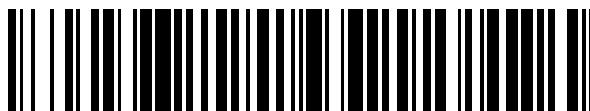


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 729 956**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7088 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61K 31/712 (2006.01)

A61P 17/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.02.2012 PCT/US2012/023620**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.08.2012 WO12106508**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.02.2012 E 12742348 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2019 EP 2670411**

54 Título: **Compuestos antisentido dirigidos al factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) para su uso en un procedimiento de tratamiento de queloides o cicatrices hipertróficas**

30 Prioridad:

26.08.2011 US 201161527821 P

20.05.2011 US 201161488666 P

02.02.2011 US 201161438879 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.11.2019

73 Titular/es:

**EXCALIARD PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
235 East 42nd Street
New York, NY 10017, US**

72 Inventor/es:

**DEAN, NICHOLAS, M.;
KROCHMAL, LINCOLN;
HARDEE, GREGORY;
FOULKES, J., GORDON;
O'DONNELL, NIALL;
YOUNG, LEROY y
JEWELL, MARK**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 729 956 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

Compuestos antisentido dirigidos al factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) para su uso en un procedimiento de tratamiento de queloides o cicatrices hipertróficas

5 La presente solicitud reivindica la prioridad de las Solicitudes Provisionales de los Estados Unidos números 61/527.821, presentada el 26 de agosto de 2011, 61/488.666, presentada el 20 de mayo de 2011 y 61/438.879, presentada el 2 de febrero de 2011.

10 Esta solicitud incorpora, por referencia, secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos que están presentes en el archivo denominado "120202_5056_81583_A_PCT_Sequence_Listing_Bl.txt" que tiene un tamaño de 62 kilobytes, y que se creó el 1 de febrero de 2012 en el formato de máquina IBM-PC, teniendo una compatibilidad de sistema operativo con MS-Windows, que se encuentra en el archivo de texto presentado el 2 de febrero de 2012 como parte de esta solicitud.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a composiciones para prevenir la formación de, o tratar, lesiones fibróticas, que incluyen cicatrices de la piel tales como queloides y cicatrices hipertróficas.

15 Antecedentes de la invención

Los compuestos antisentido son un medio eficaz para reducir la expresión de productos génicos específicos y pueden ser únicamente útiles en varias aplicaciones terapéuticas, por ejemplo, para la modulación de la expresión de proteínas involucradas en la fibrosis, tal como el factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF). (Véase la Patente de los EE.UU. N.º 6.965.025B2 de Gaarde y col.)

20 Los compuestos antisentido son compuestos oligoméricos que son capaces de hibridar con un ácido nucleico diana (por ejemplo, una molécula de ARNm diana) e inhibir la expresión del ácido nucleico diana.

25 En la Patente de EE.UU. N.º 6.965.025B2 se desvelan compuestos antisentido, composiciones y procedimientos para modular la expresión de CTGF y para tratar enfermedades asociadas con la expresión de CTGF. Sin embargo, sigue existiendo la necesidad de compuestos de este tipo adicionales capaces de proporcionar una inhibición mejorada de la expresión de CTGF así como otras propiedades ventajosas.

30 El factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF; también conocido como ctgrofact, proteína secretada inducible por fibroblastos, fisp-12, NOV2, proteína 2 relacionada con la proteína de unión al factor de crecimiento similar a insulina, IGFBP-rP2, IGFBP-8, HBGF-0.8, Hcs24, y ecogenina) es un miembro de la familia de proteínas modulares CCN (CTGF/CYR61/NOV), denominado así por los primeros miembros de la familia identificados, factor de crecimiento de tejido conectivo, rico en cisteína (CYR61), y sobreexpresado en nefroblastoma (NOV), pero la familia también incluye las proteínas ELM-1 (expresadas en células de metástasis baja), WISP-3 (proteína secretada inducida por Wnt-1) y COP-1 (WISP-2). Se ha encontrado que las proteínas CCN son proteínas secretadas, asociadas a la matriz extracelular que regulan procesos celulares tales como adhesión, migración, mitogénesis, diferenciación, supervivencia, angiogénesis, aterosclerosis, condrogénesis, curación de heridas, tumorigénesis y enfermedades vasculares y fibróticas como la esclerodermia (Lau y Lam, Exp. Cell Res., 1999, 248, 44-57). Se demostró que la proteína del factor de crecimiento de tejido conectivo estimula la síntesis de ADN y promueve la quimiotaxis de los fibroblastos (Bradham y col., J. Cell Biol., 1991, 114, 1285-1294).

35 El factor de crecimiento de tejido conectivo se expresa en los fibroblastos durante los procesos de diferenciación normales que involucran la producción y remodelación de la matriz extracelular (MEC). El factor de crecimiento de tejido conectivo también se suele sobreexpresar en trastornos fibróticos de la piel, tales como esclerosis sistémica, esclerosis cutánea localizada, queloides, tejido cicatricial, fascitis eosinofílica, fascitis nodular y contractura de Dupuytren. Los niveles de ARNm o proteína del factor de crecimiento de tejido conectivo son elevados en lesiones fibróticas de los órganos y tejidos principales, incluidos el hígado, riñón, pulmón, sistema cardiovascular, páncreas, intestino, ojo y encía. En los tumores mamarios, pancreáticos y fibrohistiocíticos caracterizados por una participación significativa del tejido conectivo, el factor de crecimiento de tejido conectivo se sobreexpresa en el compartimento del estroma.

El Papel de CTGF en las Enfermedades Queloides

40 La enfermedad queloide (KD) es un tumor fibroproliferativo dérmico benigno caracterizado por una acumulación excesiva de proteínas de la matriz extracelular, provocando un exceso de formación de colágeno. Puede producirse cicatrización anormal en la piel, después de una lesión en individuos genéticamente susceptibles. La KD también puede ser una afección familiar, que se produce con mayor frecuencia en grupos étnicos con piel más oscura. La mayor incidencia de queloides se encuentra en la población negra, en la que se estima que está alrededor del 4-6% y hasta el 16% en muestras aleatorias de negros Africanos. Se han propuesto varios modos de herencia para la KD que van desde autosómica recesiva a autosómica dominante con penetrancia clínica incompleta y expresión variable. La mayoría de los queloides pueden provocar defectos cosméticos considerables, pero también pueden

crecer lo suficiente para convertirse en sintomáticos, causando deformidad o limitando la movilidad articular.

Aunque en la piel normal se expresan niveles bajos de CTGF, CTGF se regula positivamente después de la lesión dérmica y se sobreexpresa de forma persistente cuando la cicatrización es grave, como en los queloides o en la esclerodermia sistémica. Los fibroblastos cultivados tanto de cicatrices hipertróficas, queloides, como de lesiones de esclerodermia expresan CTGF basal aumentado (Exp. Cell Res. 2000, 259: 213-224), y se demostró que las células cultivadas de cicatrices hipertróficas y queloides expresan más CTGF basalmente y también elaboran más CTGF en respuesta a la estimulación con TGF- β (Plast. Reconstr. Surg. 2005, 116: 1387-90). De forma similar, la transcripción de CTGF después de la estimulación sérica fue significativamente mayor en los fibroblastos de queloides en comparación con los normales en cultivos celulares (Ann. Surg. 2007, 246 (5): 886-95).

- 5
- 10 En el tejido que loide, se encontraron fibroblastos que expresaban ARNm de CTGF distribuidos a lo largo de las lesiones, especialmente en las áreas periféricas (J. Invest. Derm. 1996, 106:729-733). Los niveles de expresión del ARNm de CTGF se han comparado en pieles normales, cicatrices queloides, cicatrices hipertróficas y cicatrices maduras. El ARNm de CTGF se detectó de manera fuerte en todos los casos de queloides, aunque no en cicatrices maduras. Hubo una diferencia significativa entre los niveles encontrados en los queloides y en la piel normal (J. Japan Soc. Plastic Reconstr. Surg. 2002, 22:560-565). Los datos recientes también sugieren que, en relación con los fibroblastos normales, los fibroblastos de cicatrices queloides sintetizan 100-150 veces más CTGF en respuesta a TGF- β 1 exógeno que los fibroblastos normales (Plast. Reconstr. Surg. 2005, 116:1387-1390). Cuando se comparó con la piel normal, se observó una localización aumentada de CTGF en la capa basal de la epidermis que loide y se observó una mayor expresión de CTGF en el extracto de tejido que loide (J. Cell Physiol. 2006, 208 (2):336-43).
- 15
- 20 Anteriormente, no se han generado datos para validar el papel de CTGF en la enfermedad que loide demostrando que la inhibición de la expresión de CTGF inhibe el crecimiento de los queloides.

En la actualidad, no se ha establecido un régimen terapéutico único eficaz para el tratamiento de los queloides o la prevención del crecimiento de los queloides después de cirugía. Los enfoques terapéuticos existentes incluyen vendajes oclusivos, terapia de compresión, inyecciones de esteroides intralesionales, criocirugía, escisión quirúrgica, tratamiento con láser, radioterapia, Kenalog (triamcinolona), terapia con interferón, bleomicina, 5-fluoracilo, verapamilo, crema de imiquimod y combinaciones de los mismos. Tanto los apósitos oclusivos basados en silicona como los no basados en silicona han sido una opción clínica ampliamente utilizada para los queloides durante los últimos 30 años, pero todos estos procedimientos tienen una eficacia muy limitada y se entiende ampliamente que se necesita urgentemente una nueva terapia para los queloides.

- 25
- 30 Se han intentado diversas formas de radioterapia como una monoterapia para los queloides, pero siguen siendo bastante controvertidas debido a informes anecdóticos de carcinogénesis después del tratamiento. Se ha intentado de forma repetida, durante los últimos 40 años, la terapia con láser que utiliza argón, CO₂ y colorante pulsado, pero ninguno de ellos ha demostrado ser eficaz. Las tres formas de terapia con láser, de acuerdo con varios estudios, tienen tasas de recurrencia de más del 90%, mostrando poco o ningún beneficio. La crioterapia se ha utilizado como una monoterapia. Sin embargo, los efectos secundarios asociados con este enfoque incluyen dolor en el sitio terapéutico e hipo o hiperpigmentación. Las inyecciones de acetona con triamcinolona intralesionales, un tipo de corticosteroide, se usan frecuentemente como terapia de primera línea para el tratamiento de los queloides, pero nuevamente, la eficacia clínica real informada varía ampliamente. Además, la necesidad de inyecciones múltiples, junto con los efectos secundarios del dolor por inyección, la atrofia de la piel, las telangiectasias y la pigmentación alterada han provocado que los clínicos e investigadores continúen buscando otros medios de tratamiento.
- 35
- 40

Por consiguiente, sigue habiendo una necesidad sentida desde hace tiempo de procedimientos y agentes adicionales para prevenir eficazmente la formación de queloides, cicatrices hipertróficas y otros tipos de lesiones fibróticas, así como para tratar queloides, cicatrices hipertróficas y lesiones fibróticas para eliminarlas o reducirlas y/o para evitar su reaparición. Los resultados clínicos descritos en el presente documento demuestran claramente por primera vez la capacidad de un oligonucleótido antisentido dirigido a CTGF para reducir el crecimiento y la gravedad de los queloides postoperatorios.

- 45

Dosificación de compuestos antisentido en la piel

También se ha demostrado por primera vez que los oligonucleótidos antisentido no se difunden lateralmente mucho después de la dosificación en la piel (véase Ejemplo 2), lo que podría provocar efectos irregulares de esta clase de fármaco en una cicatriz de incisión lineal/cicatrizante o que loide si la dosificación se realizara como un solo tipo de administración en bolo, dando como resultado concentraciones variables de compuestos antisentido a lo largo de la cicatriz en desarrollo. Para superar este inconveniente, se ha desarrollado un procedimiento para suministrar oligonucleótidos antisentido mediante una técnica de enhebrado intradérmico. Esta técnica suministra eficazmente una cantidad constante de fármaco antisentido a lo largo de toda la cicatriz, y da como resultado una reducción eficaz y consistente de la cicatriz a lo largo de toda la cicatriz o que loide.

- 50
- 55

El enhebrado intradérmico consiste en introducir una aguja en la dermis en un ángulo tan paralelo a la piel como sea posible, y enhebrar la aguja en y a lo largo de la dermis durante una distancia generalmente de entre 1 y 5 cm. En este punto, la aguja se retira y el fármaco se inyecta en la dermis a lo largo de toda la extensión de la aguja a medida que se retira la aguja, dando como resultado que se deposite una cantidad y un volumen iguales de fármaco

a lo largo de toda la extensión de la aguja.

Los documentos WO2010042281 y WO2010027830 desvelan procedimientos para tratar cicatrices hipertróficas y queloides que comprenden un oligonucleótido antisentido que comprende de 12 a 30 nucleósidos unidos dirigidos a un ácido nucleico que codifica CTGF. El oligonucleótido antisentido se administró en alícuotas inyectadas alrededor de la periferia de la herida.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona una composición que comprende un oligonucleótido antisentido modificado que consiste en 12-30 nucleósidos unidos, cuya al menos una porción de secuencia de 12 nucleobases es complementaria a los nucleótidos presentes dentro de una región seleccionada de los nucleótidos 1388-1423, 1394-1423 y 1399-1423 de la SEQ ID NO: 9, o una sal o un éster del mismo, para su uso en el tratamiento de un queloide, o para prevenir la formación, reformación o crecimiento de un queloide después de una lesión en la piel, en un sujeto que lo necesite, en la que la composición se administra al sujeto mediante una o más inyecciones de enhebrado en el sitio del queloide o de la lesión en la piel, en una cantidad eficaz para tratar, o para prevenir la formación, reformación o crecimiento del queloide, en la que la cantidad eficaz es de 0,1 a 50 mg del oligonucleótido modificado por inyección por centímetro lineal del queloide o de la lesión en la piel.

La presente invención también proporciona una composición que comprende un oligonucleótido antisentido modificado que consiste en 12-30 nucleósidos unidos, cuya al menos una porción de secuencia de 12 nucleobases es complementaria a los nucleótidos presentes dentro de una región seleccionada de los nucleótidos 1388-1423, 1394-1423 y 1399-1423 de la SEQ ID NO: 9, o una sal o un éster del mismo, para su uso en el tratamiento de una cicatriz hipertrófica, o para prevenir la formación, reformación o crecimiento de una cicatriz hipertrófica después de una lesión en la piel, en un sujeto que lo necesite, en la que la composición se administra al sujeto mediante una o más inyecciones de enhebrado en el sitio de la cicatriz hipertrófica o de la lesión en la piel, en una cantidad eficaz para tratar, o para prevenir la formación, reformación o crecimiento de, la cicatriz hipertrófica, en la que la cantidad eficaz es de 0,1 a 25 mg del oligonucleótido modificado por inyección por centímetro lineal de la cicatriz hipertrófica o de la lesión en la piel.

Breve descripción de las figuras

La **FIGURA 1** muestra que los oligonucleótidos antisentido que contienen 2'MOE se difunden en distancias relativamente cortas (~ 0,5 - 1,0 cm) en la piel de conejo cuando se administra mediante inyección intradérmica (descrita en el Ejemplo 2).

La **FIGURA 2** muestra que el tratamiento de queloides en un modelo animal, con un oligonucleótido antisentido de CTGF dio como resultado una reducción en la expresión del ARNm tanto de CTGF (**Figura 2A**) como de Col3a1 (**Figura 2B**) en tejido queloide humano intacto trasplantado en ratones (descrito en el Ejemplo 3).

La **FIGURA 3** muestra que el tratamiento con un oligonucleótido antisentido de CTGF, (EXC 001 o la SEQ ID NO: 39) inhibe el crecimiento tanto de cicatrices hipertróficas como de queloides a las 24 semanas después de la cirugía de revisión de la cicatriz en seres humanos. Las puntuaciones debajo de cada grupo de imágenes representan el grado de mejoría entre los queloides tratados con placebo y EXC 001. Una puntuación negativa representa una mejoría en la cicatrización resultante del tratamiento con EXC 001. La **FIGURA 3A** muestra cicatrices hipertróficas tratadas con placebo y EXC 001, 24 semanas después de la cirugía de revisión de la cicatriz. La **FIGURA 3B** muestra cicatrices queloides tratadas con placebo y EXC 001, 24 semanas después de la cirugía de revisión de la cicatriz (descrita en el Ejemplo 4).

La **FIGURA 4** muestra que el tratamiento con un oligonucleótido antisentido de CTGF, (EXC 001 o la SEQ ID NO: 39) inhibe la formación y el crecimiento de una cicatriz hipertrófica 12 semanas después de la cirugía de abdominoplastia. Las puntuaciones debajo de las imágenes representan el grado de mejoría entre las cicatrices tratadas con placebo y EXC 001. Una puntuación negativa representa una mejoría en la cicatrización resultante del tratamiento con EXC 001 (descrita en el Ejemplo 5).

La **FIGURA 5** muestra la difusión limitada de EXC 001 cuando se dosifica adyacente a una cicatriz (descrita en el Ejemplo 5). La sección de la cicatriz de abdominoplastia en el lado derecho de la cicatriz (a la derecha de la línea vertical) se trató con EXC 001 mientras que la cicatriz a la izquierda de la línea vertical no recibió ningún tratamiento. Claramente, la gravedad de la cicatriz a la derecha es menor que la de la izquierda. Este ejemplo demuestra que el beneficio terapéutico de EXC 001 se limita a la región de la cicatriz directamente adyacente al sitio de suministro del fármaco mediante enhebrado intradérmico. Por lo tanto, el fármaco parece tener una difusión limitada fuera del sitio de administración y requerirá una dosificación inmediatamente adyacente a y a lo largo del posible sitio de la cicatriz, por ejemplo, mediante enhebrado intradérmico.

La **FIGURA 6** muestra un ejemplo de la capacidad de EXC 001 para reducir el crecimiento y la formación de cicatrices hipertróficas (descrito en el Ejemplo 6). En este ejemplo, se muestran dos cicatrices abdominales coincidentes de 2 cm, una tratada con 5 mg/cm de EXC 001 y una con placebo. La gravedad de la cicatriz tratada con EXC 001 es menor que la de la cicatriz tratada con placebo. El análisis histológico de estas dos

cicatrices también reveló una reducción mediada por EXC 001 en la expresión de la proteína CTGF (por inmunohistoquímica) demostrando claramente que EXC 001 funciona para reducir la expresión de su diana prevista (CTGF).

La FIGURA 7 muestra los efectos de EXC 001 sobre la expresión del ARNm en cicatrices abdominales de varios genes en diversos momentos postratamiento (descritos en el Ejemplo 6). La FIGURA 7A muestra el efecto de EXC 001 en la supresión de la expresión del ARNm de CTGF. La FIGURA 7B muestra el efecto de EXC 001 en la supresión de la expresión del ARNm del Colágeno III- α 1 (Col3A1). La FIGURA 7C muestra el efecto de EXC 001 en la supresión de la expresión del ARNm de elastina (ELASF). Las Figuras 7D y E muestran que no hubo una inhibición significativa de la expresión del ARNm de SMAD3 o TGF- β 1 por EXC 001 en comparación con el placebo.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona una composición que comprende un oligonucleótido antisentido modificado que consiste en 12-30 nucleósidos unidos, cuya al menos una porción de secuencia de 12 nucleobases es complementaria a los nucleótidos presentes dentro de una región seleccionada de los nucleótidos 1388-1423, 1394-1423 y 1399-1423 de la SEQ ID NO: 9, o una sal o un éster del mismo, para su uso en el tratamiento de un queloide, o para prevenir la formación, reformación o crecimiento de un queloide después de una lesión en la piel, en un sujeto que lo necesite, en la que la composición se administra al sujeto mediante una o más inyecciones de enhebrado en el sitio del queloide o de la lesión en la piel, en una cantidad eficaz para tratar, o para prevenir la formación, reformación o crecimiento de, el queloide, en la que la cantidad eficaz es de 0,1 a 50 mg del oligonucleótido modificado por inyección por centímetro lineal del queloide o de la lesión en la piel.

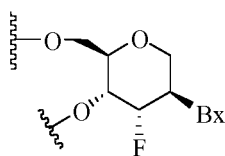
La presente invención también proporciona una composición que comprende un oligonucleótido antisentido modificado que consiste en 12-30 nucleósidos unidos, cuya al menos una porción de secuencia de 12 nucleobases es complementaria a los nucleótidos presentes dentro de una región seleccionada de los nucleótidos 1388-1423, 1394-1423 y 1399-1423 de la SEQ ID NO: 9, o una sal o un éster del mismo, para su uso en el tratamiento de una cicatriz hipertrófica, o para prevenir la formación, reformación o crecimiento de una cicatriz hipertrófica después de una lesión en la piel, en un sujeto que lo necesite, en la que la composición se administra al sujeto mediante una o más inyecciones de enhebrado en el sitio de la cicatriz hipertrófica o de la lesión en la piel, en una cantidad eficaz para tratar, o para prevenir la formación, reformación o crecimiento de, la cicatriz hipertrófica, en la que la cantidad eficaz es de 0,1 a 25 mg del oligonucleótido modificado por inyección por centímetro lineal de la cicatriz hipertrófica o de la lesión en la piel.

La divulgación proporciona un procedimiento para tratar un queloide, o prevenir la formación, reformación o crecimiento de un queloide después de una lesión en la piel, en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar al sujeto mediante una o más inyecciones en el sitio del queloide o de la lesión en la piel, una composición que comprende un oligonucleótido modificado que consiste en 12-30 nucleósidos unidos, cuya al menos una porción de secuencia de 12 nucleobases está presente dentro de una región seleccionada de los nucleótidos 553-611, 718-751, 1388-1423, 1457-1689, 2040-2069, 2120-2147, 2728-2797, 2267-2301, 1394-1423, 1469-1508, 1559-1605, 1659-1689, 2100-2129 y 1399-1423 de la SEQ ID NO: 9, o una sal o un éster del mismo, en una cantidad eficaz para tratar, o para prevenir la formación, reformación o crecimiento de, el queloide, en la que la cantidad eficaz es de 0,1 a 50 mg del oligonucleótido modificado por inyección por centímetro lineal del queloide o de la lesión en la piel.

La presente divulgación también proporciona un procedimiento para tratar una cicatriz hipertrófica, o prevenir la formación, reformación o crecimiento de una cicatriz hipertrófica después de una lesión en la piel, en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar al sujeto mediante una o más inyecciones en el sitio de la cicatriz hipertrófica o de la lesión en la piel, una composición que comprende un oligonucleótido modificado que consiste en 12-30 nucleósidos unidos, cuya al menos una porción de secuencia de 12 nucleobases está presente dentro de una región seleccionada de los nucleótidos 553-611, 718-751, 1388-1423, 1457-1689, 2040-2069, 2120-2147, 2728-2797, 2267-2301, 1394-1423, 1469-1508, 1559-1605, 1659-1689, 2100-2129 y 1399-1423 de la SEQ ID NO: 9, o una sal o un éster del mismo, en una cantidad eficaz para tratar, o para prevenir la formación, reformación o crecimiento de, la cicatriz hipertrófica, en la que la cantidad eficaz es de 0,1 a 25 mg del oligonucleótido modificado por inyección por centímetro lineal de la cicatriz hipertrófica o de la lesión en la piel.

La presente divulgación proporciona adicionalmente un procedimiento para reducir la formación, reformación o crecimiento de una cicatriz o queloide en un sitio de una lesión en la piel o para tratar una cicatriz o queloide preexistente, en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar al sujeto mediante una o más inyecciones de enhebrado en el sitio de la lesión o de la cicatriz o queloide preexistentes, una composición que comprende un oligonucleótido modificado, o una sal o éster del mismo, dirigido a un ácido nucleico que codifica una proteína involucrada en la fibrosis en una cantidad eficaz para inhibir la expresión de la proteína y reducir, de este modo, la formación, reformación o el crecimiento de la cicatriz o queloide en el sitio de la lesión o para tratar la cicatriz o queloide preexistentes. La presente invención aún proporciona adicionalmente un procedimiento para reducir la formación, reformación o crecimiento de una lesión fibrótica en un sitio de una lesión o para tratar una lesión fibrótica preexistente, en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar al sujeto mediante una o más inyecciones de

- 5 enhebrado en el sitio de la lesión o de la lesión fibrótica preexistente, una composición que comprende un oligonucleótido modificado, o una sal o éster del mismo, dirigido a un ácido nucleico que codifica una proteína involucrada en la fibrosis en una cantidad eficaz para inhibir la expresión de la proteína y reducir, de este modo, la formación, reformación o crecimiento de la lesión fibrótica en el sitio de la lesión o para tratar la lesión fibrótica preexistente.
- En una realización de la invención, la una o más inyecciones de enhebrado comprenden múltiples inyecciones de enhebrado intradérmico por cicatriz.
- 10 La proteína involucrada en la fibrosis puede ser el factor de crecimiento de tejido conectivo, factor de crecimiento transformante beta-1, homólogo-3 de las madres contra decapentapléjico, respuesta-1 de crecimiento temprano, proteína-1 quimiotáctica de monocitos, un colágeno o una elastina. Ejemplos de colágenos adecuados son Colágeno 3A1, Colágeno 1A2 y Colágeno 1A1.
- En determinadas realizaciones de la invención, la que la cantidad eficaz es desde 0,1 a 50 mg, p.ej., 0,1 a 25 mg, del oligonucleótido modificado por inyección por centímetro lineal del sitio de la lesión en la piel o de la cicatriz preexistente.
- 15 En determinadas realizaciones, el oligonucleótido modificado se administra al menos una vez cada dos semanas durante al menos cuatro semanas, es decir, por lo menos dos veces.
- En otras realizaciones, el oligonucleótido modificado se administra al menos una vez cada tres semanas durante al menos seis semanas, es decir, por lo menos dos veces.
- 20 En otras realizaciones más, el oligonucleótido modificado se administra al menos una vez cada cuatro semanas durante al menos ocho semanas. En otras realizaciones más, el oligonucleótido modificado se administra al menos una vez cada ocho semanas durante al menos dieciséis semanas.
- Actualmente se contempla que puede ser preferible que el oligonucleótido modificado se administre durante un período de al menos nueve semanas, por ejemplo, durante un período de 26 semanas.
- 25 En determinadas realizaciones, el oligonucleótido modificado consiste en 12-30 nucleósidos unidos, cuya al menos una porción de secuencia de 12 nucleobases está presente dentro de una región seleccionada del grupo que consiste en los nucleótidos 1388-1423, 1394-1423 y 1399-1423 de la SEQ ID NO: 9.
- En otras ocasiones de la divulgación, el oligonucleótido modificado consiste en 12-30 nucleósidos unidos, cuya al menos una porción de secuencia de 12 nucleobases está presente dentro de una región seleccionada del grupo que consiste en los nucleótidos 553-611, 718-751, 1457-1689, 2040-2069, 2120-2147, 2728-2797, 2267-2301, 1469-1508, 1559-1605, 1659-1689 y 2100-2129 de la SEQ ID NO: 9.
- 30 En determinadas realizaciones de la invención, al menos una porción de secuencia de 12 nucleobases del oligonucleótido modificado está presente dentro de la secuencia de nucleobases establecida en cualquiera de las secuencias establecidas en la SEQ ID NO: 39, 40, o 166.
- 35 En determinadas realizaciones, el oligonucleótido modificado consiste en al menos 14, por ejemplo, 20, nucleósidos unidos.
- En determinadas realizaciones, el oligonucleótido modificado es un oligonucleótido monocatenario. En otras, el oligonucleótido modificado es un oligonucleótido bicatenario.
- En otras realizaciones más, el oligonucleótido modificado comprende al menos un oligodesoxirribonucleótido o al menos un oligorribonucleótido.
- 40 En determinadas realizaciones, el oligonucleótido modificado tiene una secuencia que es 100% idéntica en su longitud a una porción de cualquiera de las secuencias establecidas en la SEQ ID NO: 39, 40, o 166.
- En determinadas realizaciones, el oligonucleótido modificado comprende al menos un enlace internucleosídico modificado, p. ej., un enlace internucleosídico fosfotioato, de modo que algunos o todos los enlaces internucleosídicos pueden ser enlaces internucleosídicos fosfotioato.
- 45 En determinadas realizaciones, al menos un nucleósido en el oligonucleótido modificado comprende un azúcar modificado, tal como un azúcar bicíclico. En algunas de tales realizaciones, al menos uno de los azúcares modificados comprende un 2'-O-metoxietilo.
- En otras realizaciones, el oligonucleótido modificado comprende al menos un nucleósido modificado con tetrahidropirano en el que un anillo de tetrahidropirano reemplaza al anillo de furanosa.
- 50 En algunas de tales realizaciones, cada uno de los al menos un nucleósido modificado con tetrahidropirano tiene la estructura:



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

En determinadas realizaciones, al menos un nucleósido comprende una nucleobase modificada, p. ej., un desoxinucleósido modificado, un ribonucleósido o una 5'-metilcitosina.

5 En determinadas realizaciones, el oligonucleótido modificado comprende:

- (a) un segmento hueco que consiste en desoxinucleósidos unidos;
- (b) un segmento de extremo 5' que consiste en nucleósidos modificados unidos; y
- (c) un segmento de extremo 3' que consiste en nucleósidos modificados unidos;

10 en el que el segmento hueco está situado entre el segmento de extremo 5' y el segmento de extremo 3' y en el que cada nucleósido modificado dentro de cada segmento de extremo comprende un azúcar modificado.

En determinadas realizaciones actualmente preferidas, el oligonucleótido modificado comprende:

- (a) un segmento hueco que consiste en trece desoxinucleósidos unidos;
- (b) un segmento de extremo 5' que consiste en dos nucleósidos modificados unidos; y
- (c) un segmento de extremo 3' que consiste en cinco nucleósidos modificados unidos;

15 en el que el segmento hueco está situado entre el segmento de extremo 5' y el segmento de extremo 3', en el que cada nucleósido modificado dentro de cada segmento de extremo comprende un 2'-O-metoxietil azúcar; y en el que cada enlace internucleosídico es un enlace fosfotioato.

En determinadas realizaciones, la secuencia de la nucleobase es la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 39.

En otras realizaciones, la secuencia de la nucleobase es la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 40.

20 En otras realizaciones más, la secuencia de la nucleobase es la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 166.

En determinadas realizaciones, la composición comprende el oligonucleótido modificado o una sal del mismo, y un transportador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

25 En determinadas realizaciones, el oligonucleótido modificado inhibe directa o indirectamente la expresión de colágeno o elastina o ambos, para tratar el queloide, prevenir la formación, reformación o crecimiento del queloide, tratar la cicatriz hipertrófica, prevenir la formación, reformación o crecimiento de la hipertrófica cicatriz, reducir la formación de cicatriz en el sitio de la lesión, tratar la cicatriz preexistente, reducir la formación de la lesión fibrótica en el sitio de la lesión, o tratar la lesión fibrótica preexistente.

Actualmente se contempla que las realizaciones anteriores comprenden adicionalmente administrar al sujeto un segundo compuesto.

30 En determinadas realizaciones, el segundo compuesto puede ser un compuesto antisentido dirigido a la misma secuencia o a una diferente, y el oligonucleótido modificado y el segundo compuesto pueden administrarse simultánea o secuencialmente.

35 En determinadas realizaciones, el oligonucleótido modificado está presente en un conjugado con un resto que potencia la captación del compuesto en, y/o aumenta el tiempo de residencia del compuesto en, el sujeto, en el que el tiempo de residencia es preferentemente de 7 a 60 días. El resto conjugado es polietilenglicol, ácido hialurónico, colesterol, ácido acético adamantino, ácido 1-pirenobutírico, dihidrotestosterona, 1,3-Bis-O-(hexadecil)glicerol, hexadecilglicerol, hexadecilamina, geraniloxihexilo, ácido palmítico, ácido mirístico, espermina, espermidina, ácido fólico, vitamina E, un grupo de carbohidratos, un péptido (que incluye hélice de antenapedia, fragmentos Tat del VIH, péptido de unión a integrina), transportina o porfirina.

