monos cinomolgos							
	PBS	ISIS 416838	ISIS 416850	ISIS 416858	ISIS 416864	ISIS 417002	ISIS 416850*
Día -14	1,3	0,6	1,0	0,7	1,0	0,3	0,5
Día -5	1,5	0,6	1,6	1,3	0,9	0,3	0,7
Día 8	0,9	0,4	1,1	0,3	0,7	0,2	0,5
Día 15	0,7	0,3	1,0	0,3	0,5	0,1	0,2
Día 22	0,9	0,5	0,7	0,6	0,9	0,3	0,5
Día 29	0,9	0,3	1,2	0,6	0,9	0,3	0,8
Día 36	0,9	0,5	1,7	0,4	0,6	0,2	0,4
Día 43	0,9	0,6	1,2	0,3	0,6	0,2	0,4
Día 50	1,2	0,8	1,2	0,4	0,7	0,1	0,3
Día 57	0,7	0,6	1,0	0,3	0,4	0,2	n.d.
Día 64	1,0	0,7	1,3	0,4	0,7	0,2	n.d.
Día 71	1,6	0,8	1,8	0,9	1,1	0,3	n.d.
Día 78	1,0	0,9	1,0	0,5	1,2	0,1	n.d.
Día 85	1,3	1,5	1,2	0,6	1,6	0,2	n.d.

n.d.= sin datos

Tabla 142

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre los monocitos (%) en monos cinomolgos							
	PBS	ISIS 416838	ISIS 416850	ISIS 416858	ISIS 416864	ISIS 417002	ISIS 416850*
Día -14	3,3	3,1	2,3	2,8	2,8	3,0	2,9
Día -5	3,8	3,6	2,8	2,8	3,3	3,2	2,4
Día 8	2,3	2,5	1,8	2,7	2,1	3,3	1,8
Día 15	2,7	2,4	2,0	2,2	2,4	2,3	1,5
Día 22	3,4	2,9	2,4	2,8	2,8	3,1	1,9
Día 29	3,3	3,2	2,7	3,8	3,4	3,5	2,7
Día 36	3,1	2,5	2,1	2,9	2,3	2,6	1,5
Día 43	3,5	3,3	2,6	3,1	2,1	2,8	1,8
Día 50	2,6	3,2	3,7	4,6	2,9	3,1	1,8
Día 57	2,6	3,2	n.d.3,2	3,8	2,4	3,6	n.d.
Día 64	2,6	3,5	n.d.3,5	4,4	2,8	4,0	n.d.
Día 71	3,4	4,3	n.d.4,7	4,9	3,7	4,7	n.d.
día 78	3,3	3,6	n.d.4,5	4,9	3,7	4,7	n.d.
Día 85	4,4	3,7	n.d.3,5	6,1	3,7	5,3	n.d.

n.d.= sin datos

5

Tabla 143

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre los basófilos (%) en monos cinomolgos							
	PBS	ISIS 416838	ISIS 416850	ISIS 416858	ISIS 416864	ISIS 417002	ISIS 416850*
Día -14	0,3	0,2	0,2	0,3	0,2	0,3	0,2
Día -5	0,3	0,3	0,2	0,3	0,2	0,3	0,3
Día 8	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2	0,3	0,3
Día 15	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Día 22	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1
Día 29	0,3	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2	0,3
Día 36	0,3	0,4	0,3	0,3	0,3	0,2	0,1
Día 43	0,3	0,4	0,3	0,3	0,4	0,3	0,2
Día 50	0,4	0,3	0,3	0,4	0,4	0,3	0,2
Día 57	0,2	0,3	0,4	0,2	0,3	0,3	n.d.
Día 64	0,3	0,4	0,4	0,4	0,4	0,2	n.d.
Día 71	0,2	0,5	0,3	0,4	0,4	0,3	n.d.
Día 78	0,2	0,4	0,3	0,4	0,3	0,3	n.d.
Día 85	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	0,3	n.d.

n.d.= sin datos

Ensayos de citocinas y quimiocinas

10 Las muestras de sangre obtenidas de los grupos de monos tratados con PBS, ISIS 416850 e ISIS 416858 administrados en el régimen de dosis creciente se enviaron a Pierce Biotechnology (Woburn, MA) para la medición de los niveles de quimiocinas y citoquinas. Los niveles de IL-1 β , IL-6, IFN- γ y TNF- α se midieron usando los respectivos anticuerpos de primate y se midieron los niveles de IL-8, MIP-1 α , MCP-1, MIP-1 β y RANTES usando los

respectivos anticuerpos humanos de reacción cruzada. Las mediciones se tomaron 14 días antes del inicio del tratamiento y el día 85, cuando los monos se sacrificaron. Los resultados se presentan en las tablas 144 y 145.

Tabla 144

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre los niveles de citocinas/quimiocinas (pg/ml) en monos cynomolgus el día -14									
	IL-1 β	IL-6	IFN- γ	TNF- α	IL-8	MIP-1 α	MCP-1	MIP-1 β	RANTES
PBS	16	10	114	α 7	816	54	1015	118	72423
ISIS 416850	3	30	126	14	1659	28	1384	137	75335
ISIS 416858	5	9	60	9	1552	36	1252	122	112253

5

Tabla 145

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre los niveles de citocinas/quimiocinas (pg/ml) en monos cynomolgus el día 85									
	IL-1 β	IL-6	IFN- γ	TNF- α	IL-8	MIP-1 α	MCP-1	MIP-1 β	RANTES
PBS	7	4	102	34	87	23	442	74	84430
ISIS 416850	13	17	18	27	172	41	2330	216	83981
ISIS 416858	5	25	18	45	303	41	1752	221	125511

Ejemplo 46: Efecto farmacológico de oligonucleótidos antisentido dirigidos al factor 11 humano en monos cynomolgus

10

Varios oligonucleótidos antisentido seleccionados de los estudios de tolerabilidad de roedores (Ejemplos 41-44) se analizaron en monos cynomolgus para determinar sus efectos farmacológicos, la eficacia relativa sobre la actividad del Factor 11 y la tolerabilidad en un modelo de mono cynomolgus. Los oligonucleótidos antisentido también se compararon con ISIS 416850 e ISIS 416858 seleccionados del estudio de monos descrito anteriormente (Ejemplo 45). Todos los oligonucleótidos ISIS utilizados en este estudio se dirigen al ARNm del Factor 11 humano y también son completamente reactivos con la secuencia del gen del mono rhesus (véanse las Tablas 44 y 46). Se espera que los oligonucleótidos de ISIS de mono rhesus sean completamente reactivos de forma cruzada con la secuencia del gen del mono cynomolgus también. En el momento en que se realizó el estudio, la secuencia genómica del mono cynomolgus no estaba disponible en la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI); por lo tanto, la reactividad cruzada con la secuencia del gen del mono cynomolgus no pudo ser confirmada.

15

Tratamiento

Grupos, cada uno compuesto por dos monos machos y dos hembras, fueron inyectados por vía subcutánea con 25 mg/kg de ISIS 416850, ISIS 449709, ISIS 445522, ISIS 449710, ISIS 449707, ISIS 449711, ISIS 449708, 416858 e ISIS 445531. Oligonucleótido antisentido se administró a los monos a 25 mg/kg tres veces por semana durante la semana 1 y 25 mg/kg dos veces por semana durante las semanas 2 a 8. Un grupo de control, que constaba de dos monos machos y dos hembras, se inyectó por vía subcutánea con PBS según el mismo régimen de dosificación. Los pesos corporales se tomaron 14 días y 7 días antes del inicio del tratamiento y luego se midieron semanalmente durante todo el periodo de tratamiento. Se tomaron muestras de sangre 14 días y 5 días antes del inicio del tratamiento y posteriormente varias veces durante el régimen de dosificación para las mediciones de PT y aPTT, y la medición de diversos factores hematológicos. El día 55, los monos se sacrificaron mediante exanguinación bajo anestesia profunda, y se recogieron los órganos para su posterior análisis.

Análisis de ARN

El día 55, se extrajo el ARN del tejido hepático para el análisis de PCR en tiempo real del Factor 11 usando el conjunto de sonda de cebador LTS00301. Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición del factor 11, en relación con el control de PBS. Como se muestra en la Tabla 146, el tratamiento con ISIS 416850, ISIS 449709, ISIS 445522, ISIS 449710, ISIS 449707, ISIS 449708, ISIS 416858 e ISIS 445531 dio como resultado una reducción significativa del ARNm del Factor 11 en comparación con el control de PBS.

45

50

Tabla 146

Inhibición del ARNm del factor 11 en el hígado de mono cynomolgus en relación con el control de PBS	
ID del oligo	% de inhibición
416850	68
449709	69
445522	89
449710	52
449707	47
449711	0
449708	46
416858	89
445531	66

Análisis de proteínas

- 5 Las muestras de plasma de todos los grupos de monos tomadas en días diferentes se analizaron mediante un ensayo ELISA tipo sándwich (Affinity Biologicals Inc.) utilizando un anticuerpo policlonal anti-factor 11 purificado por afinidad como anticuerpo de captura y un anti-factor policlonal conjugado con peroxidasa 11 anticuerpo como el anticuerpo de detección. El plasma de mono se diluyó 1:50 para el ensayo. La actividad de la peroxidasa se expresó por incubación con el sustrato o-fenilendiamina. El color producido se cuantificó usando un lector de microplacas a 490 nm y se consideró que era proporcional a la concentración del Factor 11 en las muestras.

Los resultados se presentan en la Tabla 147, expresados como reducción porcentual en relación con la del control de PBS. El tratamiento con ISIS 416850, ISIS 449709, ISIS 445522 e ISIS 416858 dio como resultado una disminución dependiente del tiempo en los niveles de proteína.

15

Tabla 147

Inhibición de la proteína del factor 11 en el hígado de mono cynomolgus en relación con el control de PBS										
Nº ISIS	Día -14	Día -5	Día 10	Día 17	Día 24	Día 31	Día 38	Día 45	Día 52	Día 55
416850	0	0	20	31	38	52	51	53	53	58
449709	1	0	27	35	44	45	46	48	47	50
445522	2	0	36	50	61	70	73	77	80	82
449710	1	0	10	14	17	25	20	23	4	24
449707	0	0	16	19	21	29	28	35	29	32
449711	0	1	5	3	6	9	2	4	3	5
449708	1	0	7	15	3	14	9	2	6	6
416858	4	0	36	49	62	68	74	79	81	81
445531	0	1	9	22	23	27	29	32	32	37

Ensayo de PT y aPTT

- 20 El PT y el aPTT se midieron usando plasma pobre en plaquetas (PPP) de ratones tratados con oligonucleótidos ISIS. Los valores de PT y aPTT se proporcionan en las Tablas 148 y 149 y se informan como valores de Relación Internacional Normalizada (INR). Los valores de INR para PT y aPTT se determinaron dividiendo el valor de PT o aPTT para cada grupo experimental por el PT o aPTT para el grupo tratado con PBS. Esta relación se elevó a la potencia del Índice de Sensibilidad Internacional (ISI) del factor tisular utilizado. Como se muestra en la Tabla 148, PT no se prolongó significativamente en ratones tratados con oligonucleótidos ISIS. Sin embargo, el aPTT se prolongó significativamente en grupos tratados con ISIS 416850, ISIS 445522 e ISIS 416858, como se presenta en la Tabla 149. Estos datos sugieren que la reducción antisentido del Factor 11 afecta la vía de activación de contacto, pero no la vía extrínseca de la coagulación sanguínea. Por lo tanto, la reducción antisentido del Factor 11 con estos oligonucleótidos ISIS es útil para inhibir la formación de un trombo o coágulo en respuesta a una pared vascular anormal, pero no en respuesta a la lesión tisular.

35

40

Tabla 148

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre la relación de PT en monos cynomolgus										
	Día -14	Día -5	Día 10	Día 17	Día 24	Día 31	Día 38	Día 45	Día 52	Día 55
ISIS 416850	1,02	1,00	0,99	1,00	0,97	1,00	1,01	1,00	1,02	1,07
ISIS 449709	1,00	0,96	0,95	0,95	0,95	0,95	0,97	0,97	0,99	1,03
ISIS 445522	1,00	0,94	0,95	0,96	0,94	0,96	0,97	0,96	0,98	1,01
ISIS 449710	1,03	0,96	0,98	1,00	0,97	0,98	0,99	0,97	0,98	1,06
ISIS 449707	1,01	0,94	0,95	0,97	0,95	0,96	1,00	0,96	0,96	1,00
ISIS 449711	1,00	0,95	0,94	0,95	0,94	0,98	1,02	1,01	1,00	1,07
ISIS 449708	1,03	0,95	0,98	1,00	0,95	1,06	0,99	0,99	0,99	1,04
ISIS 416858	1,01	0,96	0,96	0,98	0,95	1,00	0,97	1,00	0,99	1,01
ISIS 445531	1,06	1,00	1,00	1,06	1,02	1,04	1,03	1,01	1,04	1,06

Tabla 149

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre la relación de aPTT en monos cynomolgus										
	Día -14	Día -5	Día 10	Día 17	Día 24	Día 31	Día 38	Día 45	Día 52	Día 55
ISIS 416850	0,99	0,90	0,98	1,01	1,05	1,22	1,25	1,34	1,32	1,45
ISIS 449709	0,99	0,91	0,99	1,03	1,05	1,08	1,08	1,15	1,09	1,17
ISIS 445522	0,96	0,91	1,06	1,10	1,14	1,25	1,32	1,39	1,39	1,42
ISIS 449710	1,07	0,98	1,00	0,97	1,00	1,04	1,02	1,06	1,03	1,07
ISIS 449707	0,90	0,87	0,92	0,94	0,93	0,95	0,99	1,00	0,99	1,04
ISIS 449711	0,94	0,96	0,92	0,90	0,92	0,89	0,93	0,94	0,92	0,96
ISIS 449708	1,07	1,01	1,06	1,05	1,01	1,09	1,06	1,06	1,08	1,11
ISIS 416858	1,03	0,96	1,07	1,13	1,21	1,32	1,41	1,49	1,53	1,61
ISIS 445531	1,00	0,89	0,95	1,05	1,00	1,07	1,06	1,13	1,15	1,19

5 Pesos corporales y de órganos

Los pesos corporales de cada grupo se dan en la Tabla 150 expresada en gramos. Los resultados indican que el tratamiento con los oligonucleótidos antisentido no causó ningún cambio adverso en la salud de los animales, lo que puede haber producido una alteración significativa del peso en comparación con el control de PBS. Los pesos de los órganos se tomaron después de sacrificar a los animales el día 55, y se recogieron hígados, riñones y bazo. Los resultados se presentan en la Tabla 150 expresados como un porcentaje del peso corporal y tampoco muestran una alteración significativa en los pesos en comparación con el control de PBS, con la excepción de ISIS 449711, que causó un aumento en el peso del bazo.

15

Tabla 150

Medicinas corporales de pesos (g de monos cinologomos)										
Días	PBS	ISIS 416850	ISIS 449709	ISIS 445522	ISIS 449710	ISIS 449707	ISIS 449711	ISIS 449708	ISIS 416858	ISIS 445531
-14	2069	2061	2044	2050	2097	2072	2049	2096	2073	2079
-7	2107	2074	2093	2042	2114	2083	2105	2163	2092	2092
1	2131	2083	2112	2047	2131	2107	2123	2130	2115	2125
8	2186	2072	2075	2094	2120	2088	2123	2148	2149	2119
15	2201	2147	2085	2092	2145	2120	2103	2125	2162	2109
22	2206	2139	2117	2114	2177	2142	2171	2110	2188	2143
29	2204	2159	2068	2125	2149	2155	2203	2095	2196	2148
36	2246	2136	2064	2121	2180	2158	2227	2100	2210	2191
43	2304	2186	2106	2142	2227	2197	2251	2125	2238	2233
50	2274	2143	2147	2127	2201	2185	2227	2076	2225	2197

20

25

Tabla 151

Pesos de órganos (g) de monos cynomolgus después del tratamiento con oligonucleótidos antisentido			
	Hígado	Bazo	Riñón
PBS	2,3	0,16	0,48
ISIS 416850	2,5	0,17	0,51
ISIS 449709	2,6	0,21	0,57
ISIS 445522	2,6	0,23	0,55
ISIS 449710	2,6	0,24	0,58
ISIS 449707	2,5	0,24	0,53
ISIS 449711	2,6	0,32	0,54
ISIS 449708	2,6	0,19	0,60
ISIS 416858	2,6	0,24	0,47
ISIS 445531	2,8	0,24	0,49

Función hepática

- 5 Para evaluar el impacto de los oligonucleótidos ISIS sobre la función hepática, se midieron las concentraciones plasmáticas de ALT y AST usando un analizador químico clínico automatizado (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Se midieron las concentraciones plasmáticas de alanina transaminasa (ALT) y aspartato transaminasa (AST) y los resultados se presentan en las tablas 152 y 153 expresados en IU/l. Los niveles plasmáticos de bilirrubina también se midieron y los resultados se presentan en la Tabla 154 expresada en mg/dl. Como se observa en las
- 10 Tablas 152-154, no hubo aumentos significativos en ninguno de los marcadores metabólicos hepáticos después del tratamiento con oligonucleótidos antisentido.

