

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 657 696**

51 Int. Cl.:

A61K 38/18 (2006.01)

A61K 31/7105 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.08.2009 PCT/US2009/054975**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.03.2010 WO10027831**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.08.2009 E 09812035 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.12.2017 EP 2334319**

54 Título: **Método para reducir la cicatrización durante la curación de una herida utilizando compuestos antisentido dirigidos al CTGF**

30 Prioridad:

25.08.2008 US 190152 P

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

06.03.2018

73 Titular/es:

**EXCALIARD PHARMACEUTICALS, INC. (33.3%)
2141 Palomar Airport Rd. Suite 300
Carlsbad, CA 92011, US;
NORTHWESTERN UNIVERSITY (33.3%) y
IONIS PHARMACEUTICALS, INC. (33.3%)**

72 Inventor/es:

**DEAN, NICOLAS, M.;
MUSTOE, THOMAS, A.;
SISCO, MARK;
KRYGER, ZOL y
BENNET, FRANK, C.**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 657 696 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para reducir la cicatrización durante la curación de una herida utilizando compuestos antisentido dirigidos al CTGF

5 La invención divulgada en la presente memoria se realizó en parte con ayuda de la subvención gubernamental a los NIH R01-GM063825. En consecuencia, el gobierno de los EE. UU. tiene ciertos derechos sobre esta invención.

10 A lo largo de esta solicitud, se hace referencia a ciertas patentes, solicitudes de patentes y publicaciones por el número de patente, número de solicitud, y para este último, por autores y fecha de publicación. Las citas completas de estas publicaciones pueden encontrarse al final de esta memoria descriptiva que precede inmediatamente a las reivindicaciones.

15 Campo de la invención

La presente invención se refiere a la reducción de la cicatrización resultante de la curación de una herida.

Antecedentes de la invención

20 Proceso de curación de heridas dérmicas

25 La curación de heridas dérmicas es un proceso complejo que, cuando se orquesta adecuadamente, conduce al restablecimiento de la integridad de la piel con cicatrices residuales mínimas. La curación normal de las heridas incluye una transición de una fase proliferativa, durante la cual se elaboran las proteínas de la matriz extracelular (ECM), a una fase de remodelación, durante la cual la herida se fortalece a través de la organización del estroma. La curación anormal de la herida puede dar lugar a la cicatrización dérmica patológica, que representa un espectro diverso de trastornos que van desde cicatrices antiestéticas, a queloides hasta enfermedades sistémicas potencialmente mortales como la esclerodermia. Un ejemplo de cicatrización dérmica patológica son las cicatrices hipertróficas que son un resultado desfavorable de quemaduras, traumatismos o cirugía. Aunque se ha aprendido mucho sobre la fisiopatología de la cicatrización dérmica patológica, la mayoría de las modalidades de tratamiento carecen de un mecanismo de acción definido, son inespecíficas y tienen una eficacia limitada (Mustoe 2004). De hecho, hasta la fecha, no hay medicamentos aprobados por la FDA para tratar las cicatrices dérmicas.

35 Las funciones del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) y el factor de crecimiento del tejido conjuntivo (CTGF)

40 Existen muchos datos que apuntan a que la desregulación de la familia del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) conduce a la cicatrización en una variedad de afecciones inflamatorias crónicas y en respuesta a una lesión aguda (Shah et al., 1995; Leask y Abraham, 2004). Como tal, el TGF- β ha sido el objetivo de muchos enfoques terapéuticos diseñados para limitar la fibrosis aguda y crónica (Leask et al., 2008). Sin embargo, dado que el TGF- β desempeña funciones fisiológicas pleiotróficas, los esfuerzos para modularlo han estado limitados por las preocupaciones sobre la especificidad del tratamiento (Shull et al., 1992). Por ejemplo, la neutralización del TGF- β reduce la fibrosis en modelos animales de cicatrización quirúrgica (Lu et al., 2005; Shah et al., 1992), pero también ha retrasado la curación de heridas (Sisco et al. 2005). La señalización del TGF- β /Smad3 también se ha dirigido a promover la curación de heridas (Flanders 2003).

50 Otro factor de crecimiento de interés es el factor de crecimiento del tejido conjuntivo (CTGF) (Patentes US-5.585.270 y US-5.408.040; Solicitudes de Patente Internacional WO 00/27868 y WO2004/099372; Xu et al. 2007, Ren et al. 2006, Yamanaka et al. 2008, Daniels et al. 2003, Leask et al. 2004a y 2004b, Shi-Wen et al. 2008, Gao et al. 2007), que es una proteína de la matriz celular que se sabe que regula aspectos de la proliferación celular, migración, diferenciación, angiogénesis, producción de ECM y adhesión (Frazier et al., 1996). Se ha observado una sobreexpresión del ARNm y proteína CTGF en trastornos fibróticos crónicos que afectan a múltiples sistemas orgánicos. En la piel, el papel del CTGF en la fibrosis se está definiendo mejor. Aunque el CTGF tiene una expresión basal mínima en la piel normal, demuestra una regulación positiva transitoria durante varios días después de la lesión dérmica (Lin et al., 2005; Igarashi et al., 1993; Dammeier et al., 1998). Por el contrario, se ha observado una sobreexpresión persistente del CTGF en biopsias de queloides y esclerosis localizada (Igarashi et al., 1996). Los fibroblastos cultivados a partir de cicatrices hipertróficas, queloides y lesiones de esclerodermia expresan un nivel basal aumentado de CTGF (Colwell et al., 2006; Shi-Wen et al., 2000). Además, las células cultivadas a partir de cicatrices hipertróficas elaboran más CTGF en respuesta a la estimulación con TGF- β (Colwell et al., 2005).

60 Dado que el TGF- β induce de forma potente el CTGF a través de varias vías, se ha pensado durante mucho tiempo que el CTGF media en muchos de sus efectos fibróticos. De hecho, los estudios realizados en diversas poblaciones celulares han demostrado el papel que juega el CTGF en la inducción dependiente de TGF- β de la fibronectina (Fn), colágeno e inhibidor tisular de metaloproteinasa-1 (TIMP-1) (Frazier et al., 1996; Blalock et al., 2003; Grotendorst, 1997; Wang, et al., 2004). Un paradigma más reciente sugiere que el CTGF funciona como cofactor del TGF- β potenciando la unión ligando-receptor en células activadas. Abreu et al. 2002). Esto podría explicar la investigación

que muestra una capacidad limitada del CTGF para inducir la producción de ECM y la fibrosis sostenida *in vivo* en ausencia de TGF- β (Frazier et al., 1996; Bonniaud et al., 2003; Mori et al., 1999). Además, aunque el CTGF media los efectos del TGF- β en la diferenciación de miofibroblastos, es insuficiente para conseguir este cambio cuando se introduce exógenamente (Folger et al., 2001).

5 Existen varios ejemplos en los que la inducción del CTGF independiente de TGF- β puede contribuir a su actividad patológica. El estrés mecánico induce directamente la expresión de CTGF (Garrett 2004, Kessler et al., 2001, Schild et al., 2002). Se ha observado una expresión elevada de CTGF, sin un aumento concomitante de TGF- β , en respuesta a varios factores que contribuyen a la curación, como la trombina, el factor VIIa y el CTGF exógeno. Además, la endotelina-1, el factor de crecimiento epidérmico, el factor de crecimiento de fibroblastos, el factor de crecimiento endotelial vascular y el factor de crecimiento derivado de plaquetas pueden iniciar independientemente la transcripción de CTGF en fibroblastos.

15 El CTGF puede ser un objetivo atractivo para modular la cicatrización hipertrófica por varias razones. Como cofactor y mediador aguas abajo de TGF- β , el CTGF puede representar un objetivo más específico que el TGF- β para terapias moleculares dirigidas a genes dirigidas a la cicatrización, especialmente debido a que el TGF- β tiene efectos pluripotentes no relacionados con la formación de cicatrices. Además, el CTGF puede tener funciones independientes del TGF- β en el mantenimiento de un fenotipo fibrótico que sería obviado por las estrategias anti-TGF- β . A pesar de los avances en la comprensión del papel del CTGF en el aumento de la fibrosis en múltiples sistemas orgánicos y en enfermedades dérmicas crónicas como la esclerodermia, las funciones del CTGF en la cicatrización aguda y la curación de heridas siguen siendo en gran parte observacionales.

25 Para determinar si el CTGF era necesario para la curación de heridas y la hipertrofia de la cicatriz, se realizó un estudio en el que el CTGF se bloqueó específicamente en modelos de conejo bien caracterizados. El objetivo del estudio también fue determinar los mecanismos por los cuales el CTGF podría estar ejerciendo su efecto. La hipótesis era que la inhibición de la expresión de CTGF *in vivo* aboliría la fibrosis sin tener un efecto perjudicial sobre el cierre de la herida, un hallazgo que otros no han demostrado anteriormente en la piel.

30 El papel del oligonucleótido antisentido

La tecnología antisentido es un medio eficaz para reducir la expresión de productos génicos específicos y puede ser especialmente útil en una serie de aplicaciones terapéuticas, de diagnóstico y de investigación para la modulación de la expresión del factor de tejido conjuntivo (Garde et al., 2005, Patent US-6.965.025B2)

35 Un compuesto antisentido es un compuesto oligomérico que es capaz de someterse a hibridación con un ácido nucleico diana (por ejemplo, ARNm diana).

40 Se describen compuestos antisentido, composiciones y métodos para modular la expresión del factor de crecimiento del tejido conjuntivo y para el tratamiento de la enfermedad asociada con la expresión del factor de crecimiento del tejido conjuntivo, entre otros, en la patente US- 6965025B2

Sumario de la invención

45 La presente invención proporciona un método para reducir la cicatrización hipertrófica resultante de la curación de heridas dérmicas en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto un compuesto antisentido particularmente un oligonucleótido antisentido que inhibe la expresión del factor de crecimiento del tejido conjuntivo (CTGF) en una cantidad efectiva para inhibir la expresión de CTGF y de ese modo reducir la cicatrización hipertrófica.

50 Breve descripción de las figuras

55 La Figura 1 muestra que la expresión del ARNm del CTGF en un modelo de cicatriz hipertrófica de oreja de conejo continúa aumentando hasta el día 40 en heridas que forman cicatrices. Los niveles de ARNm se expresan en relación con los niveles encontrados en la piel no herida. El tamaño de la muestra es de 6 heridas por punto temporal (N = 6).

60 La Figura 2 muestra que los oligonucleótidos antisentido dirigidos contra CTGF reducen la expresión del ARNm del CTGF y la tinción de proteínas *in vivo*. Se inyectaron 300 μ g de oligonucleótidos anti-CTGF u oligonucleótidos inespecíficos en los días 14, 19 y 24. Las cicatrices se recogieron el día 28. La Figura 2A muestra los niveles de expresión del ARNm del CTGF medidos por la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR). PBS en la figura representa solución salina tamponada con fosfato. La Figura 2B muestra la tinción de la proteína CTGF, en la cual los cortes teñidos con anticuerpo anti-CTGF se analizaron digitalmente en cuanto a la densidad de color, que se expresa como porcentaje de tinción con relación al área de la cicatriz. La Figura 2C muestra una fotografía de una cicatriz tratada con oligonucleótidos inespecíficos. La Figura 2D muestra una fotografía de una cicatriz tratada con anti-CTGF con la barra de escala de 0,25 mm.

La Figura 3 muestra que el cierre grueso de la herida, como se determinó fotométricamente, fue similar en heridas tratadas con oligonucleótidos antisentido y oligonucleótidos inespecíficos en los días 7 y 10 posteriores a la herida. Las fotografías representan heridas representativas el día 7 a una resolución de 66 x 100 mm o 600 x 600 DPI.

La Figura 4 muestra que las medidas histológicas de la curación de las heridas son similares en heridas tratadas con oligonucleótidos antisentido y oligonucleótidos inespecíficos. La Figura 4A muestra el área de deposición del tejido de granulación. La Figura 4B muestra la epitelialización evaluada midiendo la brecha entre el epitelio migrante hacia dentro. La Figura 4C muestra una herida representativa tratada con OAS control inespecíficos el día 10 en una fotografía de la muestra de histología. La Figura 4D muestra una herida representativa tratada con OAS anti-CTG el día 10 en una fotografía de la muestra de histología. La barra de escala es de 1 mm. La tinción con hematoxilina y eosina se usó en la preparación de la muestra. Estos resultados demuestran claramente que el tratamiento con un OAS inhibidor de la expresión de CTGF no tiene ningún efecto sobre la respuesta temprana de curación de la herida posterior a la generación de una herida, aunque este tratamiento reduce la gravedad posterior de la cicatrización hipertrófica.

La Figura 5A muestra que el bloqueo temprano y tardío del CTGF reducía la hipertrofia de la cicatriz. El índice de elevación de la cicatriz se evaluó el día 28 después de la herida. La Figura 5B se refiere al esfuerzo de administrar oligonucleótidos antisentido en los días 0, 5 y 10 (cohorte de tratamiento temprano) frente a la administración en los días 14, 19 y 24 (cohorte de tratamiento tardío, (Figura 5D). La Figura 5B muestra el resultado para los oligonucleótidos inespecíficos de control. La barra de escala es de 1 mm. La tinción con hematoxilina y eosina se usó en la preparación de la muestra. Las Figuras 5B a 5D son fotografías de las muestras teñidas. La Figura 5E proporciona la fórmula para calcular el índice de elevación de la cicatriz (SEI) como una medida de la gravedad de la cicatrización.

La Figura 6C muestra que no hubo ninguna diferencia estadística en la organización del colágeno entre las heridas tratadas con OAS anti-CTGF el día 28 después de la herida. Las fotografías de los cortes representativos de las dermis teñidas con tricrómico y rojo sirio se muestran en las Figuras 6A y 6B, respectivamente. La barra de escala es 0,25 mm.

La Figura 7C muestra que la inhibición tardía del CTGF reducía la población de miofibroblastos teñida con α -SMA en cicatrices el día 28 después de la herida. Los cortes teñidos con anticuerpo anti- α -SMA se analizaron digitalmente en cuanto a densidad de color, lo cual se expresa como porcentaje de tinción con relación al área de la cicatriz. Se muestran cortes representativos de heridas tratadas con oligonucleótidos inespecíficos y oligonucleótidos antisentido en las Figuras 7A y 7B, respectivamente. La barra de escala es 0,25 mm.

La Figura 8 presenta representaciones gráficas del efecto del bloqueo de los OAS contra CTGF en comparación con oligonucleótidos control en el colágeno tipo I (FIGURA 8A), colágeno tipo III (FIGURA 8B), fibronectina (Fn) (FIGURA 8C) y expresión de TIMP-1 (FIGURA 8D) *in vivo* medido por RT-PCR. Las cicatrices se trataron con oligonucleótidos anti-CTGF en la cohorte de tratamiento tardío los días 14, 19 y 24 y se cosecharon el día 28.

La Figura 9 muestra un esquema de los sitios de inyección de la herida circular de la oreja que consiste en cinco inyecciones a razón de 20 μ l por inyección para un volumen total de 100 μ l por herida.