40 En determinadas realizaciones, el oligonucleótido modificado se administra en un sistema de suministro que potencia la captación del compuesto en, y/o aumenta el tiempo de residencia del compuesto en, el sujeto, en el que el tiempo de residencia es preferentemente de 7 a 60 días. El sistema de suministro comprende un lípido catiónico, un liposoma, una micropartícula, una nanopartícula, una formulación líquida con partículas suspendidas con o sin fármaco en la solución para liberación inmediata o con depósito de fármaco en partículas (particularmente partículas de PLGA y poli-Arg), una formulación líquida que gelifica después de las inyecciones, tal como líquidos termoestables/sensibles (por ejemplo, geles plurónicos), líquidos que contienen un polímero y un fármaco en un disolvente biocompatible que precipita cuando el disolvente se diluye con fluidos corporales (por ejemplo, atrigel), un

gel, una formulación semisólida tal como hidrogel (con un soporte de matriz o como una solución de pulverización), un polvo para espolvorear durante la cirugía, una sutura reabsorbible o un gel de disolución rápida o una tira de polímero.

5 En determinadas realizaciones, el oligonucleótido modificado se administra al sujeto después de una extirpación quirúrgica del queloide, cicatriz o lesión fibrótica.

En determinadas realizaciones, la lesión en la piel es el resultado de una incisión quirúrgica, una biopsia, una perforación en la piel, una extracción de piel, una quemadura o una herida.

10 En determinadas realizaciones, la cantidad eficaz es aproximadamente 5 mg del oligonucleótido modificado por inyección por centímetro lineal del queloide, la cicatriz hipertrófica, la lesión en la piel, el sitio de la lesión, la cicatriz preexistente o la lesión fibrótica preexistente.

En determinadas realizaciones, el oligonucleótido modificado se administra hasta 6 meses. En otras realizaciones, El oligonucleótido modificado se administra hasta 1 año.

15 En determinadas realizaciones, las realizaciones anteriores comprenden además administrar al sujeto otro agente terapéutico que puede ser un esteroide, una envoltura de silicona, TGF- β 3 (es decir, Juvista), colagenasa (es decir, Xyflex), 17 β -estradiol (es decir, Zesteem), IL-10 (es decir, Prevascar), manosa 6-fosfato (es decir, Juvindex), un relajante del músculo liso (es decir, AZX100, un péptido sintético de 24 aminoácidos), una terapia con células madre (es decir, GBT009), proteína amiloide sérica, anticuerpos dirigidos a la integrina α v β 6, CTGF, TGF β , o moléculas que inhiben la actividad de ALK-4 y/o ALK-5 (los receptores beta de TGF), cualquier inhibidor diseñado para bloquear la actividad de TNF (por ejemplo, etanercept), apósitos oclusivos, terapia de compresión, criocirugía, escisión quirúrgica, tratamiento con láser, radioterapia, terapia con interferón, bleomicina, 5-fluorouracilo, verapamilo, crema de imiquimod, uno capaz de promover la cicatrización de heridas, tal como Dermagraft, Apligraf, PDGF (es decir, Regranex), estimulación eléctrica, "factores de crecimiento" como una categoría, apósitos como una categoría, submucosa del intestino delgado (SIS), Promogran, oxígeno hiperbárico, o combinaciones de los mismos.

20

25 En determinadas realizaciones, el oligonucleótido modificado se administra por medio de una formulación, ultrasonido, electroporación, iontoforesis o microaguja.

En determinadas realizaciones, el oligonucleótido modificado se administra adyacente al queloide, la cicatriz hipertrófica, la lesión en la piel, el sitio de la lesión, la cicatriz preexistente o la lesión fibrótica preexistente.

En otras realizaciones, el oligonucleótido modificado se administra a lo largo de toda la longitud del queloide, la cicatriz hipertrófica, la lesión en la piel, el sitio de la lesión, la cicatriz preexistente o la lesión fibrótica preexistente.

30 En otras realizaciones más, el oligonucleótido modificado se administra a lo largo de cada lado del queloide, la cicatriz hipertrófica, la lesión en la piel, el sitio de la lesión, la cicatriz preexistente o la lesión fibrótica preexistente.

En otras realizaciones más, el oligonucleótido modificado se administra directamente en el queloide, la cicatriz hipertrófica, la lesión en la piel, el sitio de la lesión, la cicatriz preexistente o la lesión fibrótica preexistente.

35 En determinadas realizaciones, el sujeto está genéticamente predispuesto a la formación de queloides o cicatrices hipertróficas o ambos.

En determinadas realizaciones, el oligonucleótido modificado se administra por vía intradérmica.

En otras realizaciones, el oligonucleótido modificado se administra por vía intradérmica mediante técnica de enhebrado.

En otras realizaciones más, el oligonucleótido modificado se administra por vía subcutánea.

40 La presente invención también proporciona un kit que comprende:

- a. un dispositivo precargado con la composición que comprende el oligonucleótido modificado; y
- b. instrucciones para su uso.

45 En una determinada ocasión de la divulgación, el oligonucleótido antisentido es complementario a una porción de la región de CTGF dirigida por oligonucleótidos activos que se extiende desde los sitios diana 1396 a 1424. Este es el espacio de secuencia dirigido por los oligo 418899, 412295 y 412294/EXC 001 (SEQ ID NO: 166, 40 y 39, respectivamente).

La presente invención también proporciona un oligonucleótido modificado que comprende al menos 12, preferentemente al menos 14, nucleósidos unidos, cuya secuencia de nucleobases es una porción de una de las secuencias de nucleobases establecidas en las SEQ ID NO: 39, 40 y 166.

50 Los compuestos antisentido descritos en el presente documento pueden comprender un oligonucleótido que tiene de

12 a 30, de 12 a 20, y preferentemente 14 a 20 nucleósidos unidos.

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

5 La presente invención emplea compuestos oligoméricos, particularmente oligonucleótidos antisentido, para su uso en la modulación de la función de las moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas involucradas en la fibrosis, modulando, en última instancia, la cantidad de proteína producida. Esto se logra proporcionando compuestos antisentido que hibridan específicamente con uno o más ácidos nucleicos que codifican una proteína involucrada en la fibrosis. Tal como se usa en el presente documento, las expresiones "ácido nucleico diana" y "ácido nucleico que codifica el factor de crecimiento de tejido conectivo" abarcan el ADN que codifica una proteína involucrada en la fibrosis, el ARN (incluido el pre-ARNm y el ARNm) transcritos a partir de dicho ADN, y también el ADNc derivado de dicho ARN.

15 La hibridación específica de un compuesto oligomérico con su ácido nucleico diana interfiere con la función normal del ácido nucleico. Esta modulación de la función de un ácido nucleico diana por compuestos que hibridan específicamente con él se denomina generalmente "antisentido". Las funciones del ADN a interferir incluyen la replicación y la transcripción. Las funciones del ARN a interferir incluyen todas las funciones vitales tales como, por ejemplo, la translocación del ARN al sitio de la traducción de proteínas, la traducción de proteínas a partir del ARN, el empalme del ARN para producir una o más especies de ARNm y la actividad catalítica que puede estar involucrada o facilitada por el ARN. El efecto general de dicha interferencia con la función del ácido nucleico diana es la modulación de la expresión del factor de crecimiento de tejido conectivo. En el contexto de la presente invención, "modulación" significa un aumento (estimulación) o una disminución (inhibición) en la expresión de un gen. En el contexto de la presente invención, la inhibición es la forma preferida de modulación de la expresión génica y el ARNm es una diana preferida.

Ácidos Nucleicos Diana, Regiones Diana y Secuencias de Nucleótidos

25 Se prefiere dirigirse a ácidos nucleicos específicos para antisentido. "Dirigir" un compuesto antisentido a un ácido nucleico particular, en el contexto de la presente invención, es un procedimiento multietapa.

30 Se entiende que la secuencia establecida en cada SEQ ID NO en los Ejemplos contenidos en el presente documento es independiente de cualquier modificación de un resto de azúcar, un enlace internucleosídico o una nucleobase. Por lo tanto, los compuestos antisentido definidos por una SEQ ID NO pueden comprender, independientemente, una o más modificaciones de un resto de azúcar, un enlace internucleosídico o una nucleobase. Los compuestos antisentido descritos por el Número de Isis (Isis No) indican una combinación de secuencia de nucleobase y motivo.

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

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

45 Una región diana puede contener uno o más segmentos diana. Los múltiples segmentos diana dentro de una región diana pueden estar superpuestos. Como alternativa, pueden no estar superpuestos. En una realización, los segmentos diana dentro de una región diana están separados por no más de aproximadamente 300 nucleótidos. En otras realizaciones, los segmentos diana dentro de una región diana están separados por no más de aproximadamente, 250, 200, 150, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 o 10 nucleótidos en el ácido nucleico diana. En otra realización, los segmentos diana dentro de una región diana están separados por no más de aproximadamente 5 nucleótidos en el ácido nucleico diana. En realizaciones adicionales, los segmentos diana son contiguos.

Los segmentos diana adecuados se pueden encontrar dentro de una 5'UTR, una región codificante, una 3' UTR, un intrón o un exón. Los segmentos diana que contienen un codón de inicio o un codón de parada también son segmentos diana adecuados. Un segmento diana adecuado puede excluir específicamente una determinada región estructuralmente definida, tal como el codón de inicio o el codón de parada.

55 La determinación de segmentos diana adecuados puede incluir una comparación de la secuencia de un ácido nucleico diana con otras secuencias a lo largo del genoma. Por ejemplo, el algoritmo BLAST se puede usar para identificar regiones de similitud entre diferentes ácidos nucleicos. Esta comparación puede evitar la selección de

secuencias de compuestos antisentido que pueden hibridar de una manera no específica a secuencias distintas de un ácido nucleico diana seleccionado (es decir, secuencias no diana o inespecíficas).

5 Puede haber variación en la actividad (por ejemplo, como se define por el porcentaje de reducción de los niveles de ácido nucleico diana) de los compuestos antisentido dentro de una región diana activa. En una realización, las reducciones en los niveles de ARNm de CTGF son indicativas de la inhibición de la expresión de CTGF. Las reducciones en los niveles de una proteína CTGF también son indicativas de la inhibición de la expresión del ARNm diana. Adicionalmente, los cambios fenotípicos son indicativos de la inhibición de la expresión de CTGF.

Compuestos Antisentido

10 En el contexto de la presente invención, el término "oligonucleótido" se refiere a un oligómero o polímero de ácido ribonucleico (ARN) o ácido desoxirribonucleico (ADN) o miméticos de los mismos. Este término incluye oligonucleótidos compuestos de nucleobases naturales, azúcares y enlaces internucleosídicos covalentes (cadena principal), así como oligonucleótidos que tienen porciones no naturales que funcionan de manera similar. Dichos oligonucleótidos modificados o sustituidos son a menudo preferidos sobre formas naturales debido a propiedades deseables tales como, por ejemplo, captación celular mejorada, afinidad aumentada por la diana de ácido nucleico y estabilidad aumentada en presencia de nucleasas.

15 Aunque los oligonucleótidos antisentido son una forma preferida de compuesto antisentido, la presente invención comprende otros compuestos antisentido oligoméricos, que incluyen, pero sin limitación, miméticos de oligonucleótidos.

20 Compuesto antisentido significa un compuesto oligomérico capaz de experimentar hibridación con un ácido nucleico diana a través de enlaces de hidrógeno. Los compuestos antisentido incluyen, pero sin limitación, oligonucleótidos, oligonucleósidos, análogos de oligonucleótidos, miméticos de oligonucleótidos, oligonucleótidos antisentido, ARNip, ARNi, ribozimas, oligonucleótidos de secuencia guía externa (EGS) (oligozimas) y otros oligonucleótidos que hibridan con el ácido nucleico diana y modulan su expresión.

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

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

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

45 En determinadas realizaciones, un compuesto antisentido acortado o truncado dirigido a un ácido nucleico tiene una única subunidad eliminada del extremo 5'(truncamiento 5'), o alternativamente del extremo 3'(truncamiento 3'). Un compuesto antisentido acortado o truncado dirigido a un ácido nucleico puede tener dos subunidades eliminadas del extremo 5', o alternativamente puede tener dos subunidades eliminadas del extremo 3', del compuesto antisentido. Como alternativa, los nucleósidos eliminados se pueden dispersar en todo el compuesto antisentido, por ejemplo, teniendo, en un compuesto antisentido, un nucleósido eliminado del extremo 5' y un nucleósido eliminado del extremo 3'.

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

55 Es posible aumentar o disminuir la longitud de un compuesto antisentido, tal como un oligonucleótido antisentido, y/o introducir bases no coincidentes sin eliminar la actividad. Por ejemplo, en Woolf y col. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:

7305-7309, 1992), se probaron una serie de oligonucleótidos antisentido de 13-25 nucleobases de longitud para determinar su capacidad para inducir la escisión de un ARN diana en un modelo de inyección de ovocitos. Los oligonucleótidos antisentido de 25 nucleobases de longitud con 8 u 11 bases no coincidentes cerca de los extremos de los oligonucleótidos antisentido pudieron dirigir la escisión específica del ARNm diana, aunque en menor medida que los oligonucleótidos antisentido que no contenían desapareamientos. De forma similar, la escisión específica de la diana se logró utilizando oligonucleótidos antisentido de 13 nucleobases, incluidos aquellos con 1 o 3 desapareamientos.

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

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

Bhanot y col. (PCT/US2007/068401) proporcionaron compuestos antisentido cortos, incluidos compuestos que comprenden monómeros de alta afinidad modificados químicamente de 8 a 16 monómeros de longitud. Se demostró que estos compuestos antisentido cortos son útiles para reducir los ácidos nucleicos y/o proteínas diana en células, tejidos y animales con potencia aumentada e índice terapéutico mejorado. Los compuestos antisentido cortos fueron eficaces a dosis más bajas que los compuestos antisentido descritos anteriormente, permitiendo una reducción en la toxicidad y en el coste del tratamiento. Además, los compuestos antisentido cortos descritos tienen un mayor potencial para la dosificación oral.

Hibridaciones

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

En el contexto de la presente invención, "hibridación" significa enlaces de hidrógeno, que puede ser Watson-Crick, Hoogsteen o Hoogsteen invertidos, entre bases de nucleósidos o nucleótidos complementarias. Por ejemplo, la adenina y la timina son nucleobases complementarias que se emparejan a través de la formación de enlaces de hidrógeno.

Identidad

Los compuestos antisentido proporcionados en el presente documento también pueden tener un porcentaje de identidad definido con una secuencia de nucleótidos particular, SEC ID NO, o compuesto representado por un número de oligo específico (I_{sis}). Tal como se usa en el presente documento, un compuesto antisentido es idéntico a la secuencia desvelada en el presente documento si tiene la misma capacidad de emparejamiento de nucleobases. Por ejemplo, un ARN que contenga uracilo en lugar de timidina en una secuencia de ADN desvelada se consideraría idéntico a la secuencia de ADN ya que tanto el uracilo como la timidina se emparejan con adenina. También se contemplan versiones abreviadas y alargadas de los compuestos antisentido descritos en el presente documento, así como compuestos que tienen bases no idénticas en relación con los compuestos antisentido proporcionados en el presente documento. Las bases no idénticas pueden estar adyacentes entre sí o dispersas en todo el compuesto antisentido. El porcentaje de identidad de un compuesto antisentido se calcula de acuerdo con el número de bases que tienen un emparejamiento de bases idéntico en relación con la secuencia con la que se está comparando.

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

Modificaciones

En una realización determinada de la invención, las modificaciones a los compuestos antisentido abarcan sustituciones o cambios en los enlaces internucleosídicos, restos de azúcar o nucleobases.

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

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

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

5 Adicionalmente, 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.

10 Un nucleósido es una combinación de base-azúcar. La porción de nucleobase (también conocida como base) del nucleósido es normalmente un resto de base heterocíclica. Los nucleótidos son nucleósidos que incluyen además un grupo fosfato unido covalentemente a la porción de azúcar del nucleósido. Para aquellos nucleósidos que incluyen un azúcar pentofuranosilo, el grupo fosfato se puede unir a la porción hidroxilo 2', 3' o 5' del azúcar. Los oligonucleótidos se forman a través del enlace covalente de nucleósidos adyacentes entre sí, para formar un oligonucleótido polimérico lineal. Dentro de la estructura de oligonucleótido, los grupos fosfato se conocen comúnmente como formando los enlaces internucleosídicos del oligonucleótido.

15 Las modificaciones a los compuestos antisentido abarcan sustituciones o cambios en los enlaces internucleosídicos, restos de azúcar o nucleobases. Los compuestos antisentido modificados son a menudo preferidos sobre formas naturales debido a propiedades deseables tales como, por ejemplo, captación celular mejorada, afinidad mejorada por la diana de ácido nucleico, estabilidad aumentada en presencia de nucleasas o actividad inhibitoria aumentada.

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

Enlaces Internucleosídicos Modificados

25 El enlace internucleosídico natural de ARN y ADN es un enlace fosfodiéster de 3' a 5'. Los compuestos antisentido que tienen uno o más enlaces internucleosídicos modificados, es decir, de origen no natural, con frecuencia se seleccionan sobre compuestos antisentido que tienen enlaces internucleosídicos de origen natural debido a propiedades deseables tales como, por ejemplo, captación celular mejorada, afinidad aumentada por ácidos nucleicos diana y estabilidad aumentada en presencia de nucleasas.

30 Los oligonucleótidos que tienen enlaces internucleosídicos modificados incluyen enlaces internucleosídicos que retienen un átomo de fósforo, así como enlaces internucleosídicos que no tienen un átomo de fósforo. Los enlaces internucleosídicos representativos que contienen fósforo incluyen, pero sin limitación, fosfodiésteres, fosfotriésteres, metilfosfonatos, fosforamidoato y fosforotioato. Los procedimientos de preparación de enlaces que contienen fósforo y que no contienen fósforo son bien conocidos.

35 En una realización, los compuestos antisentido dirigidos a un ácido nucleico de CTGF comprenden uno o más enlaces internucleosídicos modificados. En algunas realizaciones, los enlaces internucleosídicos modificados son enlaces fosforotioato. En otras realizaciones, cada enlace internucleosídico de un compuesto antisentido es un enlace internucleosídico fosforotioato.

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

45 Los ejemplos específicos de compuestos antisentido preferidos útiles en la presente invención incluyen oligonucleótidos que contienen cadenas principales modificadas o enlaces internucleosídicos no naturales. Como se define en esta memoria descriptiva, los oligonucleótidos que tienen cadenas principales modificadas incluyen aquellos que retienen un átomo de fósforo en la cadena principal y aquellos que no tienen un átomo de fósforo en la cadena principal. Para los fines de esta memoria descriptiva, y como se hace referencia a veces en la técnica, los oligonucleótidos modificados que no tienen un átomo de fósforo en su cadena principal internucleosídica también pueden considerarse oligonucleosidos.

55 Las cadenas principales de oligonucleótidos modificados preferidos incluyen, por ejemplo, fosforotioatos, fosforotioatos quirales, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, fosfonatos de metilo y otros alquilfosfonatos incluyendo 3'-alquileo, fosfonatos, 5'-alquileo fosfonatos y fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidoatos, incluyendo 3'-amino fosforamidoato y aminoalquilfosforamidoatos, tionofosforamidoatos,

5 tionalquilfosfonatos, tionalquilfosfotriésteres, selenofosfatos y boranofosfatos que tienen enlaces 3'-5' normales, análogos de estos unidos en 2'-5', y aquellos que tienen polaridad invertida en los que uno o más enlaces internucleotídicos son un enlace de 3'a 3', de 5'a 5' o de 2' a 2'. Los oligonucleótidos preferidos que tienen polaridad invertida comprenden un único enlace de 3'a 3' en el enlace internucleotídico más 3', es decir, un único resto de nucleósido invertido que puede ser abásico (falta la nucleobase o tiene un grupo hidroxilo en su lugar). También se incluyen diversas sales, sales mixtas y formas ácidas libres.

10 Las patentes representativas de los Estados Unidos que enseñan la preparación de los enlaces que contienen fósforo anteriores incluyen, pero sin limitación, las Patentes de Estados Unidos números: 3.687.808; 4.469.863; 4.476.301; 5.023.243; 5.177.196; 5.188.897; 5.264.423; 5.276.019; 5.278.302; 5.286.717; 5.321.131; 5.399.676; 5.405.939; 5.453.496; 5.455.233; 5.466.677; 5.476.925; 5.519.126; 5.536.821; 5.541.306; 5.550.111; 5.563.253; 5.571.799; 5.587.361; 5.194.599; 5.565.555; 5.527.899; 5.721.218; 5.672.697 y 5.625.050, algunas de las cuales son del mismo solicitante de esta solicitud.

15 Las cadenas principales de oligonucleótidos modificados preferidos que no incluyen un átomo de fósforo en las mismas tienen cadenas principales que están formadas por enlaces internucleosídicos de alquilo o cicloalquilo de cadena corta, heteroátomo mixto y enlaces internucleosídicos de alquilo o cicloalquilo, o uno o más enlaces de internucleosídicos heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta. Estos incluyen aquellos que tienen enlaces de morfolino (formados en parte por la porción de azúcar de un nucleósido); cadenas principales de siloxano; cadenas principales de sulfuro, sulfóxido y sulfona; cadenas principales de formacetilo y tioformacetilo; cadenas principales de metileno de formacetilo y tioformacetilo; cadenas principales de riboacetilo; cadenas principales que contienen alquenos; cadenas principales de sulfamato; cadenas principales de metilenimino y metilenhidracino; cadenas principales de sulfonato y sulfonamida; cadenas principales de amida; y otros que tienen partes componentes de N, O, S y CH₂ mixtas.

20 Las patentes representativas de los Estados Unidos que enseñan la preparación de los oligonucleósidos anteriores incluyen, pero sin limitación, las Patentes de Estados Unidos números: 5.034.506; 5.166.315; 5.185.444; 5.214.134; 5.216.141; 5.235.033; 5.264.562; 5.264.564; 5.405.938; 5.434.257; 5.466.677; 5.470.967; 5.489.677; 5.541.307; 5.561.225; 5.596.086; 5.602.240; 5.610.289; 5.602.240; 5.608.046; 5.610.289; 5.618.704; 5.623.070; 5.663.312; 5.633.360; 5.677.437; 5.792.608; 5.646.269 y 5.677.439, algunas de las cuales son del mismo solicitante de esta solicitud.

25 En otros miméticos de oligonucleótidos preferidos, tanto el azúcar como el enlace internucleosídico, es decir, la cadena principal, de las unidades de nucleótidos se reemplazan con nuevos grupos. Las unidades de base se mantienen para la hibridación con un compuesto diana de ácido nucleico apropiado. Un de tal compuesto oligomérico, un mimético de oligonucleótidos que ha demostrado tener excelentes propiedades de hibridación, se denomina ácido peptidonucleico (APN). En compuestos de APN, la cadena principal de azúcar de un oligonucleótido se reemplaza con una cadena principal que contiene amida, en particular una cadena principal de aminoetilglicina. 30 Las nucleobases se retienen y se unen directa o indirectamente a átomos de nitrógeno aza de la porción amida de la cadena principal. Las patentes representativas de los Estados Unidos que enseñan la preparación de compuestos de APN incluyen, pero sin limitación, las Patentes de Estados Unidos números: 5.539.082; 5.714.331; y 5.719.262. Se puede encontrar información adicional sobre los compuestos de APN en Nielsen y col., Science, 1991, 254, 1497-1500.

35 Las realizaciones más preferidas de la invención son oligonucleótidos con cadenas principales de fosforotioato y oligonucleósidos con cadenas principales de heteroátomos, y en particular -CH₂-NH-O-CH₂-, -CH₂-N(CH₃)-O-CH₂- [conocido como metileno (metilimino) o cadena principal MMI], -CH₂-O-N(CH₃)-CH₂-, -CH₂-N(CH₃)-N(CH₃)-CH₂- y -O-N(CH₃)-CH₂-CH₂- [en el que la cadena principal de fosfodiéster natural se representa como -O-P-O-CH₂-] de la Patente de EE.UU. N.º 5.489.677 anteriormente referenciada, y las cadenas principales de amida de la Patente de EE.UU. N.º 5.602.240 anteriormente referenciada. También se prefieren los oligonucleótidos que tienen estructuras de cadena principal de morfolino de la Patente de EE.UU. N.º 5.034.506 anteriormente referenciada.

Restos de Azúcar Modificados

40 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, la unión por puentes para formar un ácido nucleico bicíclico "BNA" y la sustitución del 4'-O con un heteroátomo tal como S o N (R) como se describe en la Patente de EE.UU. N.º: 7.399.845 de Seth y col. Se describen otros ejemplos de BNA en la Solicitud de Patente Internacional publicada N.º WO 2007/146511.

45 Los compuestos antisentido de la invención pueden contener opcionalmente uno o más nucleótidos que tienen restos de azúcar modificados. Las modificaciones de azúcar pueden impartir estabilidad frente a nucleasas, 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, incluyendo, pero sin limitación: adición de un grupo sustituyente, particularmente en la posición 2'; unión por puentes entre dos átomos del anillo no geminal para formar un ácido nucleico bicíclico (BNA); y sustitución de un átomo o grupo tal como -S-, -N(R) - o -C(R1) (R2) por el anillo de oxígeno en la posición 4'. Los azúcares modificados incluyen, pero sin limitación: azúcares sustituidos,

especialmente los azúcares 2'-sustituídos que tienen un grupo sustituyente 2'-F, 2'-OCH₂ (2'-OMe) o 2'-O (CH₂)₂-OCH₃ (2'-O-metoxietilo o 2'-MOE); y azúcares modificados bicíclicos (BNA), que tienen un puente 4'-(CH₂)_n-O-2', en el que n = 1 o n = 2. Los procedimientos para las preparaciones de azúcares modificados son bien conocidos por los expertos en la materia.

- 5 En determinadas realizaciones, un nucleósido 2'-modificado tiene un resto de azúcar bicíclico. En determinadas de tales realizaciones, el resto de azúcar bicíclico es un azúcar D en la configuración alfa. En determinadas de tales realizaciones, el resto de azúcar bicíclico es un azúcar D en la configuración beta. En determinadas de tales realizaciones, el resto de azúcar bicíclico es un azúcar L en la configuración alfa. En determinadas de tales realizaciones, el resto de azúcar bicíclico es un azúcar L en la configuración beta.
- 10 En determinadas realizaciones, el resto de azúcar bicíclico comprende un grupo puente entre los átomos de carbono 2' y 4'. En determinadas de tales realizaciones, el grupo puente comprende de 1 a 8 grupos birradicales unidos. En determinadas realizaciones, el resto de azúcar bicíclico comprende de 1 a 4 grupos birradicales unidos. En determinadas realizaciones, el resto de azúcar bicíclico comprende 2 o 3 grupos birradicales unidos. En determinadas realizaciones, el resto de azúcar bicíclico comprende 2 grupos birradicales unidos. En determinadas realizaciones, un grupo birradical unido se selecciona de -O-, -S-, -N(R1)-, -C(R1)(R2)-, -C(R1)=C(R1)-, -C(R1)=N-, -C(=NR1)-, -Si(R1)(R2)-, -S(=O)₂-, -S(=O)-, -C(=O)- y -C(=S)-; en el que cada R1 y R2 es, independientemente, H, hidroxilo, alquilo C1-C12, alquilo C1-C12 sustituido, alqueno C2-C12, alqueno C2-C12 sustituido, alquino C2-C12, alquino 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, oxi sustituido (-O-), amino, amino sustituido, azido, carboxilo, carboxilo sustituido, acilo, acilo sustituido, CN, tiol, tiol sustituido, sulfonilo (S(=O)₂-H), sulfonilo sustituido, sulfoxilo (S(=O)-H) o sulfoxilo sustituido; y cada grupo sustituyente es, independientemente, halógeno, alquilo C1-C12, alquilo C1-C12 sustituido, alqueno C2-C12, alqueno C2-C12 sustituido, alquino C2-C12, alquino 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.

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

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

35 En nucleótidos que tienen restos de azúcar modificados, los restos de nucleobase (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.

40 En una realización preferida, el resto de azúcar modificado es 2'-MOE. En otras realizaciones, los nucleótidos 2'-MOE modificados están dispuestos en un motivo de oligómero con huecos.

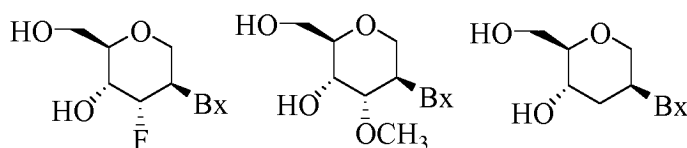
En la actualidad los oligonucleótidos preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': OH; F; O-, S-, o N-alquilo; O-, S-, o N-alqueno; O-, S- o N-alquino; u O-alquilo-O-alquilo, en el que el alquilo, alqueno y alquino pueden ser alquilo C₁ a C₁₀ o alqueno y alquino C₂ a C₁₀ sustituido o no sustituido. 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, en los que 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 de escisión de ARN, un grupo informador, un intercalador, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido, o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un oligonucleótido, y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. Una modificación preferida incluye 2'-metoxietoxi (2'-O-CH₂CH₂OCH₃, también conocida como 2'-O-(2-metoxietilo) o 2'-MOE) (Martin y col., *Helv. Chim. Acta*, 1995, 78, 486-504) es decir, un grupo alcohalcoxi. Una modificación preferida adicional incluye 2'-dimetilaminoetoxi, es decir, un grupo O(CH₂)₂ON(CH₃)₂, también conocido como 2'-DMAOE, y 2'-dimetilaminoetoxietoxi (también conocido en la técnica como 2'-O-dimetilaminoetoxietilo o 2'-DMAEOE), es decir, 2'-O--CH₂--O--CH₂-N(CH₂)₂. Una modificación preferida adicional incluye ácido nucleico bicíclico (también denominados ácidos nucleico bloqueados (LNA por sus siglas en inglés) en el que el grupo 2'-hidroxilo está unido al átomo de carbono 3' o 4' del anillo de azúcar formando, de este modo, un resto de azúcar bicíclico. El enlace es preferentemente un grupo metileno (--CH₂)_n que une por puentes el átomo de oxígeno 2' y el átomo de carbono 4' en el que n es 1 o 2 incluyendo a-L-Metilenoxi (4'-CH₂-O-2') BNA, β-D-

Metilenoxi (4'-CH₂-O-2') BNA y Etilenoxi (4'-(CH₂)₂-O-2') BNA. Los azúcares modificados bicíclicos también incluyen (6'S) -6'metil BNA, Aminooxi (4'-CH₂-O- N(R)-2') BNA, Oxiamino (4'-CH₂-N(R)-O-2') BNA en los que, R es, independientemente, H, un grupo protector o un alquilo C1-C12. Los LNA también forman dúplex con ADN complementario, ARN o LNA con altas afinidades térmicas. Los espectros de dicroísmo circular (CD) muestran que los dúplex que implican un LNA completamente modificado (esp. LNA: ARN) se asemejan estructuralmente a un dúplex de ARN:ARN de forma A. El examen de resonancia magnética nuclear (RMN) de un dúplex de LNA: ADN confirmó la conformación 3'-endo de un monómero de LNA. También se ha demostrado el reconocimiento de ADN bicatenario, lo que sugiere una invasión de la cadena por LNA. Los estudios de secuencias no coincidentes muestran que los LNA obedecen las reglas de emparejamiento de bases de Watson-Crick con una selectividad generalmente mejorada en comparación con las cadenas de referencia no modificadas correspondientes.