Tabla 152

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos en el hígado de monos cynomolgus				
	Día -14	Día -5	Día 31	Día 55
PBS	57	55	53	57
ISIS 416850	48	42	45	55
ISIS 449709	73	77	65	102
ISIS 445522	43	45	40	60
ISIS 449710	37	42	37	45
ISIS 449707	54	56	52	63
ISIS 449711	49	137	48	54
ISIS 449708	48	54	44	46
ISIS 416858	43	66	46	58
ISIS 445531	84	73	57	73

15

Tabla 153

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos sobre AST (UI) n el hígado de monos cynomolgus				
	Día -14	Día -5	Día 31	Día 55
PBS	65	45	44	47
ISIS 416850	62	45	46	57
ISIS 449709	62	51	45	71
ISIS 445522	62	47	46	79
ISIS 449710	52	38	37	64
ISIS 449707	64	53	50	52
ISIS 449711	58	78	47	47
ISIS 449708	74	53	56	50
ISIS 416858	64	100	60	69
ISIS 445531	78	46	47	49

20

25

Tabla 154

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos sobre bilirrubina (mg/dl) en el hígado de monos cynomolgus				
	Día -14	Día -5	Día 31	Día 55
PBS	0,25	0,20	0,20	0,17
ISIS 416850	0,26	0,22	0,26	0,17
ISIS 449709	0,24	0,19	0,15	0,18
ISIS 445522	0,24	0,20	0,14	0,18
ISIS 449710	0,24	0,19	0,15	0,22
ISIS 449707	0,27	0,19	0,13	0,16
ISIS 449711	0,23	0,16	0,13	0,13
ISIS 449708	0,27	0,21	0,14	0,14
ISIS 416858	0,25	0,23	0,16	0,16
ISIS 445531	0,22	0,18	0,13	0,11

Función renal

- 5 Para evaluar el impacto de los oligonucleótidos ISIS en la función renal, se recogieron muestras de orina en días diferentes. Los niveles de BUN se midieron en varios puntos de tiempo usando un analizador químico clínico automatizado (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY) y los resultados se presentan en la Tabla 155. La relación de proteína de orina a creatinina en muestras de orina después del tratamiento con oligonucleótidos antisentido también se calculó para el día 49 y los resultados se presentan en la Tabla 156. Como se observó en las tablas 155 y 156, no
- 10 hubo aumentos significativos en ninguno de los marcadores metabólicos del riñón después del tratamiento con oligonucleótidos antisentido.

Tabla 155

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre los niveles de BUN (mg/dl) en monos cinomolgus				
	Día -14	Día -5	Día 31	Día 55
PBS	22	21	22	22
ISIS 416850	24	23	21	26
ISIS 449709	22	21	20	28
ISIS 445522	23	22	22	22
ISIS 449710	19	19	19	23
ISIS 449707	25	21	21	20
ISIS 449711	26	22	20	23
ISIS 449708	25	23	23	23
ISIS 416858	25	24	23	24
ISIS 445531	22	18	20	22

15

Tabla 156

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre la proporción proteína/creatinina en la orina en monos cinomolgus	
	Relación proteína en orina/creatinina
PBS	0,02
ISIS 416850	0,08
ISIS 449709	0,05
ISIS 445522	0,01
ISIS 449710	0,00
ISIS 449707	0,03
ISIS 449711	0,01
ISIS 449708	0,00
ISIS 416858	0,05
ISIS 445531	0,08

Ensayos hematológicos

- 20 La sangre obtenida de todos los grupos de monos en días diferentes se envió al Instituto Coreano de Toxicología (KIT) para mediciones de HCT, MCV, MCH y MCHC, así como mediciones de varias células sanguíneas, como WBC (neutrófilos y monocitos), glóbulos rojos y plaquetas, así como el contenido total de hemoglobina. Los resultados se presentan en las tablas 157-166.

25

Tabla 157

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre los linfocitos HCT (%) en monos cinomolgos						
	Día -14	Día -5	Día 17	Día 31	Día 45	Día 55
PBS	40	42	43	43	41	40
ISIS 416850	41	44	42	42	42	40
ISIS 449709	41	42	43	42	41	40
ISIS 445522	42	42	41	43	41	39
ISIS 449710	41	44	43	44	43	41
ISIS 449707	40	43	42	43	43	42
ISIS 449711	41	41	42	39	39	38
ISIS 449708	41	44	44	43	44	42
ISIS 416858	41	44	43	43	41	39
ISIS 445531	41	42	43	41	41	41

Tabla 158

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido en el recuento de plaquetas (x 100/ μ l) en monos cinomolgos						
	Día -14	Día -5	Día 17	Día 31	Día 45	Día 55
PBS	361	441	352	329	356	408
ISIS 416850	462	517	467	507	453	396
ISIS 449709	456	481	449	471	418	441
ISIS 445522	433	512	521	425	403	333
ISIS 449710	411	463	382	422	313	360
ISIS 449707	383	464	408	408	424	399
ISIS 449711	410	431	325	309	257	259
ISIS 449708	387	517	444	378	381	348
ISIS 416858	369	433	358	289	287	257
ISIS 445531	379	416	380	376	345	319

5

Tabla 159

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre neutrófilos (%) en monos cinomolgos						
	Día -14	Día -5	Día 17	Día 31	Día 45	Día 55
PBS	81	84	75	75	91	118
ISIS 416850	88	109	95	100	85	108
ISIS 449709	73	101	89	81	77	115
ISIS 445522	61	84	81	66	69	125
ISIS 449710	93	86	80	94	97	132
ISIS 449707	85	106	80	89	89	98
ISIS 449711	64	71	52	58	45	70
ISIS 449708	73	84	61	57	61	75
ISIS 416858	65	84	54	54	61	73
ISIS 445531	60	80	85	116	93	91

Tabla 160

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre los monocitos (%) en monos cinomolgos						
	Día -14	Día -5	Día 17	Día 31	Día 45	Día 55
PBS	1,9	2,8	3,1	2,8	3,9	2,2
ISIS 416850	1,9	2,9	3,2	3,7	3,8	3,4
ISIS 449709	4,0	2,0	3,0	2,8	3,6	3,4
ISIS 445522	2,1	2,3	3,6	3,9	4,4	3,0
ISIS 449710	1,3	2,0	2,5	2,4	3,4	1,6
ISIS 449707	1,3	2,3	3,2	4,2	4,0	4,8
ISIS 449711	1,2	2,3	5,9	6,9	7,6	7,8
ISIS 449708	1,7	2,6	5,4	5,8	7,0	6,2
ISIS 416858	2,0	2,7	4,0	4,7	4,6	4,6
ISIS 445531	1,3	2,2	3,4	4,1	4,4	4,1

10

Tabla 161

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre el contenido de hemoglobina (g/dl) en monos cinomolgos						
	Día -14	Día -5	Día 17	Día 31	Día 45	Día 55
PBS	12,3	12,5	12,9	12,7	12,4	12,1
ISIS 416850	13,0	13,5	13,3	13,1	13,1	12,7
ISIS 449709	12,8	12,8	13,2	13,1	12,6	12,5
ISIS 445522	13,3	12,7	12,7	12,9	12,6	12,0
ISIS 449710	13,0	13,2	13,4	13,1	13,0	12,7
ISIS 449707	12,7	12,8	12,7	12,7	12,9	12,6
ISIS 449711	12,7	12,7	12,5	11,8	11,5	11,3
ISIS 449708	13,0	13,2	13,5	13,0	13,3	13,0
ISIS 416858	12,8	13,0	13,0	12,8	12,3	12,0
ISIS 445531	12,6	12,6	12,7	12,3	12,0	12,1

Tabla 162

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido en el recuento de glóbulos blancos ($\times 10^3$ /nl) en monos cinomolgos						
	Día -14	Día -5	Día 17	Día 31	Día 45	Día 55
PBS	10	10	11	12	11	12
ISIS 416850	12	13	11	12	12	10
ISIS 449709	11	10	11	11	11	10
ISIS 445522	10	9	11	13	10	11
ISIS 449710	11	11	12	12	11	15
ISIS 449707	13	11	12	11	12	8
ISIS 449711	13	12	10	9	9	7
ISIS 449708	14	10	11	11	10	10
ISIS 416858	10	11	10	9	8	9
ISIS 445531	20	15	17	17	20	15

5

Tabla 163

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido en el recuento de glóbulos rojos ($\times 10^6$ / μ l) en monos cinomolgos						
	Día -14	Día -5	Día 17	Día 31	Día 45	Día 55
PBS	5,6	5,6	5,8	5,8	5,6	5,5
ISIS 416850	5,5	5,7	5,6	5,6	5,7	5,6
ISIS 449709	5,8	5,8	5,9	5,9	5,7	5,7
ISIS 445522	5,9	5,6	5,6	5,8	5,7	5,4
ISIS 449710	5,6	5,8	5,8	5,8	5,7	5,6
ISIS 449707	5,7	5,8	5,7	5,7	5,9	5,8
ISIS 449711	5,6	5,7	5,6	5,4	5,4	5,3
ISIS 449708	5,7	5,9	5,9	5,8	6,0	5,8
ISIS 416858	5,5	5,5	5,6	5,6	5,5	5,3
ISIS 445531	5,7	5,7	5,8	5,6	5,5	5,6

Tabla 164

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido en MCV (fl) en monos cinomolgos						
	Día -14	Día -5	Día 17	Día 31	Día 45	Día 55
PBS	72	74	75	73	73	73
ISIS 416850	74	77	76	75	75	73
ISIS 449709	72	74	73	73	71	71
ISIS 445522	72	74	74	75	73	72
ISIS 449710	75	77	75	75	75	73
ISIS 449707	71	75	74	74	73	73
ISIS 449711	73	74	75	73	73	73
ISIS 449708	73	75	75	75	74	74
ISIS 416858	75	79	78	76	75	75
ISIS 445531	72	74	75	75	75	74

10

Tabla 165

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido en MCH (pgl) en monos cinomolgos						
	Día -14	Día -5	Día 17	Día 31	Día 45	Día 55
PBS	22,1	22,4	22,3	22,1	22,0	22,0
ISIS 416850	23,7	23,7	23,7	23,3	22,7	22,9
ISIS 449709	22,4	22,3	22,5	22,2	21,0	22,0
ISIS 445522	22,6	22,5	22,8	22,4	22,4	22,2
ISIS 449710	23,0	22,8	23,1	22,6	21,8	22,7
ISIS 449707	22,2	22,2	22,1	22,1	22,6	21,9
ISIS 449711	22,6	22,7	22,2	22,1	21,7	21,3
ISIS 449708	22,9	22,7	22,9	22,7	22,2	22,5
ISIS 416858	23,2	23,5	23,1	23,0	22,2	22,8
ISIS 445531	22,2	22,2	22,1	22,0	21,6	21,7

Tabla 166

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre el MCHC(g/dl) en monos cinomolgos						
	Día -14	Día -5	Día 17	Día 31	Día 45	Día 55
PBS	30,8	30,0	30,1	29,9	30,3	30,2
ISIS 416850	32,0	30,7	31,3	31,0	31,0	30,9
ISIS 449709	31,4	30,3	30,7	30,7	31,1	31,2
ISIS 445522	31,4	30,4	30,9	30,0	30,7	31,0
ISIS 449710	31,2	29,7	30,7	30,1	30,4	31,1
ISIS 449707	31,4	29,8	30,0	29,8	29,8	30,0
ISIS 449711	31,0	30,7	29,9	29,8	29,6	29,5
ISIS 449708	31,4	30,2	30,7	29,9	30,6	31,8
ISIS 416858	31,1	29,8	29,9	31,0	30,3	30,4
ISIS 445531	30,9	30,0	29,5	29,7	29,0	29,6

5 Ensayos de citocinas y quimiocinas

Las muestras de sangre obtenidas de todos los grupos de monos se enviaron a Pierce Biotechnology (Woburn, MA) para la medición de los niveles de quimioquina y citoquina. Los niveles de IL-1 β , IL-6, IFN- γ y TNF- α se midieron usando los respectivos anticuerpos de primate y se midieron los niveles de IL-8, MIP-1 α , MCP-1, MIP-1 β y RANTES usando los respectivos anticuerpos humanos de reacción cruzada. Las mediciones se tomaron 14 días antes del inicio del tratamiento y el día 55, cuando los monos se sacrificaron. Los resultados se presentan en las tablas 167 y 168.

10

Tabla 167

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre los niveles de citocinas/quimiocinas (pg/ml) en monos cynomolgus el día -14									
	IL-1 β	IL-6	IFN- γ	TNF- α	IL-8	MIP-1 α	MCP-1	MIP-1 β	RANTES
PBS	350	3	314	32	82	27	277	8	297
ISIS 416850	215	1	115	4	45	14	434	31	4560
ISIS 449409	137	1	37	9	34	13	290	14	2471
ISIS 445522	188	5	172	16	32	22	297	27	3477
ISIS 449710	271	7	1115	72	29	20	409	18	1215
ISIS 449707	115	1	34	6	106	16	294	13	3014
ISIS 449711	79	2	29	6	156	20	264	24	3687
ISIS 449708	35	1	27	12	184	11	361	19	11666
ISIS 416858	103	0	32	4	224	11	328	37	6521
ISIS 445531	101	2	68	9	83	25	317	22	7825

15

20

25

Tabla 168

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre los niveles de citocinas/quimiocinas (pg/ml) en monos cynomolgus el día 55									
	IL-1 β	IL-6	IFN- γ	TNF- α	IL-8	MIP-1 α	MCP-1	MIP-1 β	RANTES
PBS	453	3	232	191	68	21	237	34	775
ISIS 416850	106	1	19	16	620	17	887	50	27503
ISIS 449409	181	0	25	8	254	17	507	47	8958
ISIS 445522	341	2	83	18	100	22	592	63	16154
ISIS 449710	286	2	176	26	348	27	474	53	22656
ISIS 449707	97	1	24	16	48	12	264	49	1193
ISIS 449711	146	7	22	31	110	17	469	91	3029
ISIS 449708	131	0	18	17	85	23	409	128	4561
ISIS 416858	28	1	9	15	167	11	512	47	5925
ISIS 445531	155	1	15	16	293	12	339	84	5935

Ejemplo 47: Determinación de la viscosidad de los oligonucleótidos antisentido ISIS dirigidos al Factor 11 humano

5

La viscosidad de los oligonucleótidos antisentido dirigidos al factor 11 humano se midió con el objetivo de seleccionar oligonucleótidos antisentido que tienen una viscosidad superior a 40 cP a una concentración de 165-185 mg/ml.

10 Se pesaron oligonucleótidos de ISIS (32 - 35 mg) en un vial de vidrio, se añadieron 120 μ l de agua y el oligonucleótido antisentido se disolvió en solución calentando el vial a 50°C. Parte de (75 μ L) la muestra precalentada se pipeteó a un micro-viscosímetro (Cambridge). La temperatura del microcomponedor se ajustó a 250°C y se midió la viscosidad de la muestra. Otra parte (20 μ L) de la muestra precalentada se pipeteó en 10 mL de agua para lectura UV a 260 nm a 850C (instrumento Cary UV). Los resultados se presentan en la Tabla 169.