La Figura 10 muestra que el porcentaje de cierre de la herida, es decir, la respuesta de curación temprana se asocia con el bloqueo de los OAS contra CTGF en conejos heridos.

La Figura 11 muestra el efecto de varios esquemas de dosis, medido por el índice de elevación de la cicatriz (SEI), para las cohortes de administración temprana y tardía que recibieron dosis de 300 μ g. Los datos indican que la administración tardía proporciona una mejor respuesta a la dosis en comparación con las respuestas observadas en el grupo de dosis temprana.

La Figura 12 muestra la respuesta a la dosis para la cohorte de conejos de administración tardía que reciben una dosis de 100 μ g o 1000 μ g medida por el índice de elevación de la cicatriz. La respuesta a la dosis muestra una reducción más favorable de las cicatrices hipertróficas en el grupo de dosis de 1000 μ g.

La Figura 13 muestra que la cohorte de conejos de administración tardía que reciben una combinación de OAS contra CTGF y OAS contra TGF β 1 o TGF β 2 el día 28 proporciona un resultado particularmente más favorable en términos de reducción de las cicatrices hipertróficas que las cohortes que reciben OAS contra CTGF u OAS contra TGF β 1 o TGF β 2 solo.

Descripción detallada de la invención

Esta invención proporciona un compuesto antisentido que se dirige a un ácido nucleico que codifica e inhibe la expresión del factor de crecimiento del tejido conjuntivo (CTGF) para su uso en la reducción de la cicatrización hipertrófica resultante de la curación de heridas dérmicas en un sujeto que lo necesita, en el que el compuesto

antisentido comprende un oligonucleótido antisentido que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2, en el que el compuesto antisentido se empieza a administrar aproximadamente 14 días después de que el sujeto ha sufrido la herida.

5 También se divulga un método para reducir la cicatrización hipertrófica resultante de la curación de heridas dérmicas en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto un compuesto antisentido, tal como un oligonucleótido antisentido modificado, particularmente un oligodesoxirribonucleótido, o un compuesto de ARNs que inhibe la expresión del factor de crecimiento del tejido conjuntivo (CTGF) en una cantidad de dicho oligonucleótido eficaz para inhibir la expresión del CTGF en el sujeto.

10 En la práctica del método de esta invención, el sujeto puede ser un animal, preferiblemente un ser humano.

15 En una realización, el método de la invención implica la administración de un oligonucleótido antisentido que consiste en 12 a 30 nucleósidos dirigidos a un ácido nucleico que codifica el factor de crecimiento del tejido conjuntivo (véase la SEQ ID NO:19 en la patente US-6.965.025 B2), en el que el oligonucleótido se hibrida específicamente con dicho ácido nucleico e inhibe la expresión del factor de crecimiento del tejido conjuntivo, en el que dicho oligonucleótido comprende al menos una modificación seleccionada del grupo que consiste en un enlace internucleosídico modificado, un azúcar modificado y una nucleobase modificada. Ejemplos de oligonucleótidos antisentido adecuados se describen en los apartados anteriores de la patente US-6.965.025, dos de los cuales están comprendidos en la presente invención, es decir, los oligonucleótidos que tienen la secuencia expuesta en la SEQ ID NO:39 o 48, es decir, SEQ ID NOs: 1 o 2 en el presente documento, respectivamente.

20 Aunque pueden emplearse oligonucleótidos antisentido que contienen una variedad de enlaces internucleosídicos modificados, el enlace internucleosídico modificado actualmente preferido es un enlace de fosfotioato entre uno o más de los nucleósidos.

25 Los oligonucleótidos modificados también pueden contener uno o más nucleósidos que tienen restos de azúcar modificados. Por ejemplo, el anillo de azúcar de furanosilo se puede modificar de varias maneras, incluida la sustitución con un grupo sustituyente, formando un puente para formar un BNA y la sustitución del 4'-O con un heteroátomo como S o N(R) como se describe en la patente US-7.399.845 concedida a Seth et al.

30 En general, se prefiere que el oligonucleótido antisentido contenga al menos uno y generalmente más de un azúcar modificado. Aunque se pueden emplear diversos azúcares modificados, actualmente se prefiere emplear un azúcar 2'-O-metoxietilo.

35 Los oligonucleótidos modificados también pueden contener uno o más restos de azúcar sustituidos. Por ejemplo, el anillo de azúcar de furanosilo se puede modificar de varias maneras, incluida la sustitución con un grupo sustituyente, formando un puente para formar un ácido nucleico bicíclico "BNA" y la sustitución del 4'-O con un heteroátomo como S o N(R) como se describe en la patente US-7.399.845 concedida a Seth et al. Otros ejemplos de BNA se describen en la Solicitud de Patente Internacional publicada N.º WO 2007/146511.

40 Los compuestos antisentido de la invención pueden contener opcionalmente uno o más nucleótidos que tienen restos de azúcar modificados. Las modificaciones del azúcar pueden impartir estabilidad a la nucleasa, afinidad de unión o alguna otra propiedad biológica beneficiosa a los compuestos antisentido. El anillo de azúcar de furanosilo de un nucleósido se puede modificar de varias maneras, que incluyen, pero no están limitados a: adición de un grupo sustituyente, particularmente en la posición 2'; formación de un puente de dos átomos en el anillo no geminal para formar un ácido nucleico bicíclico (BNA); y la sustitución de un átomo o grupo tal como -S-, -N(R)- o -C(R1) (R2) por el oxígeno del anillo en la posición 4'. Los azúcares modificados incluyen, pero no están limitados a: azúcares sustituidos, especialmente azúcares sustituidos en 2' que tienen un grupo sustituyente 2'-F, 2'-OCH₂ (2'-OMe) o un 2'-O(CH₂)₂-OCH₃ (2'-O-metoxietilo o 2'-MOE); y azúcares modificados bicíclicos (BNA), que tienen un puente 4'-(CH₂)_n-O-2', donde n = 1 o n = 2. Los métodos para las preparaciones de azúcares modificados son bien conocidos por los expertos en la técnica.

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

50 En ciertas realizaciones, el resto de azúcar bicíclico comprende un grupo puente entre los átomos de carbono 2' y 4'. En ciertas de tales realizaciones, el grupo puente comprende de 1 a 8 grupos birradicales unidos. En ciertas realizaciones, el resto de azúcar bicíclico comprende de 1 a 4 grupos birradicales unidos. En ciertas realizaciones, el resto de azúcar bicíclico comprende 2 o 3 grupos birradicales unidos. En ciertas realizaciones, el resto de azúcar bicíclico comprende 2 grupos birradicales unidos. En ciertas realizaciones, un grupo birradical unido se selecciona de -O-, -S-, -N(R1)-, -C(R1)(R2)-, -C(R1)=C(R1)-, -C(R1)=N-, -C(=NR1)-, -Si(R1) (R2)-, -S(=O)₂-, -S(=O)-, -C(=O)- y -C(=S)-; donde cada R1 y R2 es, independientemente, H, hidroxilo, alquilo C1-C12, alquilo C1-C12 sustituido,

- alqueno C2-C12, alqueno C2-C12 sustituido, alqueno C2-C12, alqueno C2-C12 sustituido, arilo C5-C20, arilo C5-C20 sustituido, un radical heterociclo, un radical heterociclo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, radical alicíclico C5-C7, radical alicíclico C5-C7 sustituido, halógeno, oxo (-O-) sustituido, amino, amino sustituido, azido, carboxilo, carboxilo sustituido, acilo, acilo sustituido, CN, tiol, tiol sustituido, sulfonilo (S(=O)₂-H), sulfonilo sustituido, sulfoxilo (S(=O)-H) o sulfoxilo sustituido; y cada grupo sustituyente es, independientemente, halógeno, alquilo C1-C12, alquilo C1-C12 sustituido, alqueno C2-C12, alqueno C2-C12 sustituido, alqueno C2-C12, alqueno C2-C12 sustituido, amino, amino sustituido, acilo, acilo sustituido, aminoalquilo C1-C12, aminoalcoxi C1-C12, aminoalquilo C1-C12 sustituido, aminoalcoxi C1-C12 sustituido o un grupo protector.
- 5
- 10 En algunas realizaciones, el resto de azúcar bicíclico está formando un puente entre los átomos de carbono 2' y 4' con un grupo birradical seleccionado de O-(CH₂)_p-, -O-CH₂-, -O-CH₂CH₂-, -O-CH (alquil)-, -NH-(CH₂)_p-, -N(alquil)-(CH₂)_p-, -O-CH(alquil)-, -(CH(alquil))-(CH₂)_p-, -NH-O-(CH₂)_p-, -N(alquil)-O-(CH₂)_p-, o -O-N(alquil)-(CH₂)_p-, en el que p es 1, 2, 3, 4 o 5 y cada grupo alquilo puede estar sustituido adicionalmente. En ciertas realizaciones, p es 1, 2 o 3.
- 15 En un aspecto, cada uno de dichos puentes es, independientemente, -[C(R1)(R2)]_n-, -[C(R1)(R2)]_n-O-, -C(R1R2)-N(R1)-O- o -C(R1R2)-O-N(R1)-. En otro aspecto, cada uno de dichos puentes es, independientemente, 4'-(CH₂)₃-2', 4'-(CH₂)₂-2', 4'-CH₂-O-2', 4'-(CH₂)₂-O-2', 4'-CH₂-O-N(R1)-2' y 4'-CH₂-N(R1)-O-2'- en el que cada R1 es, independientemente, H, un grupo protector o alquilo C1-C12.
- 20 En los nucleótidos que tienen restos de azúcar modificados, los restos de nucleobases (naturales, modificados o una combinación de los mismos) se mantienen para la hibridación con una diana de ácido nucleico apropiada.
- En una realización, los compuestos antisentido dirigidos a un ácido nucleico comprenden uno o más nucleótidos que tienen restos de azúcar modificados. En una realización preferida, el resto de azúcar modificado es 2'-MOE. En otras realizaciones, los nucleótidos modificados con 2'-MOE están dispuestos en un motivo gapper.
- 25
- Los oligonucleótidos actualmente preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': OH; F; O-, S- o N-alquilo; O-, S- o N-alqueno; O-, S- o N-alquino; u O-alquil-O-alquilo, en el que el alquilo, alqueno y alquino pueden ser alquilo C₁ a C₁₀ o alqueno y alquino C₂ a C₁₀ sustituidos o no sustituidos. Particularmente preferidos son O[(CH₂)_nO]_mCH₃, O(CH₂)_nOCH₃, O(CH₂)_nNH₂, O(CH₂)_nCH₃, O(CH₂)_nONH₂, y O(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂, donde n y m son de 1 a aproximadamente 10. Otros oligonucleótidos preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': alquilo inferior C₁ a C₁₀, alquilo inferior sustituido, alqueno, alquino, alcarilo, aralquilo, O-alcarilo u O-aralquilo, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, polialquilamino, sililo sustituido, un grupo que escinde ARN, un grupo indicador, un intercalador, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un oligonucleótido y otros sustituyentes que tienen propiedades similares.
- 30
- 35 Las modificaciones actualmente preferidas incluyen 2'-metoxietoxi (2'-O-CH₂CH₂OCH₃, también conocido como 2'-O-(2-metoxietilo) o 2'-MOE (Martin et al., *Helv. Chim. Acta*, 1995, 78, 486-504) es decir, un grupo alcoxialcoxi. Una modificación preferida adicional incluye 2'-dimetilaminoetoxi, es decir, un grupo O(CH₂)₂ON(CH₃)₂; también conocido como 2'-DMAOE y 2'-O-dimetilaminoetoxietoxi (también conocido en la técnica como 2'-O-dimetilaminoetoxietilo o 2'-DMAEOE), es decir, 2'-O-CH₂-O-CH₂-N(CH₂)₂.
- 40
- 45 Otra modificación actualmente preferida del azúcar incluye ácido nucleico bicíclico (también denominado ácido nucleico bloqueado (LNA)) en el que el grupo 2'-hidroxilo está unido al átomo de carbono 3' o 4' del anillo de azúcar, formando así un resto de azúcar bicíclico. El enlace es preferiblemente un grupo metileno (-CH₂)_n que forma un puente con el átomo de oxígeno 2' y el átomo de carbono 4' en el que n es 1 o 2 incluyendo α-L-metilenoxi (4'-CH₂-O-2') BNA, β-D-metilenoxi (4'-CH₂-O-2') BNA y etilenoxi (4'-(CH₂)₂-O-2') BNA. Los azúcares modificados bicíclicos también incluyen (6'S)-6'metil BNA, aminoxi (4'-CH₂-O-N(R)-2') BNA, oxiamino (4'-CH₂-N(R)-O-2') BNA en el que R es, independientemente, H, un grupo protector o alquilo C1-C12. Los LNA también forman dúplex con ADN, ARN o LNA complementarios con altas afinidades térmicas. Los espectros de dicroísmo circular (CD) muestran que los dúplex que implican LNA totalmente modificado (especialmente LNA:RNA) se parecen estructuralmente a un dúplex de ARN:ARN de forma A. El examen de resonancia magnética nuclear (NMR) de un dúplex LNA:DNA confirmó la conformación 3'-endo de un monómero de LNA. El reconocimiento del ADN de doble cadena también se ha demostrado que sugiere la invasión de cadena por el LNA. Los estudios de secuencias desapareadas muestran que los LNA obedecen las reglas de emparejamiento de bases de Watson-Crick con una selectividad generalmente mejorada en comparación con las correspondientes cadenas de referencia no modificadas.
- 50
- 55
- 60 Los LNA en los que el grupo 2'-hidroxilo está unido al átomo de carbono 4' del anillo de azúcar, formando así un enlace 2'-C, 4'-C-oximetileno, forman un resto de azúcar bicíclico. El enlace puede ser un grupo metileno(-CH₂)_n que forma un puente con el átomo de oxígeno 2' y el átomo de carbono 4' en el que n es 1 o 2 (Singh et al., *Chem. Commun.*, 1998, 4, 455-456). Los LNA y análogos de LNA muestran estabilidades térmicas dúplex muy elevadas con el ADN y ARN complementario (T_m = +3 a +10 °C), estabilidad frente a la degradación 3'-exonucleolítica y buenas propiedades de solubilidad. Otros grupos puente preferidos incluyen el 2'-desoxi-2'-CH₂OCH-, -4' puente.
- 65

Los LNA y la preparación de los mismos se describen en las Solicitudes de Patente Internacional publicadas Números WO 98/39352 y WO 99/14226.