Los LNA en los que el grupo 2'-hidroxilo está unido al átomo de carbono 4' del anillo de azúcar formando, de este modo, un enlace 2'-C,4'-C-oximetileno forman, de este modo, un resto de azúcar bicíclico. El enlace puede ser un grupo metileno (-CH₂)_n que une por puentes el átomo de oxígeno 2' y el átomo de carbono 4' en el que n es 1 o 2 (Singh y col., Chem. Commun., 1998, 4, 455-456). Los LNA y análogos de LNA muestran una estabilidad térmica del dúplex muy alta con ADN y ARN complementarios (T_m = + 3 a +10 °C), estabilidad hacia la degradación exonucleolítica en 3' y buenas propiedades de solubilidad. Otros grupos puente preferidos incluyen el puente 2'-deoxi-2'-CH₂OCH₂-4'. Se describen LNA y la preparación de los mismos en las Solicitudes de Patente Internacional números WO 98/39352 y WO 99/14226.

Otras modificaciones preferidas incluyen 2'-metoxi (2'-O-CH₃), 2'-aminopropoxi (2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂), 2'-alilo (2'-CH₂-CH=CH₂), 2'-O-alilo (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).

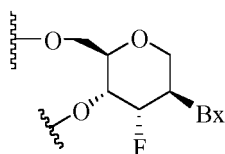
Una modificación 2'-arabino preferida es 2'-F. También se pueden hacer modificaciones similares en otras posiciones en el oligonucleótido, particularmente en la posición 3' del azúcar en el nucleótido 3' terminal o en los oligonucleótidos unidos 2'-5' y en la posición 5' del nucleótido 5' terminal. Los oligonucleótidos también pueden tener miméticos o sustitutos de azúcares (a veces denominados análogos de ADN), tal como restos de ciclobutilo en lugar del azúcar pentofuranosilo. Las patentes representativas de los Estados Unidos que enseñan la preparación de tales estructuras de azúcares modificados incluyen, pero sin limitación, las Patentes de Estados Unidos números: 4.981.957; 5.118.800; 5.319.080; 5.359.044; 5.393.878; 5.446.137; 5.466.786; 5.514.785; 5.519.134; 5.567.811; 5.576.427; 5.591.722; 5.597.909; 5.610.300; 5.627.053; 5.639.873; 5.646.265; 5.658.873; 5.670.633; 5.792.747; y 5.700.920, algunas de las cuales son del mismo solicitante de la presente solicitud. En determinadas realizaciones, los nucleósidos se modifican reemplazando el anillo ribosilo con un sistema de anillos sustitutos, tal como un anillo morfolino, un anillo ciclohexenilo, un anillo ciclohexilo o un anillo tetrahidropiranilo tal como uno que tiene una de las fórmulas:



También se conocen en la técnica muchos otros sistemas de anillos sustitutos de azúcar biciclo y triciclo que se pueden usar para modificar nucleósidos para su incorporación en compuestos antisentido (véase, por ejemplo, el artículo de revisión: Leumann, Christian J.). Tales sistemas de anillos pueden sufrir varias sustituciones adicionales para potenciar la actividad.

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

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



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

45 Nucleobases Modificadas

Los oligonucleótidos también pueden incluir modificaciones o sustituciones de nucleobases (a menudo denominadas en la técnica simplemente como "base"). Las modificaciones o sustituciones de nucleobases se pueden distinguir

estructuralmente de, pero funcionalmente intercambiables con, las nucleobases sintéticas o naturales no modificadas. Tanto las nucleobases naturales como las modificadas son capaces de participar en los enlaces de hidrógeno. Las modificaciones de nucleobases pueden impartir estabilidad frente a nucleasas, afinidad de unión o alguna otra propiedad biológica beneficiosa a los compuestos antisentido. Las nucleobases modificadas incluyen nucleobases sintéticas y naturales tales como, por ejemplo, 5-metilcitosina (5-me-C). Determinadas sustituciones de nucleobases, incluyendo sustituciones de 5-metilcitosina, son particularmente útiles para aumentar la afinidad de unión de un compuesto antisentido para un ácido nucleico diana. Por ejemplo, Las sustituciones de 5-metilcitosina han mostrado aumentar la estabilidad del dúplex de ácido nucleico a 0,6-1,2 °C (Sanghvi, Y.S., Crooke, S.T. y Lebleu, B., eds., Antisense Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, págs. 276-278).

Las nucleobases no modificadas adicionales incluyen 5-hidroximetil citosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metil y otros derivados alquilo de adenina y guanina, 2-propil y otros derivados alquilo de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracilo y citosina, 5-propinil (-C≡C-CH₃) uracilo y citosina y otros derivados de alquilo de bases de pirimidina, 6-azo uracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo y otras adeninas y guaninas 8 sustituidas, 5-halo particularmente 5-bromo, 5-trifluorometilo y otros uracilos y citosinas 5-sustituidas, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 2-F-adenina, 2-amino-adenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-desazaguanina y 7-desazaadenina y 3-desazaguanina y 3-desazaadenina.

Los restos de bases heterocíclicas también pueden incluir aquellos en los que la base purínica o pirimidínica se reemplaza por otros heterociclos, por ejemplo, 7-desazaadenina, 7-desazaguanosina, 2-aminopiridina y 2-piridona. Las nucleobases que son particularmente útiles para aumentar la afinidad de unión de los compuestos antisentido incluyen pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y purinas N-2, N-6 y O-6 sustituidas, que incluyen 2 aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina.

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

Tal como se usa en el presente documento, las nucleobases "no modificadas" o "naturales" incluyen las bases de purina adenina (A) y guanina (G), y las bases de pirimidina timina (T), citosina (C) y uracilo(U). Las nucleobases modificadas incluyen otras nucleobases sintéticas y naturales tal como la 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetil citosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metil y otros derivados alquilo de adenina y guanina, 2-propil y otros derivados alquilo de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracilo y citosina, 5-propinil (-C≡C-CH₃) uracilo y citosina y otros derivados de alquilo de bases de pirimidina, 6-azo uracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo y otras adeninas y guaninas 8 sustituidas, 5-halo particularmente 5-bromo, 5-trifluorometilo y otros uracilos y citosinas 5-sustituidas, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 2-F-adenina, 2-amino-adenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-desazaguanina y 7-desazaadenina y 3-desazaguanina y 3-desazaadenina. Otras bases modificadas incluyen pirimidinas tricíclicas tales como citidina de fenoxacina (1 H-pirimido[5,4-b][1,4]benzoxacina-2(3H)-ona), citidina de fenotiaca (1 H-pirimido[5,4-b][1,4]benzotiaca- 2(3H)-ona), abrazaderas G tales como una citidina de fenoxacina sustituida (por ejemplo, la 9-(2-aminoetoxi)-H-pirimido[5,4-b][1,4]benzoxacina-2(3H)-ona), citidina de carbazol (2H-pirimido[4,5-b]indol-2-one), citidina de piridoindol (H-pirido[3',2':4,5]pirrolo[2,3-d]pirimidin-2-ona). Las nucleobases modificadas también pueden incluir aquellas en las que la base purínica o pirimidínica se reemplaza por otros heterociclos, por ejemplo, 7-desazaadenina, 7-desazaguanosina, 2-aminopiridina y 2-piridona. Nucleobases adicionales incluyen las desveladas en la patente de los EE.UU. N.º 3.687.808, las desveladas en The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, páginas 858-859, Kroschwitz, J. I., ed. John Wiley y Sons, 1990, las desveladas por Englisch y col., Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613, y las desveladas por Sanghvi, Y. S., Capítulo 15, Antisense Research and Applications, páginas 289-302, Crooke, S. T. y Lebleu, B. ed., CRC Press, 1993. Algunas de estas nucleobases son particularmente útiles para aumentar la afinidad de unión de los compuestos oligoméricos de la invención. Estas incluyen pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y N-2, purinas N-6 y O-6 sustituidas, que incluyen 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. Las sustituciones de 5-metilcitosina han mostrado aumentar la estabilidad del dúplex de ácido nucleico a 0,6-1,2 °C (Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. y Lebleu, B., eds., Antisense Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, págs. 276-278) y son sustituciones de bases actualmente preferidas, incluso más particularmente cuando se combinan con modificaciones de azúcar 2'-O-metoxietilo.

Las patentes representativas de los Estados Unidos que enseñan la preparación de algunas de las nucleobases modificadas indicadas anteriormente, así como otras nucleobases modificadas, incluyen, pero sin limitación, la Patente de EE.UU. N.º 3.687.808 anteriormente indicada, así como las Patentes de los Estados Unidos números: 4.845.205; 5.130.302; 5.134.066; 5.175.273; 5.367.066; 5.432.272; 5.457.187; 5.459.255; 5.484.908; 5.502.177; 5.525.711; 5.552.540; 5.587.469; 5.594.121, 5.596.091; 5.614.617; 5.645.985; 5.830.653; 5.763.588; 6.005.096; y 5.681.941, algunas de las cuales son del mismo solicitante de la presente solicitud y la Patente de los Estados Unidos número 5.750.692, que tiene un titular en común con los solicitantes de la presente solicitud.

Motivos de Compuestos Antisentido

5 En determinada realización de la invención, el compuesto comprende un oligonucleótido modificado compuesto de (a) un segmento hueco que consiste en desoxinucleósidos unidos, consiste preferentemente en trece desoxinucleósidos modificados unidos; (b) un segmento de extremo 5' que consiste en nucleósidos modificados unidos, consiste preferentemente en dos nucleósidos modificados unidos; y (c) un segmento de extremo 3' que consiste en nucleósidos modificados unidos, consiste preferentemente en cinco nucleósidos unidos; en el que el segmento hueco está situado entre el segmento de extremo 5' y el segmento de extremo 3' y en el que cada nucleósido modificado dentro de cada segmento de extremo comprende un azúcar modificado, preferentemente comprende un azúcar 2'-O-metoxietilo; y en el que cada enlace internucleosídico es un enlace fosfotioato.

10 Estos patrones de nucleótidos modificados en un compuesto antisentido se denominan motivo. Estos motivos, confieren a los compuestos antisentido propiedades tales como potenciar la actividad inhibidora, aumentar la afinidad de unión por un ácido nucleico diana o aumentar la resistencia a la degradación por nucleasas *in vivo*.

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

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

25 Los compuestos antisentido que tienen un motivo de oligómero con huecos se consideran compuestos antisentido quiméricos. En un oligómero con huecos, una región interna que tiene una pluralidad de nucleótidos que soporta la escisión por RNasa H está situado entre regiones externas que tienen una pluralidad de nucleótidos que son químicamente distintos de los nucleósidos de la región interna. En el caso de un oligonucleótido antisentido que tiene un motivo de oligómero con huecos, el segmento hueco generalmente sirve como sustrato para la escisión por endonucleasas, mientras que los segmentos de extremo comprenden nucleósidos modificados. En una realización preferida, las regiones de un oligómero con huecos se diferencian por los tipos de restos de azúcar que comprenden cada región distinta. Los tipos de restos de azúcar que se usan para diferenciar las regiones de un oligómero con huecos pueden en algunas realizaciones incluir β -D-ribonucleósidos, β -D-desoxirribonucleósidos, nucleósidos 2'-modificados (tales nucleósidos 2'-modificados pueden incluir 2'-MOE) y 2'-O-CH₃, entre otros), y nucleósidos modificados con azúcar bicíclico (tales nucleósidos modificados con azúcar bicíclico pueden incluir aquellos que tienen un puente 4'-(CH₂)_nO-2', en el que n = 1 o n = 2). Preferentemente, cada región distinta comprende restos de azúcar uniformes. El motivo extremo-hueco-extremo se describe frecuentemente como "X-Y-Z", en el que "X" representa la longitud de la región de extremo 5', "Y" representa la longitud de la región del hueco, y "Z" representa la longitud de la región de extremo 3'. Cualquiera de los compuestos antisentido descritos en el presente documento puede tener un motivo de oligómero con huecos. En algunas realizaciones, X y Z son iguales, en otras realizaciones son diferentes. En una realización preferida, Y es de entre 8 y 15 nucleótidos. X, Y o Z pueden ser cualquiera de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30 o más nucleótidos. Por lo tanto, los oligómeros con huecos de la presente invención incluyen, pero sin limitación, por ejemplo 2-13-5, 5-10-5, 4-8-4, 4-12-3, 4-12-4, 3-14-3, 2-16-2, 1-18-1, 3-10-3, 2-10-2, 1-10-1 o 2-8-2.

35 En algunas realizaciones, el compuesto antisentido es un motivo de "oligómero de extremo", que tiene una configuración de extremo-hueco o hueco-extremo, es decir, una configuración X-Y o Y-Z como se describe anteriormente para la configuración del oligómero con huecos. Por lo tanto, las configuraciones de oligómero de extremo de la presente invención incluyen, pero sin limitación, por ejemplo 5-10, 8-4, 4-12, 12-4, 3-14, 16-2, 18-1, 10-3, 2-10, 1-10 u 8-2.

45 En una realización, los compuestos antisentido dirigidos a un ácido nucleico poseen un motivo de oligómero con huecos 2-13-5.

50 En algunas realizaciones, un compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico de CTGF tiene un motivo ampliado con huecos. En otras realizaciones, un oligonucleótido antisentido dirigido a un ácido nucleico de CTGF tiene un motivo ampliado con huecos.

55 En una realización, un oligonucleótido antisentido ampliado con huecos dirigido a un ácido nucleico de CTGF tiene un segmento hueco de catorce 2'-desoxirribonucleótidos situados entre segmentos de extremo de tres nucleósidos modificados químicamente. En una realización, la modificación química comprende una modificación 2' del azúcar. En otra realización, la modificación química comprende una modificación de azúcar 2'-MOE.

Los compuestos antisentido que tienen un motivo de oligómero con huecos se consideran compuestos antisentido "quiméricos" o "quimeras", que contienen dos o más regiones químicamente distintas, cada una compuesta de al menos una unidad monomérica, es decir, un nucleótido en el caso de un compuesto de oligonucleótidos. Estos

oligonucleótidos contienen normalmente al menos una región modificada para conferir al oligonucleótido una resistencia aumentada a la degradación por nucleasas, captación celular aumentada, afinidad de unión por el ácido nucleico diana aumentada y/o actividad inhibitoria aumentada. No es necesario que todas las posiciones en un compuesto dado se modifiquen uniformemente, y de hecho, más de una de las modificaciones mencionadas anteriormente pueden incorporarse en un único compuesto o incluso en un único nucleósido dentro de un oligonucleótido.

Una región adicional del oligonucleótido puede servir como un sustrato para enzimas capaces de escindir los híbridos de ARN:ADN o ARN:ARN. A modo de ejemplo, la RNasa H es una endonucleasa celular que escinde la cadena de ARN de un dúplex de ARN:ADN. La activación de la RNasa H, por lo tanto, da como resultado la escisión de la diana de ARN, lo que mejora enormemente la eficacia de la inhibición de la expresión génica de oligonucleótidos. Por consiguiente, con frecuencia se pueden obtener resultados comparables con oligonucleótidos más cortos cuando se usan oligonucleótidos quiméricos, en comparación con desoxi oligonucleótidos fosforotioato que hibridan con la misma región diana. La escisión de la diana de ARN puede detectarse rutinariamente por electroforesis en gel y, si es necesario, por técnicas asociadas de hibridación de ácidos nucleicos conocidas en la técnica.

Los compuestos antisentido quiméricos de la invención pueden formarse como estructuras compuestas de dos o más oligonucleótidos, oligonucleótidos modificados, oligonucleósidos y/o miméticos de oligonucleótidos como se describe anteriormente. Tales compuestos también se han denominado en la técnica híbridos u oligómeros con huecos. Las patentes representativas de los Estados Unidos que enseñan la preparación de tales estructuras híbridas incluyen, pero sin limitación, las Patentes de Estados Unidos números: 5.013.830; 5.149.797; 5.220.007; 5.256.775; 5.366.878; 5.403.711; 5.491.133; 5.565.350; 5.623.065; 5.652.355; 5.652.356; y 5.700.922, algunas de las cuales son del mismo solicitante de la presente solicitud.

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

Otra modificación de los oligonucleótidos de la invención implica unir químicamente al oligonucleótido uno o más restos o conjugados que potencian la actividad, la distribución celular o la captación celular del oligonucleótido. Los compuestos de la invención pueden incluir grupos conjugados unidos covalentemente a grupos funcionales tales como grupos hidroxilo primarios o secundarios. Los grupos conjugados de la invención incluyen intercaladores, moléculas informadoras, poliaminas, poliamidas, polietilenglicoles, poliéteres, grupos que potencian las propiedades farmacodinámicas de los oligómeros y grupos que potencian las propiedades farmacocinéticas de los oligómeros. Los grupos conjugados típicos incluyen colesterol, lípidos, fosfolípidos, biotina, fenazina, folato, fenantridina, antraquinona, acridina, fluoresceínas, rodaminas, cumarinas y colorantes. Los grupos que potencian las propiedades farmacodinámicas, en el contexto de la presente invención, incluyen grupos que mejoran la captación de los oligómeros, potencian la resistencia de los oligómeros a la degradación y/o refuerzan la hibridación específica de secuencia con ARN. Los grupos que potencian las propiedades farmacocinéticas, en el contexto de la presente invención, incluyen grupos que mejoran la captación, distribución, metabolismo o excreción de los oligómeros. Se desvelan grupos conjugados representativos en la Solicitud de Patente Internacional PCT/US92/09196, presentada el 23 de octubre, 1992. Los restos conjugados incluyen, pero sin limitación, restos lipídicos, tales como un resto de colesterol (Letsinger y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 6553-6556), ácido cólico (Manoharan y col., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4, 1053-1060), un tioéter, por ejemplo, hexil-S-tritilol (Manoharan y col., Ann. N. Y. Acad. Sci., 1992, 660, 306-309; Manoharan y col., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1993, 3, 2765-2770), un tiocolésterol (Oberhauser y col., Nucl. Acids Res., 1992, 20, 533-538), una cadena alifática, por ejemplo, restos de dodecandiol o undecilo (Saison-Behmoaras y col., EMBO J., 1991, 10, 1111-1118; Kabanov y col., FEBS Lett., 1990, 259, 327-330; Svinarchuk y col., Biochimie, 1993, 75, 49-54), un fosfolípido, por ejemplo, di-hexadecil-rac-glicerol o trietil-amonio 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato (Manoharan y col., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654; Shea y col., Nucl. Acids Res., 1990, 18, 3777-3783), una poliamina o una cadena de polietilenglicol (Manoharan y col., Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14, 969-973), o ácido acético adamantano (Manoharan y col., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654), un resto palmitilo (Mishra y col., Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264, 229-237), o un resto de octadecilamina o de hexilamino-carbonilcolesterol (Crooke y col., J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277, 923-937). Los oligonucleótidos de la invención también pueden conjugarse con fármacos activos, por ejemplo, aspirina, warfarina, fenilbutazona, ibuprofeno, suprofeno, fenbupfeno, ketoprofeno, (S)-(+)-pranoprofeno, carprofeno, dansilsarcosina, ácido 2,3,5-triyodobenzoico, ácido flufenámico, ácido folínico, una benzotiadiazida, clorotiazida, una diazepamina, indometicina, un barbitúrico, una cefalosporina, un fármaco sulfa, un antidiabético, un antibacteriano o un antibiótico. Los conjugados oligonucleótido-fármaco y su preparación se describen en la solicitud de patente de EE.UU. Número de serie 09/334.130 (presentada el 15 de junio de 1999).

Las patentes representativas de los Estados Unidos que enseñan la preparación de tales conjugados de oligonucleótidos incluyen, pero sin limitación, las Patentes de Estados Unidos números: 4.828.979; 4.948.882;

5.218.105; 5.525.465; 5.541.313; 5.545.730; 5.552.538; 5.578.717, 5.580.731; 5.580.731; 5.591.584; 5.109.124; 5.118.802; 5.138.045; 5.414.077; 5.486.603; 5.512.439; 5.578.718; 5.608.046; 4.587.044; 4.605.735; 4.667.025; 4.762.779; 4.789.737; 4.824.941; 4.835.263; 4.876.335; 4.904.582; 4.958.013; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.245.022; 5.254.469; 5.258.506; 5.262.536; 5.272.250; 5.292.873; 5.317.098; 5.371.241, 5.391.723; 5.416.203, 5.451.463; 5.510.475; 5.512.667; 5.514.785; 5.565.552; 5.567.810; 5.574.142; 5.585.481; 5.587.371; 5.595.726; 5.597.696; 5.599.923; 5.599.928 y 5.688.941, algunas de las cuales son del mismo solicitante de la presente solicitud.

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

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

En una realización de la invención, la composición comprende un oligonucleótido modificado que comprende nucleósidos unidos, cuya secuencia de nucleobases es una secuencia establecida en una de las SEQ ID NO: 39, 40 y 166 o una sal de los mismos, y un transportador o diluyente farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables son bien conocidas por los expertos en la materia.

15

En una realización de la invención, el compuesto antisentido es complementario dentro de un intervalo de nucleótidos en la secuencia de CTGF. En determinadas realizaciones, el compuesto antisentido es complementario dentro del intervalo de los nucleótidos 1388-1423, y en determinadas ocasiones de la divulgación es complementario a los nucleótidos 718-751, 1457-1689, 2040-2069, 2120-2147 o 2267-2301, de la SEQ ID NO: 9. En una determinada ocasión, el compuesto antisentido es complementario dentro del intervalo de los nucleótidos 2728-2797 de la SEQ ID NO: 10. Los compuestos dirigidos a estos intervalos demuestran al menos un 50% de inhibición (es decir, las SEQ ID NO: 15, 29, 31, 42, 46-49, 53, 72, 81, 82, 152-154, 164 y 165). Determinados sitios diana enumerados en la Tabla 1 también demuestran al menos un 50% de inhibición (es decir, las SEQ ID NO: 12, 20, 33, 34, 76, 107, 129, 132, 134, 136 y 146). En determinadas ocasiones, el compuesto antisentido es complementario dentro del intervalo de los nucleótidos 553-611, 1394-1423, 1469-1508, 1559-1605, 1659-1689 o 2100-2129 de la SEQ ID NO: 9 y 2623-2647 de la SEQ ID NO: 10. Los compuestos dirigidos a los mismos muestran al menos un 60% de inhibición (es decir, las SEQ ID NO: 27, 28, 38, 39, 40, 43, 44, 45, 50, 51, 52, 54, 55, 56, 77, 78, 79, 138 y 139). Determinados sitios diana adicionales enumerados en la Tabla 1 también demuestran al menos un 60% de inhibición (es decir, las SEQ ID NO: 24, 30, 61, 63, 67, 69, 73, 86, 125, 128 y 161). En determinadas realizaciones, el compuesto antisentido es complementario dentro del intervalo de los nucleótidos 1399-1423. Los compuestos dirigidos a los mismos muestran al menos un 70 % de inhibición (es decir, las SEQ ID NO: 39 y 40). Determinados sitios diana enumerados en la Tabla 1 también demuestran al menos un 70 % de inhibición (es decir, las SEQ ID NO: 28, 30, 44, 45, 51, 56, 78, 128, y 138). Un sitio diana enumerado en la Tabla 1 también demuestra al menos un 80% de inhibición (es decir, la SEQ ID NO: 44). En determinadas realizaciones, el porcentaje de inhibición se logra cuando el compuesto antisentido se suministra a las células HuVec a una concentración de 50 nm. Consúltese el Ejemplo 8, proporcionado en el presente documento a continuación, para obtener más detalles.

20

25

30

35

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

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

Los oligonucleótidos antisentido se pueden combinar con sustancias farmacéuticamente aceptables activas y/o inertes para la preparación de composiciones o formulaciones farmacéuticas. Las composiciones y los procedimientos para la formulación de composiciones farmacéuticas dependen de varios criterios, incluidos, pero sin limitación, la vía de administración, extensión de la enfermedad, o dosis a administrar.

45

El compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico se puede utilizar en composiciones farmacéuticas combinando el compuesto antisentido con un diluyente o transportador adecuado farmacéuticamente aceptable. Un diluyente farmacéuticamente aceptable incluye solución salina tamponada con fosfato (PBS). PBS es un diluyente adecuado para su uso en composiciones para ser suministradas por vía parenteral. Por consiguiente, en una realización, en los procedimientos descritos en el presente documento se emplea una composición farmacéutica que comprende un compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico y un diluyente farmacéuticamente aceptable. En una realización, el diluyente farmacéuticamente aceptable es PBS. En otra realización, el diluyente farmacéuticamente aceptable es solución salina de grado de producto farmacéutico o PBS de grado de producto farmacéutico. En otras realizaciones, el compuesto antisentido es un oligonucleótido antisentido.

50

55

Las composiciones farmacéuticas que comprenden compuestos antisentido abarcan cualquier sal, ésteres o sales de tales ésteres farmacéuticamente aceptables, o cualquier otro oligonucleótido que, tras la administración a un animal, incluyendo a un ser humano, es capaz de proporcionar (directa o indirectamente) el metabolito

biológicamente activo o resto del mismo. Por consiguiente, por ejemplo, la divulgación también se dirige a sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos antisentido, profármacos, sales farmacéuticamente aceptables de tales profármacos y otros bioequivalentes. Las sales farmacéuticamente aceptables adecuadas incluyen, pero sin limitación, sales de sodio y potasio.

- 5 Un profármaco puede incluir la incorporación de nucleósidos adicionales en uno o ambos extremos de un compuesto antisentido que se escinden por nucleasas endógenas dentro del cuerpo, para formar el compuesto antisentido activo. En particular, las versiones de profármacos de los oligonucleótidos de la invención se preparan como derivados de SATE [(S-acetil-2-tioetil) fosfato] de acuerdo con los procedimientos desvelados en el documento WO 93/24510 de Gosselin y col., publicado el 9 de diciembre de 1993 o en el documento WO 94/26764 y Patente de los Estados Unidos N° 5.770.713 de Imbach y col.

El término "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales fisiológicamente y farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la invención: es decir, sales que retienen la actividad biológica deseada del precursor y no imparten efectos toxicológicos indeseados al mismo.

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

- Para los oligonucleótidos, los ejemplos preferidos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación (a) sales formadas con cationes tales como sodio, potasio, amonio, magnesio, calcio, poliaminas tales como espermina y espermidina, etc.; (b) sales de adición de ácido formadas con ácidos inorgánicos, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido nítrico y similares; (c) sales formadas con ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, ácido acético, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido glucónico, ácido cítrico, ácido málico, ácido ascórbico, ácido benzoico, ácido tánico, ácido palmítico, ácido algínico, ácido poliglucámico, ácido naftalenosulfónico, ácido metanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido naftalenodisulfónico, ácido poligalacturónico y similares; y (d) sales formadas a partir de aniones elementales tales como cloro, bromo y yodo.

- En determinada realización de la invención, un transportador o diluyente farmacéuticamente aceptable es un ingrediente en una composición que carece de actividad farmacológica, pero es farmacéuticamente necesario o deseable como disolvente, agente de suspensión o cualquier otro vehículo farmacéuticamente inerte para suministrar uno o más ácidos nucleicos a un ser humano o animal no humano. Tales transportadores farmacéuticos son bien conocidos por aquellos expertos en la materia.

Transportadores

- Determinadas composiciones de la presente invención también incorporan compuestos transportadores en la formulación. Tal como se usa en el presente documento, "compuesto transportador" o "transportador" puede

referirse a un ácido nucleico, o análogo del mismo, que es inerte (es decir, no posee actividad biológica per se) pero se reconoce como un ácido nucleico por procesos *in vivo* que reducen la biodisponibilidad de un ácido nucleico que tiene actividad biológica, por ejemplo, degradando el ácido nucleico biológicamente activo o promoviendo su eliminación de la circulación. La administración conjunta de un ácido nucleico y un compuesto transportador, generalmente con un exceso de la última sustancia, puede dar como resultado una reducción sustancial de la cantidad de ácido nucleico recuperado en el hígado, riñón u otros reservorios extracirculatorios, probablemente debido a la competencia entre el compuesto transportador y el ácido nucleico para un receptor común. Por ejemplo, la recuperación de un oligonucleótido parcialmente fosforotioato en el tejido hepático puede reducirse cuando se coadministra junto con ácido poliinosínico, sulfato de dextrano, ácido policitídico o ácido 4-acetamido-4'-isotiocianostilbeno-2,2'-disulfónico (Miyao y col., *Antisense Res. Dev.*, 1995, 5, 115-121; Takakura y col., *Antisense & Nucl. Acid Drug Dev.*, 1996, 6, 177-183).

Excipientes

En comparación con un compuesto transportador, un "transportador farmacéutico" o "excipiente" es un disolvente, agente de suspensión o cualquier otro vehículo farmacológicamente inerte farmacéuticamente aceptable para suministrar uno o más ácidos nucleicos a un animal. El excipiente puede ser líquido o sólido y se selecciona, teniendo en cuenta la forma planificada de administración, para proporcionar el volumen deseado, la consistencia, etc., cuando se combina con un ácido nucleico y los otros componentes de una composición farmacéutica dada. Los transportadores farmacéuticos típicos incluyen, pero sin limitación, agentes aglutinantes (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa, etc.); cargas (por ejemplo, lactosa y otros azúcares, celulosa microcristalina, pectina, gelatina, sulfato de calcio, etilcelulosa, poliacrilatos o hidrógeno fosfato de calcio, etc.); lubricantes (p.ej., estearato de magnesio, talco, sílice, dióxido de silicio coloidal, ácido esteárico, estearatos metálicos, aceites vegetales hidrogenados, almidón de maíz, polietilenglicoles, benzoato sódico, acetato sódico, etc.); disgregantes (p.ej., almidón, glicolato de almidón de sodio, etc.); y agentes humectantes (p.ej., laurilsulfato de sodio, etc.).

También se puede usar el excipiente orgánico o inorgánico farmacéuticamente aceptable adecuado para la administración no parenteral que no reacciona de forma perjudicial con los ácidos nucleicos para formular las composiciones de la presente invención. Los transportadores farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, pero sin limitación, agua, soluciones salinas, alcoholes, polietilenglicoles, gelatina, lactosa, amilosa, estearato de magnesio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidona y similares.

Las formulaciones para la administración tópica de ácidos nucleicos pueden incluir soluciones acuosas estériles y no estériles, soluciones no acuosas en disolventes comunes tales como alcoholes, o soluciones de los ácidos nucleicos en bases de aceite líquido o sólido. Las soluciones también pueden contener tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados. Se pueden usar excipientes orgánicos o inorgánicos farmacéuticamente aceptables adecuados para administración no parenteral que no reaccionan de manera perjudicial con los ácidos nucleicos.

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

Otra ocasión de la divulgación implica un procedimiento para inhibir la expresión del factor de crecimiento de tejido conectivo en una célula o un tejido que comprende poner en contacto la célula o el tejido con uno cualquiera de los compuestos mencionados anteriormente en condiciones tales que se inhiba la expresión del factor de crecimiento de tejido conectivo.

Una determinada ocasión de la divulgación implica un procedimiento para tratar a un animal que tiene una enfermedad o afección asociada con la expresión del factor de crecimiento de tejido conectivo, que comprende administrar al animal una cantidad del compuesto descrito anteriormente en el presente documento eficaz para inhibir la expresión del factor de crecimiento de tejido conectivo para tratar, de este modo, al animal.

En la práctica del uso médico de la presente invención o el procedimiento de esta divulgación, un animal incluye tanto un ser humano como un animal no humano, preferentemente ser humano.

La presente invención también incluye composiciones y formulaciones farmacéuticas que incluyen los compuestos antisentido de la invención. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse en una cantidad de modos dependiendo de si se desea un tratamiento local o sistémico y del área a tratar. La administración puede ser por administración intradérmica, incluyendo el enhebrado intradérmico de la aguja de inyección, subcutánea, tópica (incluso oftálmica y de membranas mucosas, incluida la administración vaginal y rectal), pulmonar, por ejemplo, por inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, que incluyen mediante nebulizador; intratraqueal, intranasal, epidérmica y transdérmica), oral o parenteral. La administración parenteral incluye la inyección o infusión intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular; o intracraneal, por ejemplo, administración intratecal o intraventricular.

