

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 705 066**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/7125 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.11.2015 PCT/EP2015/076730**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.05.2016 WO16075339**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.11.2015 E 15797640 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.10.2018 EP 3218488**

54 Título: **Oligonucleótidos antisentido como inhibidores de la señalización TGF-R**

30 Prioridad:

16.11.2014 EP 14193368

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

21.03.2019

73 Titular/es:

**NEUROVISION PHARMA GMBH (100.0%)
Emil-Geis-Strasse 4
82031 Grünwald, DE**

72 Inventor/es:

**HOSSBACH, MARKUS;
KRAMPERT, MONIKA y
ARTH, HANS-LOTHAR**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 705 066 T3

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

DESCRIPCIÓN

Oligonucleótidos antisentido como inhibidores de la señalización TGF-R

- 5 **[0001]** La presente invención se refiere a oligonucleótidos antisentido, su uso como inhibidores de la señalización de TGF-R, composiciones farmacéuticas que contienen dichos oligonucleótidos antisentido y el uso para la profilaxis y el tratamiento de enfermedades neurológicas, neurodegenerativas e hiperproliferativas, incluidas las oncológicas.
- 10 **[0002]** El TGF- β existe en tres subtipos conocidos en seres humanos, TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3. Éstos están regulados al alza en enfermedades neurodegenerativas, como la ELA y algunos cánceres humanos, y se ha demostrado una mayor expresión de este factor de crecimiento en condiciones patológicas de enfermedades neurodegenerativas, trauma agudo, y neuroinflamación y envejecimiento. También se cree que las isoformas del factor de crecimiento beta transformante (TGF- β 1) están implicadas en la patogénesis de la preeclampsia.
- 15 **[0003]** Los TGF- β activados ejercen sus efectos sobre la célula diana a través de tres clases de receptores diferentes: tipo I (TGFRI), también denominadas quinasas de tipo activina (ALK; 53 kDa), tipo II (TGFRII; 70-100 kDa), y tipo III (TGFRIII; 200-400 kDa). Los receptores de TGF- β son receptores de quinasa serina/treonina de un solo paso. Mientras que el receptor de quinasa tipo II es constitutivamente activo, el receptor de tipo I debe activarse. Este proceso se inicia mediante la unión de un ligando a TGFRII; esto desencadena la formación transitoria de un complejo que incluye el ligando y los tipos de receptores I y II. Teniendo en cuenta la composición dimérica del ligando, el complejo del receptor probablemente consiste en una estructura tetramérica formada por dos pares de cada tipo de receptor.
- 20 **[0004]** La transducción de señales de TGF- β tiene lugar a través de sus receptores y, posteriormente, a través de las proteínas Smad. La transducción de señal celular dependiente de Smad iniciada por la unión de la isoforma TGF- β a un par de receptores TGFRI/II específico, conduce a la fosforilación de Smad intracelular y, posteriormente, a la translocación de un complejo de Smad activado en el núcleo para influir en el objetivo específico la expresión genica. La divergencia de la señal en otras vías y la convergencia de las vías de señalización vecinas generan una red altamente compleja. Dependiendo del contexto ambiental y celular, la señalización de TGF-beta da como resultado una variedad de respuestas celulares diferentes, como la proliferación celular, la diferenciación, la motilidad y la apoptosis en células tumorales. En el cáncer, el TGF- β puede afectar el crecimiento del tumor directamente (denominado efecto intrínseco de la señalización del TGF- β) o indirectamente (denominado efecto extrínseco) al promover el crecimiento del tumor, induciendo la transición epitelio-mesenquimatosa (TME), bloqueando las respuestas inmunes antitumorales, aumenta la fibrosis asociada a tumores, modula la matriz extracelular (ECM) y la migración celular, y finalmente aumenta la angiogénesis. Los factores (p. ej., concentración, tiempo, exposición local) que determinan si la señalización de TGF- β tiene una función supresora o promotora de tumores son una cuestión de intensa investigación y discusión. Actualmente, se postula que la función supresora de tumores de la señalización de TGF- β se pierde en etapas tempranas del cáncer similar a las mutaciones recesivas de pérdida de función en otros supresores de tumores. Por lo tanto, hay varios enfoques farmacológicos para el tratamiento de diversos cánceres bloqueando las vías de señalización de TGF-beta, como la investigación de Galunisertib y TEW-7197, ambos son inhibidores de la molécula pequeña de TGFRI y están en investigación clínica, y LY3022859, un anticuerpo contra el TGFRII.
- 25 **[0005]** Las señales proporcionadas por las proteínas de la familia del factor de crecimiento transformante (TGF- β) representan un sistema mediante el cual las células madre neurales se controlan en condiciones fisiológicas, pero en analogía a otros tipos de células se liberan de este control después de la transformación a células madre cancerosas. TGF- β es una citoquina multifuncional involucrada en varios procesos fisiológicos y patofisiológicos del cerebro. Se induce en el cerebro adulto después de una lesión o hipoxia y durante la neurodegeneración cuando modula y amortigua las respuestas inflamatorias. Después de la lesión, aunque el TGF- β está en general neuroprotector, limita la auto-reparación del cerebro al inhibir la proliferación de células madre neurales e inducir la fibrosis/gliosis para la formación de cicatrices. Similar a su efecto sobre las células madre neurales, el TGF- β revela un control antiproliferativo en la mayoría de los tipos de células; sin embargo, paradójicamente, muchos tumores escapan del control de TGF- β . Además, estos tumores desarrollan mecanismos que cambian la influencia antiproliferativa del TGF- β en señales oncogénicas, principalmente al orquestar una multitud de efectos mediados por el TGF- β sobre la enfermedad, la migración y la invasión, la angiogénesis y, lo más importante, mecanismos de escape inmune. Por lo tanto, TGF- β está involucrado en la progresión tumoral (ver Fig. 3).