5 Otras modificaciones actualmente preferidas incluyen 2'-metoxi (2'-O-CH₃) 2'-aminopropoxi (2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂), 2'-alil (2'-CH₂-CH=CH₂); 2'-O-alil (2'-O-CH₂-CH=CH₂) y 2'-fluoro (2'-F). La modificación 2' puede estar en la posición arabino (arriba) o en la posición ribo (abajo). Una modificación 2'-arabino preferida es 2'-F. También se pueden realizar modificaciones similares en otras posiciones sobre el oligonucleótido, particularmente la posición 3' del azúcar en el nucleótido terminal 3' o en los oligonucleótidos unidos 2'- 5' y la posición 5' del nucleótido terminal 5'. Los oligonucleótidos también pueden tener miméticos de azúcar tales como restos ciclobutilo en lugar del azúcar pentofuranosilo. Las patentes representativas de Estados Unidos que enseñan la preparación de tales estructuras de azúcar modificadas incluyen, entre otras, las patentes US-4.981.957; US-5.118.800; US-5.319.080; US-5.359.044; US-5.393.878; US-5.446.137; US-5.466.786; US-5.514.785; US-5.519.134; US-5.567.811; US-5.576.427; US-5.591.722; US-5.597.909; US-5.610.300; US-5.627.053; US-5.639.873; US-5.646.265; US-5.658.873; US-5.670.633; US-5.792.747; US-5.700.920 y 6.600.032. Una lista representativa de azúcares modificados preferidos incluye, pero no se limita a azúcares sustituidos que tienen un grupo sustituyente 2'-F, 2'-OCH₂ o 2'-O(CH₂)₂OCH₃; azúcares modificados 4'-tio y azúcares modificados bicíclicos.

20 En una realización adicional, el método de la invención proporciona que al menos una y generalmente más de una de las nucleobases contenidas en el oligonucleótido antisentido será un nucleótido modificado tal como una 5-metilcitosina.

25 En una realización de la presente divulgación, el oligonucleótido antisentido se administra comenzando no antes de 7 días después de que el sujeto se haya herido, y de acuerdo con la presente invención aproximadamente 14 días después de que el sujeto se ha herido y continúa después durante el período de curación de la herida. Las heridas pueden ser inducidas por (pero no limitadas a) las siguientes: lesiones en la piel, abrasiones en la piel, cirugía electiva, cirugía reconstructiva, cirugía general, quemaduras, cirugía cosmética y cualquier lesión que resulte en rotura o daño a la piel.

30 En ciertas realizaciones de la invención, el método comprende además administrar al sujeto un oligonucleótido antisentido que inhibe la expresión del factor de crecimiento transformante β1 (TGF β1) además del oligonucleótido antisentido que inhibe la expresión de CTGF. Ejemplos de oligonucleótidos antisentido adecuados para el TGF β1 se describen en la patente US-6.436.909, uno de los cuales se prefiere actualmente, es decir, el oligonucleótido que tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO:13, divulgada en este documento como SEQ ID NO:3.

35 En el método de esta invención, también se puede administrar un segundo oligonucleótido antisentido que inhibe la expresión del factor de crecimiento del tejido conjuntivo. En ciertas realizaciones, la administración conjunta del segundo oligonucleótido antisentido potencia el efecto del primer oligonucleótido antisentido, de manera que la administración conjunta da como resultado un efecto que es mayor que el efecto de administrar cada uno por separado.

40 Se pueden emplear diversos regímenes en la práctica del método de esta invención para administrar oligonucleótidos antisentido que incluyen regímenes de administración simultáneos y secuenciales. Por ejemplo, el OAS que inhibe la expresión del factor de crecimiento del tejido conjuntivo se puede administrar de forma intermitente con cada administración posterior que se efectúa al menos 4 días después de la administración anterior.

45 En los métodos de esta invención, el oligonucleótido antisentido se administra deseablemente en una cantidad eficaz para reducir la cicatrización sin tener un efecto adverso sobre la curación de la herida, por ejemplo, una cantidad entre aproximadamente 300 μg/cm y aproximadamente 10 mg/cm de la herida, preferiblemente entre 250 μg/cm y 5 mg/cm; siendo preferiblemente entre 500 μg/cm y 5 mg/cm.

50 En una realización de la invención, la cantidad de oligonucleótido antisentido administrada está entre 100 μg/cm y 10 mg/cm de la herida.

55 En otra realización de la invención, la cantidad de oligonucleótido antisentido administrada es superior a 300 μg/cm.

En una realización adicional de la invención, el oligonucleótido antisentido se administra en una cantidad eficaz para reducir la cicatrización sin tener un efecto sobre la curación de la herida.

60 Esta invención también proporciona un método para reducir la cicatrización hipertrófica resultante de la curación de las heridas dérmicas en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto un compuesto antisentido que inhibe la expresión del factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF-β1) en una cantidad efectiva para inhibir la expresión del TGF-β1 y de ese modo reducir la cicatrización hipertrófica.

65 Esta invención se ilustra en la sección de Detalles experimentales expuesta a continuación. Esta sección se expone para ayudar a la comprensión de la invención, pero no pretende, y no debe interpretarse que limite, de ninguna manera, la invención tal como se presenta en las reivindicaciones expuestas a continuación.

Ejemplos

Ejemplo 1: La inhibición antisentido del ARNm de los factores de crecimiento del tejido conjuntivo (CTGF/CCN2) limita la cicatrización hipertrófica sin afectar a la curación de heridas in vivo

Introducción

Este estudio evalúa la importancia del CTGF para la reparación de heridas y la cicatrización hipertrófica y evalúa su idoneidad como objetivo para terapias anti-cicatrización. Los datos demuestran que los oligonucleótidos antisentido modificados contra CTGF reducen la cicatrización hipertrófica en un modelo de animal (conejo).

Materiales y métodos

Preparación de oligonucleótidos antisentido contra CTGF

Se analizaron los ADNc del CTGF humano, de ratón y de rata para determinar secuencias de nucleótidos únicas de 20 unidades con altos contenidos de GC para minimizar la autohibridación y proporcionar estabilidad al complejo de ARNm del oligonucleótido. Se usaron 20 unidades de oligonucleótidos de fosforotioato que contienen modificaciones 2'-O-metoxietilo (2'MOE) en las posiciones 1-5 y 15-20, y oligonucleótidos en las posiciones 6-14 para todos los experimentos. Para cada diana de gen, se diseñó una serie de 36 oligonucleótidos antisentido diferentes, que incluyen desoxirribonucleótidos, para hibridar con secuencias a lo largo de todo el ARNm. Los oligonucleótidos se sintetizaron como se describió previamente (McKay et al., 1999) y se cribaron como se describe a continuación.

Los cultivos primarios de fibroblastos dérmicos de conejo de paso temprano (3 a 4) se cultivaron hasta la confluencia y luego se trataron con 150 nmol/l de oligonucleótidos y 10 µg/ml de lipofectina (Life Technologies, Inc, Rockville, MD) durante 4 horas. Las células se lavaron y cultivaron durante 24 horas, después de lo cual se aisló el ARN total de las células usando el RNeasy mini kit (Qiagen, Inc., Valencia, CA) según el protocolo del fabricante. La expresión del ARNm del CTGF se midió usando RT-PCR en tiempo real como se describe a continuación. Los niveles relativos de ARNm del CTGF del análisis de RT-PCR se determinaron después de la normalización a niveles de ARN 18S. El oligodesoxinucleótido en el sitio diana 1707 en la 3'UTR del CTGF redujo el nivel de ARNm de CTGF en fibroblastos dérmicos de conejo en un 92 %; una reducción similar en la proteína CTGF fue confirmada por transferencia Western (datos no mostrados). Se usó un control de 20 nucleótidos desapareados inespecíficos que contenía una mezcla aleatoria de las cuatro bases como control para evaluar la especificidad del oligodesoxinucleótido de fosforotioato.

Para la inyección *in vivo*, se disolvieron 50 mg del oligonucleótido antisentido o inespecífico en 1,5 ml de solución salina tamponada con fosfato estéril. Esta solución madre se diluyó adicionalmente para proporcionar una concentración final de 3 mg/ml de oligonucleótido. En base a un trabajo previo que usa oligonucleótidos antisentido en este modelo, (Sisco et al., 2005) se inyectaron 300 microgramos de oligonucleótidos antisentido en cada herida en cada punto temporal.

Modelos de herida y cicatriz en conejo

Este estudio utilizó dos modelos diferentes que se validaron por separado. El modelo de curación de heridas emplea una herida de 6 mm, la cual se observó que se curaba de manera predecible durante 1 a 2 semanas. El modelo de cicatriz se basa en una herida de 7 mm; el diámetro más grande de esta herida conduce a una hipertrofia de cicatriz significativamente mayor que la que se observa en las heridas de 6 mm. Este modelo de conejo de cicatrización hipertrófica tiene varias similitudes con las cicatrices hipertróficas humanas (Morris et al., 1997). Las cicatrices son palpables y persisten hasta nueve meses. Su apariencia microscópica es similar a la que se encuentra en los humanos; la histología muestra fibras de colágeno dispuestas de manera irregular y una mayor vascularización. Al igual que las cicatrices humanas, responden a las inyecciones de esteroides y al tratamiento tópico con silicona (Morris et al., 1997; Saulis et al., 2002) y son menos prominentes en animales de edad avanzada (Marcus et al., 2000). La aplicación de anticuerpos neutralizantes al TGF-β reduce la hipertrofia de la cicatriz (Lu et al., 2005).

Para los fines de este estudio, todos los animales fueron alojados en condiciones estándar y tratados de acuerdo con un protocolo experimental aprobado por el Comité de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Northwestern. Para todos los procedimientos, los conejos se anestesiaron con ketamina intramuscular (60 mg/kg) y xilazina (5 mg/kg). Después de la recogida del tejido, los animales previamente anestesiados se sacrificaron con una inyección intracardíaca de pentobarbital (200 mg/kg).

Se hicieron cuatro heridas circulares por punción en las orejas de los conejos blancos de Nueva Zelanda como se describió anteriormente (Mustoe et al., 1991). Estas heridas se hicieron al nivel del cartílago de la oreja usando un microscopio quirúrgico. Según la metodología estándar de los solicitantes, se crearon heridas de seis milímetros para evaluar la cinética de curación temprana de las heridas en la cohorte de curación de las heridas. Para evaluar la hipertrofia de la cicatriz, se crearon heridas de siete milímetros. Cada herida se tapó con un vendaje oclusivo estéril (Tegaderm, 3M, St. Paul, MN). Los apósitos se mantuvieron en su lugar o se reemplazaron según fue

necesario hasta que se produjo el cierre total de la herida o se cosechó la herida, lo que ocurriera primero. Se excluyeron las heridas que mostraban signos de desecación, necrosis o infección. Menos del cinco por ciento de las heridas fueron excluidas; estas se distribuyeron uniformemente entre los grupos de tratamiento. Esta tasa fue consistente con las versiones no tratadas de los modelos.

5

Tratamiento de heridas y cicatrices

Los oligonucleótidos antisentido se inyectaron intradérmicamente usando una aguja de calibre 29. Cuando se realizaba el tratamiento antes de la herida, se creaba una ampolla de 150 µl donde se planificaba la herida una hora antes de la cirugía. El tratamiento de las heridas existentes se realizó con seis inyecciones intradérmicas iguales (17 µl cada una) en la periferia de cada herida en curación. Para validar el proceso de inyección y evaluar la durabilidad *in vivo* de los oligonucleótidos, las heridas de 6 mm en dos conejos se inyectaron con 150 µg de un oligonucleótido modificado con 2'-O-metoxietilo una hora antes de realizar herida. Estas heridas se recogieron en los días 2, 4, 6 y 8. La distribución de oligonucleótidos se determinó usando inmunohistoquímica de los cortes de heridas de heridas inyectadas con oligonucleótidos e inyectadas con vehículo, como se describió previamente, usando un anticuerpo monoclonal patentado que reconoce específicamente esta clase de antisentido (Butler et al., 1997)

10

15

Cohortes de heridas

Para evaluar si el bloqueo antisentido de CTGF afecta la reparación de la herida, se realizaron heridas de 6 mm en las orejas de seis conejos. Estas heridas se trataron con oligonucleótidos anti-CTGF u oligonucleótidos inespecíficos una hora antes de la herida y en los días 3 y 6 posteriores a la herida. Las heridas se fotografiaron los días 7 y 10 y se recogieron el día 10 para el análisis histológico. Se usaron tres cohortes de conejos para evaluar si el bloqueo del CTGF afecta a la cicatrización hipertrófica. El grupo de control, que consistía en 12 conejos con cuatro heridas de 7 mm en cada oreja, se utilizó para determinar la expresión temporal del CTGF durante el desarrollo de la cicatriz. Se recogieron las heridas de tres conejos en cada punto temporal (días 7, 14, 28 y 40) para el análisis de la histología y el ARNm. Seis conejos, con cuatro heridas de 7 mm en cada oreja, comprendían la cohorte de tratamiento de cicatrización temprana. Estas heridas se trataron con oligonucleótidos anti-CTGF u oligonucleótidos inespecíficos una hora antes de la herida (día 0) y en los días 5 y 10 después de la herida. La cohorte de tratamiento de la cicatriz tardía, que consistía en 12 conejos, se trató con oligonucleótidos anti-CTGF u oligonucleótidos inespecíficos en los días posteriores a la herida 14, 19 y 24. Se extrajo ARN total de cicatrices en la cohorte de tratamiento tardío y se realizó la RT-PCR como se describe a continuación para confirmar una reducción en la expresión del ARNm del CTGF y determinar los niveles de colágeno tipo I y III, fibronectina y TIMP-1.

20

25

30

35

Histología

Se tiñeron cortes de herida y cicatriz de cinco micrómetros con hematoxilina y eosina para cuantificar la epitelización de la herida, la deposición de tejido de granulación y la hipertrofia de la cicatriz, como se describió previamente, utilizando un sistema de análisis de imágenes digitales (NIS-Elements Basic Research, Nikon Instech Co, Kanagawa, Japón) (Lu et al., 2005). Se midió la hipertrofia de la cicatriz mediante el índice de elevación de la cicatriz (SEI), una relación entre el área de la cicatriz de la sección transversal y el área del tejido extirpado para formar la herida (Figura 6d). Los cortes se tiñeron usando tricrómico de Masson y rojo sirio para evaluar la organización del colágeno dentro de la cicatriz, que se clasificó con un aumento de 40 como baja, media o alta. Dos observadores enmascarados para el tratamiento evaluaron cada corte.

40

45

Inmunoquímica

Los anticuerpos primarios utilizados incluyeron CTGF antihumano de cabra (del Dr. Gary Grotendorst, Lovelace Resp Res Institute, Albuquerque, Nuevo México), anticuerpo anti-CD31 humano de ratón (Dako North America, Inc., Carpinteria, CA) y el kit de inmunotinción del α -SMA (Sigma, St. Louis, MO). La recuperación de antígeno se realizó para la tinción de α -SMA y CD31 hirviendo los cortes en el tampón de recuperación de antígeno (Dako NA) durante 15 o 60 minutos, respectivamente.

50

Los portaobjetos se incubaron con los anticuerpos primarios dirigidos contra CTGF (1:150), CD31 (1:10) o α -SMA. Los portaobjetos de CD31 y α -SMA se incubaron a continuación con anticuerpo anti-ratón secundario biotinilado (Sigma). Los portaobjetos de CTGF se incubaron con anticuerpo anti-cabra de conejo biotinilado (1:100, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA). La detección del complejo de anticuerpo se realizó con ExtrAvidina-Peroxidasa (CD31 y α -SMA) o complejo de avidina-biotina (CTGF) y DAB (Vector Laboratories, Inc.). Las heridas inyectadas con el oligonucleótido indicador se tiñeron usando un anticuerpo monoclonal como se describió previamente (Butler et al., 1997).