15

Tabla 169

Viscosidad y concentración de los oligonucleótidos antisentido ISIS dirigidos al Factor 11 humano		
Nº ISIS	Viscosidad (cP)	Concentración (mg/ml)
412223	8	163
412224	98	186
412225	> 100	162
413481	23	144
413482	16.	172
416848	6	158
416850	67	152
416851	26	187
416852	29	169
416856	18	175
416858	10	166
416859	10	161
416860	> 100	154
416861	14	110
416863	9	165
416866	> 100	166
416867	8	168
445498	21	157
445504	20	139
445505	9	155
445509	> 100	167
445513	34	167
445522	63	173
445522	58	174
445530	25	177
445531	15	155
445531	20	179
449707	7	166
449708	9	188
449709	65	171
449710	7	186

Viscosidad y concentración de los oligonucleótidos antisentido ISIS dirigidos al Factor 11 humano		
Nº ISIS	Viscosidad (cP)	Concentración (mg/ml)
449711	6	209
451541	10	168

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> Isis Pharmaceuticals, Inc.
 Freier, Susan M.
 Monia, Brett P.
 Zhang, Hong
 Zhao, Chenguang
 10 Crosby, Jeffrey R.
 Siwkowski, Andrew M.

<120> MOCULACIÓN DEL FACTOR 11 DE EXPRESIÓN

- 15 <130> BIOL0107WO
 <150> 61/105,772
 <151> 15/10/2008
 20 <150> 61/174,461
 <151> 30/04/2009
 <160> 274
 25 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
 <210> 1
 <211> 3278
 30 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 <400> 1
 35
 40
 45
 50
 55
 60

ES 2 657 679 T3

aggcacacag	gcaaaatcaa	gttctacatc	tgtccctgtg	tatgtcactt	gtttgaatac	60
gaaataaaat	taaaaaaata	aatttcagtg	attgagaaag	caagcaattc	tctcaaggta	120
tatttctgac	atactaagat	tttaacgact	ttcacaataa	tgctgtactg	agagagaatg	180
ttacataaca	ttgagaacta	gtacaagtaa	atattaaagt	gaagtgacca	tttccctacac	240
aagctcattc	agaggaggat	gaagaccatt	ttggaggaag	aaaagcacc	ttattaagaa	300
ttgcagcaag	taagccaaca	aggtcttttc	aggatgattt	tcttatatca	agtggtacat	360
ttcatittat	ttactttcagl	ttctggtgaa	tggtgactc	agttgttgaa	ggacacctgc	420
tttgaaggag	gggacattac	tacggctctc	acaccaagcg	ccaagtactg	ccaggtagtc	480
tgcaacttacc	acccaagatg	tttactcttc	actttcacgg	cggaatcacc	atctgaggat	540
cccacccgat	ggtttacttg	tgctctgaaa	gacagtgtta	cagaaacact	gccaagagtg	600
aataggacag	cagcgatttc	tgggtattct	ttcaagcaat	gctcacacca	aataagcgct	660
tgcaacaaag	acatttatgt	ggacctagac	atgaagggca	taaactataa	cagctcagtt	720
gccaagagtg	ctcaagaatg	ccaagaaga	tgcaaggatg	acgtccactg	ccactttttc	780
acgtacgcca	caaggcagtt	tcccagctcg	gagcatcgta	acatttgtct	actgaagcac	840
acccaacacg	ggacaccaac	cagaataacg	aagctcgata	aagtgggtgc	tggattttca	900
ctgaaactct	gtgcactttc	taactctggct	tgtattaggg	acattttccc	taatacgggtg	960
tttgacagaca	gcaacatcga	cagtgtcatg	gctcccgatg	cttttgtctg	tggccgaatc	1020
tgcaactcatc	atcccgggtg	cttgtttttt	accttctttt	cccaggaatg	gccccaaagaa	1080
tctcaagaaa	atctttgtct	ccttaaaaca	tctgagagtg	gattgcccag	tacacgcatt	1140
aaaaagagca	aagctctttc	tggtttcagt	ctacaaagct	gcaggcacag	catcccagtg	1200
ttctgccatt	cttcatttta	ccatgacact	gatttcttgg	gagaagaact	ggatattggt	1260
gctgcaaaaa	gtcacgaggc	ctgccagaaa	ctgtgcacca	atgccgtccg	ctgccagttt	1320
tttacctata	ccccagccca	agcatcctgc	aacgaagggg	agggcaagtg	ttacttaaag	1380
ctttcttcaa	acggatctcc	aactaaaata	cttcacggga	gaggaggcat	ctctggatac	1440
acattaaggt	tgtgtaaaat	ggataatgag	tgtaccacca	aatcaagcc	caggatcggt	1500
ggaggaaactg	cgctgtttcg	tggtgagtg	ccgtggcagg	tgaccctgca	cacaacctca	1560
cccactcaga	tactctgtg	tggaggctcc	atcattggaa	accagtggat	attaacagcc	1620
gctcactggt	tctatggggg	agagtcacct	aagattttgc	gtgtctacag	tggcatttta	1680
aatcaatctg	aaataaaaaga	ggacacatct	ttctttgggg	ttcaagaaat	aataatccat	1740
gatcagatata	aaatggcaga	aagcgggat	gatattgcct	tgttgaaact	ggaaccaca	1800
gtgaattaca	cagattctca	acgaccata	tgctgcctt	ccaaaggaga	tagaaatgta	1860
atatacactg	atgtctgggt	gactggatgg	gggtacagaa	aactaagaga	caaaatacaa	1920
aatactctcc	agaaagccaa	gataccctta	gtgaccaacg	aagagtgcca	gaagagatac	1980
agaggacata	aaataaccca	taagatgatc	tgtcccggct	acagggaaag	agggaaaggac	2040
gcttgcaagg	gagattcggg	aggccctctg	tctgcaaac	acaatgaggt	ctggcatctg	2100
gtaggcatca	cgagctgggg	cgaaggctgt	gctcaaaggg	agcggccagg	tgtttacacc	2160
aacgtggtcg	agtacgtgga	ctggattctg	gagaaaactc	aagcagtggt	aatgggttcc	2220
caggggccat	tggagtcctc	gaaggaccca	ggatttgctg	ggagagggtg	ttgagttcac	2280
tgtgccagca	tgcttctctc	acagtaaac	gctgaagggg	cttgggtgtt	gtaagaaat	2340
gctagaagaa	aacaaactgt	cacaagtgtg	tatgtccaaa	actcccgttc	tatgatcggt	2400
gtagtttggt	tgagcattca	gtctcttgt	tttgatcac	gcttctatgg	agtcceaagaa	2460
ttaccataag	gcaatatttc	tgaagattac	tatataggca	gatatagcag	aaaataacca	2520
agtagtgcca	gtggggatca	ggcagaagaa	ctggtaaaag	aagccaccat	aaatagattt	2580
gttcgatgaa	agatgaaaac	tggaagaaag	gagaacaaag	acagtcttca	ccattttgca	2640
ggaatctaca	ctctgcttat	gtgaacacat	ttcttttgt	aagaaagaaa	ttgattgcat	2700
ttaatggcag	attttcagaa	tagtcaggaa	ttcttgtcat	ttccatttta	aaatataat	2760
taaaaaaaat	cagttcagtg	agacacgagc	taagagttaa	tgtgaagata	acagaatttc	2820
tgtgtggaag	aggattacaa	gcagcaattt	acctggaagt	gataacctag	gggcaatctt	2880
gaagatacac	tttctgaaa	aatgatttgt	gatggattgt	atatttattt	aaaatatctt	2940
gggaggggag	gctgatggag	atagggagca	tgctcaaacc	tccctaagac	aagctgctgc	3000
tgtgactatg	ggctcccaaa	gagctagatc	gtatatttat	ttgacaaaaa	tcaccataga	3060
ctgcatccat	actacagaga	aaaaacaatt	agggcgcaaa	tggatagtta	cagtaaagtc	3120
ttcagcaagc	agctgcctgt	attctaagca	ctgggatttt	ctgtttcgtg	caaatattta	3180
tctcattatt	gttgtgatct	agttcaataa	cttagaattt	gaattgtcac	cacatagctt	3240
tcaatctgtg	ccaacaacta	tacaattcat	caagtgtg			3278

5 <210> 2
 <211> 26001
 <212> ADN
 <213> H. sapiens

10 <400> 2

15

20

ES 2 657 679 T3

atgccctcca	taggctttca	gaccttcttc	aaggccaaag	ggaaggcctt	catggaaata	60
taattatgtg	aaacacccca	gaattttttc	acaaactttc	ctgcctataa	acgccaggtc	120
ctaccactgt	ccagtgctcc	acttcccact	gtccagtggg	aagactccct	ccaggacaaa	180
accacccttt	ccttcagggg	tgtgacgtgc	tgtgcttttcg	ttgacagtca	tgcagctgct	240
agacatgtca	cttcttagct	ctccattcgg	gtctgtgtcc	caggacctaa	agaaaagctaa	300
aagaagccgg	gcggtggtgc	tcatgcctgt	catcccagca	ttttgggagg	ctgaggctgg	360
cggatcacctg	gagatcagga	gtttgagacc	agtctgacca	gcatgggtgaa	accctgtctc	420
tactaaaaat	acaaaaaaaag	aaaagaaaaa	agaaaaaaa	ataagctggg	cgtgggtggcg	480
cgggcctgta	gtcccagcta	ctccggaggc	ggaggcagga	caatcacttg	aacctggaag	540
gcgagagttg	cagtgagctg	agatcgctgc	attgcactcc	agcctgtgcg	acgagagact	600
ctgtctcaaa	agaaaagaaa	aaagagagaa	agaaaagaaa	aaagaaaaga	aagaaagaaa	660
gaagaagaaa	agaaaagaaa	gaaagtaaga	agcaagcaag	ctgaaatagc	ttatttttct	720
gttttaaaaa	atagactttt	agtgttcaca	agtaagaata	aaaaaaaaaa	aagcttggcc	780
ttaggaggaa	tccatctctg	ttaggcctct	gagaggcagc	gtcacctgaa	gggaaactga	840
ctgggcaaga	gccaggctct	taggagctgt	ctgtactttg	cttcccctcc	gtccgctctc	900
ccccagcagc	caaagtctcc	tccctccatt	atattgcaaa	tcaatgaatc	cattagactt	960
tccatgtttt	ctttttgagc	tttgagattc	aaggtcagct	agaattaatg	gttaacagct	1020
gacaggtgaa	agtgtgggta	aatgcagctt	tggctagcag	gcacacaggc	aaaaatcaagt	1080
tctacatctg	tccctgtgta	tgtcacttgt	ttgaatacga	aataaaaata	aaaaaataaa	1140
ttcagtgat	tgagaaagca	agcaattctc	tcaaggata	tttctgacat	actaagattt	1200
taacgacttt	cacaaatag	ctgtactgag	agagaatggt	acataacatt	gagaactagt	1260
acaagtaaat	attaaagtga	agtgaccatt	tcctacacaa	gctcattcag	aggaggatga	1320
agaccatttt	ggaggaagaa	aagcaccctt	attaagaatt	gcagcaagta	agccaacaag	1380
gtcttttcag	gtacagtttc	agaacttact	atttaacatt	cctctcaagc	aaatacgctt	1440
tgaaatgctt	tttttaaatc	ataggaattt	aaaaacactt	tacaatagag	aatgattgat	1500
ttttaaaatg	tgtctgattt	agctttgtag	agatgttccg	ctaatatcca	taactaatct	1560
gagaggaaat	gtggaacaac	agaagagtaa	cagtgtctac	tcagtaacaa	gcgttttacg	1620
agttaaaaag	acatccaaat	gcagtactga	aaaatcagaa	gtcttgattt	gtctcactga	1680
tgactccggt	tttcttagag	cagtctgttt	aatgcttact	ggagataaat	agatttatag	1740
gtgaccaaga	caatcgatta	atgtatcagc	cacagacttt	tttaaataga	aaattttcta	1800
agtaggaaat	cattcatagc	tctttgaaag	atatagggag	aggcctcaag	gaaagaaaga	1860
aaggaaaaaa	attgggaaag	gaaacaagaa	tgaaaaattg	gggtggggag	agcggtcaga	1920
tggtggccat	gagaaggatc	tgaacacaga	gagcggcggg	gccggcgggg	aaggaggggag	1980
gaggggagag	cgctgcttcc	ctgtgggttc	cgcttctgc	agagctgtaa	gagttgaatg	2040
ccacacacag	tcacactaag	gaatgctcca	ggattgggaa	agaaaattca	acattataat	2100
gagaacactg	tgaatgctat	tgaattaact	actcccctct	ctccctatft	cttgtaagtc	2160
ttagtgtcag	taaactaatt	ataaatttac	attttatggt	ctaaaagcat	gcaccttttt	2220
ctcattgtag	gatgattttc	ttatatcaag	tggtagattt	cattttatft	acttcagttt	2280
ctggtggtaa	gtagagtgtt	atcttaacta	tgggctggga	gagggaaatc	acactgcaat	2340
ctccacacat	gtggggagaat	cccacacat	ttatgccggg	aaggaaataa	aatgttttta	2400
ttacttccct	gcctgaggct	ccagaggttt	tcaaagcagg	gtaggaattg	aggtgaaaaa	2460
attgtttgta	ctggtaggaa	tctgtgtcta	tatgtgtacc	atatctacat	ccatgcctac	2520
atacatcatt	catttaaatg	atatttaaaa	gcaatattaa	aaagaagaaa	tcttgatttg	2580
cctcactaat	tagttggttt	ttcataaagc	agtcagtcca	atggaacata	cacacacaca	2640
taaaatagga	attttgact	gaaaaatggt	atgtaactat	tcatacacag	tttatgcatt	2700
tcaataatft	aactaccctg	ttaattctcc	accctatgtc	acatctgcta	aatttgttta	2760