Las composiciones y formulaciones farmacéuticas para administración tópica pueden incluir parches transdérmicos, pomadas, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, pulverizadores, líquido y polvos. Pueden ser necesarios o

deseables transportadores farmacéuticos convencionales, bases acuosas, en polvo o aceitosas, espesantes y similares. También pueden ser útiles condones, guantes y similares recubiertos. Las formulaciones tópicas e intradérmicas preferidas incluyen aquellas en las que los oligonucleótidos de la invención se mezclan con un agente de suministro tópico tal como lípidos, liposomas, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, esteroides, agentes quelantes y tensioactivos. Los lípidos y liposomas preferidos incluyen neutros (por ejemplo, dioleoilfosfatidil DOPE etanolamina, dimiristoilfosfatidilcolina DMPC, diestearoilfosfatidilcolina) negativos ((por ejemplo, dimiristoilfosfatidil glicerol DMPG) y catiónicos (por ejemplo, dioleoiltetrametilaminopropil DOTAP y dioleoilfosfatidil etanolamina DOTMA). Los oligonucleótidos de la invención pueden encapsularse dentro de liposomas o pueden formar complejos con los mismos, en particular con liposomas catiónicos. Como alternativa, los oligonucleótidos se pueden complejar con lípidos, en particular con lípidos catiónicos. Los ácidos grasos y ésteres preferidos incluyen, pero sin limitación, ácido araquidónico, ácido oleico, ácido eicosanoico, ácido láurico, ácido caprílico, ácido cáprico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoleico, ácido linolénico, dicaprato, tricaprato, monooleín, dilaurín, 1-monocaprato de glicerilo, 1-dodecilazacicloheptano-2-ona, una acilcarnitina, una acilcolina o un éster de alquilo C₁₋₁₀ (por ejemplo, isopropilmiristato IPM), monoglicérido, diglicérido o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos. Las formulaciones tópicas se describen en detalle en la solicitud de patente de EE.UU. Número de serie. 09/315.298 presentada el 20 de mayo de 1999.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen, pero sin limitación, soluciones, emulsiones y formulaciones que contienen liposomas. Estas composiciones pueden generarse a partir de una variedad de componentes que incluyen, pero sin limitación, líquidos preformados, sólidos autoemulsionantes y semisólidos autoemulsionantes.

Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención, que se pueden presentar convenientemente en una forma de dosificación unitaria, pueden prepararse de acuerdo con técnicas convencionales bien conocidas en la industria farmacéutica. Tales técnicas incluyen la etapa de asociar los principios activos con el/los transportador(es) o excipiente(s) farmacéutico(s). En general, las formulaciones se preparan asociando de forma uniforme y estrecha los principios activos con transportadores líquidos o transportadores sólidos finamente divididos o ambos y, a continuación, si es necesario, moldear el producto.

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

En una realización de la presente invención, las composiciones farmacéuticas pueden formularse y usarse como espumas. Las espumas farmacéuticas incluyen formulaciones tales como, pero sin limitación, emulsiones, microemulsiones, cremas, gelatinas y liposomas. Si bien son básicamente similares en naturaleza, estas formulaciones varían en los componentes y la consistencia del producto final. La preparación de tales composiciones y formulaciones es generalmente conocida por los expertos en la técnica farmacéutica y de formulación y puede aplicarse a la formulación de las composiciones de la presente invención.

Liposomas

Hay muchas estructuras tensioactivas organizadas además de las microemulsiones que se han estudiado y utilizado para la formulación de fármacos. Estas incluyen monocapas, micelas, bicapas y vesículas. Las vesículas, tales como liposomas, han atraído un gran interés debido a su especificidad y a la duración de la acción que ofrecen desde el punto de vista del suministro de fármacos. Como se usa en la presente invención, el término "liposoma" significa una vesícula compuesta de lípidos anfífilicos dispuestos en una bicapa o bicapas esféricas.

Los liposomas son vesículas unilamelares o multilamelares que tienen una membrana formada por un material lipófilo y un interior acuoso. La parte acuosa contiene la composición a suministrar. Los liposomas catiónicos poseen la ventaja de poder fusionarse con la pared celular. Los liposomas no catiónicos, aunque no son capaces de fusionarse tan eficientemente con la pared celular, son captados por los macrófagos *in vivo*.

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

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

Los liposomas son útiles para la transferencia y suministro de principios activos al sitio de acción. Debido a que la membrana liposómica es estructuralmente similar a las membranas biológicas, cuando los liposomas se aplican a un tejido, los liposomas comienzan a fusionarse con las membranas celulares. A medida que la fusión del liposoma y la célula progresa, los contenidos de los liposomas se vacían en la célula donde puede actuar el agente activo.

- 5 Las formulaciones liposómicas han sido el foco de una extensa investigación así como el modo de suministro de muchos fármacos. Existe una creciente evidencia de que, para la administración intradérmica y tópica, los liposomas presentan varias ventajas sobre otras formulaciones. Tales ventajas incluyen efectos secundarios reducidos relacionados con la alta absorción sistémica del fármaco administrado, el aumento de la acumulación del fármaco administrado en la diana deseada y la capacidad de administrar una amplia variedad de fármacos, tanto hidrófilos como hidrófobos, en la piel.

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

- 15 Los liposomas se dividen en dos clases amplias. Los liposomas catiónicos son liposomas cargados positivamente que interactúan con las moléculas de ADN cargadas negativamente para formar un complejo estable. El complejo de ADN/liposoma cargado positivamente se une a la superficie celular cargada negativamente y se internaliza en un endosoma. Debido al pH ácido dentro del endosoma, los liposomas se rompen, liberando su contenido en el citoplasma celular (Wang y col., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1987, 147, 980-985).

- 20 Los liposomas que son sensibles al pH o cargados negativamente, atrapan el ADN en lugar de formar complejos con él. Debido a que tanto el ADN como los lípidos están cargados de manera similar, se produce repulsión en lugar de la formación de complejos. No obstante, algo de ADN se atrapa dentro del interior acuoso de estos liposomas. Se han usado liposomas sensibles al pH para suministrar ADN que codifica el gen de la timidina quinasa en monocapas de células en cultivo. La expresión del gen exógeno se detectó en las células diana (Zhou y col., *Journal of Controlled Release*, 1992, 19, 269-274).

- Un tipo principal de composición liposómica incluye fosfolípidos distintos de la fosfatidilcolina de origen natural. Las composiciones de liposomas neutros, por ejemplo, pueden formarse a partir de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) o dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC). Las composiciones de liposomas aniónicos generalmente se forman a partir de dimiristoilfosfatidilglicerol, mientras que los liposomas fusogénicos aniónicos se forman principalmente a partir de dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE). Otro tipo de composición liposómica se forma a partir de fosfatidilcolina (PC) tal como, por ejemplo, PC de soja y PC de huevo. Otro tipo se forma a partir de mezclas de fosfolípidos y/o fosfatidilcolina y/o colesterol.

- 35 Varios estudios han evaluado el suministro tópico de formulaciones de fármacos liposómicos a la piel. La aplicación de liposomas que contienen interferón a la piel de cobaya dio como resultado una reducción de las llagas de herpes en la piel, mientras que el suministro de interferón por otros medios (por ejemplo, como una solución o como una emulsión) fue ineficaz (Weiner y col., *Journal of Drug Targeting*, 1992, 2, 405-410). Adicionalmente, un estudio adicional probó la eficacia del interferón administrado como parte de una formulación liposómica para la administración de interferón usando un sistema acuoso, y concluyó que la formulación liposómica era superior a la administración acuosa (du Plessis y col., *Antiviral Research*, 1992, 18, 259-265).

- 40 Los sistemas liposómicos no iónicos también se han examinado para determinar su utilidad en el suministro de fármacos a la piel, en particular los sistemas que comprenden tensioactivo no iónico y colesterol. Se utilizaron formulaciones liposómicas no iónicas que comprenden Novasome™ I (dilaurato de glicerilo/colesterol/polioxietileno - 10-estearil éter) y Novasome™ II (diestearato de glicerilo/colesterol/polioxietileno-10-estearil éter) para suministrar ciclosporina-A en la dermis de piel de ratón. Los resultados indicaron que tales sistemas liposómicos no iónicos fueron eficaces para facilitar la deposición de ciclosporina-A en diferentes capas de la piel (Hu y col. *S.T.P. Pharma. Sci.*, 1994, 4, 6, 466).

- Los liposomas también incluyen liposomas "estabilizados estéricamente", un término que, como se usa en el presente documento, se refiere a los liposomas que comprenden uno o más lípidos especializados que, cuando se incorporan a los liposomas, dan como resultado duración de vida en circulación mejorados en relación con los liposomas que carecen de tales lípidos especializados. Ejemplos de liposomas estabilizados estéricamente son aquellos en los que parte de la porción lipídica formadora de vesículas del liposoma (A) comprende uno o más glicolípidos, como el monosialogangliósido G_{M1}, o (B) se derivatiza con uno o más polímeros hidrófilos, tal como un resto de polietilenglicol (PEG). Aunque sin desear quedar ligado a teoría alguna particular, se piensa en la técnica que, al menos para los liposomas estabilizados estéricamente que contienen gangliósidos, esfingomielina o lípidos derivatizados de PEG, la semivida en circulación mejorada de estos liposomas estabilizados estéricamente deriva de una absorción reducida en las células del sistema reticuloendotelial (RES). (Allen y col., *FEBS Letters*, 1987, 223, 42; Wu y col., *Cancer Research*, 1993, 53, 3765).

En la técnica se conocen diversos liposomas que comprenden uno o más glicolípidos. Papahadjopoulos y col. (*Ann.*

N. Y. Acad. Sci., 1987, 507, 64) informaron sobre la capacidad del monosialogangliósido G_{M1} , el sulfato de galactocerebrósido y el fosfatidilinositol para mejorar la semivida en sangre de los liposomas. Estos hallazgos fueron explicados por Gabizon y col. (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1988, 85, 6949). Las patentes de Estados Unidos N.º 4.837.028 y WO 88/04924, ambas de Allen y col., desvelan liposomas que comprenden (1) esfingomielina y (2) el gangliósido G_{M1} o un éster de sulfato de galactocerebrósido. La Patente de EE.UU. N.º 5.543.152 (Webb y col.) desvela liposomas que comprenden esfingomielina. Los liposomas que comprenden 1,2-sn-dimiristoilfosfatidilcolina se desvelan en el documento WO 97/13499 (Lim y col.).

Muchos liposomas que comprenden lípidos derivatizados con uno o más polímeros hidrófilos, y procedimientos de preparación de los mismos, son conocidos en la técnica. Sunamoto y col. (Bull. Chem. Soc. Jpn., 1980, 53, 2778) describieron liposomas que comprenden un detergente no iónico, 2C₁₂ 15G, que contiene un resto de PEG. Ilium y col. (FEBS Lett., 1984, 167, 79) señalaron que el recubrimiento hidrófilo de partículas de poliestireno con glicoles poliméricos da como resultado semividas en sangre significativamente mejoradas. Los fosfolípidos sintéticos modificados por la unión de grupos carboxílicos de polialquilenglicoles (por ejemplo, PEG) se describen por Sears (Patentes de Estados Unidos números 4.426.330 y 4.534.899). Klibanov y col. (FEBS Lett., 1990, 268, 235) describieron experimentos que demuestran que los liposomas que comprenden fosfatidiletanolamina (PE) derivatizada con estearato de PEG o PEG tienen aumentos significativos de las semividas en la circulación sanguínea. Blume y col. (Biochimica et Biophysica Acta, 1990, 1029, 91) extendieron tales observaciones de otros fosfolípidos derivatizados con PEG, por ejemplo, DSPE-PEG, formado a partir de la combinación de distearoilfosfatidiletanolamina (DSPE) y PEG. Los liposomas que tienen restos de PEG unidos covalentemente en su superficie externa se describen en la Patente Europea Número EP 0 445 131 B1 y en el documento WO 90/04384 de Fisher. Las composiciones de liposomas que contienen 1-20 por ciento en moles de PE derivatizado con PEG, y los procedimientos de uso de los mismos, se describen por Woodle y col. (Patentes de Estados Unidos números 5.013.556 y 5.356.633) y Martin y col. (Patente de Estados Unidos número 5.213.804 y Patente Europea Número EP 0 496 813 B1). Los liposomas que comprenden varios conjugados de lípidos y polímeros diferentes se desvelan en el documento WO 91/05545 y en la patente de EE.UU. Número 5.225.212 (ambos de Martin y col.) y en el documento WO 94/20073 (Zalipsky y col.) Los liposomas que comprenden lípidos de ceramida modificados con PEG se describen en el documento WO 96/10391 (Choi y col.). Las Patentes de EE.UU. número 5.540.935 (Miyazaki y col.) y 5.556.948 (Tagawa y col.) describen liposomas que contienen PEG que pueden derivatizarse adicionalmente con restos funcionales en sus superficies.

Se conoce en la técnica un número limitado de liposomas que comprenden ácidos nucleicos. El documento WO 96/40062 de Thierry y col. desvela procedimientos para encapsular ácidos nucleicos de alto peso molecular en liposomas. La Patente de EE.UU. N.º 5.264.221 de Tagawa y col. desvela liposomas unidos a proteínas y afirma que el contenido de tales liposomas puede incluir un ARN antisentido. La Patente de EE.UU. N.º 5.665.710 de Rahman y col. describe determinados procedimientos de encapsulación de oligodesoxinucleótidos en liposomas. El documento WO 97/04787 de Love y col. desvela liposomas que comprenden oligonucleótidos antisentido dirigidos al gen raf.

Los transferosomas son otro tipo de liposomas, y son agregados lipídicos altamente deformables que son candidatos atractivos para vehículos de suministro de fármacos. Los transferosomas pueden describirse como gotitas de lípidos que son tan altamente deformables que pueden penetrar fácilmente a través de poros que son más pequeños que la gotita. Los transferosomas se pueden adaptar al entorno en el que se utilizan, por ejemplo, se optimizan a sí mismos (se adaptan a la forma de los poros de la piel), se reparan a sí mismos, alcanzan con frecuencia sus dianas sin fragmentarse y, a menudo, se cargan a sí mismos. Para hacer los transferosomas es posible agregar activadores de borde de superficie, generalmente tensioactivos, a una composición liposómica convencional. Los transferosomas se han utilizado para suministrar albúmina sérica a la piel. Se ha demostrado que el suministro mediado por transferosoma de albúmina sérica es tan eficaz como la inyección subcutánea de una solución que contiene albúmina sérica.

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

Si la molécula de tensioactivo no está ionizada, se clasifica como un tensioactivo no iónico. Los tensioactivos no iónicos encuentran una amplia aplicación en productos farmacéuticos y cosméticos y se pueden utilizar en un amplio intervalo de valores de pH. En general, sus valores HLB varían de 2 a aproximadamente 18 dependiendo de su estructura. Los tensioactivos no iónicos incluyen ésteres no iónicos tales como ésteres de etilenglicol, ésteres de propilenglicol, ésteres de glicerilo, ésteres de poliglicerilo, ésteres de sorbitán, ésteres de sacarosa y ésteres etoxilados. También se incluyen en esta clase las alcanolamidas y éteres no iónicos, tales como los etoxilatos de alcohol graso, los alcoholes propoxilados y los polímeros de bloques etoxilados/propoxilados. Los tensioactivos de polioxitileno son los miembros más populares de la clase de tensioactivos no iónicos.

Si la molécula de tensioactivo tiene una carga negativa cuando se disuelve o dispersa en agua, el tensioactivo se clasifica como aniónico. Los tensioactivos aniónicos incluyen carboxilatos tales como jabones, acil lactilatos,

acilamidas de aminoácidos, ésteres de ácido sulfúrico tales como alquilsulfatos y alquilsulfatos etoxilados, sulfonatos tales como alquilbencenosulfonatos, acilisotionatos, aciltauratos y sulfosuccinatos y fosfatos. Los miembros más importantes de la clase de tensioactivos aniónicos son los alquilsulfatos y los jabones.

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

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

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

Potenciadores de la Penetración

- 15 En una realización, la presente invención emplea varios potenciadores de la penetración para efectuar el suministro eficaz de ácidos nucleicos, particularmente oligonucleótidos, a la piel de los animales. La mayoría de los fármacos están presentes en solución tanto en forma ionizada como no ionizada. Sin embargo, en general, solo los fármacos solubles en lípidos o lipófilos atraviesan fácilmente las membranas celulares. Se ha descubierto que incluso los fármacos no lipófilos pueden atravesar las membranas celulares si la membrana que se va a cruzar se trata con un potenciador de la penetración. Además de ayudar a la difusión de fármacos no lipófilos a través de las membranas celulares, los potenciadores de la penetración también potencian la permeabilidad de los fármacos lipófilos.

- 20 Los potenciadores de la penetración pueden clasificarse como pertenecientes a una de cinco categorías amplias, es decir, tensioactivos, ácidos grasos, sales biliares, agentes quelantes, y no quelantes no tensioactivos (Lee y col., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, pág. 92). Cada una de las clases de potenciadores de la penetración mencionadas anteriormente se describen a continuación con mayor detalle.

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

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

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

- 55 Agentes Quelantes: Los agentes quelantes, como se usa en relación con la presente invención, se pueden definir como compuestos que eliminan los iones metálicos de la solución formando complejos con ellos, con el resultado de que se potencia la absorción de oligonucleótidos a través de la mucosa. Con respecto a su uso como potenciadores de la penetración en la presente invención, los agentes quelantes tienen la ventaja añadida de que también sirven como inhibidores de la DNasa, ya que la mayoría de las nucleasas de ADN caracterizadas requieren un ion metálico

divalente para la catálisis y, por lo tanto, son inhibidas por los agentes quelantes (Jarrett, J. *Chromatogr.*, 1993, 618, 315-339). Los agentes quelantes de la invención incluyen, pero sin limitación, etilendiaminotetraacetato disódico (EDTA), ácido cítrico, salicilatos (por ejemplo, salicilato de sodio, 5-metoxisalicilato y homovanilato), derivados de N-acilo de colágeno, laurth-9 y de N-amino acilo derivados de beta-dicetonas (enaminas) (Lee y col., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, página 92; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33; Buur y col., *J. Control Rel.*, 1990, 14, 43-51).

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

Los agentes que potencian la captación de oligonucleótidos a nivel celular también pueden añadirse a las composiciones farmacéuticas y otras de la presente invención. Por ejemplo, los lípidos catiónicos, como la lipofectina (Junichi y col., *Patente de Estados Unidos N.º 5.705.188*), derivados catiónicos de glicerol y moléculas policatiónicas, tal como la polilisina (Lollo y col., *solicitud PCT WO 97/30731*), también se sabe que potencian la captación celular de oligonucleótidos.

Se pueden utilizar otros agentes para potenciar la penetración de los ácidos nucleicos administrados en y a través de la piel, incluyendo glicoles como etilenglicol y propilenglicol, pirroles tal como 2-pirrol, azonas y terpenos como limoneno y mentona.

Otros Componentes

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

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

En otra realización relacionada, las composiciones de la invención pueden contener uno o más compuestos antisentido, particularmente oligonucleótidos, dirigidos a un primer ácido nucleico y uno o más compuestos antisentido adicionales dirigidos a una segunda diana de ácido nucleico. Numerosos ejemplos de compuestos antisentido son conocidos en la técnica. Dos o más compuestos combinados se pueden usar juntos o secuencialmente.

Los compuestos antisentido usados de acuerdo con la presente invención pueden prepararse de manera conveniente y rutinaria mediante la técnica bien conocida de síntesis en fase sólida. Los compuestos de la invención también se pueden mezclar, encapsular, conjugar o asociar de otra manera con otras moléculas, estructuras moleculares o mezclas de compuestos, como por ejemplo, liposomas, moléculas dirigidas a receptores, formulaciones orales, rectales, tópicas u otras, para ayudar en la captación, distribución y/o absorción. Las patentes representativas de los Estados Unidos que enseñan la preparación de tales formulaciones que ayudan para la captación, distribución y/o absorción incluyen, pero sin limitación, las Patentes de Estados Unidos números: 5.108.921; 5.354.844; 5.416.016; 5.459.127; 5.521.291; 5.543.158; 5.547.932; 5.583.020; 5.591.721; 4.426.330; 4.534.899; 5.013.556; 5.108.921; 5.213.804; 5.227.170; 5.264.221; 5.356.633; 5.395.619; 5.416.016; 5.417.978; 5.462.854; 5.469.854; 5.512.295; 5.527.528; 5.534.259; 5.543.152; 5.556.948; 5.580.575; y 5.595.756.

Determinadas Indicaciones

La especificidad y la sensibilidad del antisentido también son aprovechadas por aquellos expertos en la materia para usos terapéuticos. Se han empleado oligonucleótidos antisentido como restos terapéuticos en el tratamiento de estados patológicos en animales y en el hombre. Los fármacos de oligonucleótidos antisentido, incluidas las ribozimas, se han administrado de forma segura y eficaz a seres humanos y actualmente se están realizando

numerosos ensayos clínicos. Por tanto, se establece que los oligonucleótidos pueden ser modalidades terapéuticas útiles que pueden configurarse para ser útiles en regímenes de tratamiento para el tratamiento de células, tejidos y animales, especialmente seres humanos.

5 En una ocasión de la divulgación, el procedimiento comprende tratar una enfermedad o afección, en la que la enfermedad o trastorno es una enfermedad fibrótica. En una ocasión del procedimiento de la divulgación, la enfermedad fibrótica es cicatrización hipertrófica, queloides, cicatrización de la piel, fibrosis hepática, fibrosis pulmonar, fibrosis renal, fibrosis cardíaca o restenosis.

10 En otra ocasión, el procedimiento comprende adicionalmente tratar la enfermedad o afección mencionada anteriormente, en la que la enfermedad o trastorno es fibrosis articular (incluido el síndrome del hombro congelado, lesión del nervio periférico y del tendón), adherencias quirúrgicas, daño de la médula espinal, derivación coronaria, adherencias abdominales y peritoneales (incluidas endometriosis, leiomiomas uterinos y fibroides), queratotomy radial y queratectomía fotorrefractiva, cirugía de reinserción retiniana, fibrosis mediada por dispositivo (en la diabetes por ejemplo), adherencias tendinosas, contractura de Dupuytren o esclerodermia.

15 En otra realización de la invención también se proporciona un uso médico para reducir la cicatrización hipertrófica o los queloides resultantes de la cicatrización de heridas dérmicas en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad de compuesto de un oligonucleótido antisentido eficaz para inhibir la expresión del factor crecimiento de tejido conectivo (CTGF) en el sujeto para reducir, de este modo, la cicatrización.

20 Se cree que la formulación de composiciones terapéuticas y su posterior administración está dentro de la experiencia de los expertos en la materia. La dosificación depende de la gravedad y la capacidad de respuesta de la patología a tratar, del curso del tratamiento que dura desde varios días hasta varios meses, o hasta que se efectúe una cura o se logre una disminución de la patología. En general, se utiliza una dosis de 0,1 a 25 mg por inyección por cm lineal de cicatriz, y se puede administrar diariamente, semanalmente, cada 3 semanas, mensualmente o bimensualmente.

25 En otra realización de la presente invención, el uso médico comprende además reducir la cicatrización hipertrófica o los queloides resultantes de la cicatrización de la herida dérmica, en el que la cicatrización de la herida es la curación de una herida seleccionada del grupo que consiste en rotura de la piel, incisiones quirúrgicas y quemaduras.

30 En determinadas realizaciones, la invención proporciona usos médicos para tratar a un individuo que comprende administrar una o más composiciones farmacéuticas de la presente invención. En determinadas realizaciones, el individuo tiene uno de los trastornos mencionados anteriormente. En determinadas realizaciones, el individuo está en riesgo de padecer uno de los trastornos mencionados anteriormente. En determinadas realizaciones, el individuo ha sido identificado como en necesidad de terapia. En determinadas realizaciones, la invención proporciona procedimientos para reducir profilácticamente la expresión de CTGF en un individuo.

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

40 En una realización, la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico de CTGF se acompaña de un control de los niveles de CTGF en la piel y/o suero de un individuo, para determinar la respuesta de un individuo a la administración del compuesto antisentido. La respuesta de un individuo a la administración del compuesto antisentido es utilizada por un médico para determinar la cantidad y la duración de la intervención terapéutica.

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

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

Determinadas Terapias de combinación

55 En determinadas realizaciones, una o más composiciones farmacéuticas de la presente invención se administran conjuntamente con uno o más agentes farmacéuticos. En determinadas realizaciones, tales uno o más agentes farmacéuticos distintos están diseñados para tratar la misma enfermedad o afección que una o más composiciones farmacéuticas de la presente invención. En determinadas realizaciones, tales uno o más agentes farmacéuticos

distintos están diseñados para tratar una enfermedad o afección diferente que una o más composiciones farmacéuticas de la presente invención. En determinadas realizaciones, tales uno o más agentes farmacéuticos distintos están diseñados para tratar un efecto no deseado de una o más composiciones farmacéuticas de la presente invención. En determinadas realizaciones, una o más composiciones farmacéuticas de la presente invención se administran conjuntamente con otro agente farmacéutico para tratar un efecto no deseado de ese otro agente farmacéutico. En determinadas realizaciones, una o más composiciones farmacéuticas de la presente invención y uno o más agentes farmacéuticos se administran al mismo tiempo. En determinadas realizaciones, una o más composiciones farmacéuticas de la presente invención y uno o más agentes farmacéuticos se administran en momentos diferentes. En determinadas realizaciones, una o más composiciones farmacéuticas de la presente invención y uno o más agentes farmacéuticos se preparan juntos en una única formulación. En determinadas realizaciones, una o más composiciones farmacéuticas de la presente invención y uno o más agentes farmacéuticos se preparan por separado.

En determinadas realizaciones, los agentes farmacéuticos que pueden administrarse conjuntamente con una composición farmacéutica de la presente invención incluyen un segundo agente terapéutico. En determinadas de tales realizaciones, los agentes farmacéuticos que pueden coadministrarse con una composición farmacéutica de la presente invención incluyen, pero sin limitación, un segundo agente terapéutico. En determinadas de tales realizaciones, el segundo agente terapéutico se administra antes de la administración de una composición farmacéutica de la presente invención. En determinadas de tales realizaciones, el segundo agente terapéutico se administra después de la administración de una composición farmacéutica de la presente invención. En determinadas de tales realizaciones, el segundo agente terapéutico se administra al mismo tiempo que una composición farmacéutica de la presente invención. En determinadas de tales realizaciones la dosis de un segundo agente terapéutico administrado conjuntamente es la misma que la dosis que se administraría si el segundo agente terapéutico se administrara solo. En determinadas de tales realizaciones la dosis de un segundo agente terapéutico coadministrado es más baja que la dosis que se administraría si el segundo agente terapéutico se administrara solo. En determinadas de tales realizaciones la dosis de un segundo agente terapéutico coadministrado es mayor que la dosis que se administraría si el segundo agente terapéutico se administrara solo.

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

La presente invención se ilustra en la Sección de Ejemplos a continuación. Esta sección se expone para ayudar a comprender la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: Selección de los Principales Candidatos de Oligonucleótidos Antisentido de Factores de Crecimiento de Tejido Conectivo Humano (CTGF)

40 Introducción

Se diseñó una serie de oligonucleótidos para dirigirse a diferentes regiones del ARN del factor de crecimiento de tejido conectivo humano, utilizando secuencias publicadas (número de referencia de GenBank NM_001901.2, incorporada en el presente documento como la SEQ ID NO: 9, número de referencia de GenBank NT_025741.14, incorporada en el presente documento como la SEQ ID NO: 10).

45 Este estudio analiza el espacio de secuencia disponible y los oligonucleótidos antisentido modificados que se dirigen al espacio tanto exónico como intrónico de CTGF. Se sintetizaron aproximadamente 150 nuevas secuencias por diana y se evaluaron para determinar su actividad contra CTGF en cultivo celular. Los oligonucleótidos se muestran en la Tabla 1. Todos los compuestos en la Tabla 1 son oligonucleótidos quiméricos ("oligómeros con huecos") de 20 nucleótidos de longitud, compuestos por una región central "hueco" que consiste en diez 2'-desoxinucleótidos, que está flanqueada en ambos lados (direcciones 5' y 3') por "extremos" de cinco nucleótidos o 13 2'-desoxinucleótidos, que está flanqueada en ambos lados (direcciones 5' y 3') por "extremos" de dos y cinco nucleótidos respectivamente. Los extremos están compuestos por nucleótidos 2'-metoxietilo (2'-MOE). Los enlaces internucleosídicos (cadena principal) son fosforotioato (P=S) a lo largo del oligonucleótido. Todos los restos de citidina son 5-metilcitidinas. Los compuestos se analizaron para determinar su efecto sobre los niveles de ARNm del factor de crecimiento de tejido conectivo humano mediante PCR cuantitativa en tiempo real como se describe más adelante. Los datos son promedios de dos experimentos. Si está presente, "N.D." indica "sin datos".