55

60

Las células inflamatorias se contaron manualmente (en función de la morfología) en cuatro campos de alta potencia por dos observadores enmascarados para el grupo de tratamiento. Para el análisis digital, las imágenes de campo brillante se adquirieron utilizando el sistema Nikon. Las imágenes se convirtieron en un canal monocromático y se estableció un umbral para cada mancha, permitiendo la cuantificación automática de DAB. El mismo umbral se

65

utilizó para cada sección de una mancha determinada. El ensamblado de las imágenes digitales permitió el análisis de cada cicatriz en su totalidad.

5 Los lúmenes de los vasos sanguíneos en los cortes teñidos con CD31 dentro de las cicatrices se contaron automáticamente usando este umbral. Del mismo modo, la densidad de la tinción de α -SMA y CTGF dentro de las cicatrices se analizó digitalmente y se expresa como un porcentaje del área total de la cicatriz.

PCR en tiempo real

10 De cada muestra congelada, se cortó afiladamente la epidermis y la dermis del lado no dañado de la oreja. El tejido se rompió y se homogeneizó en un molino de perlas Mini-Beadbeater (Biospec Products, Inc., Bartlesville, OK) en tampón de lisis basado en tiocianato de guanidina (tampón RLT, Qiagen). El ARN total se extrajo utilizando el mini kit RNeasy basado en columna (Qiagen) según el protocolo del fabricante. La digestión de ADN en la columna se realizó usando el RNase-free DNase Set (Qiagen) para evitar el arrastre de ADN genómico. El ADNc de la primera
 15 cadena se creó a partir de 1 μ g de ARN total usando el High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Inc., Foster, CA) usando cebadores hexámeros aleatorios según las instrucciones del fabricante. Los cebadores y las sondas de PCR (Tabla 1) se diseñaron basándose en los datos de secuencia de GenBank de CTGF, colágeno I-a2, colágeno IIIa1, fibronectina e inhibidor tisular de la metaloproteinasa-1 (TIMP-1). Los extremos 5' de las sondas
 20 indicadoras se marcaron con 6-FAM (carboxifluoresceína); los extremos 3' se marcaron con TAMRA (6-carboxi-tetrametilrodamina). Antes del uso, cada conjunto de cebadores se evaluó para garantizar una eficacia aceptable y una unión específica. Los cebadores comercialmente disponibles para el ARNr 18S, marcados con una sonda VIC (Applied Biosystems) se usaron como control endógeno. La expresión del ARNm se midió por triplicado usando PCR múltiple en tiempo real en un ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Cada reacción de
 25 PCR incluía 1 μ l de molde de ADNc (10 ng de ARN total), cebadores diana 900 nM y 1,25 μ l de cebadores 18S en un volumen de reacción final de 25 μ l. Los parámetros de ciclado fueron los siguientes: 50 °C (2 min), 95 °C (10 min) y 40 ciclos de 95 °C (15 segundos) y 60 °C (1 min). Se realizaron controles sin molde para excluir la amplificación del ADN genómico. Las curvas de fluorescencia de los productos de PCR se evaluaron usando el software ABI Prism 7000 SDS Study (Applied Biosystems) para obtener datos de expresión relativa.

30 Tabla 1. Secuencias de oligonucleótidos cebador y sonda utilizadas para la RT-PCR en tiempo real.

Gen	Secuencia
CTGF	Directa: 5'-AGCCGCCTCTGCATGGT-3' Inversa: 5'-CACTTCTTGCCCTTCTTAATGTTCT-3' Sonda: 5'-AGGCCTTGCGAAGCTGACCTGGA-3'
Col Ia2	Directa: 5'-TTCTGCAGGGCTCCAATGAT-3' Inversa: 5'-TCGACAAGAACAGTGAAGTGAACCT-3' Sonda: 5'-TTGAACTTGTTGCCGAGGGCAACAG-3'
Col IIIa1	Directa: 5'- CCTGAAGCCCCAGCAGAAA-3' Inversa: 5'- AACAGAAATTTAGTTGGTCACTTGTACTG-3' Sonda: 5'- TTGCACATTTTATATGTGTTCCCTTTTGTCTAATCTTGTC-3'
TIMP-1	Directa: 5'- CGCAGCGAGGAGTTTCTCA-3' Inversa: 5'- GCAAGTCGTGATGTGCAAGAG-3' Sonda: 5'- CGCTGGACAACCTGCGGAACGG-3'
Fn	Directa: 5'- CACCCCAGAGGAAGAAACATG-3' Inversa: 5'-AAGACAGGGTCTGCCAACGT-3' Sonda: 5'- CTCTGCAAAGGTCCATCCCAACTGGA-3'
18S	Directa: 5'-GCCGCTAGAGGTGAAATTCTTG-3' Inversa: 5'-CATTCTTGCAATGCTTTTCG-3' Sonda: 5'-ACCGGCGCAAGACGGACCAG-3'

Análisis estadístico

35 Los datos se analizaron usando el software Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). Las comparaciones del SEI y la expresión génica entre los grupos que recibieron oligonucleótidos inespecíficos y de tratamiento se realizaron mediante la prueba t de Student. Se realizaron comparaciones de más de dos grupos usando un análisis de varianza monodireccional con pruebas de Bonferroni basadas en nuestro protocolo experimental. Las diferencias en la organización del colágeno se evaluaron mediante el análisis tabular bivariable de chi cuadrado. Se consideró
 40 que un valor P de menos de 0,05 era estadísticamente significativo.

Resultados

El CTGF demuestra una regulación al alza progresiva durante la formación de cicatrices

45 Un objetivo de este estudio es observar la expresión temporal del CTGF en un modelo de cicatriz hipertrófica en la oreja de conejo y comparar este patrón con su expresión durante la curación normal de heridas. Los niveles de

ARNm del CTGF fueron insignificantes en la piel no herida; su expresión en la curación de las úlceras dérmicas continuó aumentando constantemente hasta el día 40 (Figura 1). Esto contrasta con un informe anterior en un modelo de cámara de espacio muerto de deposición de tejido de granulación (Igarashi et al., 1993) en el que la expresión del CTGF alcanzó su punto máximo entre los días 6-9 y luego volvió a la línea base. Anteriormente, este modelo había mostrado que el máximo de TGF- β 1 y TGF- β 2 se alcanza cerca del día 7 y entre los días 14-28, respectivamente (Kryger et al., 2007). El hecho de que el CTGF se exprese en niveles altos durante la cicatrización tardía en este modelo implica que puede aumentar el depósito elevado de matriz extracelular que continúa hasta el día 40 o en la remodelación de la matriz en este punto relativamente tardío. Además, implica que el alto nivel de expresión de CTGF en el día 40 es independiente de TGF- β 1 o TGF- β 2, lo que sugiere una vía reguladora alternativa.

Los oligonucleótidos inyectados son duraderos en un modelo de conejo de curación de heridas

La sensibilidad de los oligonucleótidos antisentido a la degradación por nucleasas *in vivo* ha sido ampliamente superado por el desarrollo de una modificación química 2'-O-metoxietilo (Zhang et al., 2000). Sin embargo, las heridas tienen una población heterogénea de células que migran, se dividen y liberan una variedad de enzimas que podrían diluir o degradar la efectividad de los ácidos nucleicos. Por lo tanto, para evaluar la durabilidad y la absorción de los oligonucleótidos de 2'-O-metoxietilo en este modelo, se controló la distribución y la durabilidad de un oligonucleótido en la piel usando un anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente ciertas secuencias de oligonucleótidos (Butler et al., 1997). La inmunohistoquímica demostró la retención intracelular del oligonucleótido inyectado dentro y adyacente a la herida los días 2, 4, 6 y 8 después de la herida. El oligonucleótido no se encontró en la piel no herida en el lado opuesto de la oreja.

Los oligonucleótidos antisentido contra CTGF son bioactivos in vivo

Se usó la RT-PCR para medir el ARNm del CTGF y la inmunohistoquímica para medir la proteína CTGF después del tratamiento con oligonucleótidos anti-CTGF en la cohorte de tratamiento tardío (tratados los días 14, 19 y 24, cosecha el día 28). En el momento de la cosecha, el nivel de ARNm del CTGF en las cicatrices tratadas con oligonucleótidos antisentido se había reducido en un 55 % ($P < 0,05$) en comparación con las cicatrices tratadas con oligonucleótidos inespecíficos (Figura 2A). El análisis digital de los cortes teñidos para CTGF reveló una reducción en la tinción de CTGF entre las heridas tratadas con antisentido (Figuras 2B, 2C y 2D). La diferencia en la eficacia que observamos entre el oligonucleótido *in vitro* (92 % reducción en el ARNm) frente a *in vivo* subraya las diferencias entre el cultivo celular y la farmacología animal. Es probable que refleje diferentes mecanismos de absorción cuando se usan lípidos catiónicos en cultivos de monocapa, así como la naturaleza heterogénea de la población celular *in vivo*.

La inhibición de la señalización del CTGF no afecta significativamente al cierre temprano de la herida

Las investigaciones previas han demostrado que el bloqueo de TGF- β 1 y TGF- β 2 mediado por oligonucleótidos retrasa la deposición de tejido de granulación en este modelo (Sisco et al., 2005). Dado que el CTGF media en muchos de los efectos proliferativos y relacionados con la matriz de TGF- β 1 o TGF- β 2, el estudio pretendía determinar si el CTGF es necesario para la curación normal (Mustoe et al., 1991). La inyección de oligonucleótidos anti-CTGF en el momento de la herida y el día 3 no tuvo un impacto significativo en la curación de la herida. El cierre grueso de la herida, medido histomorfológicamente, no se vio afectado en los días 7 y 10 (Figura 3). El área de la sección transversal del tejido de granulación en la herida no fue diferente entre las heridas tratadas con oligonucleótidos anti-CTGF, las tratadas con oligonucleótidos inespecíficos y las heridas no tratadas ($0,29 \pm 0,03$ frente a $0,28 \pm 0,03$ mm² frente a $0,28 \pm 0,04$ mm²) (Figura 4A). La brecha entre los bordes salientes del epitelio que migra hacia la herida también fue similar entre los grupos de tratamiento ($2,2 \pm 0,4$ mm frente a $2,0 \pm 0,3$ mm frente a $2,2 \pm 0,3$ mm, respectivamente) (Figura 4B). La Figura 4C muestra una herida representativa tratada con OAS inespecíficos de control el día 10. La Figura 4D muestra una herida representativa tratada con OAS anti-CTGF el día 10. La barra de escala es de 1 mm. En la preparación de la muestra se usó la tinción con hematoxilina y eosina. Estos resultados demuestran claramente que el tratamiento con un OAS inhibidor de la expresión de CTGF tal como un OAS con la secuencia expuesta en la SEQ ID No. 1 o 2, no tiene efecto sobre la respuesta temprana de curación posterior a la generación de una herida, aunque este tratamiento reduce la gravedad subsecuente de la cicatrización hipertrófica. Este fue un hallazgo inesperado y novedoso.

La inhibición temprana y tardía del CTGF reduce la hipertrofia de la cicatriz

Experimentos previos de bloqueo del TGF- β 1 o TGF- β 2 o de la procolágeno C-proteína han sugerido que el tiempo juega un papel decisivo en la determinación de la atenuación de la cicatrización; los tratamientos posteriores se correlacionan con reducciones más eficaces en la hipertrofia de la cicatriz (Lu et al., 2005, Reid et al., 2006).

Como la expresión del ARNm del CTGF alcanza un pico más tardío que la de TGF- β 1 o TGF- β 2 en este modelo, se postula que el bloqueo tardío de CTGF tendría un efecto más pronunciado sobre la cicatrización. La Figura 5A muestra que el bloqueo temprano y tardío del CTGF reducía la hipertrofia de la cicatriz. Inesperadamente, los datos presentados indican que la administración tardía proporciona mejores respuestas en comparación con la respuesta

proporcionada por la administración temprana. La inyección temprana de heridas con 300 μg de oligonucleótidos anti-CTGF en los días 0, 5 y 10 después de la herida redujo el índice de elevación de la cicatriz (SEI) en un 29 % (Figura 5C) en comparación con el oligonucleótido inespecífico de control en el día 28 ($p < 0,05$) (Figura 5B). La inyección tardía de heridas en curación, en los días 14, 19 y 24, redujo la elevación de la cicatriz en un 53 % (Figura 5D) en dos cohortes separadas de conejos ($P < 0,001$). La diferencia en la cicatrización entre las cohortes de tratamiento temprano y tardío fue estadísticamente significativa ($P = 0,05$). Las Figuras 5B a 5D son fotografías de las muestras. La Figura 5E proporciona la fórmula para un índice de elevación de la cicatriz (SEI) como una medida de la gravedad de la cicatrización. La experiencia clínica con quemaduras y los experimentos realizados con varios modelos de extirpación han sugerido que un retraso en la epitelización contribuye a la hipertrofia de la cicatriz (Mustoe et al., 2004). Los queratinocitos desempeñan funciones paracrinas complejas en la función y diferenciación de los fibroblastos, y pueden regular a la baja los procesos fibróticos. Se necesitan hasta doce días para restablecer la cobertura epitelial de heridas de siete milímetros en este modelo; esto contrasta con los modelos incisionales de curación, que, en ausencia de tensión, no tienden a producir cicatrices significativas. Como se describió anteriormente, la inhibición del CTGF no afectó al cierre epitelial en heridas en curación ni a la cantidad de epitelio en las cicatrices. Como tal, parece poco probable que el efecto que observamos esté indirectamente mediado por una alteración en la proliferación epitelial.

El bloqueo del CTGF no tiene un impacto medible en la angiogénesis, la inflamación o la organización del colágeno.

Se ha demostrado que el bloqueo de TGF- β 1 o TGF- β 2 (Shah et al., 1994) altera la arquitectura dérmica de las cicatrices incisionales en curación. En este estudio, sin embargo, no hubo diferencias significativas en la organización del colágeno según se evaluó con tinción con tricrómico y rojo sirio (Figura 6C). Las fotografías de cortes representativos de la dermis que muestran manchas rojas de tricrómico y rojo sirio se muestran en las Figuras 6A y 6B, respectivamente. La regulación a la baja del CTGF en cambio causó una reducción en la cantidad absoluta de matriz depositada dentro de las cicatrices, lo que contrasta con los cambios en la arquitectura dérmica mostrados con la modulación de TGF- β . La inmunotinción con CD-31 (datos no mostrados) se usó para evaluar la angiogénesis y la infiltración de leucocitos. En este estudio, la tinción indicó una tendencia hacia la angiogénesis reducida en las cicatrices tratadas con oligonucleótidos antisentido anti-CTGF; sin embargo, este hallazgo no fue estadísticamente significativo. Hubo una presencia mínima de macrófagos o neutrófilos en las heridas. No se pudo medir ninguna diferencia en la población de ninguna de estas células, lo que sugiere que una diferencia en la inflamación no fue la causa de los efectos observados.