ES 2 657 679 T3

taaattactt agccaatatt aagtaggata tatcagtaga ggtattgttt agttccatga 2820
 ccattcttta tttaaaatga aagctgaagc attcctttag aaaaatagct tatgtctaca 2880
 tghtatattt aatttctgat actattgcta gcattttaag catagtaaat tctttttgct 2940
 ggcctatgtg aaaaaaggca aacctagggt aagatattaa aagtaaaatc cacttaatat 3000
 attaaattac acagctcata atttcaatth tctctgtgac aagactactg ctcaggttat 3060
 aatattcctt tgttataaht atctggaat tgtattgtha tttcattgat aaatatgtca 3120
 ggctaaata atttgatata ttttgaacac tggacccaat aactacataa acaattgacc 3180
 ctgaatcagg ggttccacat ccattggattt aaacaacatt gaagtgaat ttttaaaaa 3240
 aaattatac tgcactcaac atgtgcagag ttttttcttg tcattattcc cgaacaaca 3300
 cagtataaca acaatttgca tagtatttac attgtactag gtattataag taatctagag 3360
 atgatttaaa gtacacagga ggctgtgagt aggttatatg taatactat gccattttct 3420
 atcagggact tgagcgttca tggattttgg talctgcagg aggtctggca gccaatccct 3480
 catagatatc aaggaatgat agtgtacata tttaggctct ttatacatgc acatggaaca 3540
 tttacaaata ttgaccacac acaagctctt gaaacaaggc tcaacaaatt ttaaggggtt 3600
 aaaattatac tgatcatgth attcaatcac cgtgaatggg agctagaata ataataaaaa 3660
 gggaaatgaa aatctgcaaa cgthtgaaaa ttgagtattt ataatcaccg tgaatgggag 3720
 ctagaataat aataaaaagg gaattgaaaa tctgcaaatg ttgaaaatt tagtattttat 3780
 acctttttag attaagatga atcagagatg aaatcacaaat ggtaattaga aaaggaattg 3840
 tacaataatg aaggtacagt atatcaaaaac tttgagatgt aaccgaaatca gtgttgagat 3900
 caaatgtata gatttacatg tatacattag aatacagaaa agggaaaaat taatgatata 3960
 agatgacaag aagatagaga atagcaactt aagtgtctaa aaattagaag gcagaaagaa 4020
 gaaatcgcag aatttaatta aatggaagac acacatattt gagaggtcaa cataaccctc 4080
 ttctagccca ttttataagg tcagggtaat cttgacacca aaatctgata ggaaaattct 4140
 gaggaaaaaa agtccacaggt cttttatctt atgaaatatt gtacaaatgt cctaaacaaa 4200
 atattatcca acttaaccctg gtgattgttt aaaaaaatta aaggatgatt acattgtgat 4260
 attgtgacaa agttgggttt attccaggaa tgaagattg atttaacatt caaaaaatca 4320
 tagatgtgtg acttcgggggt acataccgaa aaaaaagaag ggaaagcagg aactcacaca 4380
 gatataatg tacaccactt ccatagcagc attattcaca ctaaccctaaa ggtggaagca 4440
 gccatgtgtt ttatcaacag gtgactggat aaagtgtggt acatacatc aaaggaatat 4500
 tactcaacc taataagaaa ggaatttctg acacatgcta tgacatggat gaaccttgag 4560
 gacattacg taagtgaat aagccaagtca caaaagaaca aactactgtgg gatctcactg 4620
 ataggaggta cttagggtag tcaatttcat caagacggaa attagaacag aggttgccag 4680
 gggccgaggg gccaggggaa gggctgaggg ttgggtttha atgggacag agcatcagct 4740
 ggcgaagtgt aaaagtctg gagggtgag gtgctgag ttgcacagca atgtaaatc 4800
 cttagtgcc acagaactgt acactcaaga tggctacatg gcacatggta tgctatctgt 4860
 cataataaaa aataaaaaata attttaaatg ttaatatgtg ccgaaaaatg cttgctaaaa 4920
 ttctattaat gatcccaact ttaataaaac tggaaatgga agagaacttt catcagctat 4980
 taaacgatat tttaaacaaa agcaacaaa aatccaaacc aaaaatcttc aagaaacata 5040
 atacgtaata gccgaaatatt gaaagctttc ccaagggatt gagaatagga caagaatact 5100
 tccattatt tcaatttact ctgactgga ggtactcgtt ggtgctgtaa ggaagggaaa 5160
 taaaaggaaa acgattagga ggaacataag ctctcgtttt tcacagatga tgtgattgag 5220
 tacctagaaa aatccaaaaat faaccatcac ataaattatt tgagcctaat aatfaaatga 5280
 gtaagaagtg tcgaataaac acagcagaca acttgctcgt acttgctcgt tcgcaaaagc 5340
 agatgaaact gtttttactg acactagaag cagcatgtgt tccatgtgt ccacatccat 5400
 gcactcaaac aaccttgacg tgaatatttt tttaaaaaat tgtatctgta ctcaactgt 5460
 gcagagtttt tttccaaaaat gtttttccaa aaatttttaa atgtttatat gtttaggggg 5520
 tgaagtgtca gatttcttac atacatatat tatcgggcgg tgaagtccg gctttttggtg 5580
 taccatcac ccaagtagtg aacacagcct ccaacaggta atttttcaac gctcaccctc 5640
 ctccatcct cccatctagt ggcataattga aaatcaattt gtcttgtaaa attaataaat 5700
 ccaattagga gggggatata ttctaaggaa attagtgcat gatgcacaca cacacacaca 5760
 cacagaacac gtgtgtgccc atgtgcacat gagagagagt gagagagaaa ctgggtcttg 5820
 ctctgtcggc caggctggat tgcagtggta aaatcacagc tcaactgcagc ctcaaaactcc 5880
 caggctcagg agatcctcct cccgagtagc tgggattaca ggtggaaca 5940
 accatgcccc gctagtattt tttttttttt ttgtattttt tatagagaca ggtctctgcc 6000
 atgttgcctc ggctggctct gaactcctca gctcaagcaa tctacctacc ttgctctcc 6060
 aaagtgtggt gattacacgc atgagcact gcgcccactc cgcattatta aatataaac 6120
 atttatttga ttcatcagtt aatattcttc ttaaaagtac tattttaatg tagcaagatt 6180
 gctttccacc aaaaggtggg gtttccacgg tggggtttcc aaattattct caatgggtg 6240
 aggatgtgtg ttatcacacc cccagccat cagatgctgt cagaaaagtga tcaactctgaa 6300
 gtctttggtt caataagca cagggtttgg ataaagagac gcaattagga aaggaaaaag 6360
 cagaaggctc gttccagacc tggatgagat cctaaaaagc agcagctttt gccagtaaac 6420
 atctttgaaa tgattcaatt accctcaaac cactccttgt ctccaagaca atcactcata 6480
 agcacaattc cattgaagcc aacgtacat tttgtgattt tctgttccac ctgaggctgt 6540
 tcattcaata aactcacata aaagtgttta ttgccttgat ttccaaattc aggcgtattt 6600
 cctggtaagt agagctactt gccttgcttt tatgagatta ccacctaact agatgtatgc 6660
 ccagtaaaat ccaacataac gcatgccatg tactacatca cagaatgtgt gactcagttg 6720
 ttgaaggaca ctgcttttga aggaggggac attactacgg tcttcacacc aagcggcaag 6780
 tactgccagg tagctgcac ttaccacca agatgtttac tcttacttt cactggcgaa 6840
 tcaccatctg aggatccac ccgatggtaa atgcttatgt ttctacatcg aggagacaga 6900
 ttttaaaagg gagattgcta ttcttaacac atttccatct aacattttat aaaatttaac 6960

ES 2 657 679 T3

attaacaact ggaagataaa ttgtctttca gttgaaatat tgttacagaa agaagtgatg 7020
 gtgtttacgc aatttagaaa agaataaata tgcctccaag tgtagacttt ccagcctctc 7080
 ctatagctctc atattaatgg tatgtttctt ctgtttgtct caatttttac acttctttaa 7140
 catttcacac tttgcttttc tatcatttat taatttttgt cgtgcttctc aacaaactgg 7200
 aacttctccc aactatttta ttgaaaaaaa ataaaaatatt taaaaagaaa atttgaaaaa 7260
 aagtacagta cagtgatccc cctgccacca ccaaaaccgc aatgtttgct atatttgtag 7320
 agcaatatac aatatacaat acctatattt gtatacatgt ttaaccgttt gaaataattt 7380
 taaaaatga cactttacc ctaaataactt cagcatgcac tatcctacac aaaagacata 7440
 cgaatattaa caagaattcc tttatattat ttcagttttc cctcaaatat aattttatagt 7500
 aattaaccag aatctttacca agagtcactc actgcattgg gtggtttgct aggtttaaaa 7560
 cattttaaac agtccacca ccatittgtat tcccactctg agcttgaaaa tttataataa 7620
 agcctttctg tagaattaag ttttcaactt ctttattatt gctacattca caggcattta 7680
 tgtagcacc agaacttata aaatttacta tcccagaacc tagagcaggg attggcaaat 7740
 gtcttcttaa taacgcagag taaatagtgt aggctttgtg ggcaaaacc acagtaaac 7800
 caagatatt atttaagtat ttatgtcacc acttaaaatg taacaatttg aaaatataaa 7860
 aatcattttg atagctaac aggctaaaca gaaacacaca gatttttggg tgcattttac 7920
 caacaggtcc tagttgacac attcctgttt gttcctatta gaaaggagta ttacatgcag 7980
 tctcttaagt gtagggatat tgaagtaaaa aacaaactca gaatcctgtc aagaaaaat 8040
 ttgttttggc atagataaaa gtagtttggt tccttctttt tggctttctg tgtgctgact 8100
 tttagatcc attattttaa aaacataaat tcctattcat taatagtat tttttaaaa 8160
 aacaggttta cttgtgtcct gaaagacagt gttacagaaa cactgccaag agtgaatagg 8220
 acagcagcg tttctgggta ttctttcaag caatgctcac accaaataag cggtaagata 8280
 tgttctcaga atcaacaaat accagctgtg atgtacacat atcgccacat cggatgtgg 8340
 tttaaaggta tgaatgaaa cactgctatg tggaaataaa ccccttaat gaagttcttt 8400
 cagtgtagag taaaactag tatacataca tgcctgccc ccaacacact gtaaaaaact 8460
 cttacctca tagaagaca tatcttacta cctcacttcc catcatttat ttatattctt 8520
 tctatttccc agcctaaaa atctaaatgaa agtctttttt tttttgagac aggggtctcac 8580
 tctgttctc ctctgtgagc gcaatcacagc cactccagcc tcaacctctc 8640
 gggttcaagt gatcttctct ccttagcctc tggagttagc tggaccagag gcatgcacca 8700
 acattcccag ctaattttgtt caattttcct agagacaggg tctcactgta ttgcccaggc 8760
 tggctcctaa ctctggcct caagtgtact gcccgcctcg gccttcaga gtgcccggat 8820
 tccatggtc ccagtcgaaa ttctttatta aacgtattaa tccaaattga aaggagcaa 8880
 tataaagggt gaagtgcac tggagaagag aggtaggctc agaaaatcaa aatgtgaatt 9000
 cgaataatc aaattgttac agtgaagaa ggacattggc attcttttac tgcttccatt 9060
 tacaagtcta aattttgac attaataaa cgaaagacct ctgaggaag gtgggtgaaa 9120
 aagttgaaag agtgcagtt tgggacagc tgcttaggtc attgccccta gaactctgaa 9180
 ggtactcaty tcttctgctt ttatttccag cttgcaacaa agacatttat gtggacctag 9240
 acatgaaggg cataaactat aacagctcag ttgccaaag tgctcaagaa tgccaagaaa 9300
 gatgcacgga tgcagctcc acgcactttt tgcactacgc cacaaggcag tttcccagcc 9360
 tggagcatc gtgagttagt cccaggacat tgcagtggtc gatgaaaaac agaactctga 9420
 tttactaaaa agcttttggc atcaacttta tgcccagaatt tattttgaac ccttaaaaaga 9480
 cattctatac atagtactc tagttttctt catgaaaaat acacttgaag cctaatttgg 9540
 atgcatttca tttatggtaa ggagtctatc ttttaataac actgtcagaa aatatata 9600
 acttggctaa tttcaaaagc gctacacttt taaattggca cttttgaaac agctgcaatt 9660
 ggtatgattg tcaagtccct tcccagctca aaaaatgta cagtctaac gaataaaaat 9720
 aaaaacctac tctctctctc tctaaataac agttccttac ctaagacaaa atactcatgt 9780
 aaaaagtctt atcctgctcc atactggatt ttgaaatatt tcaaggataa atctatcaca 9840
 taaggattta aaaattatct gatctctaatt aaccaaactc gtgttctcat ctttaaaaat 9900
 ttactagggg aatagattat taatttgtat attcagaaat atttgagatg atttagattt 9960
 tcatagtaaa ctgcatttat ctggaatcaa cagaaaagtg aaaaacattc aaattactaa 10020
 tacttgcgtt ttaacattgg attttaacat tctgtctctc acattcaca agaggagtga 10080
 acagaaaagca aacaaagcat caacgagtta tttcaaaaac aacagtggtg aacaaacacac 10140
 acaccaaac cctaaattca tgatttgact tgaaggctt atcttttagc atcttttagc 10200
 gacagctttt atgtctaaga cttaacagaa tgtgaactgc aagacaagaa attggagggt 10260
 tctaagcaag ataaagttaa gtcattaaaa gtaagaagga cttagccagg cgcggtggct 10320
 cacacctgta atcccagcac tttgggaggc cgaggcgggc agatcacctg aggtcaggag 10380
 ttcgacacca gcctgaccaa tatggtgaaa ccccgctctc actaaaaaag aatacaaaaa 10440
 ttagccaggc gcggtgggtg tcccagctac ttgggaggct gagacaagag 10500
 aatcgcttga acccaggagg cggaggttgc agtgagccaa gatcgtgcca ttgcaactca 10560
 acctgggcaa cagagtgaga ctccgtctca aataaaaaaa aacaaaaaat gagaagggt 10620
 tgagaagtca ttcattcatg cactctcctt cttcatgtgg tcaactctc aagctgtcat 10680
 tatactgaag aagaataaaa cttacacaat tcacaggtgc ttagcaacac tgctgggacc 10740
 atgcccagcc attcagcctc ccagatggat gcttgggggt ctgcaggtc ctctctcaa 10800
 aggggacttt cttaatatct catgtttttt cctccttga gttggaagaa taagacactt 10860
 ttcctttttc tttttattca gtaacatttg tctactgaag cacaccaaa caggacacc 10920
 aaccagaata acgaagctcg ataaagtgg gtctggattt tcaactgaaat cctgtgact 10980
 ttctaactcy ggtaattatc gacttcttga tgatgtaatt caaccattaa atatgctgat 11040
 gattacagta gatctcactc aggataccag cttatgctca cgatgaaacg gaccacaaaga 11100
 tctttacctt cttcatgta tagatttcat catgtcctat acagttagat cctctattta 11160