- 30 **[0006]** En consecuencia, el Receptor de TGF II (factor de crecimiento transformante, receptor beta; símbolos utilizados sinónimamente: receptor de TGF-beta tipo II, TGFBR2; AAT3; FAA3; LDS1B; LDS2; LDS2B; MFS2; RIIC; TAAD2; TGFR-2; TGFbeta-RII, TGF-RII, TGF-R_{II}), y en particular su inhibición, se validó como objetivo para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, como la ALS, y enfermedades hiperproliferativas, como el cáncer y las enfermedades infecciosas fibróticas.
- 35 **[0007]** Por lo tanto, el objetivo de la presente solicitud es proporcionar compuestos farmacéuticamente activos capaces de inhibir la expresión del Receptor de TGF II (TGF-R_{II}) y, por lo tanto, reducir la cantidad de Receptor de TGF II (TGF-RII) y disminuir la actividad de señalización aguas abajo TGF- β .
- 40 **[0005]** Las señales proporcionadas por las proteínas de la familia del factor de crecimiento transformante (TGF- β) representan un sistema mediante el cual las células madre neurales se controlan en condiciones fisiológicas, pero en analogía a otros tipos de células se liberan de este control después de la transformación a células madre cancerosas. TGF- β es una citoquina multifuncional involucrada en varios procesos fisiológicos y patofisiológicos del cerebro. Se induce en el cerebro adulto después de una lesión o hipoxia y durante la neurodegeneración cuando modula y amortigua las respuestas inflamatorias. Después de la lesión, aunque el TGF- β está en general neuroprotector, limita la auto-reparación del cerebro al inhibir la proliferación de células madre neurales e inducir la fibrosis/gliosis para la formación de cicatrices. Similar a su efecto sobre las células madre neurales, el TGF- β revela un control antiproliferativo en la mayoría de los tipos de células; sin embargo, paradójicamente, muchos tumores escapan del control de TGF- β . Además, estos tumores desarrollan mecanismos que cambian la influencia antiproliferativa del TGF- β en señales oncogénicas, principalmente al orquestar una multitud de efectos mediados por el TGF- β sobre la enfermedad, la migración y la invasión, la angiogénesis y, lo más importante, mecanismos de escape inmune. Por lo tanto, TGF- β está involucrado en la progresión tumoral (ver Fig. 3).
- 45 **[0006]** En consecuencia, el Receptor de TGF II (factor de crecimiento transformante, receptor beta; símbolos utilizados sinónimamente: receptor de TGF-beta tipo II, TGFBR2; AAT3; FAA3; LDS1B; LDS2; LDS2B; MFS2; RIIC; TAAD2; TGFR-2; TGFbeta-RII, TGF-RII, TGF-R_{II}), y en particular su inhibición, se validó como objetivo para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, como la ALS, y enfermedades hiperproliferativas, como el cáncer y las enfermedades infecciosas fibróticas.
- 50 **[0005]** Las señales proporcionadas por las proteínas de la familia del factor de crecimiento transformante (TGF- β) representan un sistema mediante el cual las células madre neurales se controlan en condiciones fisiológicas, pero en analogía a otros tipos de células se liberan de este control después de la transformación a células madre cancerosas. TGF- β es una citoquina multifuncional involucrada en varios procesos fisiológicos y patofisiológicos del cerebro. Se induce en el cerebro adulto después de una lesión o hipoxia y durante la neurodegeneración cuando modula y amortigua las respuestas inflamatorias. Después de la lesión, aunque el TGF- β está en general neuroprotector, limita la auto-reparación del cerebro al inhibir la proliferación de células madre neurales e inducir la fibrosis/gliosis para la formación de cicatrices. Similar a su efecto sobre las células madre neurales, el TGF- β revela un control antiproliferativo en la mayoría de los tipos de células; sin embargo, paradójicamente, muchos tumores escapan del control de TGF- β . Además, estos tumores desarrollan mecanismos que cambian la influencia antiproliferativa del TGF- β en señales oncogénicas, principalmente al orquestar una multitud de efectos mediados por el TGF- β sobre la enfermedad, la migración y la invasión, la angiogénesis y, lo más importante, mecanismos de escape inmune. Por lo tanto, TGF- β está involucrado en la progresión tumoral (ver Fig. 3).
- 55 **[0006]** En consecuencia, el Receptor de TGF II (factor de crecimiento transformante, receptor beta; símbolos utilizados sinónimamente: receptor de TGF-beta tipo II, TGFBR2; AAT3; FAA3; LDS1B; LDS2; LDS2B; MFS2; RIIC; TAAD2; TGFR-2; TGFbeta-RII, TGF-RII, TGF-R_{II}), y en particular su inhibición, se validó como objetivo para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, como la ALS, y enfermedades hiperproliferativas, como el cáncer y las enfermedades infecciosas fibróticas.
- 60 **[0007]** Por lo tanto, el objetivo de la presente solicitud es proporcionar compuestos farmacéuticamente activos capaces de inhibir la expresión del Receptor de TGF II (TGF-R_{II}) y, por lo tanto, reducir la cantidad de Receptor de TGF II (TGF-RII) y disminuir la actividad de señalización aguas abajo TGF- β .
- 65 **[0007]** Por lo tanto, el objetivo de la presente solicitud es proporcionar compuestos farmacéuticamente activos capaces de inhibir la expresión del Receptor de TGF II (TGF-R_{II}) y, por lo tanto, reducir la cantidad de Receptor de TGF II (TGF-RII) y disminuir la actividad de señalización aguas abajo TGF- β .