El bloqueo del CTGF se asocia con una marcada reducción de los miofibroblastos α -SMA positivo

En las cicatrices no tratadas, la inmunohistoquímica reveló una tinción significativa para la α -actina de músculo liso (α -SMA), el marcador más confiable para el fenotipo de los miofibroblastos. Los miofibroblastos, que elaboran proteínas de la matriz e inician la contracción de la herida, están presentes transitoriamente en las heridas en curación; normalmente desaparecen por apoptosis a partir del día 16. La presencia persistente de miofibroblastos es una característica distintiva de las cicatrices hipertroóficas y se cree que contribuye a la producción excesiva de matriz y a la contractura que se encuentran en las mismas (Baur et al., 1975; Ehrlich et al., 1994). Junto con el TGF- β 1 o TGF- β 2, se requiere estrés mecánico para generar miofibroblastos α -SMA positivo. Esto puede explicar el principio quirúrgico establecido de que la tensión excesiva de la herida provoca cicatrices desfavorables (Arem et al., 1976). Las heridas en este modelo animal no se contraen ya que la herida está rígidamente entablillada por la base cartilaginosa subyacente (Mustoe et al., 1991). A medida que los fibroblastos intentan contraer esta herida, experimentan estrés isométrico, lo que proporciona el medio físico necesario para la diferenciación de los miofibroblastos (Hinz et al., 2001; Tomasek et al., 2002). En este estudio, el bloqueo del CTGF en puntos tardíos redujo notablemente la presencia de miofibroblastos que expresan α -SMA en las cicatrices a pesar de la presencia continua de tensión en la herida (Figura 7C). Los cortes teñidos con anticuerpo anti- α -SMA se analizaron digitalmente para determinar la densidad de color, que se expresa como porcentaje de tinción con relación al área de la cicatriz. Se muestran cortes representativos de heridas tratadas con oligonucleótidos inespecíficos y oligonucleótidos antisentido teñidos en las Figuras 7A y 7B, respectivamente. Este hallazgo puede explicar parte de la reducción observada en la hipertrofia de la cicatriz, ya que los miofibroblastos cicatriciales hipertroóficos contribuyen en gran medida a la elaboración de la matriz (Ghahary et al., 1993; Harrop et al., 1995).

El bloqueo del CTGF se asocia con reducciones del TIMP-1 y del colágeno tipos I y III

La cicatrización patológica es el resultado de una producción excesiva y una disminución de la degradación de las macromoléculas de la matriz extracelular. Con el fin de evaluar los efectos moleculares del CTGF en la producción de matriz, se midió la expresión del ARNm del colágeno y de la fibronectina, que constituyen la mayor parte de la matriz extracelular de la cicatriz (Figuras 8A a C). Como era de esperar, la expresión del colágeno I disminuyó en un 31 % ($P < 0,05$) y del colágeno tipo III se redujo en un 41 % ($P < 0,05$) en las cicatrices tratadas con anti-CTGF. La expresión de fibronectina se redujo en un 14 %; esto no fue estadísticamente significativo. A continuación, se midió la expresión de TIMP-1, que protege el colágeno y otros elementos de la matriz de la degradación por metaloproteinasas (Figura 8D). Se ha demostrado que el bloqueo del ARNsi del CTGF reduce la expresión de TIMP-1 in vitro (Li et al., 2006). De forma similar, los resultados indicaron que la expresión del ARNm de TIMP-1 disminuyó en un 23 % en las cicatrices tratadas con anti-CTGF ($P < 0,05$). No hubo diferencias detectables en los niveles de

colágeno, fibronectina y TIMP-1 en la cohorte de tratamiento temprano. Esto se debe presumiblemente a que estas heridas se recogieron 18 días después del último tratamiento antisentido, en cuyo momento no se pudo demostrar una diferencia medible para el oligonucleótido en la expresión génica corriente abajo.

5 Discusión

Este estudio evalúa la importancia del CTGF en la reparación de heridas y la cicatrización hipertrófica y evalúa su idoneidad como objetivo para terapias anticicatrización. Los datos demuestran que los oligonucleótidos antisentido modificados contra CTGF reducen la cicatrización hipertrófica en un modelo animal. Los datos también muestran que el bloqueo del CTGF no tiene un impacto medible en la deposición de la formación de tejido de granulación o epitelización, esta falta de efecto sobre la curación de la herida fue inesperada y será altamente beneficiosa en un contexto clínico, donde no se desee una reducción de la curación de la herida. La reducción de la cicatrización que se observó se asocia con una disminución de la presencia de miofibroblastos en las cicatrices y una reducción en los genes asociados con la producción de matriz y la prevención de la degradación de la matriz. Estos resultados apoyan la hipótesis de que el CTGF es un mediador importante de la cicatrización hipertrófica y arrojan luz sobre su papel en la patogénesis de la cicatriz.

Muchos de los hallazgos corroboran las observaciones clínicas e *in vitro* que han sido publicadas previamente. Los altos niveles de CTGF están presentes transitoriamente en las heridas agudas (Lin et al., 2005; Igarashi et al., 1993, Dammeier et al., 1998). En nuestro modelo de cicatrización hipertrófica, la expresión del ARNm del CTGF continúa aumentando hasta el día 40 después de la herida y es paralela a la hipertrofia progresiva de las cicatrices en estos puntos temporales. Esta expresión continua del CTGF dura más que la expresión elevada de TGF- β 1 o TGF- β 2 (Kryger et al., 2007). Esta se correlaciona con los datos del cultivo celular de los fibroblastos cicatriciales hipertróficos (Colwell et al., 2005) y refleja las observaciones de varios trastornos fibróticos como la esclerodermia.

La expresión prolongada de CTGF es probable que contribuya a la acumulación excesiva de matriz, lo que da lugar a la elevación de la cicatriz en este modelo. La autoinducción del CTGF puede contribuir a la aparición de altos niveles de CTGF en ausencia de TGF- β 1 o TGF- β 2 (Riser et al., 2000). Además, existen pruebas acumuladas de que el estrés mecánico es un inductor importante e independiente de la expresión de CTGF (Garrett et al., 2004; Kessler et al., 2001; Schild et al., 2002; Chaqou et al., 2006). Este modelo, en el que la base cartilaginosa impide que la herida se contraiga, es un modelo rígido de curación. La tensión isométrica generada en los fibroblastos cuando intentan contraer la herida puede explicar los niveles elevados de expresión de CTGF y la acumulación excesiva de matriz resultante.

Una gran cantidad de datos observacionales ha alimentado la especulación de que el CTGF es un importante mediador de la curación de heridas: existe una expresión aumentada de CTGF en heridas en curación; el CTGF aumenta la producción de muchas proteínas que son esenciales para la curación y los ratones con CTGF desactivado exhiben defectos en la producción de matriz y en la remodelación durante la embriogénesis (Ivkovic et al., 2003). Sin embargo, no se ha establecido la importancia del CTGF para la curación de heridas *in vivo*. Este estudio demuestra inesperadamente que la inhibición antisentido del ARNm del CTGF durante y poco después de la lesión no tiene un impacto medible en dos parámetros de la curación. La migración del epitelio a través de las heridas agudas y el grosor del epitelio en las cicatrices maduras no se modificaron por el bloqueo del CTGF.

Aunque se sabe que el CTGF participa en la formación de tejido de granulación cuando se inyecta (Frazier et al., 1996; Mori et al., 1999), su inhibición aquí no afectó a la producción de tejido de granulación. Estos resultados sugieren que la expresión normal de CTGF puede no ser necesaria para la capacidad regenerativa de la herida aguda. Es posible que el oligonucleótido antisentido no bloquee el CTGF suficientemente para desenmascarar un papel sutil en la curación. Sin embargo, los datos demostraron claramente que existe una ventana terapéutica en la que la hipertrofia de la cicatriz relacionada con el CTGF puede bloquearse sin tener un efecto perjudicial sobre la curación.

El corolario para evaluar la importancia del CTGF para la curación de heridas es si el CTGF juega un papel importante en la formación de cicatrices. Si bien varios trabajos han demostrado una capacidad para reducir la fibrosis tisular mediante el bloqueo de la transducción de señales del CTGF *in vivo*, el efecto de la modulación del CTGF sobre la formación de cicatrices dérmicas no ha sido explorado. El hallazgo más importante aquí es que los oligonucleótidos antisentido contra CTGF provocan una reducción significativa en la cicatrización hipertrófica. La administración tardía de oligonucleótidos antisentido contra CTGF reduce la elevación de la cicatriz más que la administración temprana. Esto va acompañado de una expresión reducida del colágeno tipo I, colágeno tipo III y TIMP-1, todos los cuales se sabe que son inducidos por el CTGF.

El grado de reducción de la cicatriz fue proporcional al nivel de expresión del ARNm del CTGF en el momento de la administración de oligonucleótidos. Estos hallazgos establecen que la expresión excesiva del ARNm del CTGF es responsable de al menos una parte del fenotipo de la cicatriz hipertrófica que observamos. Este efecto clínico es significativo dado que no hemos podido lograr el mismo grado de reducción de la transcripción *in vivo* como *in vitro*. Se sabe que los oligonucleótidos antisentido desnudos se internalizan en múltiples células en animales después de la administración sistémica (Butler et al., 1997). En este estudio, la dificultad refleja la complejidad de la herida en

curación, en la cual existe una población heterogénea de células que aparecen transitoriamente. También demuestra los desafíos inherentes a la reducción de la expresión génica en heridas. Los métodos para mejorar la transfección de los oligonucleótidos pueden reducir aún más los niveles de CTGF y pueden resaltar aún más su importancia para la cicatrización.

5 En este estudio, el bloqueo del CTGF se asoció con una marcada reducción en la presencia de miofibroblastos que expresan α -SMA. Varios estudios de cultivo celular han implicado al CTGF en la diferenciación de miofibroblastos. Se ha demostrado que el CTGF media el efecto del TGF- β en la diferenciación de fibroblastos corneales (Garrett et al., 2004; Grotendorst et al., 2004). Sin embargo, el CTGF solo parece ser insuficiente para inducir la expresión de α -SMA (Folger et al., 2001). Esto ha llevado a la hipótesis de que los fibroblastos sujetos a tensión mecánica responden al CTGF después de ser cebados por TGF- β (Garrett et al., 2004). Los resultados del experimento de los solicitantes sugieren que el CTGF puede orquestar la diferenciación de miofibroblastos o el reclutamiento de cicatrices hipertróficas. Esto proporciona un mecanismo potencial adicional mediante el cual el CTGF como diana ejerce su efecto: a través del bloqueo de la diferenciación de miofibroblastos mediada por CTGF, que a su vez se manifiesta como una producción de matriz extracelular reducida.

La importancia del momento adecuado para efectuar la terapia farmacológica de las cicatrices se observó previamente en Lu et al (2005). Al igual que con el bloqueo de TGF- β 1 o TGF β 2, los efectos del bloqueo del CTGF fueron más pronunciados en puntos temporales posteriores. Esto puede reflejar simplemente la expresión aumentada de CTGF después del día 14 después de la herida. Si la cicatrización hipertrófica es consecuencia de la expresión sostenida del CTGF después de que TGF- β 1 o TGF- β 2 hayan empezado a disminuir, parece lógico que seleccionarlo durante su pico de expresión dará como resultado el resultado clínico más pronunciado. En otra alternativa, la eficacia mejorada del tratamiento tardío puede reflejar la cronología de la diferenciación de los miofibroblastos, que alcanza su punto máximo en las heridas normales el día 16. Si el CTGF coordina el reclutamiento, diferenciación o función de los miofibroblastos, bloquearlo en este momento sería presumiblemente más efectivo.

A pesar de la evidencia circunstancial que implica al CTGF en la curación y cicatrización de heridas dérmicas, su importancia para estos procesos *in vivo* no ha sido bien definida hasta el contexto actual. Los datos confirman que la expresión del CTGF se mantiene en niveles elevados durante la cicatrización, después de que los niveles de TGF- β 1 o TGF- β 2 hayan retornado hasta la línea base. También demuestra adicionalmente que el tratamiento con oligonucleótidos antisentido contra CTGF reduce eficazmente la cicatrización sin tener un efecto perjudicial sobre la curación. Este estudio identifica dos mecanismos mediante los cuales el CTGF puede promover la cicatrización hipertrófica: aumentando o manteniendo la persistencia de los miofibroblastos α -SMA positivo en la cicatriz y promoviendo la deposición de matriz extracelular a través de la transcripción de genes tales como el del colágeno y del TIMP-1. Se puede imaginar un ciclo, iniciado por TGF- β 1 o TGF- β 2, mediante el cual la tensión mecánica induce la expresión de CTGF. El CTGF potencia la diferenciación de miofibroblastos y la elaboración de las macromoléculas de la matriz. Estos miofibroblastos activados elaboran a continuación más CTGF. Es tentador especular que el CTGF podría proporcionar una diana mediante la cual este ciclo podría romperse. Dado que el CTGF es un regulador corriente abajo de la síntesis de colágeno sin los efectos proteicos del TGF- β 1 o TGF- β 2, puede resultar ser un objetivo más atractivo que el TGF- β 1 o TGF- β 2 en la modulación de la cicatrización.

EJEMPLO 2: La inhibición antisentido del ARNm de factores de crecimiento del tejido conjuntivo (CTGF/CCN2) limita el experimento combinado de cicatrización hipertrófica

45 Materiales y métodos

Producción de heridas

50 Se practicaron cuatro heridas por punción circulares en las orejas de conejos blancos de Nueva Zelanda como se describió anteriormente. Estas heridas se hicieron al nivel del cartílago de la oreja. Se usó un microscopio quirúrgico para asegurar la eliminación completa de la epidermis, la dermis y el pericondrio de cada herida, de modo que permaneció una úlcera basada en el cartílago. Se crearon heridas de seis milímetros para evaluar la cinética de curación temprana de heridas en la cohorte de curación de heridas. Se crearon heridas de siete milímetros para evaluar la hipertrofia de la cicatriz en la cohorte de cicatrices. Cada herida se tapó individualmente con un vendaje oclusivo estéril (Tegaderm, 3M, St. Paul, MN) para prevenir la desecación y la necrosis del cartílago. La integridad de los apósitos y el estado de las heridas se verificaron a diario.

Administración de OAS

60 Los oligonucleótidos antisentido se inyectaron intradérmicamente usando una aguja de calibre 29 en una jeringa de 0,5 ml. Cuando se realizaba el tratamiento antes de la herida, se creaba una ampolla de 150 μ l donde se planificaba la herida una hora antes de la cirugía. El tratamiento de las heridas existentes se realizó con seis inyecciones intradérmicas iguales (17 μ l cada una) en la periferia de cada herida en curación o 4 inyecciones de 20 μ l con 20 μ l en el medio (Figura 9).