ES 2 657 679 T3

aatttccagt ttaaaaaaat catgccattt tcttctaagt aaaaaaaaaa taaaagatct 11220
 tgggatacac ttaaaatctt taatatggaa tttacacata ctgtgaccgg aattttcctg 11280
 atagctgggt aattgagtcg cgacatagtt tcttccgctg cgcagcttgt attagggaca 11340
 tttccctaa tacgggtgtt gcagacagca acatcgacag tgcatggct cccgatgctt 11400
 ttgtctgtgg ccgaatctgc actcatcatc cgggttgctt gttttttacc ttttttccc 11460
 aggaatggcc caaagaatct caaaggtaa gagttaacaa gtaaggataa tttgttatct 11520
 tctaaaaata gctgatcaaa atccatcatt aaaaattcca agtaactaaa aatttactct 11580
 aaatgtcagt ataggataaa agttgcaaag aatttctagc cctctccctt tttctattccc 11640
 cacctactta ccacaaacc aacattaccg aggactcttt tttttttttt tttttttttg 11700
 agatggagtc tgcctctgct gccagggctg gagtgcggtg gcatgatttc agctcactgc 11760
 aaccttcgcc tcccaggctc aagcgattct cctgcctcag cctcctgagt agctgggact 11820
 acaggcatgg gacaccacgc ccagtaattt tttttgtatt ttttagtagag atgggggttc 11880
 accatggttg ccaggctggt ctcaaactcc tgacttcagg tgatccacct gcctcggcct 11940
 cccaaagtgc tgagattaca gggttgggccc accgtgcccg gccagtaaat tttaaaaata 12000
 atataaatat tacttcacct aaataaattt taggtacagg tacagttgtg ttacatggat 12060
 atactgtgta ctgggctttc ctgggctttc agtgtagcca aatagtatac attattccca 12120
 ttagataatt tctctgcctt caccctcctc tatcctccca actcctctgag tctccaatag 12180
 ctttacttcc actgtctctg tgcctgtgta cacttttatt agctcccact taaaagtgag 12240
 aatctacaat atttgacttt ctgtttctga gttgtttcac ttgagataat agcctccagt 12300
 tctatccatg ttgctgcaaa agatatgatt ttatgatttt tttatggcta agtaacattc 12360
 tataagtata tctatacacc acattttctt tatccattca tttgctgata gactccttagg 12420
 ttgatccata tctttgttat tgtgaatagt gctgcagtaa acatgtgagt gttaggtatct 12480
 ttgtgacatg attttttttt ctttcttttc ctttggctat gtaccagta gtgggattgc 12540
 tggaggtctc caccttggca aaggggcagt tgtctagtcc taaatgaaat gaagagattc 12600
 catttccatt tccatgacaac ttaaaagacaa ttcagtccaa tgcctttgtt aaaaataatg 12660
 aaccaggaac agaaagagct gaaaatgtca gtgaaatgtc aaacccaag tggagagaga 12720
 gagagaggtg gaaatgaaat tctccatcaa gtgggttagg gtgggtggtg agggaggttt 12780
 gagaattgag tccctgtttc cttaccaatg gaaattaaca taggacatca gaaacagcat 12840
 ggaaaatttc tttgattatc aaaagtacac tagctaaggt tgctgtccct cttttattta 12900
 tttattttat tgagacaggg tcttgcctct cactcagat ttggttgcac tgggtgtgat 12960
 ctcagcccac tgcagcctcc acttccatgg ctcaagcaat ccaccgctct ctcctccca 13020
 agttgctggg accacaggtg tgcaccacca ccccagcta atgtttgttt tttttagtag 13080
 acagagtttc gccatgttgg ccaggctggt ctgaaactcc tggcctcaag caatccacct 13140
 gccctgggtg cccacagttg agggattaca agcctgagcc actatgccc aactccacct 13200
 cctcattgac aacattcact taaacaagca aacaaaatc cgtaaaatta agtcagcttt 13260
 aaaaactggc ttgtatatac ctctgaaatt gaactctcag agccctcagc acttgccctga 13320
 ttggcctcct gttgatgaaa agttgtcctc cagacaactc agccaagggg ggcctgtgt 13380
 gccctgccta tcacatgagc ctcactttcc actgagtgag gctgtcattt cagaagcacc 13440
 gggctctgta catgaaaata tatctgttac catcacttac taaacaatcc tagtagaatt 13500
 tgtttggtgc ttattatgta tctgaagc ttctgaagc tggggatacc atttagttaa 13560
 ctaaatcgac aaaaactttg cctattggac cagagtggag atgagagaga agtgaccaga 13620
 tcgatctgtg ttatcagcag acagccaata agatttgctg ataggttggg ccacggattg 13680
 tgaaggagtc agtgtagcga caagactttt tggcccagg aactggaag atggaaatgt 13740
 caatgacaga atgtggagga tttcgaagc agcagagtgt aggagaagca atgcccctgg 13800
 ctcacttagg gcaaaggggt gaattggcaa ctggaatagc aagtcaaatt cagaagagag 13860
 gtttatgtgt acatctgtgt ttagggtcca ccaatatac gctgatactt tttaaaaatc 13920
 tagtgaatt atcaaaaggt taaatgcaga gagggaaaga agtaggtcca aagatcaagc 13980
 cttgggacat tggaagttta gaaataagaa agatgtcatt gtcacttgta attttgtgct 14040
 agtcaactgc cttttctttt gtcttattac cttactgacc aattcctaga ataggaataa 14100
 cacatttgat ctttaataca gtatgtgata ggaacatggc ttctataagc ccaaacttgg 14160
 caatttaaat ttaaaatctt taaaattaaa taaaactggc tgggtgcagt ggctcacgcc 14220
 tgtaatccca gcactttggg aggccgaggg ggtgaatcac gaggtcagga gtacggagacc 14280
 atcctggcca acatgggtgaa accccgtctc tactaaaaat acaaaaagta gccaggtgtg 14340
 gtggcatgtg cctgtaatcc cagctactca agaggctgag gcaggagaat cacttgacc 14400
 cgggagggcg aggttgcagt gagccaagat cgcgacactg cactccagcc tgggtgacaa 14460
 gagaagact atgtctcaaa aaaaaaaaaa attttaata aactaaaaa ttcaccttcc 14520
 cagctgtgtt agccacattt caagtggcca atagccacat gtagttggca gttactgtat 14580
 tggatggcac aggcatagaa tatttccatc actgcagaaa gatctatgga cagtcttct 14640
 ctgactgtg attttgccta cttaggaaaa gtcactcttt tccaggaaga tgcttccagg 14700
 gtgtggagta aacgacggac ttcaccatc tccttataaa cctattgcaa ccttggatag 14760
 gaggtttcta ggtagcatga agactcttga atctttaaga taggctggga gtgttgaaag 14820
 gaaggaaatg aaaaagggaa atactaggaa gactgacaat agagcaagct cagaaaaatt 14880
 ttatggaggt gatttagtta gaaaatttgt ctgcaacctc agggccatgg agtggtactc 14940
 catggtttat ggggtgaaat ccgtggttta tgaagagtac tttcaaaata ggaaaaatct 15000
 cacaactaag tgctagcatg agctgacttt actttctcta ggtgctgtaa aaatgttttt 15060
 atgtgtttga tatgatatac ttctacttcc cttttgtttt tgttagaaat ctttctctcc 15120
 ttaaaacatc tgagagtggg ttgccagta cacgcattaa aaagagcaaa gctctttctg 15180
 gtttcagctc acaaagctgc aggcacagca tcccaggtaa actgagagtt ctgcattctg 15240
 gctgagagtg accagccccg agggagctga tacatgctga gggaggtct cactctgaca 15300
 tgtggtctgc tgtctagttg tctgccattc ttcattttac catgacactg atttcttggg 15360

ES 2 657 679 T3

agaagaactg gatattggtg ctgcaaaaag tcacgaggcc tgccagaaac tgtgaccaa 15420
 tgccgctccg tgccagtttt ttacctatac cccagcccaa gcatcctgca acgaaggaa 15480
 gtaagccata tgaagggtta tgcagacacc cttgtcccgt ctgctctgta ggtgcattat 15540
 gtttataccg ttttgtttcc aactgcaggg gcaagtgtta cttaaagctt tcttcaaacg 15600
 gatctccaac taaaatactt cacgggagag gaggcatctc tggatacaca ttaagggtgt 15660
 gtaaaatgga taatggtgag tataatgtca cttgaaaaaa tatagctgaa ggaattattc 15720
 catgcttcat acatcacaaat caagactgtc agttatagcc acagaaggga gaacattcag 15780
 gaaataacaa attttgcaat tttctattat tttcactcct gtcactcaag ctgaccatgi 15840
 tttaaaggta aatattgagg cttgactaaa ctgtacattg cctagtatta actaaatata 15900
 tgctttaatt tgacacattt atacacctgg catttctggt ttctttcttt cttttttttt 15960
 tttttttttt tgagacacag tctcactctg ttgcccaggc tggagtgtag tgatgtggtc 16020
 agtgttact gcagcctctg gcttgaactc ctggactcga acaatcctcc caccttagct 16080
 ccctgagtag cttggggtac aggcgtgcac cacaacactc ggctaatttg ttgtagagat 16140
 gggatcttgc catgttgccc aggcgtggtc tgaactcctg ggctcaagca atcctcccgc 16200
 tttggcctcc caaagttctg ggattacagg cttcagccac tgcaccagc cacaactggc 16260
 atttcctaatt gagacacaga ctctgccaac actcctgtta tcaaggccag taactctttc 16320
 tattatcctt tgtaagggaa ttatcgatca gcactttggt tagtcaaat actaattttc 16380
 ttccaaaaat tgtgtatcta ttcaagaaat actggagcac ctctttttta gggcttttat 16440
 tcagattcca tgcagggttc tggagactta gggattggca aaggttaagg taaaacttta 16500
 ctagtaacaa tgagtgtggt aggatggaaa taagtgttta gattacagga gacctgtaat 16560
 aacataaaag ttacaataaa aatccaacca cgagtgttc taagatttaa gccaattttc 16620
 gagcatagtc acgagagatc atccttaact aaacagaatt gttctaagg acaaaatccc 16680
 caacaggaaa gaacacacca caaacactcc tgcttaaat accatagtaa cttaggatgg 16740
 ctttactata tattgtattt cataaagctg catgttctta tactgtttat tgccaaatgt 16800
 ccaatattac aatacactat aaggtgcaac tgagatttaa tgaataaaat ggaagtaaca 16860
 atcctgcctc gtgatagttt tagaagcaca aaaacattct gtgtcagatt atctgctgta 16920
 ccgagaaggc gaatcaatcc ttaatttctg agaacttgt ttgtagaaca taagacggtt 16980
 atattgcttc caacactggt atccctaact acagactatg ccttcttaga gcttagaggg 17040
 gctccgatga aaatctctgg atggctcaag acttcttaaa aagcaagtca attacgctgt 17100
 atctcataca ttctgttttt ctcacaataa atttccctaa gacaagaagg agcattcggc 17160
 accattctgt tgtctttttc gcgttagaag ggacacttag caaatgttgc caaatgttgc 17220
 tghtaagtaa tghtgacatg gtttaataaa atgggaatga gcacgtatac ctcaatacat 17280
 tgcagactgc attttcccc ttccctcttc attatggttt tctctgttgg atttatagac 17340
 tctggcctgt agaagttaca ggaatgcca ggtatagatt gatagctaca ggagaaaatg 17400
 taagataaag gaaaataaag tcttacgtct tttcagtgca actttggagg gagtgaatta 17460
 gataactagg tttttactgc gctgtatttg atgaaataac cccctaattg gaaagggaaat 17520
 agctgctgta gatatttatt gtgccttggg tgtcactggg ctacaatgta acttaacttt 17580
 ctgaaagatg atagcagcac cattaaaata aacatttctt accacaaaat atgattctaa 17640
 acacatattt tcagcatctt gtttaaaact agaaacagca taggatgaac ctcaaggcct 17700
 ctacattctg ccttgagttt ttcttaaaat atcttagtta ctatttacct attaattttc 17760
 ctaaaattta cctttatgac gcttcccacc ttgcagaaat tccagaatag atggccctcc 17820
 aaaatgaatt ttccaccttc cggctctaaa atgagagcct ctgttcaggc ttccgaagtc 17880
 acatctgctc cgttctcacc tttagctgtg tttagctgtg tttcctccg aactcctct 17940
 ctcatcctc cctctatatt gaaatctgcc ccagaattat acactcattt tcttaccagg 18000
 gaaaaaaaag cctgaaaagg ttgttttaca cccacaaaac tagtgaatgg accttctagg 18060
 acccgcttc tcactagtga ttctctgttt aacttagact cctcccttag ctcaggacgc 18120
 ggagccttct gagcacctga gcctgtttat tctaaaatg tctctgggac agcacattga 18180
 catcacctgg gagcttgtaa gaaagaatth caggaccac acagatgta ctgagtcaga 18240
 atctgcattt tgaagctac acaggcaacc cacaggcaca taaattttga gtcgcatagg 18300
 tgtgtgctg tgtgtgctgca cgtgtgtttg cgtgtgtttg tgtgacgtg tgtgtgtgtg 18360
 tgtctagaat actgctgtct acgaacaccc tattccatc catctgtgtt ccatggctcc 18420
 aaccgggagg gtgggttctt gtgtcgggca tccagtaagt agaaatagag ggcactgtcc 18480
 tgtctaggca gcccacaagag gagggatgag cctgagtcaa agtcctgaa 18540
 aagtaccaag gacccagag aatcccaaac tgtcaacaag gccaaaaggc agaggaagtt 18600
 catagcagat cagtcttact ttggacgtgg gtggagcagg agtgactggg atcatggtca 18660
 gcagagctac tgggacagg caggaactgg acaatggctg cagcctgagg gcaagggtct 18720
 tgccttttct ttctaagagc agtttcaaaa cgccagcagg gctgggtcaa acacagatgg 18780
 ctgagcttcc aggcctggag ttctcattca ctggatctga ggttgggctg aagaatgtgc 18840
 atttctaaca cgttcccagg tgacgtggt tatcatttga aggagggtaa gacagcctg tagtaccaca 18900
 tttaaaaaca ccattcacgt tatcatttga aggagggtaa gacagcctg tagtaccaca 18960
 caaggaggc tacattctta ggggtgtgta attacaagat gacttagtca attccattt 19020
 tcatgtgcat gttttgcttt ggcagcttga ttataaagtc tctgtaactc agggctatga 19080
 taaactattg acttgaggaa aggttttctt cttgttctct aaggagcata attactgatg 19140
 gaaaggaaga tgtaggaagc tgctcatcac aatgcttctg ttgcagagtg taccacaaa 19200
 atcaagccca ggatcgttgg aggaactgag tctgttctgt gtgagtgccc gtggcaggtg 19260
 accctgcaca caacctcacc cactcagaga cacctgtgtg gaggctccat cattggaac 19320
 cagtggatg taacagccgc tcaactgtttc tatgggtcag taccacggct gtttttatta 19380
 gttcatcttc ttcacacatt tataaaaaat attactagca tgyttaggaaa taaatacttt 19440
 aaccaattag attgtcttat ttgcaaaatt aattaattgc ttcagtggtta aaaacgcaa 19500
 aaaggaagag ctcatggtct cccagcatca gaacaggtgc aggtacaagg ctgcttgact 19560

ES 2 657 679 T3

gcctgctatt ccgcttccca tttaccgcga ttcacatccc caagggcctt catgttattc 19620
cctgcaagag catacctccc tctgtgcctc gctctgtgca ctgtgcccgg aactaaactc 19680
acagagagatt taccattgtc tgaatcaaat ttctaataatg tgtgtgtgtg tgtgtgcgtg 19740
tgtgtttaaa tacagaaagt ggccagggtg ggtgggtcac gccctgtcac tcagcacitt 19800
gggtggctga ggtgggagga ttgctcaatg ccaggagtct gagggtcagcc tgggcaacat 19860
agtggagacct cgtctctaaa aaatatttaa aaactagcct ggcatgggtg tttgtgtgcc 19920
tgtagcacca gctgctcaga agtctgaggt aggaggattg cttgagccca agagttcaag 19980
ggtgcagtga gttactacag tgccactgtg ciccagcctg agcaacagag caagacccta 20040
tctctaagta aataataaaa atacagaacg agttcgggat gcacccctac attggattcc 20100
ttacttaggt cactttcagc gttggccaaa caaaaaggct ccagctgggg gtatatatat 20160
tccagggag ttaagttggc caaaccttcc gtttgcactc tcagtatcct ccgagttgtt 20220
tccagacaca gttttgtgtg ctttttagtt ttggttttct ttttaataca atctgcagca 20280
cactcatggt aaactcaaga acacatgtga ggccaaagat tcccgttacc tgtcacatat 20340
gggaatggag tagcagaaag cctagtttct gtcacagcta gttactggcg agattgagac 20400
tgagtccagc ggtcttcgtg tgtgtgtgtg cgtgtgtgtc tgtgcagtgt gcgtgtgtgt 20460
gcgtgtcgt gctgctcagc gcgggtgtgt gcgtgtgtgt gtgttggagc acggaggag 20520
tgctcattca tttttgtgt ataatggatt ttctttatag ggtgaatag tttttatcc 20580
cgaaaaatct taggataaaa tcactttttt ctacctaatt gtccatcatt ggcagaaaa 20640
attagtaata attaaacagc cacacacttc acaatgtctg ggaattattt ttagtaaaag 20700
aaattcttt cccctgtttg tttgctcctt agggtagagt cacctaagat ttgctgtgc 20760
tacagtygca ttttaaatca atctgaaata aaagaggaca catctttctt tggggttcaa 20820
gaaataataa tccatgatca gtataaaatg gcagaaagcg ggtatgat tgccttgtt 20880
aaactggaaa ccacagtga ttacacaggt acggagaatt ttatccgga agttgtctcc 20940
aatggtgaac tggataaaat gttaaacact actagactta cggcctgacc ctgccaatct 21000
ctcatgctg tatcatcatg aaagggagag ggccctggaat gctagtcat cactctgcta 21060
aggctgacac actttcctgg ctattgaaac ttattttggg aatgtgggta aagagatacg 21120
ttttcctgag tcttcttcag gtcgatagaa tgacataatt tcataact tttggaatag 21180
aaagataatt tagtctaaag ataatttatt aaagataatt tagggatgaa ggaattgaa 21240
ttagaacaat taagcaactt gtgcaggatc aaagtgagtt ggatgaggag ttagcgggta 21300
gggtgaggct tgtctctctc tcgcccctctc atcctggcac atgtgagata tctgtgtaa 21360
cctgagggag gaaaatacac gacaacaagg caaaaaatga atatagtaaa caaagaaaa 21420
acagataatg tacagtggaa gaagagtctc ttctggaaaa gaggatata tttgcgtctc 21480
atatttaaac cagcattttt taaatttaga ttctcaacga cccatattgcc tgccttcaa 21540
aggagataga acactgattg acactgattg ctgggtgagt ggatgggggt acagaaaa 21600
aagaggtaaa aatgatgttg ttataatgtc tccatcctag aaatgaagag cggaaccttt 21660
tctgcccctg caagtcatgt agctgaagca caactcgagt cacactactc agttgcagga 21720
agcggataatt taaagatgta gaggcaaaaa tcaccaagt gaggctgtg ttaatgaa 21780
ttgattggaa attttaaatg tgactaaatc tctttaaaga ctaattatat ttaatgaa 21840
ttaatgtgaa gcctagcact tttcagtaaa tgttctagcc tgctatccaa ttactttct 21900
gggaagtcat tccagttaga atctataatta aittttgaa ttaattaa 21960
ggtacagcga atagtgggaa taatgtcttc ttcatactg taattataaa aggtctgtga 22020
agtaaatcta acattttttc cttctagatt tttataataga catgagttt gtgttgtgt 22080
tgttttgaga tggactctcg cctgtcggc caggctggag tgcagtggca cgatecggc 22140
tcactgttac tcccaactcc cgggtcaag tgattctct gcctcagcct ccgagtagc 22200
tgggattata ggtacccaac caccacccca agctaatttt ttgtatttt agtagagacg 22260
gggtttcact atgttagcca ggtgtctc atctcctga cctcgtgatc cactgcctc 22320
ggccttccaa agtgcgtgaa ttacaggcgt gageccccc gacctccat gatttttatt 22380
ttaaatatat gtggcccagc accactgggt gctcagcct gtaatccag cactttggga 22440
ggccaagatg ggtggatcac ttgaggtcag gagtcaaga ctggcctggc caacatggtg 22500
aaaccctgtc tctactaaaa atacaaaaat tagctgggca tgggtgtgtg tgccgtgat 22560
cccagctact cgggaggctg aggcaagata atcgcctgaa cttgggaggt ggaggtagca 22620
gtgagctgag attgaccac cactccag cctggcgac agaaagagac tccgtctca 22680
ttaaaaaat atatatatat gtatgcatat atgtttatgt atgtttatgt gtattgtgta 22740
tggttattct acaaacgaac caaaaaaatt ttttcagac aaaatacaaa atactctca 22800
gaaagccaag atacccttag tgaccaacga agagtgccag aagagataca gaggacata 22860
aataacccat aagatgatct gtgcccgtca cagggagga gggagagac cttgcaagg 22920
aacagagtg tcttagccaa tggaaatat gcaaatggga atgcttaatg cgttggggt 22980
ttttgtttg tttgttttt tttgtttgt tttttttgag acagagtctc gctcgtgtg 23040
ccaggctgga gtcagttggc tcatctcag ctactgcaa gctctgctc ccagttcac 23100
gccattctc tgcctcagcc tcccaaatag ctgggactac aggcgacagc taccaagccc 23160
agctagcgtc ttttttttt ttagttttag tagagacggg gtttcaccat gttggccagg 23220
atggtctcga tctcctgacc cctgcctggg cctcccaag cctcccaag tgctgggatt 23280
acagggctga gccaccgctg cgggctgctt aatgcatttt aaaaagcagt cttctgcca 23340
tgagcagga acacagtgt tttgtttgac ttgactgaa atcaaaaagc agggattga 23400
ctggatgaac gcaagcacc aggttctctg cagtatatta aggggccaag acaacattt 23460
aggcaaatc agcctgagca agatgtgctg aagatgggaa gcgtctgagt tgatctgtc 23520
accttttct gtctcccctc gttctagggg gattcgggg gccctctgtc ctgcaaacac 23580
aatgaggtc ggcactcgtt aggcacacg agctggggc aaggctgtg tcaaaggag 23640
cggccagggt tttacaccaa cgtggtcag tacgtggact ggattctgga gaaactcaa 23700
gcagtgtaa tgggttccca ggggccattg gagtccctga aggaccagc atttgctgg 23760