ES 2 729 956 T3

TABLA 1

Inhibición de los niveles de ARNm del factor de crecimiento de tejido conectivo humano por oligonucleótidos fosforotioato quiméricos que tienen extremos 2'-MOE y un hueco desoxi						
N.º ISIS	REGION	SEQ ID NO DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	% INHIB	SEQ ID NO.
124173	CDS	9	380	CCAGCTGCTTGGCGCAGACG	35	11
124189	CDS	9	1003	GCCAGAAAGCTCAAACCTTGA	57	12
124212	3'-UTR	9	1783	CCACAAGCTGTCCAGTCTAA	47	13
124235	3'-UTR	9	2267	GGTCACACTCTCAACAAATA	47	14
124238	3'-UTR	9	2282	AAACATGTAACCTTTTGGTCA	53	15
412271	5'-UTR	9	4	GGGAAGAGTTGTTGTGTGAG	0	16
412272	5'-UTR	9	38	AGGGTGGAGTCGCACTGGCT	46	17
412273	CDS	9	228	ACGAAGGCGACGCGGACGGG	35	18
412274	CDS	9	265	GCCGACGGCCGCGCGCTGC	40	19
412275	CDS	9	475	GGTGCACACGCCGATCTTGC	52	20
412276	CDS	9	483	TCTTTGGCGGTGCACACGCC	0	21
412277	CDS	9	489	GCACCATCTTTGGCGGTGCA	0	22
412278	CDS	9	496	GCAGGGAGCACCATCTTTGG	16	23
412279	CDS	9	501	AAGATGCAGGGAGCACCATC	63	24
412280	CDS	9	507	CCACCGAAGATGCAGGGAGC	0	25
412281	CDS	9	512	CCGTACCACCGAAGATGCAG	47	26
412282	CDS	9	553	GTACTIONGACAGCTGCTCTGGA	68	27
412283	CDS	9	592	GGGCATGCAGCCCACCGCCC	72	28
412284	CDS	9	718	AGGCCCAACCACGGTTTGGT	59	29
412285	CDS	9	723	AGGGCAGGCCCAACCACGGT	79	30
412286	CDS	9	732	TAAGCCGCGAGGGCAGGCC	55	31
412287	CDS	9	829	CCCACAGGTCTTGAACAGG	30	32
412288	CDS	9	839	AGATGCCCATCCCACAGGTC	55	33
412289	3'-UTR	9	1273	CCAGTCTAATGAGTTAATGT	56	34
412290	3'-UTR	9	1281	TTCAAGTTCCAGTCTAATGA	10	35
412291	3'-UTR	9	1361	TTTTCCCCCAGTTAGAAAAA	38	36
412292	3'-UTR	9	1388	CACAATGTTTTGAATTGGGT	50	37
412293	3'-UTR	9	1394	ACATGGCACAATGTTTTGAA	67	38
412294	3'-UTR	9	1399	GTTTGACATGGCACAATGTT	73	39
412295	3'-UTR	9	1404	TATTTGTTTGACATGGCACA	74	40

ES 2 729 956 T3

(continuación)

Inhibición de los niveles de ARNm del factor de crecimiento de tejido conectivo humano por oligonucleótidos fosforotioato quiméricos que tienen extremos 2'-MOE y un hueco desoxi						
N.º ISIS	REGION	SEQ ID NO DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	% INHIB	SEQ ID NO.
412296	3'-UTR	9	1412	TGATAGACTATTTGTTTGAC	35	41
412297	3'-UTR	9	1457	GTTCCACTGTCAAGTCTTAA	55	42
412298	3'-UTR	9	1469	TGTACTAATGTAGTTCCACT	69	43
412299	3'-UTR	9	1482	CATTCTGGTGCTGTGTA	86	44
412300	3'-UTR	9	1489	TAATATACATTCTGGTGCTG	76	45
412301	3'-UTR	9	1495	ACACCTTAATATACATTCTG	54	46
412302	3'-UTR	9	1502	TAAAGCCACACCTTAATATA	54	47
412303	3'-UTR	9	1520	GTACCCTCCCCTGCTCCTA	53	48
412304	3'-UTR	9	1554	AAGATGCTATCTGATGATAC	52	49
412305	3'-UTR	9	1559	CGTATAAGATGCTATCTGAT	69	50
412306	3'-UTR	9	1577	AATAGCAGGCATATTACTCG	74	51
412307	3'-UTR	9	1586	TACACTTCAAATAGCAGGCA	69	52
412308	3'-UTR	9	1591	TCAATTACACTTCAAATAGC	50	53
412309	3'-UTR	9	1659	GGAGAATGCACATCCTAGCT	66	54
412310	3'-UTR	9	1665	ATGGCTGGAGAATGCACATC	60	55
412311	3'-UTR	9	1670	TCTTGATGGCTGGAGAATGC	71	56
412312	3'-UTR	9	1729	GAATCAGAATGTCAGAGCTG	37	57
412313	3'-UTR	9	1946	CATTGAAATATCAAAGCATT	0	58
412314	3'-UTR	9	1952	GGCTAACATTGAAATATCAA	25	59
412315	3'-UTR	9	1958	AATTGAGGCTAACATTGAAA	1	60
412316	3'-UTR	9	1965	GTTTCAGAAATTGAGGCTAAC	65	61
412317	3'-UTR	9	1971	TATGGTGTTTCAGAAATTGAG	13	62
412318	3'-UTR	9	1976	CTACCTATGGTGTTTCAGAAA	61	63
412319	3'-UTR	9	1982	TACATTCTACCTATGGTGTT	38	64
412320	3'-UTR	9	1991	GACAAGCTTTACATTCTACC	24	65
412321	3'-UTR	9	1996	GATCAGACAAGCTTTACATT	37	66
412322	3'-UTR	9	2007	ATGCTTTGAACGATCAGACA	64	67
412323	3'-UTR	9	2012	ATTTTCATGCTTTGAACGATC	44	68
412324	3'-UTR	9	2018	GTATCCATTTTCATGCTTTGA	60	69

ES 2 729 956 T3

(continuación)

Inhibición de los niveles de ARNm del factor de crecimiento de tejido conectivo humano por oligonucleótidos fosforotioato quiméricos que tienen extremos 2'-MOE y un hueco desoxi						
N.º ISIS	REGION	SEQ ID NO DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	% INHIB	SEQ ID NO.
412325	3'-UTR	9	2026	CCATATAAGTATCCATTTC	48	70
412326	3'-UTR	9	2032	GAATTTCCATATAAGTATCC	28	71
412327	3'-UTR	9	2040	TCTGAGCAGAATTTCCATAT	58	72
412328	3'-UTR	9	2050	TGTCATTCTATCTGAGCAGA	61	73
412329	3'-UTR	9	2060	TTTGACGGACTGTCATTCTA	47	74
412330	3'-UTR	9	2070	AACAATCTGTTTTGACGGAC	48	75
412331	3'-UTR	9	2088	TGATGCCTCCCCTTTGCAAA	53	76
412332	3'-UTR	9	2100	TGCCAAGGACACTGATGCCT	68	77
412333	3'-UTR	9	2105	CAGCCTGCCAAGGACACTGA	75	78
412334	3'-UTR	9	2110	GAAATCAGCCTGCCAAGGAC	60	79
412335	3'-UTR	9	2115	ACCTAGAAATCAGCCTGCCA	46	80
412336	3'-UTR	9	2120	TTCCTACCTAGAAATCAGCC	51	81
412337	3'-UTR	9	2128	TACCACATTTCTACCTAGA	59	82
412338	3'-UTR	9	2134	TGAGGCTACCACATTTCTA	0	83
412339	3'-UTR	9	2140	TAAAAGTGAGGCTACCACAT	48	84
412340	3'-UTR	9	2213	CAAATGCTTCCAGGTGAAAA	49	85
412341	3'-UTR	9	2219	TAGAAACAAATGCTTCCAGG	66	86
412342	3'-UTR	9	2230	TCATATCAAAGTAGAAACAA	12	87
412343	3'-UTR	9	2242	TCCGAAAAACAGTCATATCA	24	88
412368	Intrón 1	10	1308	ACCCGGCTGCAGAGGGCGAG	0	89
412369	Intrón 1	10	1313	CGCTTACCCGGCTGCAGAGG	0	90
412370	Intrón 1	10	1410	GACAGGGCGGTCAGCGGCGC	0	91
412371	Intrón 2	10	1730	AGTCCGAGCGGTTTCTTTTT	0	92
412372	Intrón 2	10	1735	AACTCAGTCCGAGCGGTTTC	19	93
412373	Intrón 2	10	1740	AAAGAACTCAGTCCGAGCG	10	94
412374	Intrón 2	10	1745	TGGAGAAAGAACTCAGTCC	45	95
412375	Intrón 2	10	1750	GCAGCTGGAGAAAGAACTC	14	96
412376	Intrón 2	10	1755	TGGCAGCAGCTGGAGAAAGA	46	97
412377	Intrón 2	10	1887	AGGGAGCACCATCTTTGGCT	20	98

ES 2 729 956 T3

(continuación)

Inhibición de los niveles de ARNm del factor de crecimiento de tejido conectivo humano por oligonucleótidos fosforotioato quiméricos que tienen extremos 2'-MOE y un hueco desoxi						
N.º ISIS	REGION	SEQ ID NO DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	% INHIB	SEQ ID NO.
412378	Intrón 3	10	2125	TCACCCGCGAGGGCAGGCC	33	99
412379	Intrón 3	10	2137	GGAAGACTCGACTCACCCGC	0	100
412380	Intrón 3	10	2142	TTAGAGGAAGACTCGACTCA	0	101
412381	Intrón 3	10	2150	ACCCTGACTTAGAGGAAGAC	47	102
412382	Intrón 3	10	2155	TCACGACCCTGACTTAGAGG	31	103
412383	Intrón 3	10	2160	GAGAATCACGACCCTGACTT	2	104
412384	Intrón 3	10	2165	TGGGAGAGAATCACGACCCT	31	105
412385	Intrón 3	10	2170	CTCCCTGGGAGAGAATCACG	0	106
412386	Intrón 3	10	2191	GGTCGGCACAGTTAGGACTC	53	107
412387	Intrón 3	10	2196	CGTTCGGTCGGCACAGTTAG	30	108
412388	Intrón 3	10	2216	CCTGGATAAGGTATTTCCCC	0	109
412389	Intrón 3	10	2235	ACAAACACCATGTAAAACGC	11	110
412390	Intrón 3	10	2241	GAGCACACAAACACCATGTA	0	111
412391	Intrón 3	10	2251	TGCGAGAGCAGAGCACACAA	0	112
412392	Intrón 3	10	2256	TAAGCTGCGAGAGCAGAGCA	2	113
412393	Intrón 3	10	2261	GTCGGTAAGCTGCGAGAGCA	23	114
412394	Intrón 3	10	2266	TTCCAGTCGGTAAGCTGCGA	15	115
412395	Intrón 4	10	2472	ACATGTACCTTAATGTTCTC	0	116
412396	Intrón 4	10	2477	GCAGAACATGTACCTTAATG	0	117
412397	Intrón 4	10	2482	TAGGAGCAGAACATGTACCT	9	118
412398	Intrón 4	10	2487	GTTAATAGGAGCAGAACATG	19	119
412399	Intrón 4	10	2496	TGAAAAATAGTTAATAGGAG	0	120
412400	Intrón 4	10	2511	CCACTGTTTTTCTGTGAAA	10	121
412401	Intrón 4	10	2525	AAGTTGGGTCCTATCCACTG	28	122
412402	Intrón 4	10	2530	GCCCTAAGTTGGGTCCTATC	20	123
412403	Intrón 4	10	2535	CAAGAGCCCTAAGTTGGGTC	0	124
412404	Intrón 4	10	2540	CGTGGCAAGAGCCCTAAGTT	64	125
412405	Intrón 4	10	2558	CGGGCTTATACTAACAAGCG	6	126
412406	Intrón 4	10	2563	GATAACGGGCTTATACTAAC	33	127

ES 2 729 956 T3

(continuación)

Inhibición de los niveles de ARNm del factor de crecimiento de tejido conectivo humano por oligonucleótidos fosforotioato quiméricos que tienen extremos 2'-MOE y un hueco desoxi						
N.º ISIS	REGION	SEQ ID NO DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	% INHIB	SEQ ID NO.
412407	Intrón 4	10	2568	TTGGAGATAACGGGCTTATA	73	128
412408	Intrón 4	10	2573	TAGTTTTGGAGATAACGGGC	51	129
412409	Intrón 4	10	2578	TTAGATAGTTTTGGAGATAA	24	130
412410	Intrón 4	10	2584	CAATGGTTAGATAGTTTTGG	36	131
412411	Intrón 4	10	2589	CAGCTCAATGGTTAGATAGT	53	132
412412	Intrón 4	10	2594	CAAAACAGCTCAATGGTTAG	34	133
412413	Intrón 4	10	2599	TCCAGCAAAACAGCTCAATG	59	134
412414	Intrón 4	10	2604	CTCATTCCAGCAAAACAGCT	42	135
412415	Intrón 4	10	2609	AAGCTCTCATTCCAGCAAAA	57	136
412416	Intrón 4	10	2614	TACACAAGCTCTCATTCCAG	44	137
412417	Intrón 4	10	2623	GGTTGCTATTACACAAGCTC	72	138
412418	Intrón 4	10	2628	CTGGTGGTTGCTATTACACA	61	139
412419	Intrón 4	10	2633	GAAAACGGTGGTTGCTATT	29	140
412420	Intrón 4	10	2638	TAGTGAAAACGGTGGTTG	5	141
412421	Intrón 4	10	2663	TTAACTAACCCGTGGAAGA	15	142
412422	Intrón 4	10	2672	TGTCTTGAATTAACCTAACC	4	143
412423	Intrón 4	10	2677	TGGAATGTCTTGAATTAAC	0	144
412424	Intrón 4	10	2691	GCCAGAGCCTCTCTTGAAT	36	145
412425	Intrón 4	10	2698	AAAAATAGCCAGAGCCTCTC	59	146
412426	Intrón 4	10	2703	TGTCCAAAAATAGCCAGAGC	28	147
412427	Intrón 4	10	2708	TGCTATGTCCAAAAATAGCC	15	148
412428	Intrón 4	10	2713	TCATTTGCTATGTCCAAAAA	28	149
412429	Intrón 4	10	2718	GAGTCTCATTTGCTATGTCC	20	150
412430	Intrón 4	10	2723	AGTTTGAGTCTCATTTGCTA	30	151
412431	Intrón 4	10	2728	GAGGAAGTTTGAGTCTCATT	55	152
412432	Intrón 4	10	2763	CTTCTGTTGTCTGACTTCTG	55	153
412433	Intrón 4	10	2778	CCTCTGTGTTTTAGTCTTCT	56	154
412434	Intrón 4	10	2788	TTTCTTCAACCCCTGTGTT	15	155
412435	Intrón 4	10	2796	GGAGTGGCTTTCTTCAACCC	43	156

(continuación)

Inhibición de los niveles de ARNm del factor de crecimiento de tejido conectivo humano por oligonucleótidos fosforotioato quiméricos que tienen extremos 2'-MOE y un hueco desoxi						
N.º ISIS	REGION	SEQ ID NO DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	% INHIB	SEQ ID NO.
412436	Intrón 4	10	2849	AGGAAGACAAGGGAAAAGAG	20	157
412437	Intrón 4	10	2854	TTCTAAGGAAGACAAGGGAA	0	158
412438	Intrón 4	10	2859	TGCCCTTCTAAGGAAGACAA	31	159
412439	Intrón 2	10	1791	GGATGCGAGTTGGGATCTGG	0	160
412440	CDS	9	380	CCAGCTGCTTGGCGCAGACG	64	161
412441	CDS	9	1003	GCCAGAAAGCTCAAACCTTGA	37	162
412442	3'-UTR	9	1783	CCACAAGCTGTCCAGTCTAA	32	163
412443	3'-UTR	9	2267	GGTCACACTCTCAACAAATA	59	164
412444	3'-UTR	9	2282	AAACATGTAACTTTTGGTCA	55	165
418899	3'-UTR	9	1391	TGACATGGCACAATGTTTTG	ND*	166

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

- 5 Como se muestra en la tabla 1, las SEQ ID NO 11-15, 17-20, 24, 26-34, 36-57, 59, 61, 63-82, 84-86, 88, 95, 97, 99, 102, 103, 105, 107, 108, 122, 125, 127-140, 145, 146, 149, 151-154, 156, 159, 161-165 demostraron al menos el 24% de inhibición de la expresión del factor de crecimiento de tejido conectivo humano en este ensayo y, por lo tanto, son preferidas. Los sitios diana a los que estas secuencias preferidas son complementarias se denominan en el presente documento "sitios activos" y, por lo tanto, son sitios preferidos para que se dirijan los compuestos de la presente invención.
- 10 El compuesto antisentido es complementario dentro de un intervalo de nucleótidos en la secuencia CTGF, es decir, dentro del intervalo de los nucleótidos 718-751, 1388-1423, 1457-1689, 2040-2069, 2120-2147, o 2267-2301 de la SEQ ID NO: 9. En una determinada realización, el compuesto antisentido es complementario dentro del intervalo de los nucleótidos 2728-2797 de la SEQ ID NO: 10. Los compuestos dirigidos a estos intervalos demuestran al menos un 50% de inhibición (es decir, las SEQ ID NO: 15, 29, 31, 42, 46-49, 53, 72, 81, 82, 152-154, 164 y 165). Determinados sitios diana enumerados en la Tabla 1 también demuestran al menos un 50% de inhibición (es decir, las SEQ ID NO: 12, 20, 33, 34, 76, 107, 129, 132, 134, 136 y 146).
- 15 En determinadas realizaciones, el compuesto antisentido es complementario dentro del intervalo de los nucleótidos 553-611, 1394-1423, 1469-1508, 1559-1605, 1659-1689 o 2100-2129. Los compuestos dirigidos a los mismos muestran al menos un 60% de inhibición (es decir, las SEQ ID NO: 27, 38, 43, 50, 52, 54, 55, 77, 79 y 86). Determinados sitios diana enumerados en la Tabla 1 también demuestran al menos un 60 % de inhibición (es decir, las SEQ ID NO: 24, 61, 63, 67, 69, 73, 125, 139 y 161).
- 20 El compuesto antisentido también es complementario dentro del intervalo de los nucleótidos 1399-1423. Los compuestos dirigidos a los mismos muestran al menos un 70 % de inhibición (es decir, las SEQ ID NO: 39 y 40). Determinados sitios diana enumerados en la Tabla 1 también demuestran al menos un 70 % de inhibición (es decir, las SEQ ID NO: 28, 30, 45, 51, 56, 78, 128 y 138). Un sitio diana enumerado en la Tabla 1 también demuestra al menos un 80% de inhibición (es decir, la SEQ ID NO: 44). En determinadas realizaciones, el porcentaje de inhibición se logra cuando el compuesto antisentido se suministra a las células HuVec a una concentración de 50 nm.
- 25 Se identificaron múltiples candidatos con actividad aparente mayor que la secuencia candidata histórica de ASO, SEQ ID N.º 15 (ISIS 124238), tanto en las secuencias exónicas como en las intrónicas.

Materiales y procedimientos

- 30 Se evaluaron los oligonucleótidos y se confirmó la actividad a una concentración de 50 nM en células endoteliales de la vena umbilical humana (HuVEC) utilizando transfección mediada por Lipofectina. Se sembraron células HuVEC de Cascade Biologics (Portland, OR) mantenidas en Medio 200 complementado con Suplemento de Crecimiento de Suero Bajo (de Cascade Biologics) en placas de 96 pocillos a 5.000 células por pocillo y se incubaron durante la

noche a 37 °C en presencia de CO₂ al 5%. Al día siguiente, se aspiró el medio y se reemplazó con Opti-MEM I (Invitrogen) precalentado que contenía la mezcla Oligo-Lipofectamine 2000 (Invitrogen) (3 mg de Lipofectamine 2000 por 1 ml de medio Opti-MEM I). Después de 4 horas, la mezcla de transfección se intercambiaba por medio fresco 200 complementado con Suplemento de Crecimiento de Suero Bajo y se incubó a 37 °C en presencia de CO₂ al 5 %.

5 Después de 16 -24 horas, a aproximadamente el 80% de confluencia, las células se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se lisaron para la purificación del ARN con el kit RNeasy de Qiagen. El mensaje de CTGF se midió mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (RT-PCR) (los conjuntos de cebador/sonda se muestran a continuación) y los resultados se normalizaron al ARN total.

Análisis Estadístico

10 Cada muestra se analizó por duplicado y las barras verticales representan la dispersión entre las dos mediciones.

Resultados y Análisis

De las aproximadamente 150 secuencias nuevas por diana sintetizadas y evaluadas para determinar la actividad contra CTGF en cultivo celular, los oligonucleótidos de CTGF (SEQ ID NO: 28, 30, 39, 40, 45, 52, 56, 78, 125 y 166) muestran excelente inhibición de la expresión del ARNm de CTGF humano.

15 Ejemplo 2: Un Estudio Farmacocinético Intra-Dérmico de Dosis Única de Oligonucleótido Antisentido de CTGF en Conejos Objeto de Estudio

El fin de este estudio farmacocinético en conejos es evaluar la difusión y la concentración de un oligonucleótido antisentido de CTGF (SEQ ID NO: 39, ISIS 412294) en piel de conejos en diferentes momentos posteriores a una única inyección intradérmica.

20 Diseño del Estudio

En el día 0 del estudio, se administró a todos los animales por vía intradérmica (ID) una única inyección de 100 µl de oligonucleótido antisentido de CTGF, SEQ ID NO: 39, a una concentración de 50 mg/ml (5 mg de dosis total). A los animales se les administró el oligonucleótido antisentido en un sitio a la izquierda de la línea media espinal, aproximadamente paralelo a los hombros del conejo y adyacente a una sutura de 3 cm de herida incisional (**Figura 1A**). La aguja se insertó de manera que el material de prueba se inyectara hacia la base del cuerpo del animal. En los días 1, 3, 7 y 14, los conejos fueron sacrificados y se obtuvieron dos biopsias de punzones de 1,0 cm de grosor completo, una centrada sobre el lugar de la inyección original y la otra verticalmente debajo separadas por 0,5 cm. Las muestras se congelaron instantáneamente y se almacenaron a -80 °C antes del análisis de los niveles de fármaco de oligonucleótido antisentido utilizando un procedimiento de captura por hibridación. Los resultados representan los niveles medios de oligonucleótido antisentido de ambas biopsias en el momento indicado.

25

30

Resultados y conclusiones

Los niveles significativos del oligonucleótido antisentido están presentes hasta 14 días después de la administración intradérmica (véase la **Figura 1B**). El oligonucleótido antisentido también permanece cerca del sitio original de inyección (≤ 1 cm), con una difusión lateral muy limitada distal al sitio de administración (**Figura 1B**). Por ejemplo, los niveles de ASO son muy bajos a distancias de 1,5 cm distales al sitio de inyección en todo momento después de la inyección. Por lo tanto, los efectos farmacológicos de esta clase de molécula se limitarán a las áreas de la piel inmediatamente adyacentes al lugar de inyección. Para superar esta limitación, se ha desarrollado una técnica de enhebrado de inyección intradérmico (y se ha utilizado en estudios clínicos) que suministra cantidades iguales de antisentido a lo largo de toda la cicatriz en desarrollo. Estos resultados demuestran dos nuevos hallazgos. Primero, que hay un tiempo de residencia prolongado de un oligonucleótido antisentido 2'MOE con esta configuración química en la piel; y segundo, los oligonucleótidos antisentido tienen una difusión lateral muy limitada en la piel. La última limitación de esta clase de molécula se puede superar mediante la dosificación del oligonucleótido antisentido mediante una técnica de enhebrado como se describe anteriormente.

35

40

45 Ejemplo 3: Estudio en Animales con Oligonucleótido Antisentido de CTGF Dirigido a Queloides Humanos en un Sistema de Modelo *In Vivo*

Objeto de Estudio

El fin de este estudio fue evaluar la eficacia de los oligonucleótidos antisentido dirigidos a CTGF humano en un sistema de modelo *in vivo* utilizando un modelo de xenoinjerto de queloide humano/ratón. El oligonucleótido analizado fue el oligonucleótido antisentido N.º 412300 (SEQ ID NO: 45).

50 Procedimientos

Modelo de Xenoinjerto de Queloides Humano/Ratón.

Se usó un modelo de xenoinjerto queloide humano/ratón que usa tejido queloide humano trasplantado en ratones atímicos.

Las muestras frescas de tejido queloide se obtuvieron de forma anónima, a partir de tejido desechado de pacientes sometidos a escisión electiva de queloides por razones cosméticas. Las muestras de queloides se procesaron en muestras de 10x5x5 mm y se pesaron en una balanza analítica. Las muestras de queloides se implantaron, a continuación, en los ratones como se describe a continuación.

- 5 Los ratones se anestesiaron con isoflurano al 3%. Se administró buprenorfina antes de la cirugía y después de la operación, según fuera necesario (buprenorfina a 0,3 mg/ml; 2 mg/kg; SC).

Después de lograr la anestesia general y preparar al animal, se hicieron dos incisiones de 10 mm en la piel, sobre la escápula izquierda y derecha, y se creó una bolsa con tijeras de punta fina, entre la grasa subcutánea y la fascia. Se insertó una muestra de queloide en cada bolsa. Las incisiones se cerraron con pegamento de cianoacrilato de grado veterinario (VetBond o Nexaband) y el área se frotó con etanol al 70%. El área se cubrió, a continuación, con membranas semipermeables estériles (Op-Site™, Smith y Nephew).

10

Evaluación de ASO *In Vivo* Contra los Queloides

Se utilizó un ASO dirigido a CTGF humano (y no de ratón) (oligonucleótido antisentido N.º 412300; SEQ ID NO: 45). Para probar la eficacia del ASO en el sistema de modelo *in vivo* descrito anteriormente, los implantes de queloides se inyectaron con ASO (disuelto en PBS) o con PBS control. Hubo dos grupos de animales con 8 animales por grupo (con dos queloides/animal). Los animales se dejaron aclimatar durante aproximadamente 2 semanas después de la implantación de los queloides antes de la dosificación de ASO.

15

Se administró una dosis total de 500 µg de oligo por muestra de queloide en un volumen total de 100 µl (de una solución madre de 5,0 mg/ml). El ASO o PBS control se administró inmediatamente adyacente a cada implante durante un total de 4 semanas, dos veces a la semana. Una semana después de la última inyección, se retiró un implante y se sometió a qRT-PCR para el análisis de la expresión génica, y se eliminó el queloide contralateral y se analizó la histología para determinar el contenido de colágeno mediante el uso de densidad de fluorescencia integrada (IDF).

20

Se aisló el ARN total y se determinó el ARNm de CTGF o de colágeno, tipo III, alfa 1 (Col3A1) mediante PCR cuantitativa en tiempo real utilizando pares de cebadores que han demostrado ser específicos para las secuencias de ARNm humano. Los niveles de ARNm se correlacionaron con los niveles de GAPDH en las mismas muestras, y se calculó cualquier cambio en las muestras tratadas con ASO sobre el control tratado con PBS solo.

25

Resultados

Los resultados después de 4 semanas de tratamiento con 500 µg de oligonucleótido antisentido N.º 412300 (SEQ ID NO: 45) en un volumen total de 100 µl por muestra de queloide indican una reducción en la expresión del ARNm de CTGF y Col3A1 en muestras de queloides individuales. El tratamiento con ASO de CTGF redujo la expresión del ARNm de CTGF en el tejido queloide al 67% del control ($p = 0,082$) (**Figura 2A**). El tratamiento con ASO de CTGF redujo la expresión del ARNm de Col3a1 en el tejido queloide al 45% del control ($p = 0,153$) (**Figura 2B**).

30

Conclusión

Los queloides se caracterizan por una proliferación anormal de fibroblastos y la sobreproducción de diferentes formas de colágeno. Histopatológicamente, se caracterizan por la presencia de espirales y nódulos de haces de colágeno hialinizados gruesos o colágeno de queloide con sustancia mucinosa y relativamente pocos fibroblastos en la dermis de las cicatrices queloides. Los haces de colágeno grandes y gruesos y las numerosas fibrillas delgadas están estrechamente empaquetados juntos. El colágeno tipo III es el segundo colágeno más abundante encontrado en la piel y es muy abundante en los queloides. Col3A1 está significativamente elevado en los queloides en comparación con la piel normal.

35

40

Se ha demostrado, en este caso, por primera vez, la capacidad de los ASO 2'MOE modificados químicamente para reducir el CTGF en tejido queloide humano intacto. El tratamiento de los tejidos queloides humanos con un ASO de CTG redujo la expresión del ARNm de CTGF diana en un 33%. Este también dado como resultado una reducción en la expresión de Col3A1 del 55%. Esta reducción en la expresión de Col3A1 provocaría un beneficio terapéutico significativo en pacientes que padecen de crecimiento de queloides, y demostraría la utilidad de un ASO 2'MOE como un nuevo fármaco para el tratamiento de queloides.

45

Ejemplo 4: Estudio de Revisión de Cicatrices de Mama en Seres Humanos

Objeto de Estudio

Este es un estudio clínico aleatorizado, doble ciego, dentro del sujeto controlado que evalúa la eficacia y la seguridad de oligonucleótidos antisentido de CTGF (EXC 001) en sujetos que se someten a una revisión electiva de cicatrices resultantes de una cirugía de mama previa. Este estudio requiere que los sujetos tengan cicatrices preexistentes de gravedad suficiente para justificar la cirugía de revisión de cicatrices. Por lo tanto, este estudio realiza una evaluación previa de los sujetos de los que podría esperarse que tengan una alta tasa de formación de

50

cicatrices hipertróficas o queloides en las cicatrices revisadas tratadas con placebo.

En pacientes que se sometieron a una cirugía previa de mama y ahora tienen cicatrices coincidentes bilaterales en las mismas ubicaciones anatómicas, se administró EXC 001 (SEQ ID NO: 39) o placebo a la parte de las cicatrices revisadas de mama a través de inyecciones de enhebrado intradérmico. El objeto principal del estudio fue evaluar la eficacia de EXC 001 para reducir la cicatrización posterior de la piel. El objeto secundario del estudio fue evaluar la seguridad de EXC 001.

Procedimientos

Se trató una sección de 6 cm de cada lado de la herida/cicatriz de mama revisada con 4 dosis de EXC 001 o placebo, a las 2, 5, 8 y 11 semanas después de que se cerrara la incisión quirúrgica. La asignación al azar determinó qué lado se trataba con EXC 001 o placebo en cada sujeto.

La dosis de EXC 001 utilizada fue de 5 mg por centímetro lineal. La concentración de EXC 001 utilizada fue de 25 mg/ml y se inyectaron 100 ul de EXC 001 por centímetro lineal de la herida/cicatriz de mama revisada. Las inyecciones se realizaron en ambos lados de cada incisión, con la mitad de la cantidad por centímetro lineal administrada en cada lado. Las inyecciones en un lado dado estaban separadas 3 cm. Para suministrar placebo o EXC 001 adyacente a y a lo largo de la incisión, se usaron agujas intradérmicas (3 cm de longitud) para las inyecciones. La aguja se inserta inmediatamente adyacente a la incisión quirúrgica en cada lado mediante una técnica de enhebrado, y se inyecta EXC 001 o placebo cuando se extrae la aguja, de modo que se administran cantidades iguales de fármaco antisentido a lo largo de la cicatriz.

La duración del estudio fue de aproximadamente 31 semanas. Los sujetos recibieron las revisiones de las cicatrices en el Día 1, seguidas de 4 dosis de EXC 001 y placebo, a las 2, 5, 8 y 11 semanas después de que se cerraran las incisiones quirúrgicas. La observación y la evaluación de las cicatrices se realizaron en la semana 24.

La eficacia se determinó calificando cada par de incisiones coincidentes de pacientes individuales (dentro del análisis de los sujetos). La eficacia se evaluó en la semana 24 después de la cirugía de revisión de las cicatrices, utilizando tres procedimientos de calificación de la gravedad de las cicatrices incisionales:

- Evaluación por el sujeto de sus cicatrices. En una escala del 1-10, el paciente calificó su opinión "general" sobre el aspecto de la cicatriz.
- Evaluación por el médico(investigador) de las cicatrices. En una escala de 1-10, el médico calificó la opinión general sobre el aspecto de la cicatriz.
- El Grupo de expertos evalúa pares de fotografías de cicatrices ciegas, utilizando una Escala Analógica Visual (EVA) de 100 mm, en la que 0 = mejor cicatriz posible y 100 = peor cicatriz posible. Este procedimiento proporciona información sobre la gravedad absoluta de las cicatrices, así como las diferencias entre las dos cicatrices en el par.

Resultados

21 sujetos completaron este estudio. El examen de las fotografías posteriores a la cirugía de la semana 24 indica que casi todos los sujetos muestran recurrencia de cicatrices hipertróficas en al menos un lado después de la cirugía de revisión de cicatrices. En algunos casos, las cicatrices se extienden más allá de los límites de las incisiones originales y, por lo tanto, son cicatrices queloides.

Este estudio logró resultados estadísticamente significativos a favor de EXC 001 en los tres puntos finales (una puntuación negativa representa la diferencia entre tratado con placebo y con EXC 001, a favor de EXC 001 - véase la **Tabla 2** a continuación).

- La valoración por el sujeto de sus cicatrices:
 - La calificación "general" fue estadísticamente significativa a favor de EXC 001 ($p = 0,033$).
- La valoración por el médico de las cicatrices:
 - La calificación "general" fue altamente significativa estadísticamente a favor de EXC 001 ($p = 0,001$).
- La calificación de EVA por el grupo de expertos también fue altamente significativa a favor de EXC 001 ($p < 0,001$).

TABLA 2

Escala de Evaluación de Cicatrices	Diferencia entre placebo y EXC 001	valor de p
General del Sujeto	-2,4	0,003
General del Médico	-2,3	<0,001
EVA de Expertos	-26,0	<0,001

La **Figura 3A** muestra que el tratamiento con el oligonucleótido antisentido de CTGF, (EXC 001 o la SEQ ID NO: 39) inhibe la formación y el crecimiento de una cicatriz hipertrófica 24 semanas después de la cirugía. La **Figura 3B** muestra los resultados de un sujeto diferente, también a las 24 semanas. En este segundo ejemplo, el paciente desarrolló un queloide a las 24 semanas después de la cirugía de revisión en la cicatriz tratada con placebo. En cambio, la formación y el crecimiento de una cicatriz queloide en el sitio de revisión de la cicatriz adyacente se evitó casi por completo con el tratamiento con EXC 001.