Régimen de tratamiento

Las heridas de 6 mm en dos conejos se inyectaron con 150 µg de un oligonucleótido modificado con 2'-Ometoxietilo una hora antes de la herida. Para evaluar si el bloqueo antisentido contra CTGF afecta la reparación de la herida, se realizaron heridas de 6 mm en los oídos de seis conejos. Estas heridas se trataron con oligonucleótidos anti-CTGF u oligonucleótidos inespecíficos una hora antes de la herida y en los días 3 y 6 posteriores a la herida. Las heridas se fotografiaron los días 7 y 10, y se recogieron el día 10 para el análisis histológico.

Cicatriz hipertrófica

El modelo animal utilizado en este experimento es el modelo de conejo de cicatrización hipertrófica que tiene varias similitudes con las cicatrices hipertróficas humanas. Las cicatrices son palpables y persisten hasta nueve meses. Su apariencia microscópica es similar a la que se encuentra en los humanos; la histología muestra fibras de colágeno dispuestas de manera irregular y una mayor vascularización. Al igual que las cicatrices humanas, responden a las inyecciones de esteroides y al tratamiento tópico con silicona y son menos prominentes en los animales viejos. Para inducir la cicatrización hipertrófica, se hicieron heridas circulares por punción de siete milímetros en las orejas de conejos blancos de Nueva Zelanda hasta el nivel del cartílago de la oreja utilizando un microscopio quirúrgico. Se inyectaron en la herida dosis de 100 µg, 300 µg o 1000 µg de oligonucleótido anti-CTGF u oligonucleótido inespecífico.

- Tratamiento temprano

Las heridas se trataron con oligonucleótidos anti-CTGF u oligonucleótidos inespecíficos una hora antes de la herida (día 0) y en los días 5 y 10 después de la herida.

- Tratamiento tardío

La cohorte de tratamiento de cicatrices, que consistía en 12 conejos, se trató con oligonucleótidos anti-CTGF u oligonucleótidos inespecíficos en los días 14, 19 y 24 después de la herida. Se observó respuesta a la dosis. La conclusión preliminar es que 100 µg es subterapéutico, 300 µg indica respuesta a la dosis y 1000 µg indica una respuesta mejor que 300 µg.

Experimentos clave realizados

Los experimentos clave realizados en dos cohortes se enumeran a continuación:

Cohorte 1: Modelo de cicatriz hipertrófica de 7 mm (n = 14 en total)

- Indicador de osteoglicina (OGN) inyectado y cosechado en los días 2, 4, 8 para inmunohistoquímica (IHC).
- Anti-CTGF inyectado en los días 0, 3, cosechado el día 7
- Anti-CTGF inyectado en los días 0, 5, 10 o días 14, 19, 24; ambos cosechados el día 28
- Análisis fotométrico e histológico de curación realizados en los días 7 y 10
- Índice de elevación de la cicatriz (SEI) calculado el día 28 (consultar la Figura 5E para la fórmula para calcular el SEI para determinar la gravedad de la cicatrización hipertrófica).
- CTGF clonado; RT-PCR realizada los días 7, 14, 28, 40 y después de 1-5 días después de la inyección de OGN.

Cohorte 2: Modelo de cicatriz hipertrófica de 7 mm (n = 17 en total)

- Expresión de CTGF determinada en diversos puntos temporales en la curación
- OGN antisentido probado para durabilidad y bioactividad *in vitro* e *in vivo*
- Oligonucleótidos anti-CTGF u oligonucleótidos inespecíficos inyectados temprano para evaluar la curación de la herida
- Oligonucleótidos anti-CTGF u oligonucleótidos inespecíficos inyectados tarde para evaluar la cicatrización

Resumen del experimento de combinación

Los primeros tres grupos se mantuvieron sin cambios. Para el grupo cuatro (ambos subgrupos) se utilizó un régimen de dosificación diferente de la siguiente manera:

- Administrado los días 14, 19, 24 con OAS contra CTGF (SEQ ID No. 1 o 2) (a 300 µg en 100 µl)
- Administrado los días 15, 20, 25 con OAS contra TGFβ1 (SEQ ID No. 3) (a 300 µg en 100 µl)

Resultados y discusión

Para evaluar si el bloqueo antisentido de CTGF afecta a la cicatrización hipertrófica, se usaron tres grupos de conejos. El grupo de control, que consistía en 12 conejos con cuatro heridas de 7 mm en cada oreja, se utilizó para determinar la expresión temporal de CTGF durante el desarrollo de la cicatriz.

Se recogieron las heridas de tres conejos en cada punto temporal (días 7, 14, 28 y 40) para histología y el análisis de ARNm. Seis conejos, con cuatro heridas de 7 mm en cada oreja, comprendían la cohorte de tratamiento temprano de la cicatriz. Se realizaron análisis fotométricos e histológicos de curación los días 7 y 10. La Figura 10 muestra el porcentaje de cierre de la herida, es decir, la respuesta de curación temprana asociada con el bloqueo del OAS contra CTGF en conejos heridos. Estas heridas se trataron con oligonucleótidos anti-CTGF u oligonucleótidos inespecíficos una hora antes de la herida (día 0) y en los días 5 y 10 después de la herida. La cohorte de tratamiento de la cicatriz tardía, que consistía en 12 conejos, se trató con oligonucleótidos anti-CTGF u oligonucleótidos inespecífico en los días 14, 19 y 24 posteriores a la herida.

La inyección de heridas con oligonucleótidos anti-CTGF en los días 0, 5 y 10 después de la herida redujo el índice de elevación de la cicatriz (SEI) en un 29 % en comparación con el oligonucleótido inespecífico de control el día 28 ($p < 0,05$). La inyección tardía de heridas en curación, en los días 14, 19 y 24, redujo la elevación de la cicatriz en un 53 % (Figura 11) en dos cohortes separadas de conejos ($P < 0,001$). La Figura 11 muestra el efecto de estos esquemas de dosis, medido por el índice de elevación de la cicatriz, para las cohortes de administración temprana y tardía. La diferencia en la cicatrización entre las cohortes de tratamiento temprano y tardío fue estadísticamente significativa ($P = 0,05$).

En una cohorte de conejos administrados tardíamente que reciben una dosis de 100 μg o 1000 μg , la respuesta a la dosis medida por el índice de elevación de la cicatriz muestra una reducción más favorable de cicatrices hipertróficas en los conejos que reciben dosis de 1000 μg que con la dosis de 100 μg (Figura 12).

En comparación, la cohorte de conejos administrados tardíamente que reciben una combinación de OAS contra CTGF y OAS contra TGF- β 1 en el día 28 proporciona un resultado particularmente más favorable en términos de reducción de cicatrices hipertróficas que las cohortes que reciben OAS contra CTGF u OAS contra TGF- β 1 (SEQ ID NO:3) por separado (Figura 13). Esto fue inesperado dados los mecanismos de acción superpuestos de estas dos dianas, y representa un hallazgo novedoso.

Estos resultados demuestran que los oligonucleótidos antisentido modificados con 2'MOE contra CTGF reducen la cicatrización hipertrófica en un modelo animal y el bloqueo del CTGF no tiene un impacto medible en la deposición de formación de tejido de granulación o epitelización. La reducción en la cicatrización que se observó se asocia con una disminución de la presencia de miofibroblastos en las cicatrices y una reducción en los genes asociados con la producción de matriz y la prevención de la degradación de la matriz. Estos resultados apoyan la hipótesis de que el CTGF es un mediador importante de la cicatrización hipertrófica y arrojan luz sobre su papel en la patogénesis de la cicatriz.

Referencias

Abreu JG, Ketpura NI, Reversade B, De Robertis EM. Connective-tissue growth factor (CTGF) modulates cell signalling by BMP and TGF-beta. *Nat Cell Biol* 2002;4(8):599-604.

Arem AJ, Madden JW. Effects of stress on healing wounds: I. Intermittent noncyclical tension. *The Journal of surgical research* 1976;20(2):93-102.

Baur PS, Larson DL, Stacey TR. The observation of myofibroblasts in hypertrophic scars. *Surg Gynecol Obstet* 1975;141 (1) :22-6.

Blalock TD, Duncan MR, Varela JC, Goldstein MH, Tuli SS, Grotendorst GR, et al. Connective tissue growth factor expression and action in human corneal fibroblast cultures and rat corneas after photorefractive keratectomy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44(5):1879-87.

Bonnaud P, Margetts PJ, Kolb M, Haberberger T, Kelly M, Robertson J, et al. Adenoviral gene transfer of connective tissue growth factor in the lung induces transient fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168(7):770-8.

Butler M, Stecker K, Bennett CF. Cellular distribution of phosphorothioate oligodeoxynucleotides in normal rodent tissues. *Lab Invest* 1997;77(4):379-88.

Chaquour B, Yang R, Sha Q. Mechanical stretch modulates the promoter activity of the profibrotic factor CCN2 through increased actin polymerization and NF-kappaB activation. *The Journal of biological chemistry* 2006;281(29):20608-22.

- Colwell AS, Krummel TM, Longaker MT, Lorenz HP. Fetal and adult fibroblasts have similar TGF-beta-mediated, Smad-dependent signaling pathways. *Plast Reconstr Surg* 2006; 117 (7): 2277-83.
- 5 Colwell AS, Phan TT, Kong W, Longaker MT, Lorenz PH. Hypertrophic scar fibroblasts have increased connective tissue growth factor expression after transforming growth factor-beta stimulation. *Plast Reconstr Surg* 2005;116(5):1387-90; discussion 91-2.
- 10 Dammeier J, Beer HD, Brauchle M, Werner S. Dexamethasone is a novel potent inducer of connective tissue growth factor expression. Implications for glucocorticoid therapy. *J Biol Chem* 1998;273(29):18185-90.
- Ehrlich HP, Desmouliere A, Diegelmann RF, Cohen IK, Compton CC, Garner WL, et al. Morphological and immunochemical differences between keloid and hypertrophic scar. *The American journal of pathology* 1994;145(1):105-13.
- 15 Folger PA, Zekaria D, Grotendorst G, Masur SK. Transforming growth factor-beta-stimulated connective tissue growth factor expression during corneal myofibroblast differentiation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42(11):2534-41.
- 20 Frazier K, Williams S, Kothapalli D, Klapper H, Grotendorst GR. Stimulation of fibroblast cell growth, matrix production, and granulation tissue formation by connective tissue growth factor. *J Invest Dermatol* 1996;107(3):404-11.
- Garrett Q, Khaw PT, Blalock TD, Schultz GS, Grotendorst GR, Daniels JT. Involvement of CTGF in TGF-beta1-stimulation of myofibroblast differentiation and collagen matrix contraction in the presence of mechanical stress. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45(4) :1109-16.
- 25 Ghahary A, Shen YJ, Scott PG, Gong Y, Tredget EE. Enhanced expression of mRNA for transforming growth factor-beta, type I and type III procollagen in human post-burn hypertrophic scar tissues. *J Lab Clin Med* 1993;122(4):465-73.
- 30 Grotendorst GR, Rahmanie H, Duncan MR. Combinatorial signaling pathways determine fibroblast proliferation and myofibroblast differentiation. *Faseb J* 2004;18(3):469-79.
- 35 Grotendorst GR. Connective tissue growth factor: a mediator of TGF-beta action on fibroblasts. *Cytokine Growth Factor Rev* 1997;8(3):171-9.
- Harrop AR, Ghahary A, Scott PG, Forsyth N, Uji-Friedland A, Tredget EE. Regulation of collagen synthesis and mRNA expression in normal and hypertrophic scar fibroblasts in vitro by interferon-gamma. *J Surg Res* 1995;58(5):471-7.
- 40 Hinz B, Mastrangelo D, Iselin CE, Chaponnier C, Gabbiani G. Mechanical tension controls granulation tissue contractile activity and myofibroblast differentiation. *The American journal of pathology* 2001;159(3):1009-20.
- 45 Igarashi A, Nashiro K, Kikuchi K, Sato S, Ihn H, Fujimoto M, et al. Connective tissue growth factor gene expression in tissue sections from localized scleroderma, keloid, and other fibrotic skin disorders. *The Journal of investigative dermatology* 1996;106(4):729-33.
- Igarashi A, Okochi H, Bradham DM, Grotendorst GR. Regulation of connective tissue growth factor gene expression in human skin fibroblasts and during wound repair. *Mol Biol Cell* 1993;4 (6) :637-45.
- 50 Ivkovic S, Yoon BS, Popoff SN, Safadi FF, Libuda DE, Stephenson RC, et al. Connective tissue growth factor coordinates chondrogenesis and angiogenesis during skeletal development. *Development (Cambridge, England)* 2003;130(12):2779-91.
- 55 Kessler D, Dethlefsen S, Haase I, Plomann M, Hirche F, Krieg T, et al. Fibroblasts in mechanically stressed collagen lattices assume a "synthetic" phenotype. *J Biol Chem* 2001;276(39):36575-85.
- Kryger ZB, Sisco M, Roy NK, Lu L, Rosenberg D, Mustoe TA. Temporal expression of the transforming growth factor-Beta pathway in the rabbit ear model of wound healing and scarring. *J Am Coll Surg* 2007;205(1):78-88.
- 60 Leask A, and Abraham DJ. TGF-beta signaling and the fibrotic response. *Faseb J* 2004;18(7) :816-27.
- Li G, Xie Q, Shi Y, Li D, Zhang M, Jiang S, et al. Inhibition of connective tissue growth factor by siRNA prevents liver fibrosis in rats. *The journal of gene medicine* 2006; 8(7):889-900.
- 65