ES 2 657 679 T3

```

agagggtggt gagttcactg tgccagcatg cttcctccac agtaacacgc tgaaggggct 23820
tgggtgttfgt aagaaaatgc tagaagaaaa caactgtgca caagttgtta tgtccaaaac 23880
tcccgttcta tgatcgttgt agtttgtttg agcattcagt ctctttgttt ttgatcacgc 23940
ttctatggag tccaagaatt accataaggc aatatttctg aagattacta tataggcaga 24000
tatagcagaa aataaccaag tagtggcagt ggggatcagg cagaagaact ggtaaaagaa 24060
gccaccataa atagatttgt tcgatgaaag atgaaaactg gaagaaaagg gaacaaagac 24120
agtcttcacc attttgcagg aatctacact ctgcctatgt gaacacattt cttttgtaa 24180
gaaagaaatt gattgcattt aatggcagat tttcagaata gtcagggaatt cttgtcattt 24240
ccattttaa atatatatta aaaaaaatca gttcagagtag acacgagcta agagtgaatg 24300
tgaagataac agaatttctg tgtggaagag gattacaagc agcaatttac ctggaagtga 24360
taccttaggg gcaatcttga agatacactt tcctgaaaaa tgatttgtga tggattgtat 24420
atatttttaa aatatcttgg gaggggaggc tgatggagat agggagcatg ctcaaacctc 24480
cctaagacaa gctgctgctg tgactatggg ctcccaaaga gctagatcgt atattttatt 24540
gacaaaaaat accatagact gcatccaiaa tacagagaaa aaacaattag ggcgcaaatg 24600
gatagttaca gtaaagtctt cagcaagcag ctgcctgtat tctaagcact gggattttct 24660
gtttcgtgca aatattttatc tcattattgt tegtatctag ttcaataacc tagaatttga 24720
attgtcacca catagcttcc aatctgtgcc aacaactata caattcatca agtgtgattt 24780
tttttttttt tttttgagat gaagtctcac cctgttgccc aagctggagt gcagtgggtg 24840
gatctcggct cactgtaaac tctacctcct ggattcaagc gattgtcctg cctcagctc 24900
ccaagtagct gagattacag gcacatgcca ccatgcccgg ctaatttttg tatttttagt 24960
agagacgggg tttcactatg ttggccaggc tggctttgaa ctcctgacct cgtgatctgc 25020
ccacctgggc ctctcaaagt gctgggatta cagggtgtgag tccactgcgtc tggccatgga 25080
aaatatttat tgagcacaat tatgtgagag catcatgctg agctttgag atacagtggg 25140
gagcaaacat atatcctggc ttcatagaaga ttactacta gttaacatga gcaacaaaat 25200
aaaataatca cacaaaaat ataggttcaa gctgaaatga gtggctgcac cagattctat 25260
gagataagaa aggaagaagg acatttttca ccaagttcaa agactgggat acaaaaggat 25320
ttgtcctgac aaaggcaaaa caaaaacaac aacaacaaa aaacccaaaa gagcaaatg 25380
acagtagaac ataacggggc cagatcaaaa atgctgacag gttcccaaaa gaataaaatg 25440
acggtaggac atgacggggc cagatcaaaa atgctgacag gttcaacaa aattggaatt 25500
gaaaatcaga gtgctgttcaa gagtatcaaaa caatactatc ttgttacttg cttattacct 25560
tagtagactg gaagcaaac ttcacacaaa aaaaggggtt ggatgtaatt tcggataaga 25620
agagatgttt ctgtaaagtc tttcctgaga agcatattat ttgagaaaa cacatatttc 25680
tgtttttagt atttcacttt gtataatgtc ttaatttttg aagagctggg atattcctat 25740
gattcattaa tgaaagttct ataagatata aaatatacaa tgaggagatc tcctcttctg 25800
taccagaaga gtgcacattc tacacactgc gtacacactt tctcacttac gttctgtctg 25860
ggcacacttc tgattgacac gcagagggct ctctctgtct ggggatattt ctgatgggta 25920
ccgagagagc ttcctctatc ttgggttatt tctgatgctg agagaagggc tgcctctgct 25980
cattatggaa ggctggtggt c 26001

```

- <210> 3
- <211> 20
- 5 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

- <220>
- <223> cebador
- 10
- <400> 3

- cagcctggag catcgtaaaca 20

- 15 <210> 4
- <211> 25
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 20 <223> cebador

- <400> 4
- ttatcgcagc ttcgttattc tgggt 25

- 25 <210> 5
- <211> 29
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

- 30 <220>
- <223> sonda

- <400> 5
- ttgtctactg aagcacaccc aaacaggga 29
- 35

ES 2 657 679 T3

<210> 6
 <211> 2246
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

5
 <400> 6

```

ggataccggc tcacgtagaa aaaggacaag actataggaa agaaagcaa cactccgccg 60
aggactacag caaagacaga aagtatctgc aggatgacct cattaacatca ggtgttatat 120
tttatctttt ttgcctcagt ttctagttaa tgcgttacta aggtcttcaa agacatcagc 180
tttcaaggag gtgacctgag tactgttttc acaccgagcg ccacatactg ccgcttggtc 240
tgcactcacc acccacgggtg cttgctcttc acgttcatgg ctgagtcac ttcggatgat 300
cctaccaaat ggtttgcctg catcctgaag gacagcgtca cagaaatatt gccaatggta 360
aacatgacag gcgcgatctc tggatattcc ttcaagcaat gccctcagca attaatgact 420
tgcagcaaa atgtgtactg gaacctagac atgaagggca tgaactataa cagctctgtc 480
gtgaagaatg ctcgagaatg ccaggagaga tgcacagacg atgcccactg ccagtttttc 540
acatacgcaa caggggtattt tcccagtgtg gacctcgtta aaatgtgtct tttgaagtac 600
acccgaacgg ggacgccaac cacataaacg aagctcaatg gcgtgggatc tggattttca 660
ctgaagtctt gtggactttc aaacttggct tgtatcaggg acattttccc taacacgggtg 720
ctggcagacc ttaacattga cagcgtgggtg gccccagatg cttttgtctg tcgtcgcac 780
tgcacgcac accccacttg tttgttcttc acattctttt cccaagcatg gccgaaagaa 840
tctcagagac atctttgtct ccttaaaccc tctgaaagtg gattaccaag cacacgcatt 900
acaaagagcc acgccccttc gggcttcagt ctccagcact gcaggcacag tgtcccagta 960
ttctgccatc cgtcctttta caacgacact gatttcttgg gagaagagct ggacatcgtc 1020
gatgtgaaag gccaaagaac ctgtcagaaa acgtgtacca ataacgcccg ctgccagttc 1080
tttacctact atccatcgca cagactgtgc aatgagagga accgcagggg cagatgttac 1140
ctaaagcttt cctccaatgg atctccaacg agaatacttc atgggagggg aggcactctc 1200
ggatactcac tgaggctgtg caaaaatggat aatgtgtgca caactaaaat caaccccaga 1260
gtggtaggag gagctgctgc tgttcacggg gatgtggccat ggcaggtgac tctgcacatc 1320
agccagggac acctgtgtgg aggtccatc aatggaaacc aatggatact gacagcagct 1380
cattgtttct ctgggataga gacacctaaa aagctgctg tctacggtgg cattgtaaat 1440
caatcagaaa taaatgaagg gactgctttc ttcaggggtc aagaaatgat aattcatgat 1500
cagtatacga cagcagaaaag tgggtatgat attgccctgt taaaactgga atcagccatg 1560
aattacacag attttcagcg gccaatatgc ctgccttcca aaggagatag aaacgcagtg 1620
cacacagaat gctgggtgac tggatggggg tacacagcac taagaggtga agtacaaagt 1680
actcttcaga aagccaaggt tccattgggt tcaaatgaag aatgtcagac aagatacaga 1740
agacacaaaa taaccaataa gatgatctgt gcaggctaca aagaaggagg gaaggatacg 1800
tgcgaaggag attctggagg gccctgtccc tgcaaataca atgggggtctg gcacttgggtg 1860
ggcatcacia gctgggggtga aggctgtggt cagaaggaga gaccgggggt ctacacgaac 1920
gtggccaagt acgtggactg gattctggag aaaactcaaa cagtctgaaa gagttcaact 1980
ggatcactt tgtggccctg gaagattatt ccatagaaat gagcttgacg tctctgatga 2040
agacactggg atactgactc ttccactgta accaattgaa tggccttgat gtacgtaaga 2100
acaccagaa agaaaaactat tattttcaga attcctgatc tgggagaacc actggttgtt 2160
ttctgcatcc agctactact caaggaaca aatacagcaa ggagatttta aaaataaaaa 2220
cacatcagat atataaggaa aatatac 2246
    
```

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

15 <220>
 <223> cebador
 <400> 7

20 acatgacagg cgcgatctct 20

<210> 8
 <211> 25
 <212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador

30 <400> 8

tctaggttca cgtacacatc ttgac 25

<210> 9
 <211> 26
 <212> ADN

35

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sonda
 5 <400> 9
 ttcttcaag caatgccctc agcaat 26
 10 <210> 10
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 10
 20 tcctggcatt ctcgagcatt 20
 <210> 11
 <211> 20
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 30 <400> 11
 tgtaatcca ctttcagagg 20
 <210> 12
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 12
 aaggacctac actatggaat 20
 45 <210> 13
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 13
 55 cctctgaaag tggattacca 20
 <210> 14
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 65 <400> 14

tcggaagcga ctcttatatg 20
 <210> 15
 <211> 20
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 10 <400> 15
 ttcaaacaag tgacatacac 20
 15 <210> 16
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 16
 25 tgagagaatt gcttgcttc 20
 <210> 17
 <211> 20
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 35 <400> 17
 aaatatacct tgagagaatt 20
 40 <210> 18
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 45 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 18
 agtatgtcag aaatatacct 20
 50 <210> 19
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 19
 60 ttaaatctt agtatgtcag 20
 <210> 20
 <211> 20
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> oligonucleótido sintético

 <400> 20
 5 cagcatattt gtgaaagtcg 20

 <210> 21
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 15 <400> 21

 tgtgtaggaa atggtcact 20
 20 <210> 22
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 25 <220>
 <223> oligonucleótido sintético

 <400> 22
 30 tgcaattctt aataagggtg 20

 <210> 23
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 40 <400> 23

 aaatcatcct gaaaagacct 20
 45 <210> 24
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 50 <400> 24

 tgatataaga aaatcatcct 20
 55 <210> 25
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> oligonucleótido sintético

 <400> 25
 65 acacattcac cagaaactga 20

<210> 26
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 26
 10 ttcaggacac aagtaaacca 20
 <210> 27
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 20
 <400> 27
 ttactcttg gcagtgttc 20
 25 <210> 28
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 28
 35 aagaataccc agaatcgct 20
 <210> 29
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 45 <400> 29
 cattgctga aagaataccc 20
 <210> 30
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 55 <400> 30
 ttggtgag cattgctga 20
 60 <210> 31
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>

<223> oligonucleótido sintético
 <400> 31
 5 aatgtctttg ttgcaagcgc 20
 <210> 32
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 15 <400> 32
 ttcattgtcta ggtccacata 20
 <210> 33
 20 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 33
 gtttatgccc ttcattgtcta 20
 30 <210> 34
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 34
 40 ccgtgcatct ttcttggcat 20
 <210> 35
 <211> 20
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 50 <400> 35
 cgtgaaaaag tggcagtgga 20
 55 <210> 36
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 36
 65 agacaaatgt tacgatgctc 20

<210> 37
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 37
 10
 gtgcttcagt agacaaatgt 20
 <210> 38
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 20
 <400> 38
 tgcacaggat ttcagtgaaa 20
 25
 <210> 39
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 39
 35
 gattagaaaag tgcacaggat 20
 <210> 40
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 45
 <400> 40
 ccgggatgat gtagtcagat 20
 50
 <210> 41
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 41
 aaacaagcaa ccgggatgat 20
 60
 <210> 42
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65
 <220>

<223> oligonucleótido sintético
 <400> 42
 5 tcctgggaaa agaaggtaaa 20
 <210> 43
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 15 <400> 43
 attccttggg ccattcctgg 20
 <210> 44
 20 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 44
 aaagatttct ttgagattct 20
 30 <210> 45
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 45
 40 aatccactct cagatgttt 20
 <210> 46
 <211> 20
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 50 <400> 46
 aaccagaaag agctttgctc 20
 55 <210> 47
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 47
 65 ggcagaacac tgggatgctg 20

<210> 48
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 48
 10
 tggtaaatg aagaatggca 20
 <210> 49
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 20
 <400> 49
 atcagtgca tggtaaatg 20
 25
 <210> 50
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 50
 35
 aacaatatcc agttctctc 20
 <210> 51
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 45
 <400> 51
 acagttctg gcaggcctcg 20
 <210> 52
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 55
 <400> 52
 gcattggtgc acagttctg 20
 60
 <210> 53
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65
 <220>