Por lo tanto, en estos dos ejemplos, el crecimiento tanto de las cicatrices hipertróficas como de las cicatrices queloides se inhibe con el tratamiento con EXC 001. Las puntuaciones debajo de cada grupo de imágenes representan el grado de mejoría entre las cicatrices tratadas con placebo y EXC 001. Por ejemplo, una puntuación de EVA por expertos de -19,3 indica que la cicatriz de placebo se encuentra peor que la cicatriz tratada con EXC 001 correspondiente a 19,3 en una escala de 100 puntos. Las puntuaciones del médico y del sujeto de -1 significan que la cicatriz tratada con placebo se encuentra peor que la cicatriz tratada con EXC 001 correspondiente en 1 punto en una escala de 10 puntos. El resultado demuestra que EXC 001 reduce la gravedad tanto de las cicatrices hipertróficas como de las cicatrices queloides.

Ejemplo 5: Estudio de Abdominoplastia de Prevención Primaria en Seres Humanos

Objeto de Estudio

Este es un estudio clínico aleatorizado, doble ciego, dentro del sujeto controlado que evalúa la eficacia y la seguridad de oligonucleótidos antisentido de CTGF (EXC 001) en sujetos que se someten a cirugía de abdominoplastia electiva.

Procedimiento

La duración del estudio fue de 24 semanas. Los sujetos recibieron la abdominoplastia el día 1, seguida de un tratamiento con EXC 001 o placebo durante un período de 9 semanas.

La dosis de EXC 001 utilizada fue de 5 mg por centímetro lineal. La concentración de EXC 001 utilizada fue de 25 mg/ml y se inyectaron 100 ul de EXC 001 por centímetro lineal de la herida/cicatriz de la abdominoplastia. Las inyecciones se realizaron en ambos lados de cada incisión, con la mitad de la cantidad por centímetro lineal administrada en cada lado. Tanto el fármaco como el placebo se administraron a lo largo de dos porciones de 6 cm de la cicatriz en cada extremo lateral de la cicatriz, y, así, las secciones dosificadas están separadas por al menos 10 cm de cicatriz sin tratar. Las inyecciones en un lado dado estaban separadas 3 cm. Para suministrar placebo o EXC 001 adyacente a y a lo largo de la incisión, se usaron agujas intradérmicas (3 cm de longitud) para las inyecciones. La aguja se inserta inmediatamente adyacente a la incisión quirúrgica en cada lado mediante una técnica de enhebrado, y se inyecta EXC 001 o placebo al retirar la aguja.

Los sujetos recibieron las revisiones de las cicatrices en el Día 1, seguidas de 4 dosis de EXC 001 y placebo, a las 2, 5, 8 y 11 semanas después de que se cerraran las incisiones quirúrgicas. La observación y la evaluación de las cicatrices se realizaron en la semana 12.

La eficacia se determina calificando cada porción combinada de la incisión dosificada (tratada con placebo en comparación con tratada con EXC 001) utilizando los tres procedimientos de calificación de la gravedad de la cicatriz de cicatrices incisionales como se describe en el ejemplo anterior.

Resultados

EXC 001 es eficaz según estos criterios en la semana 12. En la **Figura 4** se muestra un ejemplo de la eficacia. En este ejemplo, se ve, de manera clara, la reducción en la gravedad de la cicatriz resultante de la dosificación de EXC 001 en comparación con la de la dosificación de placebo. La sección de la incisión tratada con placebo se ha convertido en una cicatriz hipertrófica, mientras que la sección de la cicatriz tratada con EXC 001 es más fina.

Otro ejemplo de la capacidad de EXC 001 para reducir la formación de cicatrices hipertróficas se muestra en la **Figura 5**. En este ejemplo, la sección de la cicatriz de abdominoplastia en el lado derecho de la cicatriz (a la derecha de la línea vertical) se trató con EXC 001 mientras que la cicatriz a la izquierda de la línea vertical no recibió ningún

tratamiento. Claramente, la gravedad de la cicatriz a la derecha es menos grave que la de la izquierda.

Este ejemplo también demuestra que el beneficio terapéutico de EXC 001 se limita a la región de la cicatriz directamente adyacente al sitio de dosificación por enhebrado intradérmico del fármaco. Por lo tanto, el fármaco parece tener una difusión limitada fuera del sitio de administración y requerirá una dosificación inmediatamente adyacente a la cicatriz, por ejemplo, mediante enhebrado intradérmico.

Ejemplo 6: Estudio de Biomarcadores que demuestra el Efecto de EXC 001 en la Expresión de ARNm de Varios Genes en Seres Humanos

Procedimiento

13 semanas antes de un procedimiento de abdominoplastia, se usó un área entre el ombligo y la línea del cabello suprapúbica como un sitio para crear un total de veinte incisiones de 2 cm. Las incisiones de 2 cm de longitud estaban en cuatro columnas de cuatro incisiones (A, B, C, D) y se usaron para el análisis de ARN en la semana 13 después de las incisiones. Se usaron dos incisiones adicionales laterales a estas columnas en cada lado del abdomen (a, b y c, d) durante 4 u 8 semanas después del análisis de ARNm de las incisiones. Cada columna se separó al menos 4 cm y cada incisión se separó al menos 3 cm.

Los tratamientos de las heridas incisionales con EXC 001 o placebo se asignaron al azar a dos grupos de tratamiento. Las cuatro heridas incisionales en cada una de las columnas A, B, C y D recibieron la misma dosis de EXC 001 o de placebo. Todas las heridas/cicatrices incisionales en un lado del abdomen recibieron inyecciones de EXC 001 y en el otro lado recibieron inyecciones de placebo. Todas las inyecciones se cegaron al individuo que recibió los agentes de prueba. Todas las incisiones/cicatrices en un sujeto dado se trataron con la misma pauta de dosificación.

Se asignaron de manera aleatoria treinta sujetos a una de las tres cohortes de 10 sujetos cada una; se trató cada cohorte con una pauta de dosificación diferente (pero las dosis altas y bajas fueron las mismas para todas las cohortes):

Cohorte número 1: Inyecciones intradérmicas en las semanas 2, 4, 6, 8 y 10

Cohorte número 2: Inyecciones intradérmicas en las semanas 2, 5, 8 y 11

Cohorte número 3: Inyecciones intradérmicas en las semanas 2, 6 y 10

Una aguja de calibre 27, de aproximadamente 38 mm de longitud, se insertó 2 cm por vía intradérmica (la longitud completa de cada incisión), paralela y aproximadamente a 3 mm de la herida/cicatriz incisional (técnica de enhebrado intradérmico). A continuación, se inyectó EXC 001 o placebo mientras se retiraba gradualmente la aguja, de modo que se depositó uniformemente la cantidad correcta por centímetro lineal en la dermis a lo largo de la línea de incisión.

Biopsia de las Incisiones

Se realizó una biopsia por punción de 6 mm en cada lado adyacente a las incisiones laterales el día 1 para el análisis de ARNm y se usó como control para muestras de piel sin herir. En la semana 4, a los 9 pacientes en la cohorte 1, y en la semana 8, a los 20 pacientes en las cohortes 2 y 3 se les realizó una biopsia de sus incisiones laterales (a, b, c, d). Dos de estas incisiones recibieron EXC 001 y dos recibieron placebo a través de una asignación aleatoria. Justo antes de la cirugía de abdominoplastia (en la semana 13), cada una de las cicatrices en las columnas A, B, C y D se puntuaron según la gravedad de la cicatriz (por las escalas de Médico y de Grupo de Expertos, véase el **Ejemplo 5** anterior), y también se tomaron muestras tanto para análisis histológico como de ARN.

Resultados

Se observó una mejoría estadísticamente significativa para las cicatrices tratadas con EXC 001 frente a las tratadas con placebo para la Opinión General del Médico cuando todas las cohortes se combinaron a nivel de dosis alta (8,7%, valor de $p = 0,018$). También se observó una diferencia de medias estadísticamente significativa para la Evaluación General de todas las cohortes combinadas y todas las dosis combinadas (5,9%, valor de $p = 0,016$). Estos resultados demuestran nuevamente la capacidad de EXC 001 para reducir la gravedad de la cicatriz.

En la **FIGURA 6** se muestra un ejemplo de la capacidad de EXC 001 para reducir el crecimiento y la formación de cicatrices hipertróficas. En este ejemplo, se muestran dos cicatrices coincidentes, una tratada con 5 mg/cm de EXC 001 y una con placebo. La gravedad de la cicatriz tratada con EXC 001 es menor que la de la cicatriz tratada con placebo. El análisis histológico de estas dos cicatrices también reveló una reducción mediada por EXC 001 en la expresión de la proteína CTGF (por inmunohistoquímica) demostrando claramente que EXC 001 funciona para reducir la expresión de su diana prevista (CTGF). El análisis de la expresión de 9 transcritos de ARNm diferentes también se realizó a las 4, 8 y 13 semanas después de la herida (Tabla 3)

Tabla 3: Transcritos de ARNm analizados por XP-PCR

Gen Medido	Identificador (Acceso)
Colágeno1-a1 (COL1A1)	NM_000088
Colágeno1-a2 (COL1A2)	NM_000089
Colágeno III-a1 (COL3A1)	NM_000090
Factor de Crecimiento de Tejido Conectivo (CTGF)	NM_001901
Factor de Crecimiento Transformante betal (TGF-β1)	NM_000660
Homólogo 3 de las Madres Contra Decapentapléjico (SMAD3)	NM_005902
Elastina	M_36860
Metaloproteinasa de Matriz 1 (MMP-1)	NM_002421
Actina del músculo liso α (α-SMA/ACTA2)	NM_001613

Después de la herida postquirúrgica, se anticipó una mayor expresión de ARNm de CTGF y genes de colágeno. La expresión de ARNm de CTGF en las cicatrices se incrementó desde el valor inicial sin heridas en tres puntos temporales, y en las tres cohortes (aproximadamente 2-5 veces). También se observó una expresión aumentada de una variedad de genes que se sabe están asociados con la cicatrización, incluidos los genes de colágeno, tal como Col1A2 (5-8 veces) y Col3A1 (3-7 veces), como se esperaría en el desarrollo de tejidos cicatriciales.

Cuando se comparó con la cicatriz tratada con placebo correspondiente en los tres puntos temporales medidos, se observó la supresión de la inducción del ARNm de CTGF después de las inyecciones de EXC 001. Tal como se muestra en la **Figura 7A**, en la semana 13, la reducción total mediada por EXC 001 (en todas las 3 cohortes) en la inducción del ARNm de CTGF fue del 53%. El grado de supresión del ARNm de CTGF también varió con el tiempo y la dosis de cohorte. Por ejemplo, en una cohorte, una dosis única de 5 mg/cm redujo la inducción en la expresión de CTGF en un 74% (p = 0,011) a una inducción de solo un 140% de expresión en comparación con la piel no herida (medida tomada dos semanas después de la última dosis de EXC 001) (**Figura 7D**). Además, los niveles totales de expresión de ARNm inducidos de Col1A2, Col3A1 (**Figura 7B**), y de fibras de elastina (ELASF) (**Figura 7C**) también disminuyeron significativamente (en un 40% (p = 0,0013), 69% (p <0,0001) y 63% (p = 0,0004), respectivamente) por el tratamiento con EXC 001, cuando se midió en la semana 13 (en las tres cohortes).

La inhibición completa de la expresión del gen del colágeno probablemente no sería un resultado deseable del tratamiento farmacológico, ya que se requiere cierta expresión del gen del colágeno para facilitar la reparación normal de la herida y los procesos de curación. Como se muestra en las **Figuras 7D y E**, no hubo una inhibición significativa de la expresión del ARNm de SMAD3 o TGFβ1 por el tratamiento con EXC 001 en comparación con placebo en las semanas 4 o 13.

Estos datos demuestran un mecanismo de acción para EXC 001 en seres humanos. Estos datos también demuestran un mecanismo por el cual EXC 001 puede reducir la gravedad de las cicatrices en la piel.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Excaliard Pharmaceuticals, Inc.
 Dean, Nicholas M.
 Krochmal, Lincoln
 Hardee, Gregory
 Foulkes, J. Gordon
 O'Donnell, Niall
 Young, Leroy
 Jewell, Mark

<120> procedimiento de Tratamiento de Queloides o Cicatrices Hipertróficas Utilizando Compuestos Antisentido Dirigidos al Factor de Crecimiento de Tejido Conectivo (CTGF)

<130> 81583-A-PCT/JPW/BI

<150> 61/438.879
 <151> 02/02/2011

ES 2 729 956 T3

<150> 61/488.666
 <151> 20/05/2011

5

<150> 61/527.821
 <151> 26/08/2011

<160> 167

10

<170> PatentIn versión 3.5

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

15

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

20

<400> 1
 tccgtcatcg ctctcaggg 20

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

25

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

30

<400> 2

cccggccgac agccccgaga cgacagcccg gcgcgtcccg gtccccacct ccgaccaccg 60
 ccagcgcctcc aggccccgcg ctccccgctc gccgccaccg cgcctccgc tccgcccgca 120
 gtgccaacc atg acc gcc gcc agt atg ggc ccc gtc cgc gtc gcc ttc gtg 171
 Met Thr Ala Ala Ser Met Gly Pro Val Arg Val Ala Phe Val
 1 5 10
 gtc ctc ctc gcc ctc tgc agc cgg ccg gcc gtc ggc cag aac tgc agc 219
 Val Leu Leu Ala Leu Cys Ser Arg Pro Ala Val Gly Gln Asn Cys Ser
 15 20 25 30

ES 2 729 956 T3

ggg ccg tgc cgg tgc ccg gac gag ccg gcg ccg cgc tgc ccg gcg ggc Gly Pro Cys Arg Cys Pro Asp Glu Pro Ala Pro Arg Cys Pro Ala Gly	267
35 40 45	
gtg agc ctc gtg ctg gac ggc tgc ggc tgc tgc cgc gtc tgc gcc aag Val Ser Leu Val Leu Asp Gly Cys Gly Cys Cys Arg Val Cys Ala Lys	315
50 55 60	
cag ctg ggc gag ctg tgc acc gag ccg gac ccc tgc gac ccg cac aag Gln Leu Gly Glu Leu Cys Thr Glu Arg Asp Pro Cys Asp Pro His Lys	363
65 70 75	
ggc ctc ttc tgt gac ttc ggc tcc ccg gcc aac cgc aag atc ggc gtg Gly Leu Phe Cys Asp Phe Gly Ser Pro Ala Asn Arg Lys Ile Gly Val	411
80 85 90	
tgc acc gcc aaa gat ggt gct ccc tgc atc ttc ggt ggt acg gtg tac Cys Thr Ala Lys Asp Gly Ala Pro Cys Ile Phe Gly Gly Thr Val Tyr	459
95 100 105 110	
cgc agc gga gag tcc ttc cag agc agc tgc aag tac cag tgc acg tgc Arg Ser Gly Glu Ser Phe Gln Ser Ser Cys Lys Tyr Gln Cys Thr Cys	507
115 120 125	
ctg gac ggg gcg gtg ggc tgc atg ccc ctg tgc agc atg gac gtt cgt Leu Asp Gly Ala Val Gly Cys Met Pro Leu Cys Ser Met Asp Val Arg	555
130 135 140	
ctg ccc agc cct gac tgc ccc ttc ccg agg agg gtc aag ctg ccc ggg Leu Pro Ser Pro Asp Cys Pro Phe Pro Arg Arg Val Lys Leu Pro Gly	603
145 150 155	
aaa tgc tgc gag gag tgg gtg tgt gac gag ccc aag gac caa acc gtg Lys Cys Cys Glu Glu Trp Val Cys Asp Glu Pro Lys Asp Gln Thr Val	651
160 165 170	
gtt ggg cct gcc ctc gcg gct tac cga ctg gaa gac acg ttt ggc cca Val Gly Pro Ala Leu Ala Ala Tyr Arg Leu Glu Asp Thr Phe Gly Pro	699
175 180 185 190	
gac cca act atg att aga gcc aac tgc ctg gtc cag acc aca gag tgg Asp Pro Thr Met Ile Arg Ala Asn Cys Leu Val Gln Thr Thr Glu Trp	747
195 200 205	
agc gcc tgt tcc aag acc tgt ggg atg ggc atc tcc acc ccg gtt acc Ser Ala Cys Ser Lys Thr Cys Gly Met Gly Ile Ser Thr Arg Val Thr	795
210 215 220	
aat gac aac gcc tcc tgc agg cta gag aag cag agc cgc ctg tgc atg Asn Asp Asn Ala Ser Cys Arg Leu Glu Lys Gln Ser Arg Leu Cys Met	843
225 230 235	
gtc agg cct tgc gaa gct gac ctg gaa gag aac att aag aag ggc aaa Val Arg Pro Cys Glu Ala Asp Leu Glu Glu Asn Ile Lys Lys Gly Lys	891
240 245 250	
aag tgc atc cgt act ccc aaa atc tcc aag cct atc aag ttt gag ctt Lys Cys Ile Arg Thr Pro Lys Ile Ser Lys Pro Ile Lys Phe Glu Leu	939
255 260 265 270	
tct ggc tgc acc agc atg aag aca tac cga gct aaa ttc tgt gga gta Ser Gly Cys Thr Ser Met Lys Thr Tyr Arg Ala Lys Phe Cys Gly Val	987

ES 2 729 956 T3

	275	280	285	
	tgt acc gac ggc cga tgc tgc acc ccc cac aga acc acc acc ctg ccg			1035
	Cys Thr Asp Gly Arg Cys Cys Thr Pro His Arg Thr Thr Thr Leu Pro			
	290	295	300	
	gtg gag ttc aag tgc cct gac ggc gag gtc atg aag aag aac atg atg			1083
	Val Glu Phe Lys Cys Pro Asp Gly Glu Val Met Lys Lys Asn Met Met			
	305	310	315	
	ttc atc aag acc tgt gcc tgc cat tac aac tgt ccc gga gac aat gac			1131
	Phe Ile Lys Thr Cys Ala Cys His Tyr Asn Cys Pro Gly Asp Asn Asp			
	320	325	330	
	atc ttt gaa tcg ctg tac tac agg aag atg tac gga gac atg gca tga a			1180
	Ile Phe Glu Ser Leu Tyr Tyr Arg Lys Met Tyr Gly Asp Met Ala			
	335	340	345	
	gccagagagt gagagacatt aactcattag actggaactt gaactgattc acatctcatt			1240
	tttccgtaaa aatgatttca gtagcacaag ttattttaat ctgtttttct aactggggga			1300
	aaagattccc acccaattca aaacattgtg ccatgtcaaa caaatagtct atcttcccca			1360
	gacactgggt tgaagaatgt taagacttga cagtgggaact acattagtagc acagcaccag			1420
	aatgtatatt aaggtgtggc tttagtagca gtgggagggt accggcccgg ttagtatcat			1480
	cagatcgact cttatacgag taatatgcct gctatttgaa gtgtaattga gaaggaaaat			1540
	tttagcgtgc tcaactgacct gcctgtagcc ccagtgcagc ctaggatgtg cattctccag			1600
	ccatcaagag actgagtcaa gttgttcctt aagtcagaac agcagactca gctctgacat			1660
	tctgattcga atgacactgt tcaggaatcg gaatcctgtc gattagactg gacagcttgt			1720
	ggcaagtgaa tttgcctgta acaagccaga ttttttaaaa tttatattgt aaatattgtg			1780
	tgtgtgtgtg tgtgtgtata tatatatata tatgtacagt tatctaagtt aatttaaagt			1840
	tgtttgtgcc tttttatatt tgtttttaat gctttgatat ttcaatgtta gcctcaattt			1900
	ctgaacacca taggtagaat gtaaagcttg tctgatcggt caaagcatga aatggatact			1960
	tatatggaaa ttctgctcag atagaatgac agtccgtcaa aacagattgt ttgcaaaggg			2020
	gaggcatcag tgtcttgcca ggctgatttc taggtaggaa atgtggtagc tcacg			2075

<210> 3
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Cebador de PCR directo dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)

10

<400> 3
 acaagggcct ctctgtgac tt 22

15

<210> 4
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> Cebador de PCR inverso dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)

ES 2 729 956 T3

	<400> 4	
	ggtacaccgt accaccgaag at	22
5	<210> 5 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Sonda de PCR dirigida al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
	<400> 5	
	tgtgcaccgc caaagatggt gct	23
15	<210> 6 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Cebador de PCR directo dirigido GAPDH humana	
	<400> 6	
25	gaagtggaag gtcggagtc	19
	<210> 7 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Cebador de PCR inverso dirigido GAPDH humana	
	<400> 7	
35	gaagatggtg atgggatttc	20
	<210> 8 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Sonda de PCR dirigida GAPDH humana	
	<400> 8	
45	caagctccc gttctcagcc	20
	<210> 9 <211> 2358 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
50	<220> <221> exón <222> (207)..(1256)	
55	<400> 9	

ES 2 729 956 T3

aaactcacac aacaactctt ccccgctgag aggagacagc cagtgcgact ccaccctcca	60
gctcgcagggc agccgccccg gccgacagcc ccgagacgac agccccggcgc gtccccgggtcc	120
ccacctccga ccaccgccag cgctccaggc cccgccgctc cccgctcgcc gccaccgcgc	180
cctccgctcc gcccgagctg ccaacc atg acc gcc gcc agt atg ggc ccc gtc	233
Met Thr Ala Ala Ser Met Gly Pro Val	
1 5	
cgc gtc gcc ttc gtg gtc ctc ctc gcc ctc tgc agc cgg ccg gcc gtc	281
Arg Val Ala Phe Val Val Leu Leu Ala Leu Cys Ser Arg Pro Ala Val	
10 15 20 25	
ggc cag aac tgc agc ggg ccg tgc cgg tgc ccg gac gag ccg gcg ccg	329
Gly Gln Asn Cys Ser Gly Pro Cys Arg Cys Pro Asp Glu Pro Ala Pro	
30 35 40	
cgc tgc ccg gcg ggc gtg agc ctc gtg ctg gac ggc tgc ggc tgc tgc	377
Arg Cys Pro Ala Gly Val Ser Leu Val Leu Asp Gly Cys Gly Cys Cys	
45 50 55	
cgc gtc tgc gcc aag cag ctg ggc gag ctg tgc acc gag cgc gac ccc	425
Arg Val Cys Ala Lys Gln Leu Gly Glu Leu Cys Thr Glu Arg Asp Pro	
60 65 70	
tgc gac ccg cac aag ggc ctc ttc tgt gac ttc ggc tcc ccg gcc aac	473
Cys Asp Pro His Lys Gly Leu Phe Cys Asp Phe Gly Ser Pro Ala Asn	
75 80 85	
cgc aag atc ggc gtg tgc acc gcc aaa gat ggt gct ccc tgc atc ttc	521
Arg Lys Ile Gly Val Cys Thr Ala Lys Asp Gly Ala Pro Cys Ile Phe	
90 95 100 105	
ggt ggt acg gtg tac cgc agc gga gag tcc ttc cag agc agc tgc aag	569
Gly Gly Thr Val Tyr Arg Ser Gly Glu Ser Phe Gln Ser Ser Cys Lys	
110 115 120	
tac cag tgc acg tgc ctg gac ggg gcg gtg ggc tgc atg ccc ctg tgc	617
Tyr Gln Cys Thr Cys Leu Asp Gly Ala Val Gly Cys Met Pro Leu Cys	
125 130 135	
agc atg gac gtt cgt ctg ccc agc cct gac tgc ccc ttc ccg agg agg	665
Ser Met Asp Val Arg Leu Pro Ser Pro Asp Cys Pro Phe Pro Arg Arg	
140 145 150	
gtc aag ctg ccc ggg aaa tgc tgc gag gag tgg gtg tgt gac gag ccc	713
Val Lys Leu Pro Gly Lys Cys Cys Glu Glu Trp Val Cys Asp Glu Pro	
155 160 165	
aag gac caa acc gtg gtt ggg cct gcc ctc gcg gct tac cga ctg gaa	761
Lys Asp Gln Thr Val Val Gly Pro Ala Leu Ala Ala Tyr Arg Leu Glu	
170 175 180 185	

ES 2 729 956 T3

gac acg ttt ggc cca gac cca act atg att aga gcc aac tgc ctg gtc Asp Thr Phe Gly Pro Asp Pro Thr Met Ile Arg Ala Asn Cys Leu Val 190 195 200	809
cag acc aca gag tgg agc gcc tgt tcc aag acc tgt ggg atg ggc atc Gln Thr Thr Glu Trp Ser Ala Cys Ser Lys Thr Cys Gly Met Gly Ile 205 210 215	857
tcc acc cgg gtt acc aat gac aac gcc tcc tgc agg cta gag aag cag Ser Thr Arg Val Thr Asn Asp Asn Ala Ser Cys Arg Leu Glu Lys Gln 220 225 230	905
agc cgc ctg tgc atg gtc agg cct tgc gaa gct gac ctg gaa gag aac Ser Arg Leu Cys Met Val Arg Pro Cys Glu Ala Asp Leu Glu Glu Asn 235 240 245	953
att aag aag ggc aaa aag tgc atc cgt act ccc aaa atc tcc aag cct Ile Lys Lys Gly Lys Lys Cys Ile Arg Thr Pro Lys Ile Ser Lys Pro 250 255 260 265	1001
atc aag ttt gag ctt tct ggc tgc acc agc atg aag aca tac cga gct Ile Lys Phe Glu Leu Ser Gly Cys Thr Ser Met Lys Thr Tyr Arg Ala 270 275 280	1049
aaa ttc tgt gga gta tgt acc gac ggc cga tgc tgc acc ccc cac aga Lys Phe Cys Gly Val Cys Thr Asp Gly Arg Cys Cys Thr Pro His Arg 285 290 295	1097
acc acc acc ctg ccg gtg gag ttc aag tgc cct gac ggc gag gtc atg Thr Thr Thr Leu Pro Val Glu Phe Lys Cys Pro Asp Gly Glu Val Met 300 305 310	1145
aag aag aac atg atg ttc atc aag acc tgt gcc tgc cat tac aac tgt Lys Lys Asn Met Met Phe Ile Lys Thr Cys Ala Cys His Tyr Asn Cys 315 320 325	1193
ccc gga gac aat gac atc ttt gaa tcg ctg tac tac agg aag atg tac Pro Gly Asp Asn Asp Ile Phe Glu Ser Leu Tyr Tyr Arg Lys Met Tyr 330 335 340 345	1241
gga gac atg gca tga agccagagag tgagagacat taactcatta gactggaact Gly Asp Met Ala	1296
tgaactgatt cacatctcat ttttccgtaa aaatgatttc agtagcacia gttatttaaa	1356
tctgtttttc taactggggg aaaagattcc cacccaattc aaaacattgt gccatgtcaa	1416
acaaatagtc tatcaacccc agacactggt ttgaagaatg ttaagacttg acagtggaac	1476
tacattagta cacagcacca gaatgtatat taagggtgtg ctttaggagc agtgggaggg	1536
taccagcaga aaggttagta tcatcagata gcatcttata cgagtaatat gcctgctatt	1596
tgaagtgtaa ttgagaagga aaatthtagc gtgctcactg acctgcctgt agccccagtg	1656
acagctagga tgtgcattct ccagccatca agagactgag tcaagttggt ccttaagtca	1716
gaacagcaga ctgagctctg acattctgat tcgaatgaca ctgttcagga atcggaatcc	1776
tgctgattag actggacagc ttgtggcaag tgaatttgcc tgtaacaagc cagatthttt	1836
aaaatttata ttgtaaatat tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tatatatata tatatgtaca	1896

ES 2 729 956 T3

gttatctaag ttaatttaaa gttgtttggt cctttttatt tttgttttta atgctttgat 1956
 atttcaatgt tagcctcaat ttctgaacac cataggtaga atgtaaagct tgtctgatcg 2016
 ttcaaagcat gaaatggata cttatatgga aattctgctc agatagaatg acagtccgtc 2076
 aaaacagatt gtttgcaaag gggaggcatc agtgtccttg gcaggctgat ttctaggtag 2136
 gaaatgtggt agcctcactt ttaatgaaca aatggccttt attaaaaact gagtgactct 2196
 atatagctga tcagtttttt cacctggaag catttgtttc tactttgata tgactgtttt 2256
 toggacagtt tatttgttga gagtgtgacc aaaagttaca tgtttgcacc tttctagttg 2316
 aaaataaagt gtatatTTTT tctataaaaa aaaaaaaaaa aa 2358

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

5

<400> 10

tatattattc actgtcaatc ttagtttata tccagatata acagggtaca ctgctcttgt 60
 aatggaatca gacttcttat tttaacaaga caaaccaaat ccaatccaca tttgaagatt 120
 ataggtttta atataagaaa atgcactcat ttctcaaaga ccctagttaa gctgtgttta 180
 aatgctccta ggtgaacccc ctttgcatcc cagtgtccc accctgacac ccagagcccc 240
 tacctacca acacagaatc atttgctctg atagaacaat ggatcccttt ttctggaac 300
 attgatggcc actcctcctt tgccttgcc tatataaac tcctacatat attaagagaa 360
 aactaagcaa gagttttgga aatctgcccc aggagactgc atcctgagtc acacgcgtct 420
 ttgttctctt tcttgtccca aaaccgttac ctcaagtgac aatgatcaa atctcaaata 480
 tagaattcag ggttttacag gtaggcatct tgaggatttc aatggttaa aagcaactca 540
 ctcttttctt actctttgga gagtttcaag agcctatagc ctctaaaacg caaatcattg 600
 ctaagggttg ggggggagaa accttttcga attttttagg aattcctgct gtttgcctct 660
 tcagctacct acttctctaaa aaggatgtat gtcagtggac agaacagggc aaacttattc 720
 gaaaaagaaa taagaaataa ttgccagtgt gtttataaat gatatgaatc aggagtgtg 780
 cgaagaggat agggaaaaaa aaattctatt tgggtgctgga aatactgctc tttttttttt 840
 cctttttttt tttttctgtg agctggagtg tgccagcttt ttcagacgga ggaatgctga 900
 gtgtcaaggg gtcaggatca atccggtgtg agttgatgag gcaggaaggt ggggaggaat 960
 gcgaggaatg tccctgtttg ttaggactc cattcagctc attggcgagc cgcggccgcc 1020
 cggagcgtat aaaagcctcg ggccgcccgc cccaaactca cacaacaact cttccccgct 1080
 gagaggagac agccagtgcg actccaccct ccagctcgac ggcagccgcc ccggccgaca 1140
 gccccgagac gacagcccgg cgcgtcccgg tccccacctc cgaccaccgc cagcgtctca 1200

10

ES 2 729 956 T3

ggccccgccg ctccccgctc gccgccaccg cgcctccgc tccgcccgca gtgccaacca 1260
tgaccgccgc cagtatgggc cccgtccgcg tcgccttctg ggtcctcctc gccctctgca 1320
gccgggtaag cgccgggagc ccccgtgcg gccggcggct gccagggagg gactcggggc 1380
cggccgggga gggcgtgcg gccgaccgag cgccgtgac cgcctgtcc tccctgcagc 1440
cggccgtcgg ccagaactgc agcgggccgt gccggtgcc ggacgagccg gcgccgcgt 1500
gcccgggggg cgtgagcctc gtgctggacg gctgcggctg ctgccgcctc tgcgccaagc 1560
agctgggca gctgtgcacc gagcgcgacc catgcgaccc gcacaagggc ctattctgtc 1620
acttcggctc cccggccaac cgcaagatcg gcgtgtgac cggtagacc cgcagcccc 1680
accgctaggt gtccggccgc ctctccctc acccccaccc gcccgctgga aaaagaaacc 1740
gctcggactg agtttcttc tccagctgct gccagccgc cccctgcagc ccagatccca 1800
actcgcaccc ctgacgtctt ggatgtgaga gtgccccaat gcctgacctc tgcaccccc 1860
accctctct tccctcctc ttctccagcc aaagatggtg ctccctgcat cttcgggtgt 1920
acggtgtacc gcagcggaga gtccttccag agcagctgca agtaccagtg cacgtgcctg 1980
gacggggcgg tgggctgcat gccctgtgc agcatggacg ttcgtctgcc cagccctgac 2040
tgccccttcc cgaggagggt caagctgcc gggaaatgct gcgaggagtg ggtgtgtgac 2100
gagcccaagg accaaaccgt ggttgggcct gccctcggcg gtgagtcgag tcttctctc 2160
agtcagggtc gtgattctct cccagggagg gagtccaac tgtgccgacc gaacggggga 2220
aataccttat ccaggcgttt tacatggtgt ttgtgtgctc tgctctcgca gcttaccgac 2280
tggaagacac gtttggccca gaccctaacta tgattagagc caactgcctg gtccagacca 2340
cagagtggag cgcctgttcc aagacctgtg ggatgggcat ctccaccggt gttaccaatg 2400
acaacgcctc ctgcaggcta gagaagcaga gccgcctgtg catggtcagg ccttgccaag 2460
ctgacctgga agagaacatt aaggtacatg ttctgctcct attaactatt tttcacagga 2520
aaaacagtgg ataggacca acttagggct cttgccacgc ttgttagtat aagcccgta 2580
tctccaaaac tatctaacca ttgagctggt ttgctggaat gagagcttgt gtaatagcaa 2640
ccaccagttt tccactacga aatcttccac agggtagtt aattcaagac attccaagag 2700
aggctctggc tatttttggg catagcaaat gagactcaa cttcctcccc tcaaaatata 2760
aacagaagtc agacaacaga agactaaaac acagagggtt gaagaaagcc actcctcttg 2820
tagagtcgct gattttttt tttcctctct cttttccctt gtcttcctta gaagggcaaa 2880
aagtgcaccc gtactcccaa aatctccaag cctatcaagt ttgagcttc tggtgcacc 2940
agcatgaaga cataccgagc taaattctgt ggagtatgta ccgacggccg atgctgcacc 3000
ccccacagaa ccaccaccct gccggtggag ttcaagtgcc ctgacggcga ggtcatgaag 3060