[0008] El objetivo de la presente invención se resuelve mediante la enseñanza de las reivindicaciones independientes. Otras características, aspectos y detalles ventajosos de la invención son evidentes a partir de las reivindicaciones dependientes, la descripción, las figuras y los ejemplos de la presente solicitud.

5 [0009] Sorprendentemente bajo miles de sustancias candidatas, tales como complejos de proteína-nucleótido, ARNsi, micro-ARN (ARNmi), ribozimas, aptámeros, cpG-oligos, ADN-zimas, riboswitches, lípidos, péptidos, moléculas pequeñas, modificadores de balsas o caveoli, modificadores del aparato de Golgi, los anticuerpos y sus derivados, especialmente quimeras, fragmentos Fab y fragmentos Fc, oligonucleótidos antisentido que contienen LNA (LNA®: Locked Nucleic Acids) fueron los candidatos que se encontraron más prometedores para los usos aquí descritos.

15 [0010] Por lo tanto, la presente invención está dirigida a oligonucleótidos antisentido que consisten en 10 a 28 nucleótidos y al menos dos de los 10 a 28 nucleótidos son LNA y el oligonucleótido antisentido es capaz de hibridar con una región del gen que codifica el TGF-R_{II} o con una región del ARNm que codifica el TGF-R_{II}, en donde la región del gen que codifica el TGF-R_{II} o la región del ARNm que codifica el TGF-R_{II} comprende la secuencia **TGGTCCATTC** (Seq. ID No. 4), y el oligonucleótido antisentido comprende una secuencia complementaria a la secuencia **TGGTCCATTC** (Seq. ID. No. 4) y sales e isómeros ópticos de dicho oligonucleótido antisentido.