<223> oligonucleótido sintético
 <400> 53
 5 gcagcggacg gcattggtgc 20
 <210> 54
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 15 <400> 54
 ttgaagaaag cttaagtaa 20
 <210> 55
 20 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 55
 agtatttag ttggatcc 20
 30 <210> 56
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 56
 40 atgtgatcc agagatgct 20
 <210> 57
 <211> 20
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 50 <400> 57
 gtacactcat tatccattt 20
 55 <210> 58
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 58
 65 gattttggtg gtacactcat 20

<210> 59
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 59
 10
 tcctgggctt gatttggtg 20
 <210> 60
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 20
 <400> 60
 ggccactcac cacgaacaga 20
 25
 <210> 61
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 61
 35
 tgtctctgag tgggtgaggt 20
 <210> 62
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 45
 <400> 62
 gttccaatg atggagcctc 20
 <210> 63
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 55
 <400> 63
 atatccactg gttccaatg 20
 60
 <210> 64
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65
 <220>

<223> oligonucleótido sintético
 <400> 64
 5 ccatagaaac agtgagcggc 20
 <210> 65
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 15 <400> 65
 tgactctacc ccatagaaac 20
 <210> 66
 20 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 66
 cgcaaaatct tagtgactc 20
 30 <210> 67
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 67
 40 ttcagattga tttaaatgc 20
 <210> 68
 <211> 20
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 50 <400> 68
 tgaaccccaa agaagatgt 20
 55 <210> 69
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 69
 65 tattattct tgaaccccaa 20

<210> 70
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 70
 10
 aacaaggcaa tatcatacc 20
 <210> 71
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 20
 <400> 71
 ttccagtttc aacaaggcaa 20
 25
 <210> 72
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 72
 35
 gaaggcaggc atatgggtcg 20
 <210> 73
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 45
 <400> 73
 gtcactaagg gtatcttggc 20
 <210> 74
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 55
 <400> 74
 agatcatctt atgggttatt 20
 60
 <210> 75
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65
 <220>

<223> oligonucleótido sintético
 <400> 75
 5 tagccggcac agatcatctt 20
 <210> 76
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 15 <400> 76
 ccagatgccca gacctcattg 20
 <210> 77
 20 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 77
 cattcacact gcttgagttt 20
 30 <210> 78
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 78
 40 tggcacagtg aactcaacac 20
 <210> 79
 <211> 20
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 50 <400> 79
 ctagcatttt cttacaaca 20
 55 <210> 80
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 80
 65 ttatggaat tcttgactc 20

<210> 81
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 81
 10
 aaatattgcc ttatggtaat 20
 <210> 82
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 20
 <400> 82
 tatctgccta tatagtaatc 20
 25
 <210> 83
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 83
 35
 gccactactt gggtatttc 20
 <210> 84
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 45
 <400> 84
 aacaaatcta ttatgggtgg 20
 <210> 85
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 55
 <400> 85
 ctgcaaaatg gtgaagactg 20
 60
 <210> 86
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65
 <220>

<223> oligonucleótido sintético
 <400> 86
 5 gtgtagattc ctgcaaatg 20
 <210> 87
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 15 <400> 87
 ttttcaggaa agtgtatctt 20
 <210> 88
 20 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 88
 cacaatcat ttttcaggaa 20
 30 <210> 89
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 89
 40 tccaagata ttttaaataa 20
 <210> 90
 <211> 20
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 50 <400> 90
 aatgagataa atattgcac 20
 55 <210> 91
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 91
 65 tgaaagctat gtggtgacaa 20

<210> 92
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 92
 10
 cacacttgat gaattgata 20
 <210> 93
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 20
 <400> 93
 taccttgaga gaattgcttg 20
 25
 <210> 94
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 94
 35
 gtcagaaata taccttgaga 20
 <210> 95
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 45
 <400> 95
 atcttagtat gtcagaaata 20
 50
 <210> 96
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 96
 60
 gagtcacaca ttcaccagaa 20
 <210> 97
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65
 <220>

<223> oligonucleótido sintético
 <400> 97
 5 gtagcattg ctgaaagaa 20
 <210> 98
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 15 <400> 98
 ctatttggg gtagcattg 20
 <210> 99
 20 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 99
 acataaatgt cttgttgca 20
 30 <210> 100
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 100
 40 ggtccacata aatgtcttg 20
 <210> 101
 <211> 20
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 50 <400> 101
 gtctagggcc acataaatgt 20
 55 <210> 102
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 102
 65 tgccctcat gtctagggcc 20

<210> 103
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 103
 10 gttatagttt atgccctca 20
 <210> 104
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 20
 <400> 104
 tcagtagaca aatgttacga 20
 25 <210> 105
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 105
 35 tgggtgtgct tcagtagaca 20
 <210> 106
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 45 <400> 106
 agccagatta gaaagtgcac 20
 <210> 107
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 55 <400> 107
 agcaaccggg atgatgagtg 20
 60 <210> 108
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>

<223> oligonucleótido sintético
 <400> 108
 5 gccattcctg ggaaaagaag 20
 <210> 109
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 15 <400> 109
 ttgagattct ttggccatt 20
 <210> 110
 20 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 110
 actgaaacca gaaagagctt 20
 30 <210> 111
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 111
 40 agaatggcag aactggga 20
 <210> 112
 <211> 20
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 50 <400> 112
 tgtcatggta aaatgaaga 20
 55 <210> 113
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 113
 65 aagaaatcag tgtcatggta 20

<210> 114
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 114
 10
 ggtgcacagt ttctggcagg 20
 <210> 115
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 20
 <400> 115
 ggacggcatt ggtgcacagt 20
 25
 <210> 116
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 116
 35
 aactggcagc ggacggcatt 20
 <210> 117
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 45
 <400> 117
 ccttaatgtg tatccagaga 20
 <210> 118
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 55
 <400> 118
 tgggtgtaca ctcatatcc 20
 60
 <210> 119
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65
 <220>

<223> oligonucleótido sintético
 <400> 119
 5 ggcttgattt tgggtgtaca 20
 <210> 120
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 15 <400> 120
 aacgatcctg ggcttgattt 20
 <210> 121
 20 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 121
 acaggtgtct ctgagtgggt 20
 30 <210> 122
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 122
 40 cactggtttc caatgatgga 20
 <210> 123
 <211> 20
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 50 <400> 123
 ctaccccata gaaacagtga 20
 55 <210> 124
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 124
 65 ttagtgact ctaccccata 20

<210> 125
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 125
 10 agacacgcaa aatcttagt 20
 <210> 126
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 20
 <400> 126
 tttcttgaac cccaagaaa 20
 25 <210> 127
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 127
 35 gtggttcca gttcaacaa 20
 <210> 128
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 45 <400> 128
 ttggcttct ggagagtatt 20
 <210> 129
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 55 <400> 129
 ggcacagatc atcttatggg 20
 60 <210> 130
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>

<223> oligonucleótido sintético
 <400> 130
 5 gattcctgca aaatgggtaa 20
 <210> 131
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 15 <400> 131
 gcagagtgta gattcctgca 20
 <210> 132
 20 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 132
 atcattttc aggaaagtgt 20
 30 <210> 133
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 133
 40 gtgagacaaa tcaagacttc 20
 <210> 134
 <211> 20
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 50 <400> 134
 ttagttact gactaaga 20
 55 <210> 135
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 135
 65 ctgcttatg aaaaaccaac 20

<210> 136
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 136
 10
 atacctagta caatgtaaatt 20
 <210> 137
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 20
 <400> 137
 ggcttggtg tggtcaatat 20
 25
 <210> 138
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 138
 35
 tgggaaagct ttcaatattc 20
 <210> 139
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 45
 <400> 139
 atggaattgt gcttatgagt 20
 <210> 140
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 55
 <400> 140
 tttcaagctc aggatgggaa 20
 60
 <210> 141
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65
 <220>

<223> oligonucleótido sintético
 <400> 141
 5 gttgtaaaa tgcaaccaa 20
 <210> 142
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 15 <400> 142
 tcaggacaca agtaaacctg 20
 <210> 143
 20 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 143
 tgcaagctgg aaataaaagc 20
 30 <210> 144
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 144
 40 tgccaattta aaagtgtagc 20
 <210> 145
 <211> 20
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 50 <400> 145
 atattcaaa atccagtatg 20
 55 <210> 146
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 146
 65 ttctgaatat acaaattaat 20

<210> 147
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 147
 10
 ttactatga aaatctaat 20
 <210> 148
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 20
 <400> 148
 ggtatcctga gtgagatcta 20
 25
 <210> 149
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 149
 35
 ccagctatca ggaaaattcc 20
 <210> 150
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 45
 <400> 150
 aaagctattg gagactcaga 20
 50
 <210> 151
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 151
 atggaatctc ttcatttcat 20
 60
 <210> 152
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65
 <220>

<223> oligonucleótido sintético
 <400> 152
 5 atggagacat tcattccac 20
 <210> 153
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 15 <400> 153
 gctctgagag ttccaattca 20
 <210> 154
 20 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 154
 ctggaaggt gaattttag 20
 30 <210> 155
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 155
 40 tcaagagtct tcatgctacc 20
 <210> 156
 <211> 20
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 50 <400> 156
 tcagttacc tgggatgctg 20
 55 <210> 157
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 157
 65 gacattatac tcaccattat 20

<210> 158
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 158
 10
 gtataaatgt gtcaaattaa 20
 <210> 159
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 20
 <400> 159
 gtaaagtttt acctaacct 20
 25
 <210> 160
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 160
 35
 ccataatgaa gaaggaaggg 20
 <210> 161
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 45
 <400> 161
 ttaagtaca ttgtagacca 20
 <210> 162
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 55
 <400> 162
 tgtgtgggtc ctgaaattct 20
 60
 <210> 163
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65
 <220>

<223> oligonucleótido sintético
 <400> 163
 atcttgtaat tacacacccc 20
 5
 <210> 164
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 164
 15
 gtacactctg caacagaagc 20
 <210> 165
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 25
 <400> 165
 aggaataac atgaaggccc 20
 30
 <210> 166
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 166
 40
 atccagttca ccattggaga 20
 <210> 167
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 50
 <400> 167
 tttccagaa gagactctc 20
 <210> 168
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 60
 <400> 168
 gtcacattta aaatttcaa 20
 65
 <210> 169

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

5 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 169

10 ttaatatact gcagagaacc 20
 <210> 170
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético

20 <400> 170
 agaaatatcc ccagacagag 20
 <210> 171
 25 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 171
 aaatgtcttt gttgcaagcg 20
 35 <210> 172
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 172
 45 taaatgtctt tgggcaagc 20
 <210> 173
 <211> 20
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético

55 <400> 173
 ataaatgtct ttgggcaag 20
 60 <210> 174
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> oligonucleótido sintético

<400> 174
 cataaatgct tttgtgcaa 20

5 <210> 175
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> oligonucleótido sintético

<400> 175

15 cacataaatg tctttgtgc 20

<210> 176
 <211> 20
 <212> ADN

20 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> oligonucleótido sintético

25 <400> 176

ccacataaat gtctttgtg 20

<210> 177

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

<220>

35 <223> oligonucleótido sintético

<400> 177

tccacataaa tgtctttgtt 20

40 <210> 178
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> oligonucleótido sintético

<400> 178

50 gtccacataa atgtctttgt 20

<210> 179
 <211> 20

55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> oligonucleótido sintético

60 <400> 179

aggtccacat aatgtcttt 20

65 <210> 180
 <211> 20

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> oligonucleótido sintético

 <400> 180

 taggtccaca taaatgtct 20
 10
 <210> 181
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético

 <400> 181
 20
 cttaggtccac ataaatgtct 20

 <210> 182
 <211> 20
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 30
 <400> 182

 tcttaggtcca cataaatgtc 20
 35
 <210> 183
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético

 <400> 183
 45 tgtctaggtc cacataaatg 20

 <210> 184
 <211> 20
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 55
 <400> 184

 atgtctaggt ccacataaat 20
 60
 <210> 185
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 65 <223> oligonucleótido sintético

<400> 185
 catgtctagg tccacataaa 20

5 <210> 186
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 186

15 tcatgtctag gtccacataa 20
 <210> 187
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético

25 <400> 187
 ctctcatgtct aggtccacat 20
 <210> 188
 30 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 188

40 ccttcatgtc taggtccaca 20
 <210> 189
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 189

50 cccttcatgt ctaggccac 20
 <210> 190
 <211> 20
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético

60 <400> 190
 gcccttcatg tctaggcca 20

65 <210> 191
 <211> 20

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> oligonucleótido sintético

 <400> 191

 atgcccttca tgtctaggtc 20
 10
 <210> 192
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético

 <400> 192
 20
 tatgcccttc atgtctaggt 20

 <210> 193
 <211> 20
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 30
 <400> 193

 ttatgccctt catgtctagg 20
 35
 <210> 194
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético

 <400> 194
 45 tttatgccct tcatgtctag 20

 <210> 195
 <211> 20
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido sintético

 <400> 195
 55
 tccgtgcatc ttcttgga 20

 <210> 196
 60 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 65 <223> oligonucleótido sintético

<400> 196
 atccgtgcat ctttcttggc 20
 5 <210> 197
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 197
 15 catccgtgca tctttcttgg 20
 <210> 198
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 25 <400> 198
 tcatccgtgc atctttcttg 20
 <210> 199
 30 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 199
 gtcacccgtg catctttctt 20
 40 <210> 200
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 200
 50 accgggatga tgagtcaga 20
 <210> 201
 <211> 20
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 60 <400> 201
 aaccgggatg atgagtcag 20
 65 <210> 202
 <211> 20

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> oligonucleótido sintético

 <400> 202

 caaccgggat gatgagtgca 20
 10
 <210> 203
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético

 <400> 203
 20
 gcaaccggga tgatgagtgc 20

 <210> 204
 <211> 20
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 30
 <400> 204

 gattcttgg gccattcctg 20
 35
 <210> 205
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético

 <400> 205
 45 agattcttg ggccattcct 20

 <210> 206
 <211> 20
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 55
 <400> 206

 gagattctt gggcattcc 20
 60
 <210> 207
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 65 <223> oligonucleótido sintético

<400> 207
 tgagattctt tgggccattc 20

5 <210> 208
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 208

15 tttgagattc tttggccat 20
 <210> 209
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético

25 <400> 209
 ctttgagatt ctttggcca 20
 <210> 210
 30 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 210
 tctttgagat tctttggcc 20
 40 <210> 211
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 211
 50 ttctttgaga ttctttggc 20
 <210> 212
 <211> 20
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 60 <400> 212
 tttctttgag attctttggg 20

65 <210> 213
 <211> 20

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> oligonucleótido sintético

 <400> 213

 cacagtttct ggcaggcctc 20
 10
 <210> 214
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético

 <400> 214
 20
 gcacagtttc tggcaggcct 20

 <210> 215
 <211> 20
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 30
 <400> 215

 tgcacagttt ctggcaggcc 20
 35
 <210> 216
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético

 <400> 216
 45 gtcacagtt tctggcaggc 20

 <210> 217
 <211> 20
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido sintético

 <400> 217
 55 tggcagcag ttctggcag 20

 <210> 218
 60 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 65 <223> oligonucleótido sintético

<400> 218
 ttggtgcaca gtttctggca 20
 5 <210> 219
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 219
 attggtgcac agtttctggc 20
 15
 <210> 220
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 25 <400> 220
 cattggtgca cagtttctgg 20
 30 <210> 221
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 221
 ggcatggtg cacagtttct 20
 40
 <210> 222
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 222
 50 cggcattggt gcacagttc 20
 <210> 223
 <211> 20
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 60 <400> 223
 acggcattgg tgcacagttt 20
 65 <210> 224
 <211> 20

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> oligonucleótido sintético

 <400> 224

 gacggcattg gtgcacagtt 20
 10
 <210> 225
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético

 <400> 225
 20
 cggacggcat tgggcacag 20

 <210> 226
 <211> 20
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 30
 <400> 226

 gcggacggca ttgggcaca 20
 35
 <210> 227
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético

 <400> 227
 45 agcggacggc attggtgcac 20

 <210> 228
 <211> 20
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 55
 <400> 228

 cagcggacgg cattggtgca 20
 60
 <210> 229
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 65 <223> oligonucleótido sintético

<400> 229
ggcagcggac ggcattggtg 20

5 <210> 230
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> oligonucleótido sintético
<400> 230