ES 2 729 956 T3

aagaacatga tgttcatcaa gacctgtgcc tgccattaca actgtcccgg agacaatgac 3120
atctttgaat cgctgtacta caggaagatg tacggagaca tggcatgaag ccagagagtg 3180
agagacatta actcattaga ctggaacttg aactgattca catctcattt ttccgtaaaa 3240
atgatttcag tagcacaagt tatttaaatc tgtttttcta actgggggaa aagattccca 3300
cccaattcaa aacattgtgc catgtcaaac aaatagtcta tcaaccccag aacttggttt 3360
gaagaatggt aagacttgac agtggaaacta cattagtaca cagcaccaga atgtatatta 3420
aggtgtggct ttaggagcag tgggagggta ccagcagaaa ggtagtatc atcagatagc 3480
atcttatagc agtaatatgc ctgctatctg aagtgttaatt gagaaggaaa atttttagcgt 3540
gctcactgac ctgcctgtag ccccagtgc agctaggatg tgcattctcc agccatcaag 3600
agactgagtc aagtgttcc ttaagtcaga acagcagact cagctctgac attctgattc 3660
gaatgacact gttcaggaat cggaaactctg tcgattagac tggacagctt gtggcaagtg 3720
aatttgctg taacaagcca gattttttaa aatttatatt gtaaatattg tgtgtgtgtg 3780
tgtgtgtgta tatatatata tatgtacagt tatctaagtt aatttaaagt tgtttgtgcc 3840
tttttatttt tgtttttaat gctttgatat ttcaatgta gcctcaattt ctgaacacca 3900
taggtagaat gtaaagcttg tctgatogtt caaagcatga aatggatact tatatggaaa 3960
ttctgctcag atagaatgac agtccgtcaa aacagattgt ttgcaaaggg gaggcacag 4020
tgtccttggc aggctgattt ctaggtagga aatgtggtag cctcactttt aatgaacaaa 4080
tggcctttat taaaaactga gtgactctat atagctgac agttttttca cctggaagca 4140
tttgtttcta ctttgatag actgtttttc ggacagtta tttgttgaga gtgtgaccaa 4200
aagttacatg tttgcacctt tctagttgaa aataaagtgt atattttttc tataaagggc 4260
ttggttattc atttatcctt ctaaacattt ctgagttttc ttgagcataa ataggaagtt 4320
cttattaatc ataagataat tcaccaataa ttttctaaat atctttaatt attctataca 4380
ttaataaatt gattattcca tagaattttt atgtaaacat acttcacact gaatcaagta 4440
tcacagactt gcaggcatac acaccacatt gactatacag ccattttttt tgttatcttc 4500
acagaacttt atagacactt taaattcaat tctctctaga ttacttcagt ctccattaac 4560
cctgttgat tacacttggc ccttttggca tttgtacctc tctggccggt ataggttagt 4620
ttccaaccct tcacatcaca aactagtcta tgtgccttgc acgtggaaaa tgtttacatt 4680
ttttaaaaat tttatgctct aggtctgttt ctgaacttca ttaccttact gttaaatctg 4740
aaaattatga aatgaaatcc tcatttaaat ggagctatct cataagtctt gttttgtata 4800
attccgtttt tggttgccat gataaccaat gacaaacaga tggcataaat agaaaagggg 4860
ggatgagcaa atcttccatt cattaacatt aatagaaatt tgttttgaaa gtaattcctc 4920
catttgccca agtcttttagc tttatcagac ttccagatta atgcatccta ccttaccaag 4980

ES 2 729 956 T3

tggtttatac atgagaaaat ggaattgttc aagaagcctc atgtggaaac aatattgtac 5040
 ctaccaggt aggtttttac taaagagtga accaaagtga atggtaaaca aaagcaatac 5100
 accaaaggca actagaatct tctccacatg aggatagctg aggattctag gggaaaaaaaa 5160
 aattgcagac agactaactt ttccaaggt aattagcaac gttgtagtgc caatgtcatt 5220
 tggacagaca aaaatacacc tgaaaataaa gactagctct acaaacaact gtccacacca 5280
 caaaccaaag ggaaaacttc ccgtgttcag aatgtgaaaa tttatgggtca aaactctggg 5340
 ctttaaggat acaccacat ctgtatatag cagtgtgccc aggagcagca cccacactcc 5400
 ccaaataaat gcgcatgtac acatacacat aggcacacac acagagtaca ctgttagttc 5460
 acacttcctt tctgtcaatt aattcctaac tgcaaagatg aagggccatg catgataaac 5520
 gagactgact actgaattag agcattctgg aaatatagaa gcagcaggaa aagcatagat 5580
 ttcacatfff ccaaataccc acattaaaga aaaaaaaaaag agtcaactaga ttgcaaaaaca 5640
 aaaatcccac aggcaatggt tctacaaaaa ttagatggca atgcacactt tcacccccca 5700
 aatatcggag gtaggggggtg ccaaatcatc aaccaccgta agatctgcac cgtgtcagca 5760
 catgtgtgag aaaagcagag aaacaacaag gtatctgatg cttctgagaa cacgagagct 5820
 ctcaaacagc cagcaggtag tcactagata tatagaaggc caggctgaca gcagctgttg 5880
 aatctagtag gggtttggcc tagcactcca acaaagctta caagccaggg ctgcctccca 5940
 ggagaagatc ctcatactcc tggaagtgga atctaaattg agcaggtcac cagacagatg 6000
 t 6001

5 <210> 11
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 11
 ccagctgctt ggccagacg 20

15 <210> 12
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 12
 gccagaaagc tcaaactga 20

25 <210> 13
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)

ES 2 729 956 T3

	<400> 13 ccacaagctg tccagtctaa	20
5	<210> 14 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
	<400> 14 ggtcacactc tcaacaata	20
15	<210> 15 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
25	<400> 15 aaacatgtaa ctttggtca	20
30	<210> 16 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
35	<400> 16 gggaagagtt gttgtgtgag	20
40	<210> 17 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
45	<400> 17 agggtggagt cgactggct	20
50	<210> 18 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
55	<400> 18 acgaaggcga cgcggacggg	20
60	<210> 19 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	

ES 2 729 956 T3

<400> 19
 gccgacggcc ggccggctgc 20

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

10 <220>
 <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 20
 ggtgcacacg ccgatcttgc 20

15 <210> 21
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 21
 tcttggcgg tgcacacgcc 20

25 <210> 22
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 22
 gcaccatctt tggcgggtgca 20

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

40 <220>
 <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)

45 <400> 23
 gcaggagca ccatcttgg 20

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

50 <220>
 <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 24
 aagatgcagg gagcaccatc 20

55 <210> 25
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)

65 <220>
 <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)

ES 2 729 956 T3

	<code><400> 25</code>		
	<code>ccaccgaaga tgcagggagc</code>	20	
5	<code><210> 26</code> <code><211> 20</code> <code><212> ADN</code> <code><213> Secuencia artificial</code>		
10	<code><220></code> <code><223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)</code>		
	<code><400> 26</code>		
	<code>ccgtaccacc gaagatgcag</code>	20	
15	<code><210> 27</code> <code><211> 20</code> <code><212> ADN</code> <code><213> Secuencia artificial</code>		
20	<code><220></code> <code><223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)</code>		
	<code><400> 27</code>		
25	<code>gtactgcag ctgctctgga</code>	20	
	<code><210> 28</code> <code><211> 20</code> <code><212> ADN</code> <code><213> Secuencia artificial</code>		
30	<code><220></code> <code><223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)</code>		
	<code><400> 28</code>		
35	<code>gggcatgcag cccaccgccc</code>	20	
	<code><210> 29</code> <code><211> 20</code> <code><212> ADN</code> <code><213> Secuencia artificial</code>		
40	<code><220></code> <code><223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)</code>		
	<code><400> 29</code>		
45	<code>aggcccaacc acggtttggt</code>	20	
	<code><210> 30</code> <code><211> 20</code> <code><212> ADN</code> <code><213> Secuencia artificial</code>		
50	<code><220></code> <code><223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)</code>		
	<code><400> 30</code>		
55	<code>agggcaggcc caaccacggt</code>	20	
	<code><210> 31</code> <code><211> 20</code> <code><212> ADN</code> <code><213> Secuencia artificial</code>		
60	<code><220></code> <code><223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)</code>		
	<code><400> 30</code>		
65	<code>agggcaggcc caaccacggt</code>	20	
	<code><210> 31</code> <code><211> 20</code> <code><212> ADN</code> <code><213> Secuencia artificial</code>		
65	<code><220></code> <code><223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)</code>		

ES 2 729 956 T3

<400> 31
 taagccgcga gggcaggccc 20

5 <210> 32
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 32
 cccacaggtc ttggaacagg 20

15 <210> 33
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 33
 agatgcccat cccacaggtc 20

25 <210> 34
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 34
 ccagtctaag gagttaatgt 20

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

40 <220>
 <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)

45 <400> 35
 ttcaagtcc agtctaataga 20

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

50 <220>
 <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)

<400> 36
 tttccccca gtagaaaaa 20

55 <210> 37
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)

65 <220>
 <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)

ES 2 729 956 T3

	<400> 37 cacaatgttt tgaattgggt	20
5	<210> 38 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
	<400> 38 acatggcaca atgtttgaa	20
15	<210> 39 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
	<400> 39 gtttgacatg gcacaatgtt	20
25	<210> 40 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
	<400> 40 tattgtttg acatggcaca	20
35	<210> 41 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
	<400> 41 tgatagacta tttgttgac	20
45	<210> 42 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
	<400> 42 gtccactgt caagtcttaa	20
55	<210> 43 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
65		

ES 2 729 956 T3

	<400> 43 tgtactaatg tagttccact	20
5	<210> 44 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
	<400> 44 cattctggtg ctgtgtacta	20
15	<210> 45 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
25	<400> 45 taatatacat tctggtgctg	20
30	<210> 46 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
35	<400> 46 acaccttaat atacattctg	20
40	<210> 47 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
45	<400> 47 taaagccaca ccttaatata	20
50	<210> 48 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
55	<400> 48 gtaccctccc actgctccta	20
60	<210> 49 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
65	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	

ES 2 729 956 T3

	<400> 49 aagatgctat ctgatgatac	20
5	<210> 50 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
	<400> 50 cgtataagat gctatctgat	20
15	<210> 51 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
25	<400> 51 aatagcaggc atattactcg	20
30	<210> 52 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
	<400> 52 tacactcaa atagcaggca	20
40	<210> 53 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
	<400> 53 tcaattacac ttcaaatagc	20
50	<210> 54 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
	<400> 54 ggagaatgca catcctagct	20
60	<210> 55 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	

ES 2 729 956 T3

	<400> 55 atggctggag aatgcacatc	20
5	<210> 56 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
	<400> 56 tcttgatggc tggagaatgc	20
15	<210> 57 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
	<400> 57 gaatcagaat gtcagagctg	20
25	<210> 58 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
	<400> 58 cattgaaata tcaaagcatt	20
35	<210> 59 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
	<400> 59 ggctaacatt gaaatatcaa	20
45	<210> 60 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
	<400> 60 aattgaggct aacattgaaa	20
55	<210> 61 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
65		

ES 2 729 956 T3

	<400> 61 gttcagaaat tgaggctaac	20
5	<210> 62 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
	<400> 62 tatggtgttc agaaattgag	20
15	<210> 63 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
25	<400> 63 ctacctatgg tgttcagaaa	20
30	<210> 64 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
35	<400> 64 tacattctac ctatggtgtt	20
40	<210> 65 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
45	<400> 65 gacaagcttt acattctacc	20
50	<210> 66 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
55	<400> 66 gatcagacaa gctttacatt	20
60	<210> 67 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	

ES 2 729 956 T3

	<400> 67	
	atgctttgaa cgatcagaca	20
5	<210> 68 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
	<400> 68	
	atttcagct ttgaacgatc	20
15	<210> 69 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
	<400> 69	
25	gtatccattt catgctttga	20
	<210> 70 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
	<400> 70	
35	ccatataagt atccattca	20
	<210> 71 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
45	<400> 71	
	gaatttccat ataagtatcc	20
	<210> 72 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
55	<400> 72	
	tctgagcaga atttccatat	20
	<210> 73 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
65	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	

ES 2 729 956 T3

	<400> 73 tgtcattcta tctgagcaga	20
5	<210> 74 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
	<400> 74 ttgacggac tgtcattcta	20
15	<210> 75 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
25	<400> 75 aacaatctgt ttgacggac	20
30	<210> 76 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
35	<400> 76 tgatgcctcc cctttgcaaa	20
40	<210> 77 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
45	<400> 77 tgccaaggac actgatgcct	20
50	<210> 78 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
55	<400> 78 cagcctgccca aggacactga	20
60	<210> 79 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	

ES 2 729 956 T3

	<code><400> 79</code>		
	<code>gaaatcagcc tgccaaggac</code>	20	
5	<code><210> 80</code> <code><211> 20</code> <code><212> ADN</code> <code><213> Secuencia artificial</code>		
10	<code><220></code> <code><223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)</code>		
	<code><400> 80</code>		
	<code>acctagaaat cagcctgcca</code>	20	
15	<code><210> 81</code> <code><211> 20</code> <code><212> ADN</code> <code><213> Secuencia artificial</code>		
20	<code><220></code> <code><223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)</code>		
	<code><400> 81</code>		
25	<code>ttcctaccta gaaatcagcc</code>	20	
	<code><210> 82</code> <code><211> 20</code> <code><212> ADN</code> <code><213> Secuencia artificial</code>		
30	<code><220></code> <code><223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)</code>		
	<code><400> 82</code>		
35	<code>taccacattt cctacctaga</code>	20	
	<code><210> 83</code> <code><211> 20</code> <code><212> ADN</code> <code><213> Secuencia artificial</code>		
40	<code><220></code> <code><223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)</code>		
	<code><400> 83</code>		
45	<code>tgaggctacc acatttccta</code>	20	
	<code><210> 84</code> <code><211> 20</code> <code><212> ADN</code> <code><213> Secuencia artificial</code>		
50	<code><220></code> <code><223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)</code>		
	<code><400> 84</code>		
55	<code>taaaagtgag gctaccacat</code>	20	
	<code><210> 85</code> <code><211> 20</code> <code><212> ADN</code> <code><213> Secuencia artificial</code>		
60	<code><220></code> <code><223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)</code>		
	<code><400> 84</code>		
65	<code>taaaagtgag gctaccacat</code>	20	

ES 2 729 956 T3

	<400> 85 caaatgcttc caggtgaaaa	20
5	<210> 86 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
	<400> 86 tagaaacaaa tgctccagg	20
15	<210> 87 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
25	<400> 87 tcatatcaaa gtagaaacaa	20
30	<210> 88 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
	<400> 88 tccgaaaaac agtcatatca	20
40	<210> 89 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
	<400> 89 accggctgc agaggcgag	20
50	<210> 90 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
	<400> 90 cgcttaccg gctgcagagg	20
60	<210> 91 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	

ES 2 729 956 T3

	<code><400> 91</code>		
	<code>gacagggcgg tcagcggcgc</code>	20	
5	<code><210> 92</code> <code><211> 20</code> <code><212> ADN</code> <code><213> Secuencia artificial</code>		
10	<code><220></code> <code><223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)</code>		
	<code><400> 92</code>		
	<code>agtccgagcg gttctttt</code>	20	
15	<code><210> 93</code> <code><211> 20</code> <code><212> ADN</code> <code><213> Secuencia artificial</code>		
20	<code><220></code> <code><223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)</code>		
	<code><400> 93</code>		
25	<code>aactcagtcc gagcggtttc</code>	20	
	<code><210> 94</code> <code><211> 20</code> <code><212> ADN</code> <code><213> Secuencia artificial</code>		
30	<code><220></code> <code><223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)</code>		
	<code><400> 94</code>		
35	<code>aaagaaactc agtccgagcg</code>	20	
	<code><210> 95</code> <code><211> 20</code> <code><212> ADN</code> <code><213> Secuencia artificial</code>		
40	<code><220></code> <code><223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)</code>		
	<code><400> 95</code>		
45	<code>tggagaaaga aactcagtcc</code>	20	
	<code><210> 96</code> <code><211> 20</code> <code><212> ADN</code> <code><213> Secuencia artificial</code>		
50	<code><220></code> <code><223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)</code>		
	<code><400> 96</code>		
55	<code>gcagctggag aaagaaactc</code>	20	
	<code><210> 97</code> <code><211> 20</code> <code><212> ADN</code> <code><213> Secuencia artificial</code>		
60	<code><220></code> <code><223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)</code>		
	<code><400> 96</code>		
65	<code>gcagctggag aaagaaactc</code>	20	
	<code><210> 97</code> <code><211> 20</code> <code><212> ADN</code> <code><213> Secuencia artificial</code>		
65	<code><220></code> <code><223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)</code>		

ES 2 729 956 T3

	<code><400> 97</code>		
	<code>tggcagcagc tggagaaaga</code>	20	
5	<code><210> 98</code> <code><211> 20</code> <code><212> ADN</code> <code><213> Secuencia artificial</code>		
10	<code><220></code> <code><223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)</code>		
	<code><400> 98</code>		
	<code>agggagcacc atctttggct</code>	20	
15	<code><210> 99</code> <code><211> 20</code> <code><212> ADN</code> <code><213> Secuencia artificial</code>		
20	<code><220></code> <code><223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)</code>		
	<code><400> 99</code>		
25	<code>tcacccgcga gggcaggccc</code>	20	
	<code><210> 100</code> <code><211> 20</code> <code><212> ADN</code> <code><213> Secuencia artificial</code>		
30	<code><220></code> <code><223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)</code>		
	<code><400> 100</code>		
35	<code>ggaagactcg actcacccgc</code>	20	
	<code><210> 101</code> <code><211> 20</code> <code><212> ADN</code> <code><213> Secuencia artificial</code>		
40	<code><220></code> <code><223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)</code>		
	<code><400> 101</code>		
45	<code>ttagaggaag actcgactca</code>	20	
	<code><210> 102</code> <code><211> 20</code> <code><212> ADN</code> <code><213> Secuencia artificial</code>		
50	<code><220></code> <code><223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)</code>		
	<code><400> 102</code>		
55	<code>accctgactt agaggaagac</code>	20	
	<code><210> 103</code> <code><211> 20</code> <code><212> ADN</code> <code><213> Secuencia artificial</code>		
60	<code><220></code> <code><223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)</code>		
	<code><400> 102</code>		
65	<code>accctgactt agaggaagac</code>	20	

ES 2 729 956 T3

	<400> 103 tcacgaccct gacttagagg	20
5	<210> 104 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
	<400> 104 gagaatcacg accctgactt	20
15	<210> 105 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
	<400> 105 tgggagagaa tcacgaccct	20
25	<210> 106 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
	<400> 106 ctccctggga gagaatcacg	20
35	<210> 107 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
	<400> 107 ggtcggcaca gtaggactc	20
45	<210> 108 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
	<400> 108 cgttcggtcg gcacagttag	20
55	<210> 109 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
65		

ES 2 729 956 T3

	<code><400> 109</code>		
	<code>cctggataag gtattcccc</code>	20	
5	<code><210> 110</code> <code><211> 20</code> <code><212> ADN</code> <code><213> Secuencia artificial</code>		
10	<code><220></code> <code><223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)</code>		
	<code><400> 110</code>		
	<code>acaaacacca tgtaaacgc</code>	20	
15	<code><210> 111</code> <code><211> 20</code> <code><212> ADN</code> <code><213> Secuencia artificial</code>		
20	<code><220></code> <code><223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)</code>		
	<code><400> 111</code>		
25	<code>gagcacacaa acaccatgta</code>	20	
	<code><210> 112</code> <code><211> 20</code> <code><212> ADN</code> <code><213> Secuencia artificial</code>		
30	<code><220></code> <code><223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)</code>		
	<code><400> 112</code>		
35	<code>tgcgagagca gagcacacaa</code>	20	
	<code><210> 113</code> <code><211> 20</code> <code><212> ADN</code> <code><213> Secuencia artificial</code>		
40	<code><220></code> <code><223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)</code>		
	<code><400> 113</code>		
45	<code>taagctgcca gagcagagca</code>	20	
	<code><210> 114</code> <code><211> 20</code> <code><212> ADN</code> <code><213> Secuencia artificial</code>		
50	<code><220></code> <code><223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)</code>		
	<code><400> 114</code>		
55	<code>gtcggtaagc tgcgagagca</code>	20	
	<code><210> 115</code> <code><211> 20</code> <code><212> ADN</code> <code><213> Secuencia artificial</code>		
60	<code><220></code> <code><223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)</code>		
	<code><400> 114</code>		
65	<code>gtcggtaagc tgcgagagca</code>	20	
	<code><210> 115</code> <code><211> 20</code> <code><212> ADN</code> <code><213> Secuencia artificial</code>		
65	<code><220></code> <code><223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)</code>		

ES 2 729 956 T3

	<400> 115 ttccagtcgg taagctgcga	20
5	<210> 116 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
	<400> 116 acatgtacct taatgtctc	20
15	<210> 117 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
	<400> 117 gcagaacatg tacctaatg	20
25	<210> 118 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
	<400> 118 taggagcaga acatgtacct	20
35	<210> 119 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
	<400> 119 gttaatagga gcagaacatg	20
45	<210> 120 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
	<400> 120 tgaaaaatag ttaataggag	20
55	<210> 121 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
	<400> 121 tgaaaaatag ttaataggag	20
65	<210> 122 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
70	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	

ES 2 729 956 T3

	<code><400> 121 ccactgtttt tcctgtgaaa</code>	20
5	<code><210> 122 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial</code>	
10	<code><220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)</code>	
15	<code><400> 122 aagttgggtc ctatccactg</code>	20
20	<code><210> 123 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial</code>	
25	<code><220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)</code>	
30	<code><400> 123 gccctaagtt ggtcctatc</code>	20
35	<code><210> 124 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial</code>	
40	<code><220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)</code>	
45	<code><400> 124 caagagccct aagttgggtc</code>	20
50	<code><210> 125 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial</code>	
55	<code><220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)</code>	
60	<code><400> 126 cgggcttata ctaacaagcg</code>	20
65	<code><210> 127 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial</code>	
70	<code><220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)</code>	

ES 2 729 956 T3

	<code><400> 127</code>		
	<code>gataacgggc ttactaac</code>	20	
5	<code><210> 128</code> <code><211> 20</code> <code><212> ADN</code> <code><213> Secuencia artificial</code>		
10	<code><220></code> <code><223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)</code>		
	<code><400> 128</code> <code>ttggagataa cgggctata</code>	20	
15	<code><210> 129</code> <code><211> 20</code> <code><212> ADN</code> <code><213> Secuencia artificial</code>		
20	<code><220></code> <code><223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)</code>		
	<code><400> 129</code> <code>tagttttgga gataacgggc</code>	20	
25	<code><210> 130</code> <code><211> 20</code> <code><212> ADN</code> <code><213> Secuencia artificial</code>		
30	<code><220></code> <code><223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)</code>		
	<code><400> 130</code> <code>ttagatagtt ttggagataa</code>	20	
35	<code><210> 131</code> <code><211> 20</code> <code><212> ADN</code> <code><213> Secuencia artificial</code>		
40	<code><220></code> <code><223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)</code>		
	<code><400> 131</code> <code>caatggtag atagttttgg</code>	20	
45	<code><210> 132</code> <code><211> 20</code> <code><212> ADN</code> <code><213> Secuencia artificial</code>		
50	<code><220></code> <code><223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)</code>		
	<code><400> 132</code> <code>cagctcaatg gtagatagt</code>	20	
55	<code><210> 133</code> <code><211> 20</code> <code><212> ADN</code> <code><213> Secuencia artificial</code>		
60	<code><220></code> <code><223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)</code>		
	<code><400> 132</code> <code>cagctcaatg gtagatagt</code>	20	
65	<code><210> 133</code> <code><211> 20</code> <code><212> ADN</code> <code><213> Secuencia artificial</code>		
70	<code><220></code> <code><223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)</code>		

ES 2 729 956 T3

	<code><400> 133 caaaacagct caatggttag</code>	20
5	<code><210> 134 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial</code>	
10	<code><220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)</code>	
	<code><400> 134 tccagcaaaa cagctcaatg</code>	20
15	<code><210> 135 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial</code>	
20	<code><220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)</code>	
25	<code><400> 135 ctcattccag caaaacagct</code>	20
30	<code><210> 136 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial</code>	
	<code><220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)</code>	
35	<code><400> 136 aagctctcat tccagcaaaa</code>	20
40	<code><210> 137 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial</code>	
	<code><220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)</code>	
45	<code><400> 137 tacacaagct ctcattccag</code>	20
50	<code><210> 138 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial</code>	
55	<code><220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)</code>	
	<code><400> 138 ggttgctatt acacaagctc</code>	20
60	<code><210> 139 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial</code>	
65	<code><220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)</code>	

ES 2 729 956 T3

	<400> 139 ctggtggttg ctattacaca	20
5	<210> 140 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
	<400> 140 gaaaactggt ggttgctatt	20
15	<210> 141 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
	<400> 141 tagtggaata ctggtggttg	20
25	<210> 142 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
	<400> 142 ttaactaacc ctgtggaaga	20
35	<210> 143 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
	<400> 143 tgttctgaat taactaaccc	20
45	<210> 144 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
	<400> 144 tggatgtct tgaattaact	20
55	<210> 145 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
65		

ES 2 729 956 T3

	<400> 145 gccagagcct ctcttgaat	20
5	<210> 146 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
	<400> 146 aaaaatagcc agagcctctc	20
15	<210> 147 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
	<400> 147 tgtccaaaa tagccagagc	20
25	<210> 148 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
	<400> 148 tgctatgtcc aaaaatagcc	20
35	<210> 149 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
	<400> 149 tcatttgcta tgtccaaaa	20
45	<210> 150 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
	<400> 150 gagtctcatt tgctatgtcc	20
55	<210> 151 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
65		

ES 2 729 956 T3

	<400> 151 agtttgagtc tcatttgcta	20
5	<210> 152 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
	<400> 152 gaggaagttt gagtctcatt	20
15	<210> 153 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
25	<400> 153 cttctgttgt ctgactctg	20
30	<210> 154 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
	<400> 154 cctctgtggt ttagtcttct	20
40	<210> 155 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
	<400> 155 tttctcaac cctctgtggt	20
50	<210> 156 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
	<400> 156 ggagtggtt tcttcaacct	20
60	<210> 157 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	

ES 2 729 956 T3

	<400> 157 aggaagacaa gggaaaagag	20
5	<210> 158 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
	<400> 158 ttctaaggaa gacaaggaa	20
15	<210> 159 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
	<400> 159 tgcccttcta aggaagacaa	20
25	<210> 160 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
	<400> 160 ggatgcgagt tgggatctgg	20
35	<210> 161 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
	<400> 161 ccagctgctt ggcgagacg	20
45	<210> 162 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
	<400> 162 gccagaaagc tcaaactga	20
55	<210> 163 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
65	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	

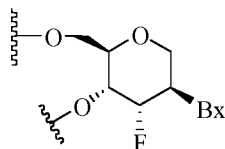
ES 2 729 956 T3

	<400> 163 ccacaagctg tccagtctaa	20
5	<210> 164 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
	<400> 164 ggtcacactc tcaacaaata	20
15	<210> 165 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
25	<400> 165 aaacatgtaa ctttggta	20
30	<210> 166 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
	<400> 166 tgacatggca caatgtttg	20
40	<210> 167 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Antisentido dirigido al factor de crecimiento de tejido conectivo humano (CTGF)	
	<400> 167 ccttcctga aggtcctcc	20

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un oligonucleótido antisentido modificado que consiste en 12-30 nucleósidos unidos, del los cuales al menos una porción de secuencia de 12 nucleobases es complementaria a los nucleótidos presentes dentro de una región seleccionada de los nucleótidos 1388-1423, 1394-1423 y 1399-1423 de la SEQ ID NO: 9, o una sal o un éster del mismo, para su uso en el tratamiento de un queloide, o para prevenir la formación, reformación o crecimiento de un queloide después de una lesión en la piel, en un sujeto que lo necesite, en la que la composición se administra al sujeto mediante una o más inyecciones de enhebrado en el sitio del queloide o de la lesión en la piel, en una cantidad eficaz para tratar, o para prevenir la formación, reformación o crecimiento de, el queloide, en la que la cantidad eficaz es de 0,1 a 50 mg del oligonucleótido modificado por inyección por centímetro lineal del queloide o de la lesión en la piel.
2. Una composición que comprende un oligonucleótido antisentido modificado que consiste en 12-30 nucleósidos unidos, de los cuales al menos una porción de secuencia de 12 nucleobases es complementaria a los nucleótidos presentes dentro de una región seleccionada de los nucleótidos 1388-1423, 1394-1423 y 1399-1423 de la SEQ ID NO: 9, o una sal o un éster del mismo, para su uso en el tratamiento de una cicatriz hipertrófica, o para prevenir la formación, reformación o crecimiento de una cicatriz hipertrófica después de una lesión en la piel, en un sujeto que lo necesite, en la que la composición se administra al sujeto mediante una o más inyecciones de enhebrado en el sitio de la cicatriz hipertrófica o de la lesión en la piel, en una cantidad eficaz para tratar, o para prevenir la formación, reformación o crecimiento de, la cicatriz hipertrófica, en la que la cantidad eficaz es de 0,1 a 25 mg del oligonucleótido modificado por inyección por centímetro lineal de la cicatriz hipertrófica o de la lesión en la piel.
3. La composición, para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que la composición se administra por vía intradérmica.
4. La composición, para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la una o más inyecciones comprenden múltiples inyecciones de enhebrado intradérmico por cicatriz.
5. La composición, para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el oligonucleótido antisentido modificado se administra al menos una vez cada dos semanas durante al menos cuatro semanas, al menos una vez cada tres semanas durante al menos seis semanas, al menos una vez cada cuatro semanas durante al menos ocho semanas, al menos una vez cada ocho semanas durante al menos dieciséis semanas, se administra durante un periodo de al menos nueve semanas, o se administra durante un periodo de 26 semanas.
6. La composición, para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que al menos una porción de secuencia de 12 nucleobases del oligonucleótido antisentido modificado está presente dentro de la secuencia de nucleobases establecida en cualquiera de las secuencias establecidas en la SEQ ID NO: 39, 40, o 166.
7. La composición, para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el oligonucleótido antisentido modificado comprende al menos 14 nucleósidos unidos.
8. La composición, para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que el oligonucleótido antisentido modificado consiste en 20 nucleósidos unidos.
9. La composición, para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que el oligonucleótido antisentido modificado es un oligonucleótido monocatenario, es un oligonucleótido bicatenario, comprende al menos un oligodesoxirribonucleótido, o comprende al menos un oligorribonucleótido.
10. La composición, para su uso según la reivindicación 6, en la que el oligonucleótido antisentido modificado tiene una secuencia que es 100% idéntica en su longitud a una porción de una cualquiera de las secuencias establecidas en la SEQ ID NO: 39, 40, o 166.
11. La composición, para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que el oligonucleótido antisentido modificado comprende al menos un enlace internucleosídico modificado, opcionalmente, al menos un enlace internucleosídico modificado es un enlace internucleosídico fosforotioato.
12. La composición, para su uso según la reivindicación 11, en la que todos los enlaces internucleosídicos son enlaces internucleosídicos fosforotioato.
13. La composición, para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que al menos un nucleósido comprende un azúcar modificado, opcionalmente en la que el azúcar modificado es un azúcar bicíclico.
14. La composición, para su uso según la reivindicación 13, en la que al menos uno de los azúcares modificados comprende un 2'-O-metoxietilo.
15. La composición, para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende al menos un nucleósido modificado con tetrahidropirano en el que un anillo de tetrahidropirano reemplaza al anillo de furanosa.
16. La composición, para su uso según la reivindicación 15, en la que cada uno de los al menos un nucleósido

modificado con tetrahidropirano tiene la estructura:



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

- 5 17. La composición, para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que al menos un nucleósido comprende una nucleobase modificada.
18. La composición, para su uso según la reivindicación 17, en la que la nucleobase modificada es un desoxinucleósido, un ribonucleósido o una 5'-metilcitosina.
19. La composición, para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que el oligonucleótido antisentido modificado comprende:
- 10 (a) un segmento hueco que consiste en desoxinucleósidos unidos;
 (b) un segmento de extremo 5' que consiste en nucleósidos modificados unidos; y
 (c) un segmento de extremo 3' que consiste en nucleósidos modificados unidos;
- en el que el segmento hueco está situado entre el segmento de extremo 5' y el segmento de extremo 3' y en el que cada nucleósido modificado dentro de cada segmento de extremo comprende un azúcar modificado.
- 15 20. La composición, para su uso según la reivindicación 19, en la que el oligonucleótido antisentido modificado comprende:
- (a) un segmento hueco que consiste en trece desoxinucleósidos unidos;
 (b) un segmento de extremo 5' que consiste en dos nucleósidos modificados unidos; y
 (c) un segmento de extremo 3' que consiste en cinco nucleósidos modificados unidos;
- 20 en el que el segmento hueco está situado entre el segmento de extremo 5' y el segmento de extremo 3', en el que cada nucleósido modificado dentro de cada segmento de extremo comprende un 2'-O-metoxietil azúcar; y en el que cada enlace internucleosídico es un enlace fosforotioato.
21. La composición, para su uso según la reivindicación 6, en la que la secuencia de la nucleobase es la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40 o SEQ ID NO: 166.
- 25 22. La composición, para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, en la que la composición comprende el oligonucleótido antisentido modificado o una sal del mismo, y un transportador o diluyente farmacéuticamente aceptable.
23. La composición, para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, comprende adicionalmente administrar al sujeto un segundo compuesto antisentido dirigido a la misma secuencia o a una diferente.
- 30 24. La composición, para su uso según la reivindicación 23, en el que el oligonucleótido antisentido modificado y el segundo compuesto antisentido se administran simultánea o secuencialmente.
25. La composición, para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, en la que el oligonucleótido antisentido modificado está presente en un conjugado con un resto que potencia la captación del compuesto en, y/o aumenta el tiempo de residencia del compuesto en, el sujeto, en el que el tiempo de residencia es preferentemente de 7 a 60 días.
- 35 26. La composición, para su uso según la reivindicación 25, en la que el resto es polietilenglicol, ácido hialurónico, colesterol, ácido acético adamantino, ácido 1-pirenobutírico, dihidrotestosterona, 1,3-Bis-O-(hexadecil)glicerol, hexadecilglicerol, hexadecilamina, geraniloxihexilo, ácido palmítico, ácido mirístico, espermina, espermidina, ácido fólico, vitamina E, un grupo de carbohidratos, un péptido (que incluye hélice de antenapedia, fragmentos Tat del VIH, péptido de unión a integrina), transportina o porfirina.
- 40 27. La composición, para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26, en el que el oligonucleótido antisentido modificado se administra en un sistema de suministro que potencia la captación del compuesto en, y/o aumenta el tiempo de residencia del compuesto en, el sujeto, en el que el tiempo de residencia es preferentemente de 7 a 60 días.
- 45 28. La composición, para su uso según la reivindicación 27, en el que el sistema de suministro comprende un lípido catiónico, un liposoma, una micropartícula, una nanopartícula, una formulación líquida con partículas suspendidas con o sin fármaco en la solución para liberación inmediata o con depósito de fármaco en partículas (particularmente

partículas de PLGA y poli-Arg), una formulación líquida que gelifica después de las inyecciones, tal como líquidos termoestables/sensibles (por ejemplo, geles plurónicos), líquidos que contienen un polímero y un fármaco en un disolvente biocompatible que precipita cuando el disolvente se diluye con fluidos corporales (por ejemplo, atrigel), un gel, una formulación semisólida tal como hidrogel.

- 5 29. La composición, para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28, en el que el oligonucleótido antisentido modificado se administra al sujeto después de una extirpación quirúrgica del queloide, cicatriz o lesión fibrótica.
- 10 30. La composición, para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29, en el que la lesión en la piel es el resultado de una incisión quirúrgica, una biopsia, una perforación en la piel, una extracción de piel, una quemadura o una herida.
31. La composición, para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 30, en el que la cantidad eficaz es aproximadamente 5 mg del oligonucleótido antisentido modificado por inyección por centímetro lineal del queloide, la cicatriz hipertrófica, la lesión en la piel, el sitio de la lesión, la cicatriz preexistente o la lesión fibrótica preexistente.
- 15 32. La composición, para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 31, en el que el oligonucleótido antisentido modificado se administra hasta 6 meses o hasta 1 año.
33. La composición, para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 32, comprende adicionalmente administrar al sujeto otro agente terapéutico.
- 20 34. La composición, para su uso según la reivindicación 33, en el que tal otro agente terapéutico es un esteroide, una envoltura de silicona, TGF- β 3 (es decir, Juvista), colagenasa (es decir, Xyflex), 17 β -estrodíol (es decir, Zesteem), IL-10 (es decir, Prevascar), manosa 6-fosfato (es decir, Juvindex), relajante del músculo liso (es decir, AZX100, un péptido sintético de 24 aminoácidos), una terapia con células madre (es decir, GBT009), proteína amiloide sérica, anticuerpos dirigidos a la integrina α v β 6, CTGF, TGF β , o moléculas que inhiben la actividad de ALK-4 y/o ALK-5 (los receptores beta de TGF), cualquier inhibidor diseñado para bloquear la actividad de TNF (por ejemplo, etanercept), apósitos oclusivos, terapia de compresión, criocirugía, escisión quirúrgica, tratamiento con láser, radioterapia, terapia con interferón, bleomicina, 5-fluorouracilo, verapamilo, crema de imiquimod, uno capaz de promover la cicatrización de heridas, tal como Dermagraft, Apligraf, PDGF (Regranex), estimulación eléctrica, "factores de crecimiento" como una categoría, apósitos como una categoría, submucosa del intestino delgado (SIS), Promogran, oxígeno hiperbárico, o combinaciones de los mismos.
- 25 35. La composición, para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 34, en el que el oligonucleótido antisentido modificado se administra por medio de una formulación, ultrasonido, electroporación, iontoforesis o microaguja.
- 30 36. La composición, para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 35, en el que el oligonucleótido antisentido modificado se administra adyacente al queloide, la cicatriz hipertrófica, la lesión en la piel, el sitio de la lesión, la cicatriz preexistente o la lesión fibrótica preexistente.
- 35 37. La composición, para su uso según la reivindicación 36, en el que el oligonucleótido antisentido modificado se administra a lo largo de toda la longitud o a lo largo de cada lado del queloide, la cicatriz hipertrófica, la lesión en la piel, el sitio de la lesión, la cicatriz preexistente o la lesión fibrótica preexistente.
- 40 38. La composición, para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 37, en el que el oligonucleótido antisentido modificado se administra directamente en el queloide, la cicatriz hipertrófica, la lesión en la piel, el sitio de la lesión, la cicatriz preexistente o la lesión fibrótica preexistente.
39. La composición, para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 38, en el que el sujeto está genéticamente predispuesto a la formación de queloides o cicatrices hipertróficas o ambos.
- 45 40. Un kit que comprende la composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 39 que comprende:
- a. un dispositivo precargado con la composición que comprende el oligonucleótido antisentido modificado; y
 - b. instrucciones para su uso.

FIGURA 1A

Difusión y aclaramiento de ASO en piel de conejo

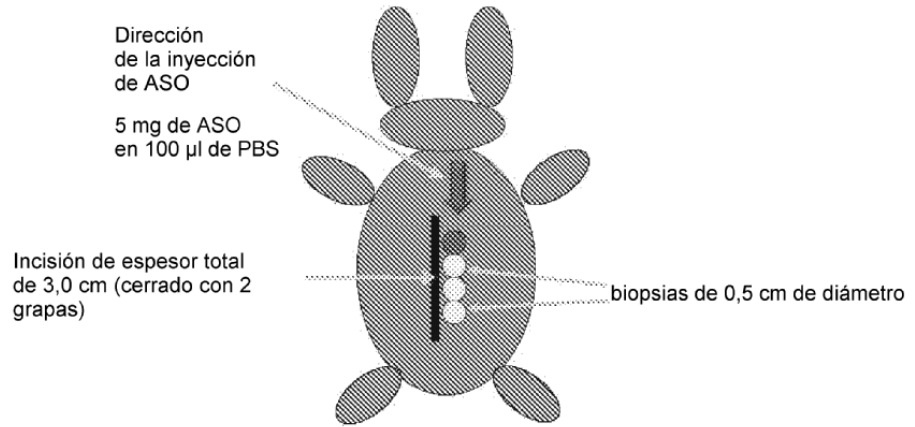


FIGURA 1B

Difusión y aclaramiento de ASO en piel de conejo

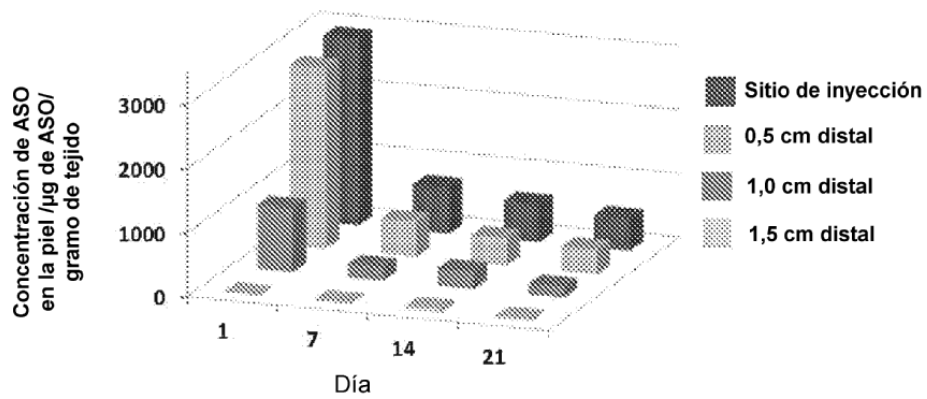


FIGURA 2A

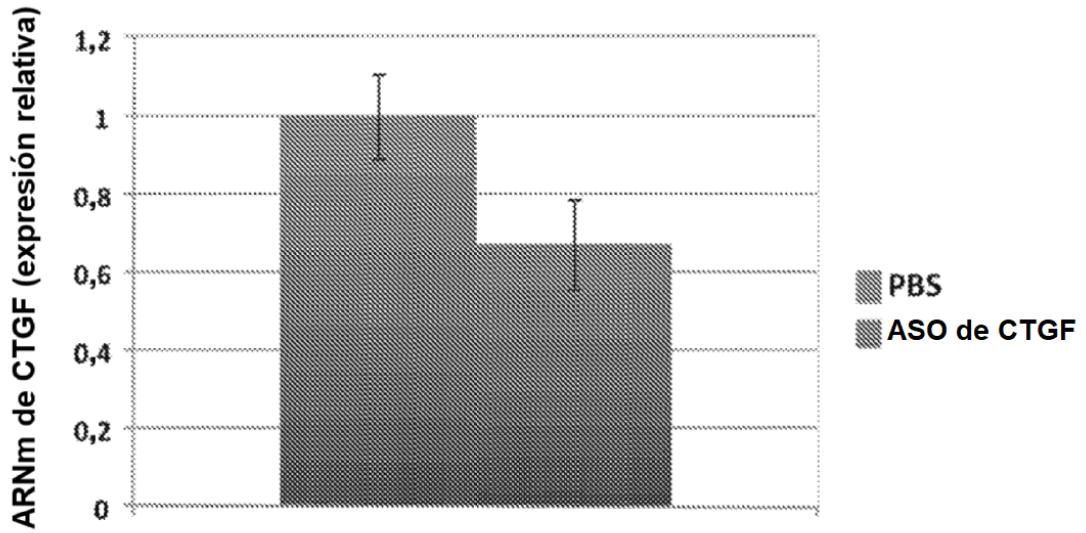


FIGURA 2B

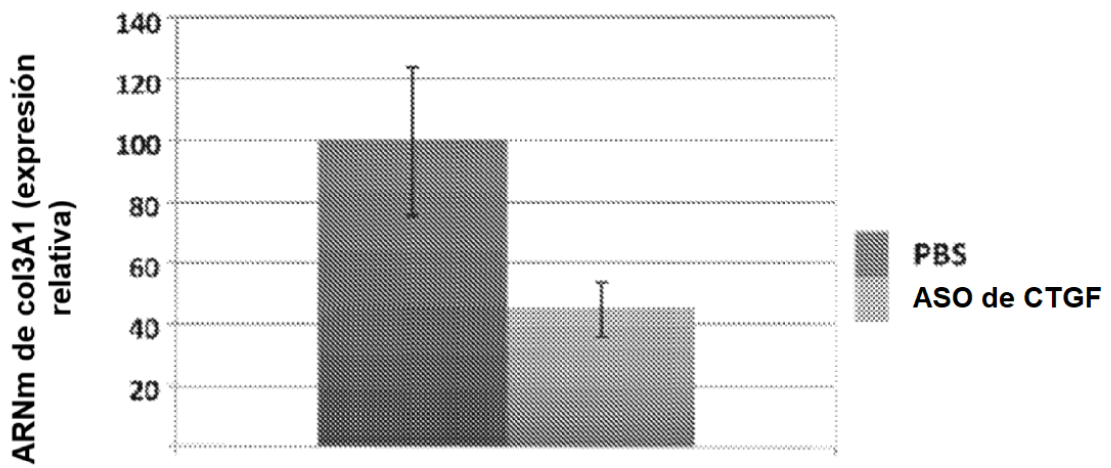


FIGURA 3A (cicatriz hipertrófica 24 semanas después de la cirugía de revisión)

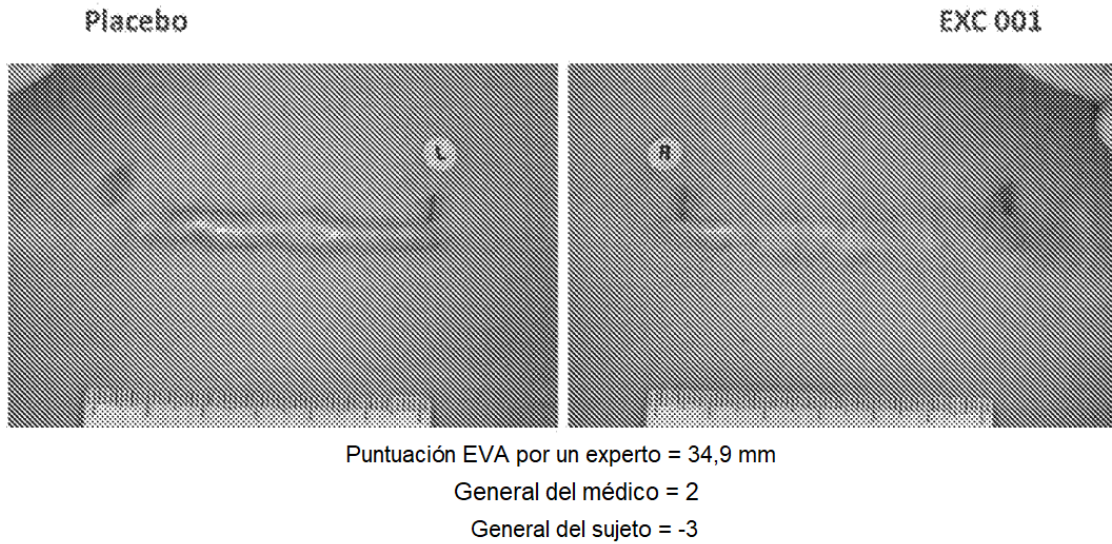


FIGURA 3B (cicatriz queloide 24 semanas después de la cirugía de revisión)

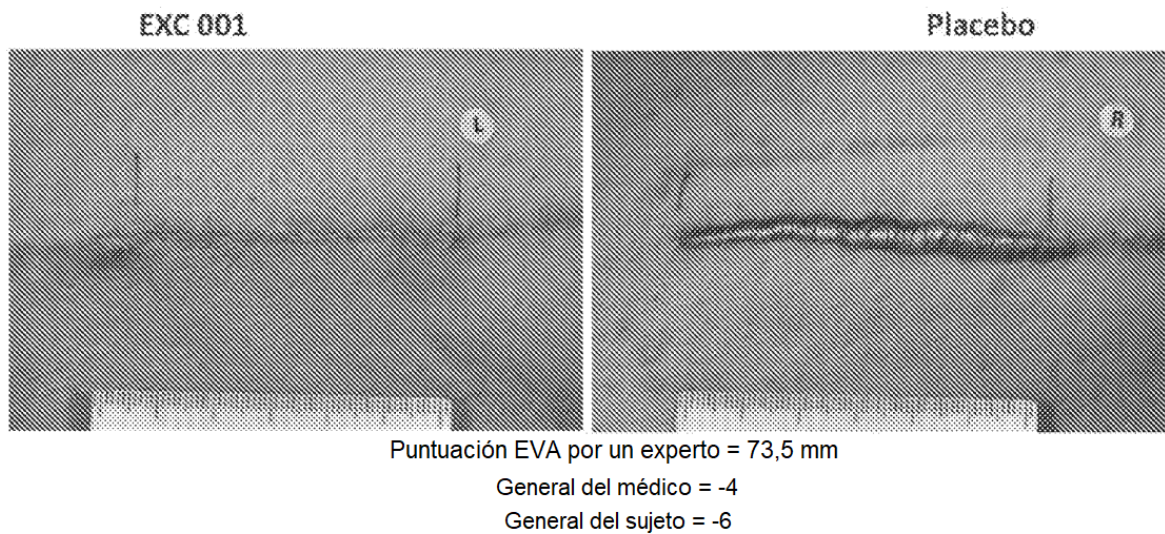
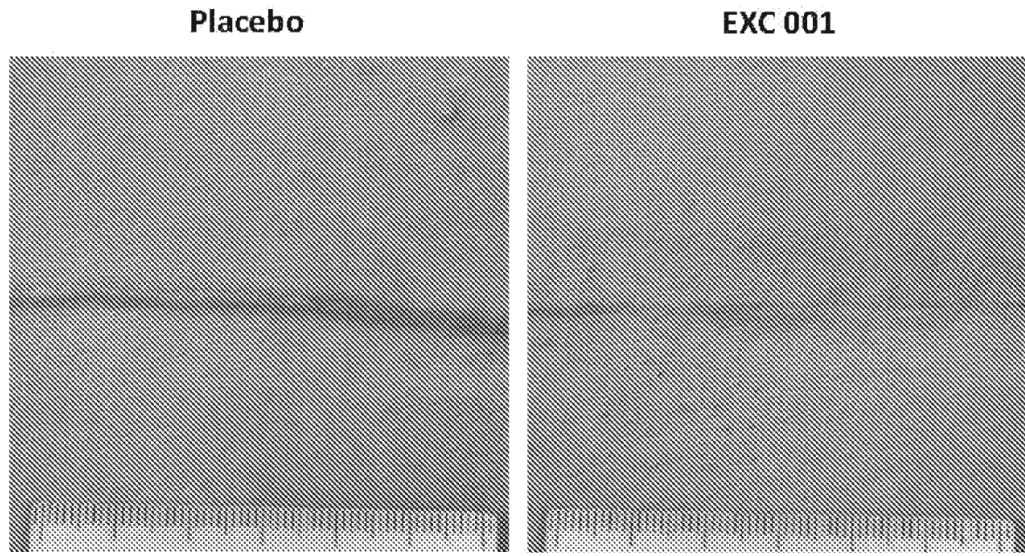


FIGURA 4: Cicatriz hipertrófica 12 semanas después de la cirugía de abdominoplastia.



Puntuación EVA por un experto = -47,2 mm

General del médico = -2

General del sujeto = -1

FIGURA 5: Ejemplo de difusión lateral limitada de EXC001 distal al sitio de inyección.

**Estudio de Abdominoplastia
(número 202)
Semana 12**

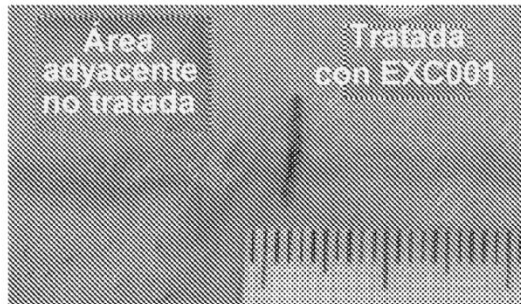


FIGURA 6: Reducción mediada por EXC001 en la gravedad de la cicatriz abdominal y expresión de la proteína CTGF

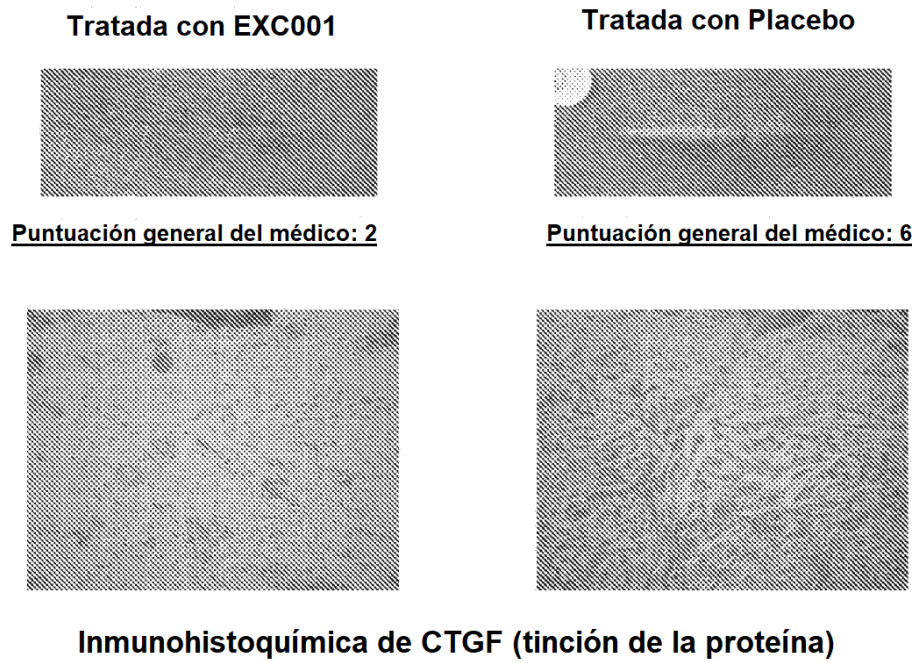


FIGURA 7A

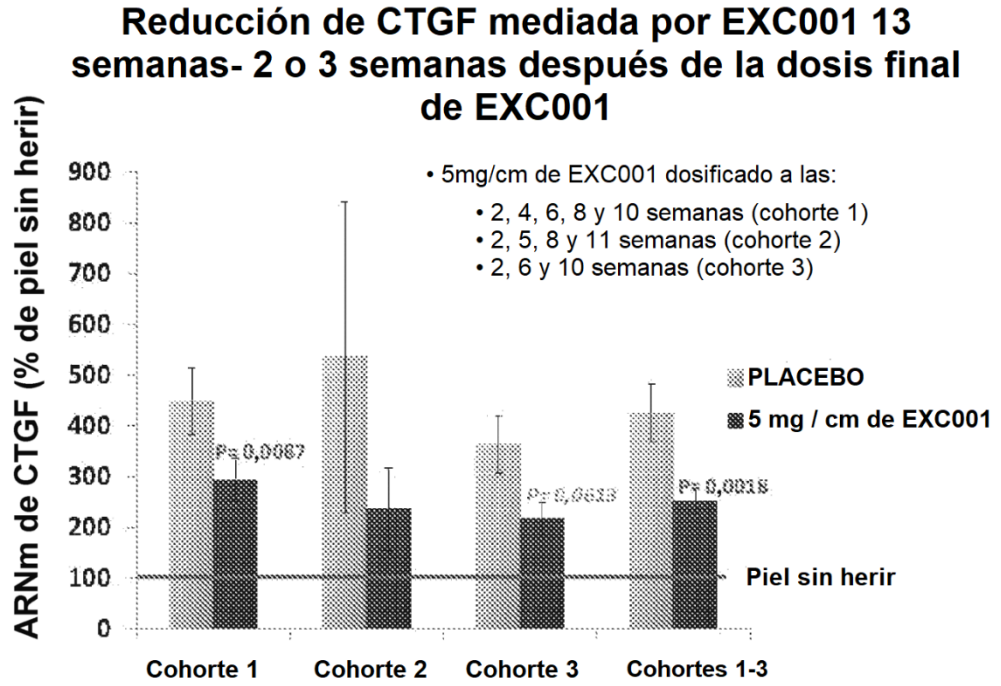


FIGURA 7B

Reducción de Col3A1 mediada por EXC001 13 semanas- 2 o 3 semanas después de la dosis final de EXC001

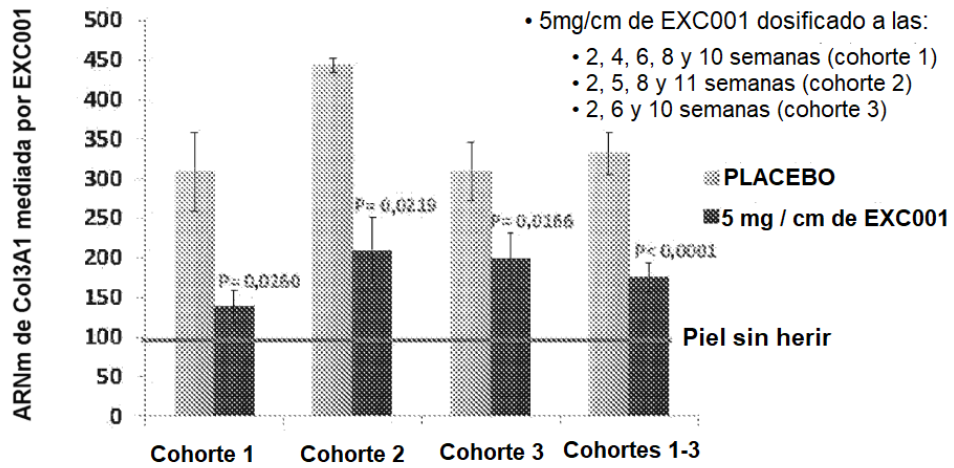


FIGURA 7C

Reducción de ELASF mediada por EXC001 13 semanas- 2 o 3 semanas después de la dosis final de EXC001

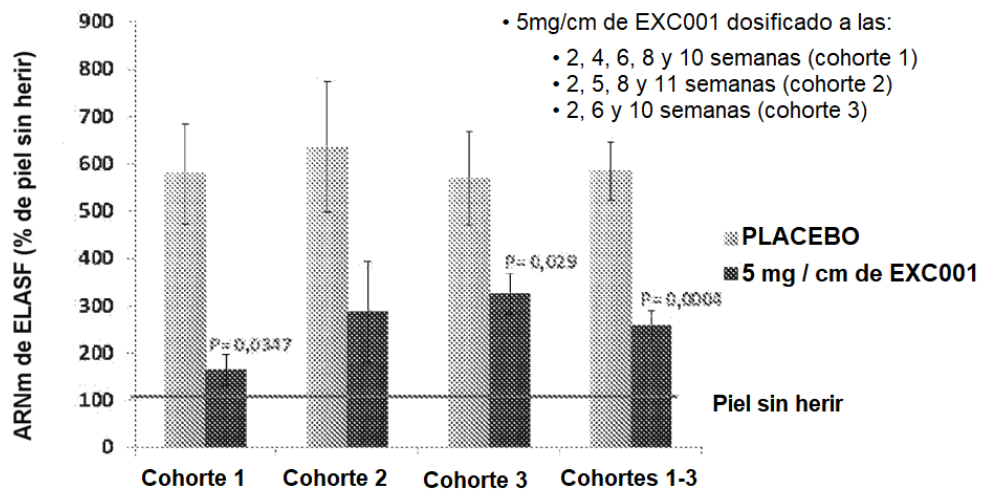


FIGURA 7D

Estudio Modelo de PANNUS (número 201)
2 semanas después de la dosis única de EXC001

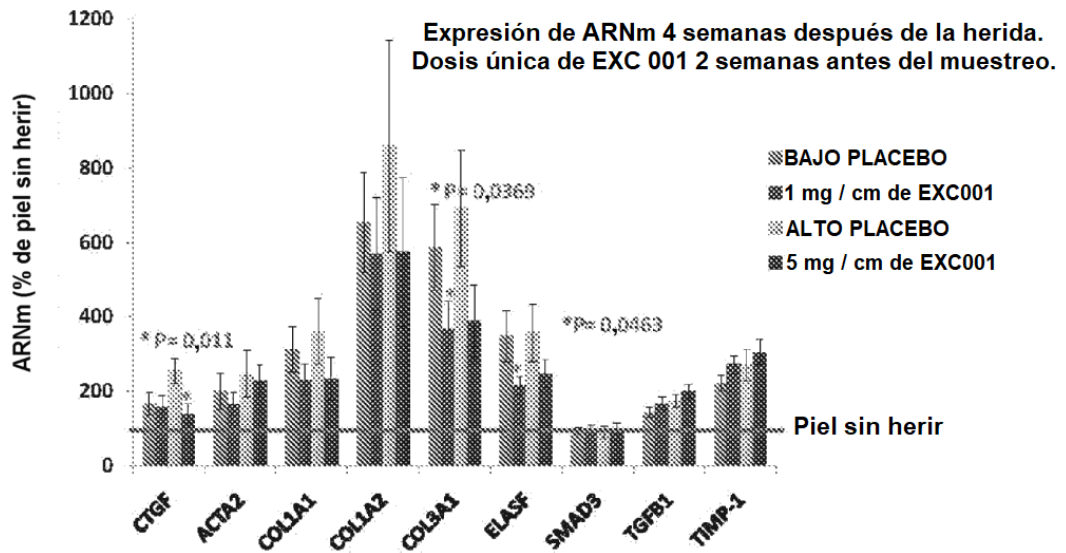


FIGURA 7E

Estudio Modelo de PANNUS (número 201)
13 semanas- 2 semanas después de la dosis final de EXC001