- Lin CG, Chen CC, Leu SJ, Grzeszkiewicz TM, Lau LF. Integrin-dependent functions of the angiogenic inducer NOV (CCN3): implication in wound healing. *J Biol Chem* 2005;280(9):8229-37.
- 5 Lu L, Saulis AS, Liu WR, Roy NK, Chao JD, Ledbetter S, et al. The temporal effects of anti-TGF-beta1, 2, and 3 monoclonal antibody on wound healing and hypertrophic scar formation. *J Am Coll Surg* 2005;201(3):391-7.
- Marcus JR, Tyrone JW, Bonomo S, Xia Y, Mustoe TA. Cellular mechanisms for diminished scarring with aging. *Plast Reconstr Surg* 2000;105(5):1591-9.
- 10 McKay RA, Miraglia LJ, Cummins LL, Owens SR, Sasmor H, Dean NM. Characterization of a potent and specific class of antisense oligonucleotide inhibitor of human protein kinase C-alpha expression. *J Biol Chem* 1999;274(3):1715-22.
- 15 Mori T, Kawara S, Shinozaki M, Hayashi N, Kakinuma T, Igarashi A, et al. Role and interaction of connective tissue growth factor with transforming growth factor-beta in persistent fibrosis: A mouse fibrosis model. *J Cell Physiol* 1999;181(1):153-9.
- Morris DE, Wu L, Zhao LL, Bolton L, Roth SI, Ladin DA, et al. Acute and chronic animal models for excessive dermal scarring: quantitative studies. *Plast Reconstr Surg* 1997;100(3):674-81.
- 20 Mustoe TA, Pierce GF, Morishima C, Deuel TF. Growth factor-induced acceleration of tissue repair through direct and inductive activities in a rabbit dermal ulcer model. *J Clin Invest* 1991;87(2):694-703.
- Mustoe TA. Scars and keloids. *BMJ Clinical research ed* 2004;328 (7452) :1329-30.
- 25 Reid RR, Mogford JE, Butt R, deGiorgio-Miller A, Mustoe TA. Inhibition of procollagen C-proteinase reduces scar hypertrophy in a rabbit model of cutaneous scarring. *Wound Repair Regen* 2006;14(2):138-41.
- Riser BL, Denichilo M, Cortes P, Baker C, Grondin JM, Yee J, et al. Regulation of connective tissue growth factor activity in cultured rat mesangial cells and its expression in experimental diabetic glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol* 2000;11(1) :25-38.
- 30 Saulis AS, Mogford JH, Mustoe TA. Effect of Mederma on hypertrophic scarring in the rabbit ear model. *Plast Reconstr Surg* 2002;110(1):177-83; discussion 84-6.
- 35 Schild C, Trueb B. Mechanical stress is required for high-level expression of connective tissue growth factor. *Exp Cell Res* 2002;274(1):83-91.
- Shah M, Foreman DM, Ferguson MW. Control of scarring in adult wounds by neutralising antibody to transforming growth factor beta. *Lancet* 1992;339(8787):213-4.
- 40 Shah M, Foreman DM, Ferguson MW. Neutralisation of TGF-beta 1 and TGF-beta 2 or exogenous addition of TGF-beta 3 to cutaneous rat wounds reduces scarring. *Journal of cell science* 1995;108 (Pt 3):985-1002.
- 45 Shah M, Foreman DM, Ferguson MW. Neutralising antibody to TGF-beta 1, 2 reduces cutaneous scarring in adult rodents. *J Cell Sci* 1994;107 (Pt 5):1137-57.
- Shi-wen X, Pennington D, Holmes A, Leask A, Bradham D, Beauchamp JR, et al. Autocrine overexpression of CTGF maintains fibrosis: RDA analysis of fibrosis genes in systemic sclerosis. *Exp Cell Res* 2000;259(1):213-24.
- 50 Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M, et al. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 1992;359(6397):693-9.
- Sisco M, Kryger ZB, Jia SC, Schultz GS, Dean NM, Mustoe TA. Antisense oligonucleotides against transforming growth factor-beta delay wound healing in a rabbit ear model. *J Am Coll Surg* 2005;201:S60.
- 55 Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3(5):349-63.
- 60 Wang JF, Olson ME, Ma L, Brigstock DR, Hart DA. Connective tissue growth factor siRNA modulates mRNA levels for a subset of molecules in normal and TGF-beta 1-stimulated porcine skin fibroblasts. *Wound Repair Regen* 2004;12(2):205-16.
- Zhang H, Cook J, Nickel J, Yu R, Stecker K, Myers K, et al. Reduction of liver Fas expression by an antisense oligonucleotide protects mice from fulminant hepatitis. *Nat Biotechnol* 2000;18(8):862-7. Reid RR, Mogford JE,
- 65

Butt R, deGiorgio-Miller A, Mustoe TA. Inhibition of procollagen C-proteinase reduces scar hypertrophy in a rabbit model of cutaneous scarring. *Wound Repair Regen* 2006; 14 (2):138-41.

5 Daniels, J.T., Schultz, G.S., Blalock, T.D., Garrett, Q., Grotendorst, G.R., Dean, N.M., Khaw, P.T., 2003. Mediation of transforming growth factor-beta(1)-stimulated matrix contraction by fibroblasts: a role for connective tissue growth factor in contractile scarring. *Am. J. Pathol.* 163, 2043-2052.

10 Flanders, K.C., Major, C.D., Arabshahi, A., Aburime, E.E., Okada, M.H., Fujii, M., Blalock, T.D., Schultz, G.S., Sowers, A., Anzano, M.A., Mitchell, J.B., Russo, A., Roberts, A.B., 2003. Interference with transforming growth factor-beta/ Smad3 signaling results in accelerated healing of wounds in previously irradiated skin. *Am. J. Pathol.* 163, 2247-2257.

15 Gao, Y et al, 2007, Connective tissue Growth and Scar, *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research*, 11(23), 4606-4609

Leask, A., 2008. Targeting the TGFbeta, endothelin-1 and CCN2 axis to combat fibrosis in scleroderma. *Cell. Signal.* 20, 1409-1414

20 Leask, A., Denton, C.P., Abraham, D.J., 2004a. Insights into the molecular mechanism of chronic fibrosis: the role of connective tissue growth factor in scleroderma. *J. Invest. Dermatol.* 122, 1-6

Leask, A., 2004b. Transcriptional profiling of the scleroderma fibroblast reveals a potential role for connective tissue growth factor (CTGF) in pathological fibrosis. *Keio J Med* 53, 74-77.

25 Ren, L-H, Hao, L-J, Xia, Z-B, Pang, J-H, Teng, W, 2006, Effects of antisense oligonucleotides on expression of connective tissue growth factor and collagen synthesis in human hyperplastic scar fibroblast, *Chinese Journal of Clinical Rehabilitation*, 10(16), 92-94

30 Shi-Wen, X., Leask, A., Abraham, D., 2008. Regulation and function of connective tissue growth factor/CCN2 in tissue repair, scarring and fibrosis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 19, 133-144

35 Xu, M., Xing, X., 2007. Effects of antisense oligonucleotide of connective tissue growth factor on apoptosis of hypertrophic scar fibroblasts and the related mechanism. *Di-Er Jun-Yi Daxue Xuebao - Academic Journal of Second Military Medical University*, 28(8), 822-826

Yamanaka, O., Saika, S., Ikeda, K., Miyazaki, K.-I., Kitano, A., Ohnishi, Y., 2008. Connective tissue growth factor modulates extracellular matrix production in human subconjunctival fibroblasts and their proliferation and migration in vitro. *Jpn. J. Ophthalmol.* 52, 8-15. doi:10.1007/s10384-007-0497-3

40 LISTADO DE SECUENCIAS

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

45 <120> Método para reducir la cicatrización durante la curación de una herida utilizando compuestos antisentido dirigidos al CTGF

<130> 79242-A-PCT

50 <160> 3

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

55 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

60 <223> Oligonucleótido antisentido dirigido al CTGF humano

<400> 1

ccacaagctg tccagtctaa

20

ES 2 657 696 T3

5 <210> 2
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al CTGF humano

10 <400> 2
aaacatgtaa ctttggca 20

15 <210> 3
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido dirigido al TGF-Beta 1

20 <400> 3
gtccaccatt agcacgcggg 20

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un compuesto antisentido que se dirige a un ácido nucleico que codifica e inhibe la expresión del factor de crecimiento del tejido conjuntivo (CTGF) para su uso en la reducción de la cicatrización hipertrófica resultante de la curación de heridas dérmicas en un sujeto que lo necesita, en el que el compuesto antisentido comprende un oligonucleótido antisentido que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2, en el que el compuesto antisentido debe administrarse comenzando aproximadamente 14 días después de que el sujeto ha resultado herido.
- 10 2. El compuesto antisentido para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el compuesto antisentido debe administrarse en una cantidad que está entre 100 µg/cm y 10 mg/cm de la herida.
- 15 3. El compuesto antisentido para el uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicho oligonucleótido antisentido comprende al menos una modificación seleccionada del grupo que consiste en un enlace internucleosídico modificado, un azúcar modificado y una nucleobase modificada.
- 20 4. El compuesto antisentido para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el oligonucleótido antisentido comprende al menos un enlace internucleosídico modificado.
- 25 5. El compuesto antisentido para el uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el enlace internucleosídico modificado es un enlace fosforotioato.
6. El compuesto antisentido para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el oligonucleótido antisentido comprende al menos un azúcar modificado.
- 30 7. El compuesto antisentido para el uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el azúcar modificado es un azúcar 2'-O-metoxietilo o un azúcar modificado 2'-F.
8. El compuesto antisentido para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el oligonucleótido antisentido comprende al menos una nucleobase modificada.
- 35 9. El compuesto antisentido para el uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la nucleobase modificada es una 5-metilcitosina.
- 40 10. El compuesto antisentido para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el compuesto antisentido debe administrarse comenzando aproximadamente 14 días después de que el sujeto ha resultado herido y continuar después durante el período de curación y cicatrización de la herida.
- 45 11. El compuesto antisentido para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el compuesto antisentido debe administrarse al sujeto además de un oligonucleótido antisentido que se dirige a un ácido nucleico que codifica e inhibe la expresión del factor de crecimiento transformante β1 (TGF β1).
- 50 12. El compuesto antisentido para el uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el oligonucleótido antisentido contra TGF β1 comprende un nucleótido de la SEQ ID NO:3.
- 55 13. El compuesto antisentido para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el oligonucleótido del compuesto antisentido debe administrarse al sujeto además de un segundo oligonucleótido antisentido que inhibe la expresión del factor de crecimiento del tejido conjuntivo.
14. El compuesto antisentido para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que el compuesto antisentido que inhibe la expresión del factor de crecimiento del tejido conjuntivo debe administrarse intermitentemente con cada administración posterior efectuada al menos 4 días después de la administración anterior.
15. El compuesto antisentido para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que dicho sujeto es un ser humano.

FIGURA 1

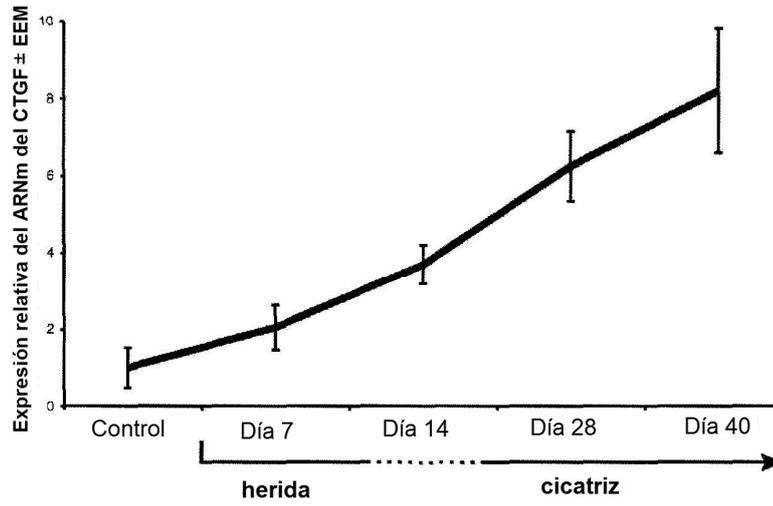


FIGURA 2

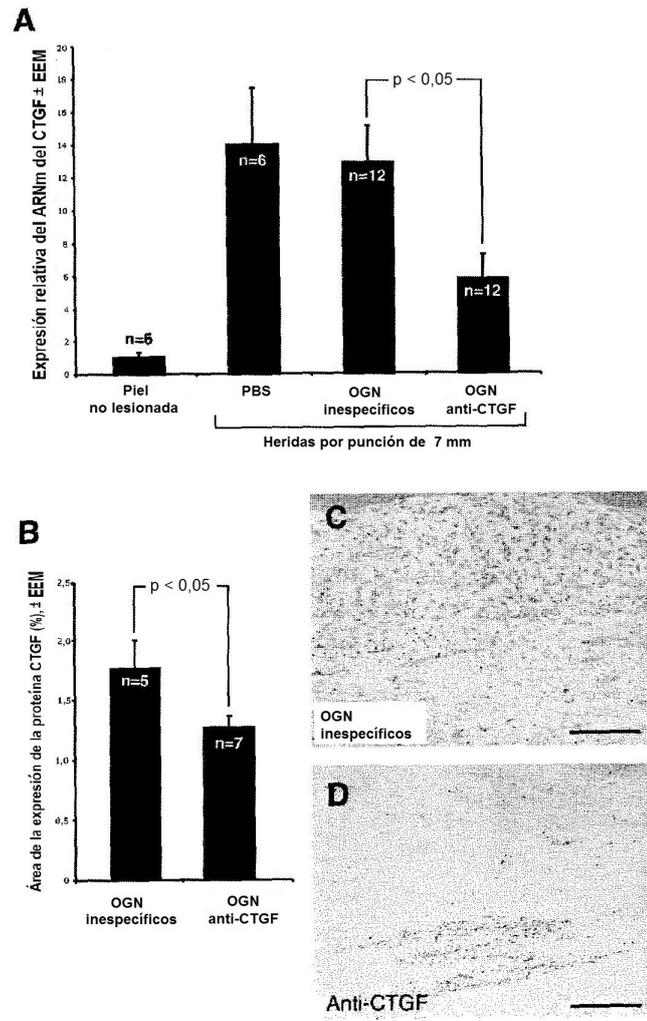
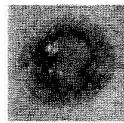
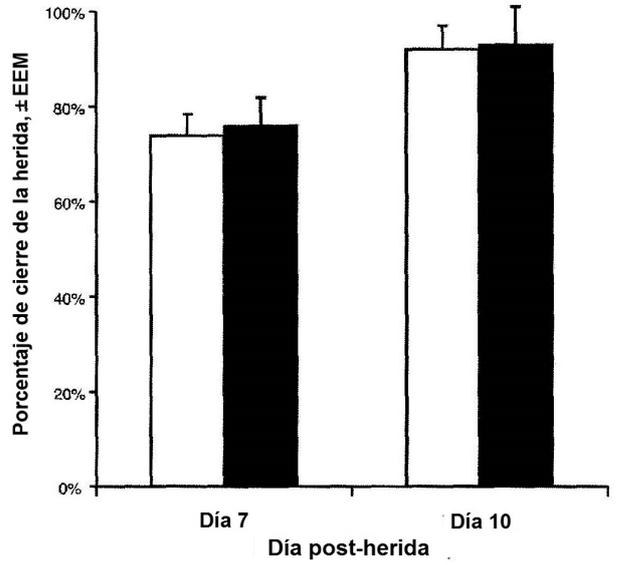
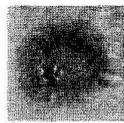


FIGURA 3



□ OGN inespecificos
(n=18)



■ OGN anti-CTGF
(n=18)