15 tggcagcggc cggcattggt 20
<210> 231
<211> 20
<212> ADN
20 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> oligonucleótido sintético

25 <400> 231
ctggcagcgg acggcattgg 20
<210> 232
30 <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
35 <223> oligonucleótido sintético
<400> 232

40 actggcagcg gacggcattg 20
<210> 233
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> oligonucleótido sintético
<400> 233

50 tgcttgaagg aatatccaga 20
<210> 234
<211> 20
55 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> oligonucleótido sintético

60 <400> 234
tagttcatgc ccttcatgtc 20

65 <210> 235
<211> 20

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> oligonucleótido sintético

 <400> 235

 tggtatagtt catgcccttc 20
 10
 <210> 236
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético

 <400> 236
 20
 aatgtccctg atacaagcca 20

 <210> 237
 <211> 20
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 30
 <400> 237

 gggaaaatgt cctgataca 20
 35
 <210> 238
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético

 <400> 238
 45 tgtgcagagt cacctgcat 20

 <210> 239
 <211> 20
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido sintético

 <400> 239
 55
 ttctgaacc ctgaagaaag 20

 <210> 240
 60 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 65 <223> oligonucleótido sintético

<400> 240
 tgaattatca ttcttgaac 20
 5 <210> 241
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 241
 15 tgatcatgaa ttatcattc 20
 <210> 242
 <211> 18
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 25 <400> 242
 agtttctggc aggctcg 18
 <210> 243
 30 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 243
 cagtttctgg caggcctc 18
 40 <210> 244
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 244
 50 acagtttctg gcaggcct 18
 <210> 245
 <211> 18
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 60 <400> 245
 cacagtttct ggcaggcc 18
 65 <210> 246
 <211> 18

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> oligonucleótido sintético

 <400> 246

 gcacagtttc tggcaggc 18
 10
 <210> 247
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético

 <400> 247
 20
 gtgcacagtt tctggcag 18

 <210> 248
 <211> 18
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 30
 <400> 248

 ggtgcacagt ttctggca 18
 35
 <210> 249
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético

 <400> 249
 45 tggcagtttctggc 18

 <210> 250
 <211> 18
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 55
 <400> 250

 ttggtgcaca gtttctgg 18
 60
 <210> 251
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 65 <223> oligonucleótido sintético

<400> 251
 attggtgcac agtttctg 18

5 <210> 252
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 252

15 cattggtgca cagtttct 18
 <210> 253
 <211> 18
 <212> ADN

20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético

25 <400> 253
 gcattggtgc acagtttc 18
 <210> 254

30 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>

35 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 254

40 ggcattggtg cacagttt 18
 <210> 255
 <211> 18
 <212> ADN

45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético

50 <400> 255
 cggcattggt gcacagtt 18
 <210> 256
 <211> 18

55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético

60 <400> 256
 acggcattgg tgcacagt 18

65 <210> 257
 <211> 18

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> oligonucleótido sintético

 <400> 257

 gacggcattg gtgcacag 18
 10
 <210> 258
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético

 <400> 258
 20
 ggacggcatt ggtgcaca 18

 <210> 259
 <211> 18
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 30
 <400> 259

 cggacggcat tggtcac 18
 35
 <210> 260
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético

 <400> 260
 45 gcgacggca ttggtgca 18

 <210> 261
 <211> 18
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 55
 <400> 261

 agcggacggc attggtgc 18
 60
 <210> 262
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 65 <223> oligonucleótido sintético

<400> 262
cagcggacgg cattggtg 18

5 <210> 263
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> oligonucleótido sintético
<400> 263

15 gcagcggacg gcattggt 18
<210> 264
<211> 18
<212> ADN
20 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> oligonucleótido sintético

25 <400> 264
ggcagcggac ggattgg 18
<210> 265
30 <211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
35 <223> oligonucleótido sintético
<400> 265

40 tggcagcggc cggattg 18
<210> 266
<211> 18
<212> ADN
45 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> oligonucleótido sintético
<400> 266

50 ctggcagcgg acggcatt 18
<210> 267
<211> 18
55 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
60 <223> oligonucleótido sintético
<400> 267

tgcacagttt ctggcagg 18

65 <210> 268
<211> 16

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> oligonucleótido sintético

 <400> 268

 cacagtttct ggcagg 16
 10
 <210> 269
 <211> 14
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético

 <400> 269
 20
 acagtttctg gcag 14

 <210> 270
 <211> 27
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 30
 <400> 270

 gcgttgctc ttcttctgc gttttt 27
 35
 <210> 271
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> cebador

 <400> 271
 45 acacgcatta aaaagagcaa agc 23

 <210> 272
 <211> 26
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador
 55
 <400> 272

 cagtgcatg gtaaaatgaa gaatgg 26
 60
 <210> 273
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 65 <223> sonda

<400> 273

tgcaggcaca gcatcccagt gttct 25

- 5 <210> 274
- <211> 3275
- <212> ADN
- <213> Macaca mulatta

- 10 <220>
- <221> misc_feature
- <222> (1) ... (3275)
- <223> n = A,T,C or G

15 <400> 274

```

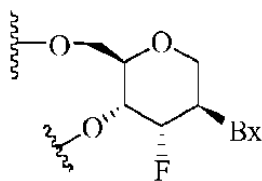
aggcacacag acaaaatcaa gctctacagc tgtctgtgtg tatgtcactt gtttgaatat 60
gaattaaaat taaaatataa attcaatgta ttgagaaagc aagcaattct ctcaaggat 120
atctctgaca tactaagatt ttaacgactt tcacaaatat gctgcaccga gagacaatgt 180
tacacaacac tgagaaccag tacaagtaa tattaagtt aagtgaccat ttcttacaca 240
cgctcattca gaggaggatg aggatcaatt tggagaaga aaaacaccc tattaagaat 300
tgcagcaaat aagcaaacga ggtcttttca ggatgatttt cttatatcaa atggtacatt 360
tcattctatt tacgtcagtt tctggtgaat gtgtgactcg gttgttcaag gacatccact 420
ttgaaggagg ggacattgct acggttttca caccaagcgc caagcactgc caggtggct 480
gcactcacca cccacgatgt ctgctcttca ctttcacggg ggaatctgca tctgaggatc 540
ctaccagtg gtttacttgt gtcctgaagg acagtgttac agaaacactg ccaagagtga 600
ataggacagg agcgatttct gggtaattct tcaagcaatg ctcacacca ataagcgtt 660
gcaacaaaga ctttatgtg gacctagaca tgaagggcat aaactataac agtccacttg 720
ccaagagtgc tcaagaatgc caagaaagat gcacggatga catccactgc cactttttca 780
cgtatgccac aaggcagttt cccagctctg agcatcgtaa ctttgtcta ctgaagcaca 840
cccaaacggg gacaccaacc ggaataatga agctcgataa agtgggtgact ggattttcac 900
tgaatcctg tgcactttct aatctggctt gtatcagggg cgttttcccc aacacgggtg 960
ttgctggacag caacatcgat agtgtcatgg ctccagatgc ctttgtctgt cgccggatct 1020
gcactcatca tcccggttgc ttgtttttta ctttctttc ccaggaatgg cccaagaat 1080
ctcaagaaa tctttgtctc cttaaaacat ctgagagtgg attaccagat acacgcatta 1140
aaaagagcaa agctctttct ggtttcagtc tccaagctg caggcacagc atcccagtg 1200
tctgccattc ttcattttac catgacactg atttcttggg agaagaactg gatattggtg 1260
ctgtgaaagg tcacgaggcc tgccagaaac tgtgcaccaa tgccgtccgc tgccagtttt 1320
ttactatgct cccagctcaa gcactctgca acgaagggaa gggcaaatgt tacttaaagc 1380
tttctcaaaa ttgactctca actaaaatac ttctcgggac aggaggcatc tctggataca 1440
cattaaggct gtgtaaaatg gataatgagt gtaccacca aatcaagccc aggatcgttg 1500
gaggaactgc atctgttctg ggtgagtggc catggcaggt gactctgcac accacctcac 1560
ccactcagag cacactgtgt ggaggctcca tcattggaaa ccagtggata ttaacggccg 1620
ctcactgttt ctatggggta gagtcaccta agattttgcg tgtctacatt ggcattttta 1680
atcaatctga aataaaagag gatacatctt tctttggggt tcaagaaata ataatccatg 1740
atcaatataa atgtggcagaa agtgggtatg atattgcctt gttgaaactg gaaaccacag 1800
tgaattacac agattctcaa cgaccataa gcctgccttc aaaaggagat agaaatgtga 1860
tatacactga ctgctgggtg actggatggg ggtacagaaa attaagagac aaaatacaga 1920
atactctcca gaaagccaag atacccttag tgaccaatga cgagtgccag aagagataca 1980
gaggacataa aataaccatc aagatgatct gtgccggcta cagggaaagga gggaaaggatg 2040
cttgcaagnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 2100
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 2160
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 2220
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 2280
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnngc ttggtgctgg taggaaaatg 2340
ccagaagaaa acaaaactgt acaagctgtt atgtccaag ctcccgttct atgatcattg 2400
tagtttgttt cagcatccag tgtcttggtt tctgatcacg cttctaagga gtccaagaat 2460
taccataagg caatatttct gatgattact atataggcag atatatcaga aaataaccaa 2520
gtagtggcag cagggatcag gtagaagaac tgataaaaga aaccaccata aatagatttg 2580
ttcaatgaaa aatgaaaact ggaagaaagg ataacaagaa cagtcttcac cttttgcag 2640
gaatctacac tctgcctgtg tgaacacatt tctttgtaaa gaaagaattt gattgcattt 2700
actggcagat tttcagaata gtcaggaatt catgttattt ccattttaaa acatgtttta 2760
aaaaatcagt ttgagttagc acaagctaag agtgaatgtg aaggtaccag aatttctgta 2820
tggaaagagg tgacaagcag caatgtacct ggaagtggta ccttaggacc aatcttaag 2880
atacactttc ctgaaaaatg atttgtgatg gatcgatat ttatttataa tatctggga 2940
gggagaggct gctggcgata gggaggcaag ctgaagcctc cataagacaa gctgctactg 3000
cgactgtggc ccccaagag ctacaccgca tattttattg acaaaagtca ccattgacta 3060
catccgtact acagagaaaa aacaatttgg gcacaaatgg atggttacag taaagtcttc 3120
agcaagcagc tccctgtatt ctaagtactg ggcttttctg tttggtgcaa atatttatct 3180
cattattgct gtgatctagt ccagtaacct agaatttgat ttgtcaccac atagctttca 3240
acctgtgcc acaattatac aattcatcaa gtgtg 3275

```

20

Reivindicaciones

1. Un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que consiste en de 18 a 24 nucleósidos unidos y que comprende una secuencia de bases nucleotídicas que comprende una porción de al menos 8 bases nucleotídicas contiguas 100 % complementarias a una porción de igual longitud de bases nucleotídicas 1275 a 1318 de SEQ ID NO: 1, en el que la secuencia de bases nucleotídicas del oligonucleótido modificado es 100 % complementaria a una porción de igual longitud de SEQ ID NO: 11, y en la que el compuesto es capaz de inhibir la expresión del factor 11 humano.
2. El compuesto de la reivindicación 1, que tiene
 (i) una secuencia de bases nucleotídicas que comprende al menos 8, al menos 10, al menos 12, al menos 14, al menos 16, al menos 18 o 20 bases nucleotídicas contiguas de SEQ ID NO: 223, 217, 51, 52, 53, 114, 115, 213, 214, 215, 216, 218, 219, 220, 221, 222, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 242, 243, 245, 246, 247, 248, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268 o 269.
3. El compuesto de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que tiene una secuencia de bases nucleotídicas que comprende al menos 8, al menos 10, al menos 12, al menos 14, al menos 16, al menos 18 o 20 bases nucleotídicas contiguas de SEQ ID NO: 223 o 217.
4. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el oligonucleótido modificado consiste en 19-22 o 20 nucleósidos unidos.
5. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que consiste en un oligonucleótido modificado monocatenario.
6. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que al menos un enlace internucleosídico es un enlace internucleosídico modificado y en el que, opcionalmente, cada enlace internucleosídico es un enlace internucleosídico fosforotioato.
7. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que al menos un nucleósido comprende un azúcar modificado.
8. El compuesto de la reivindicación 7, en el que
 (a) al menos un azúcar modificado es un azúcar bicíclico, en el que, opcionalmente,
 (i) dicho al menos un azúcar bicíclico comprende un puente 4'-(CH₂)_n-O-2', en el que n es 1 o 2; o
 (ii) dicho al menos un azúcar bicíclico comprende un puente 4'-CH(CH₃)-O-2', o
 (b) al menos un azúcar modificado comprende un grupo 2'-O-metoxietilo.
9. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende al menos un nucleósido modificado con tetrahidropirano en el que un anillo de tetrahidropirano reemplaza el anillo de furanosa, y en el que, opcionalmente, dicho al menos un nucleósido modificado con tetrahidropirano tiene la estructura:



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

10. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que al menos un nucleósido comprende una base nucleotídica modificada, y en el que, opcionalmente, la base nucleotídica modificada es una 5-metilcitosina.
11. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el oligonucleótido modificado comprende:
 (i) un segmento separador que consiste en desoxinucleósidos unidos;
 un segmento del ala en 5' que consiste en nucleósidos unidos;
 un segmento del ala en 3' que consiste en nucleósidos unidos;
 en el que el segmento separador está situado inmediatamente adyacente a y 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;

- (ii) un segmento separador que consiste en diez desoxinucleósidos unidos;
 un segmento del ala en 5' que consiste en cinco nucleósidos unidos;
 un segmento del ala en 3' que consiste en cinco nucleósidos unidos;
 en el que el segmento separador está situado inmediatamente adyacente a y entre el segmento del ala 5' y el
 segmento del ala 3', en el que cada nucleósido de cada segmento de ala comprende un azúcar 2'-O-metoxietilo,
 y en el que cada enlace internucleosídico es un enlace internucleosídico fosforotioato; y en el que cada citosina
 es una 5-metilcitosina.
12. Un oligonucleótido modificado monocatenario que consiste en 20 nucleósidos unidos y que tiene una secuencia
 de bases nucleotídicas que comprende 20 bases nucleotídicas contiguas de SEQ ID NO: 223 o 217, y en la que el
 oligonucleótido modificado comprende:
- un segmento separador que consiste en diez desoxinucleósidos unidos;
 un segmento del ala en 5' que consiste en cinco nucleósidos unidos;
 un segmento del ala en 3' que consiste en cinco nucleósidos unidos;
 en el que el segmento separador está situado inmediatamente adyacente a y entre el segmento del ala 5' y el
 segmento del ala 3', en el que cada nucleósido de cada segmento de ala comprende un azúcar 2'-O-metoxietilo,
 en el que al menos un enlace internucleosídico es un enlace internucleosídico fosforotioato y cada citosina es
 una 5-metilcitosina.
13. El oligonucleótido modificado monocatenario de la reivindicación 12, en el que cada enlace internucleosídico es
 un enlace internucleosídico fosforotioato.
14. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11 o el oligonucleótido modificado monocatenario de la
 reivindicación 12 o la reivindicación 13, en el que el compuesto u oligonucleótido modificado monocatenario es un
 compuesto antisentido conjugado.
15. Una composición que comprende un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-11 y 14
 o una sal del mismo o un oligonucleótido modificado monocatenario de acuerdo con una cualquiera de las
 reivindicaciones 12-14 o una sal del mismo y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, en la que,
 opcionalmente, la sal es una sal de sodio y / o el diluyente farmacéuticamente aceptable es solución salina
 tamponada con fosfato (PBS).
16. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11 y 14, un oligonucleótido modificado
 monocatenario de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12-14 o una composición de acuerdo con la
 reivindicación 15, para uso en terapia.
17. El compuesto, oligonucleótido modificado monocatenario o composición de acuerdo con la reivindicación 16,
 para su uso en:
- (i) tratar o prevenir una complicación tromboembólica, en el que opcionalmente la complicación tromboembólica
 se selecciona de trombosis venosa profunda, embolia pulmonar, infarto de miocardio y accidente
 cerebrovascular; o
 (ii) tratar un trastorno de coagulación.