FIGURA 4

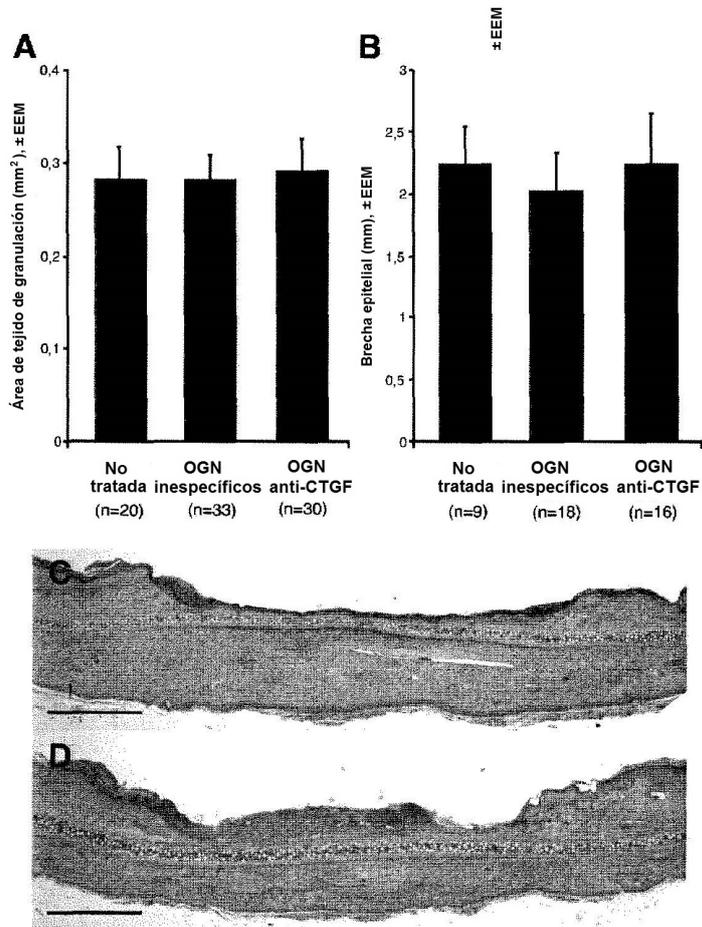


FIGURA 5

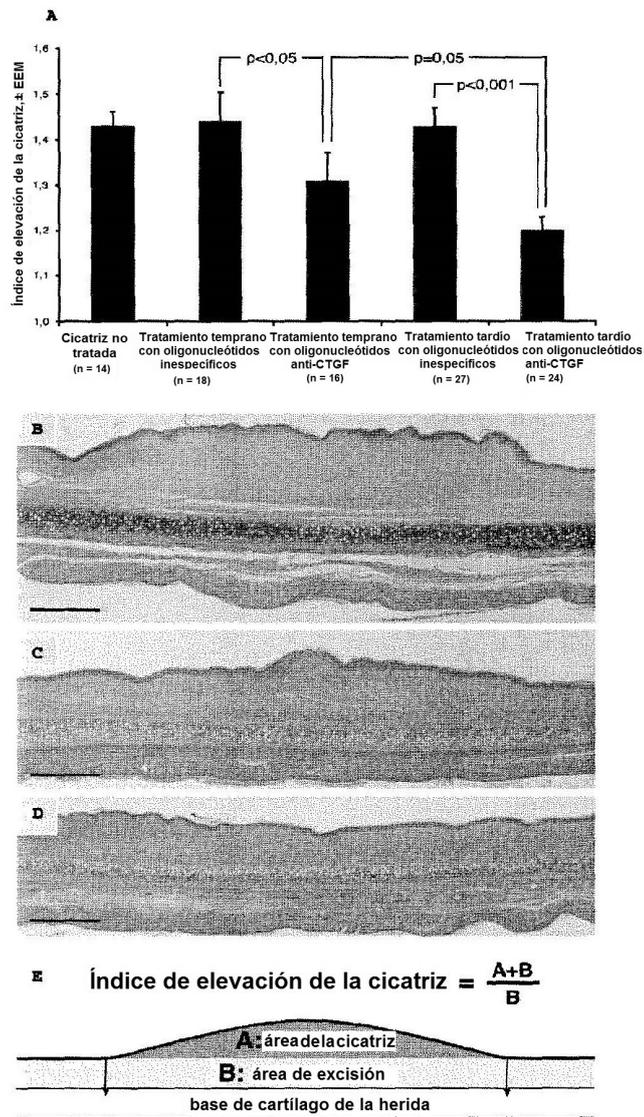


FIGURA 6

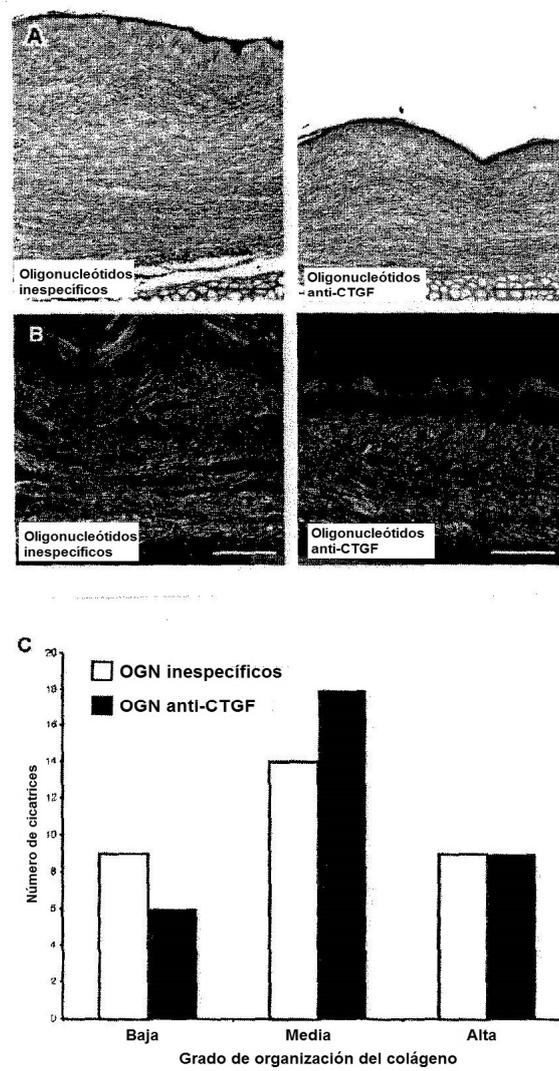


FIGURA 7

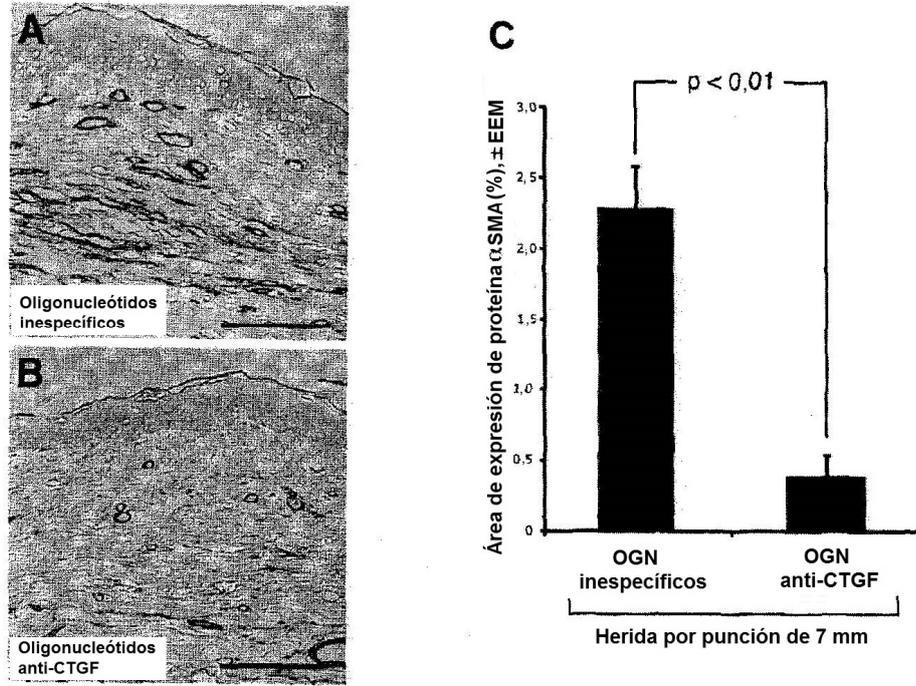


FIGURA 8

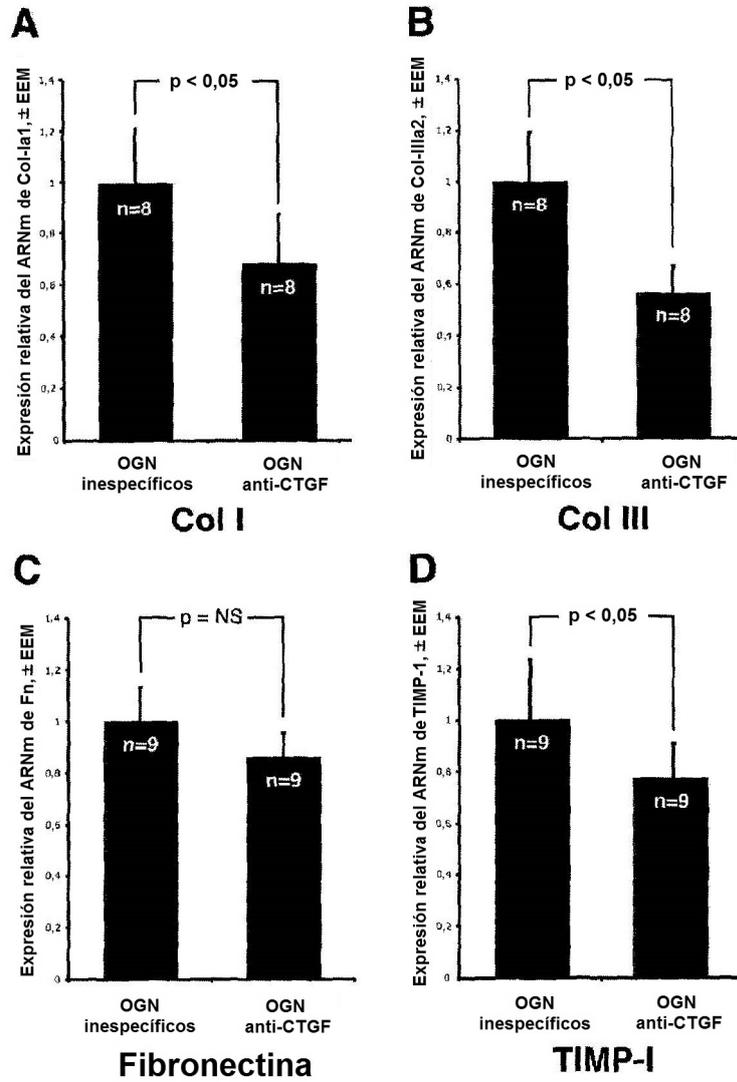


FIGURA 9

Volumen total por
herida: 100 μ l

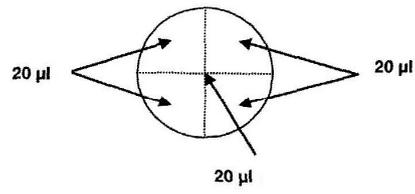


FIGURA 10

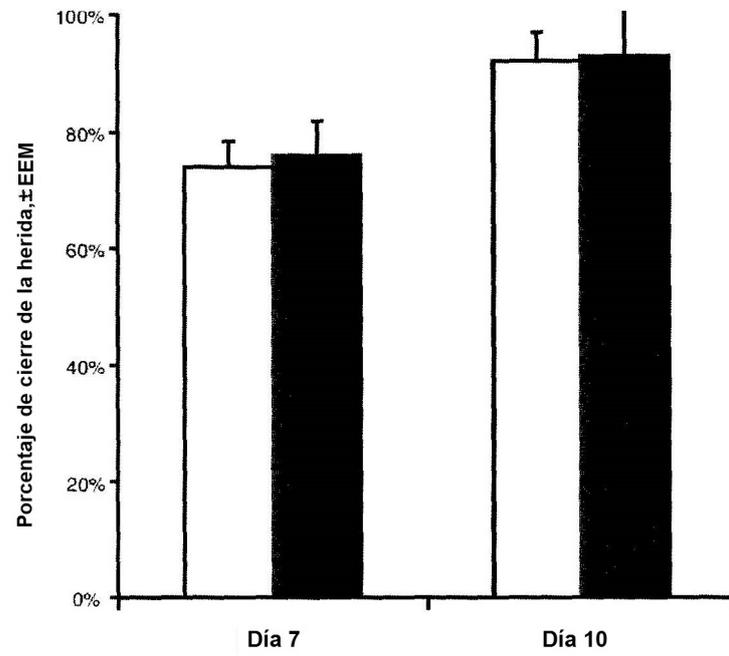


FIGURA 11

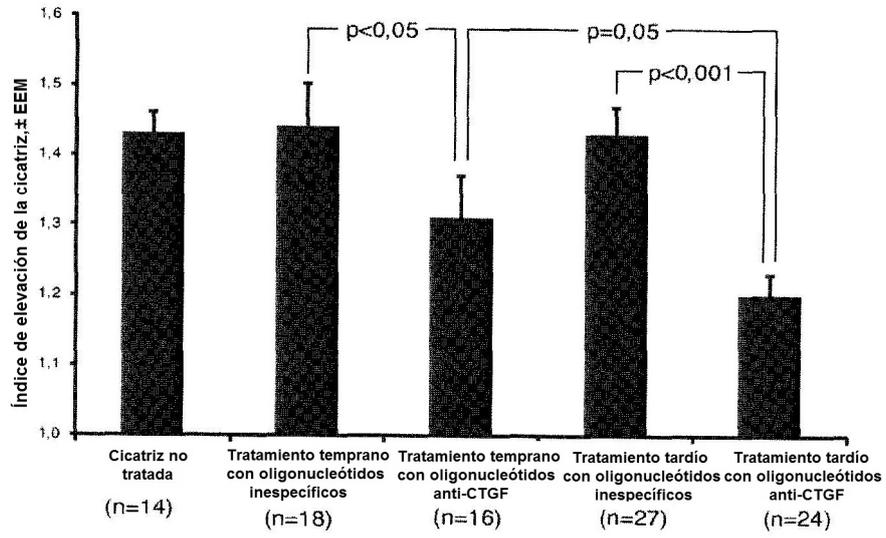


FIGURA 12

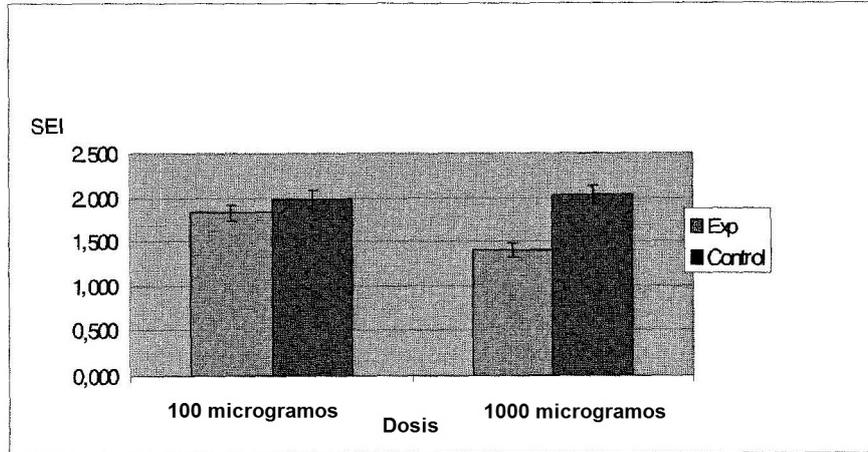


FIGURA 13