20 [0011] También se describen oligonucleótidos antisentido que consisten en 10 a 28 nucleótidos y al menos dos de los 10 a 28 nucleótidos son LNA y el oligonucleótido antisentido es capaz de hibridar con una región del gen que codifica el TGF-R_{II} o con una región del ARNm que codifica el TGF-R_{II}, en donde la región del gen que codifica el TGF-R_{II} o la región del ARNm que codifica el TGF-R_{II} comprende la secuencia **TGGTCCATTC** (Seq. ID No. 4) o la secuencia **CCCTAAACAC** (Seq. ID No. 5) o la secuencia **ACTACCAAAT** (Seq. ID No. 6) o la secuencia **GGACGCGTAT** (Seq. ID No. 7) o la secuencia **GTCTATGACG** (Seq. ID No. 8) o la secuencia **TTATTAATGC** (Seq. ID No. 9), y el oligonucleótido antisentido comprende una secuencia capaz de hibridar con dicha secuencia **TGGTCCATTC** (Seq. ID No. 4) o secuencia **CCCTAAACAC** (Seq. ID No. 5) o secuencia **ACTACCAAAT** (Seq. ID No.6) o secuencia **GGACGCGTAT** (Seq. ID No. 7) o secuencia **GTCTATGACG** (Seq. ID No. 8) o secuencia **TTATTAATGC** (Seq. ID No. 9), respectivamente y sales e isómeros ópticos de dicho oligonucleótido antisentido.

30 [0012] Un poco rediseñada, la presente divulgación está dirigida a oligonucleótidos antisentido que consisten en 10 a 28 nucleótidos y al menos dos de los 10 a 28 nucleótidos son LNA y el oligonucleótido antisentido es capaz de hibridar con una región del marco de lectura abierto del gen que codifica el TGF-R_{II} o con una región del ARNm que codifica el TGF-R_{II}, en donde la región del marco de lectura abierto del gen que codifica el TGF-R_{II} o la región del ARNm que codifica el TGF-R_{II} comprende la secuencia **TGGTCCATTC** (Seq. ID No. 4) o la secuencia **CCCTAAACAC** (Seq. ID No. 5) o la secuencia **ACTACCAAAT** (Seq. ID No. 6) o la secuencia **GGACGCGTAT** (Seq. ID No. 7) o la secuencia **GTCTATGACG** (Seq. ID No. 8) o la secuencia **TTATTAATGC** (Seq. ID No. 9), y el oligonucleótido antisentido comprende una secuencia capaz de hibridar con dicha secuencia **TGGTCCATTC** (Seq. ID No. 4) o secuencia **CCCTAAACAC** (Seq. ID No. 5) o secuencia **ACTACCAAAT** (Seq. ID No. 6) o secuencia **GGACGCGTAT** (Seq. ID No. 7) o secuencia **GTCTATGACG** (Seq. ID No. 8) o secuencia **TTATTAATGC** (Seq. ID No. 9) respectivamente y sales e isómeros ópticos de dicho oligonucleótido antisentido.

45 [0013] Alternativamente, la presente divulgación está dirigida a oligonucleótido(s) antisentido que consta de 10 a 28 nucleótidos y al menos dos de los 10 a 28 nucleótidos son LNA y el oligonucleótido antisentido es capaz de hibridar con una región del gen que codifica el TGF-R_{II} o con una región del ARNm que codifica el TGF-R_{II}, en donde la región del gen que codifica el TGF-R_{II} o la región del ARNm que codifica el TGF-R_{II} comprende la secuencia **TGGTCCATTC** (Seq. ID No. 4) o la secuencia **CCCTAAACAC** (Seq. ID No. 5) o la secuencia **ACTACCAAAT** (Seq. ID No. 6) o la secuencia **GGACGCGTAT** (Seq. ID No. 7) o la secuencia **GTCTATGACG** (Seq. ID No. 8) o la secuencia **TTATTAATGC** (Seq. ID No. 9) y el oligonucleótido antisentido comprenden una secuencia complementaria a la secuencia **TGGTCCATTC** (Seq. ID No. 4) o la secuencia **CCCTAAACAC** (Seq. ID No. 5) o la secuencia **ACTACCAAAT** (Seq. ID No. 6) o la secuencia **GGACGCGTAT** (Seq. ID No. 7) o la secuencia **GTCTATGACG** (Seq. ID No. 8) o la secuencia **TTATTAATGC** (Seq. ID No. 9) respectivamente y sales e isómeros ópticos de dicho oligonucleótido antisentido.

55 [0014] Un poco rediseñada, la presente divulgación está dirigida a oligonucleótidos antisentido que consisten en 10 a 28 nucleótidos y al menos dos de los 10 a 28 nucleótidos son LNA y el oligonucleótido antisentido es capaz de hibridar con una región del marco de lectura abierto del gen que codifica el TGF-R_{II} o con una región del ARNm que codifica el TGF-R_{II}, en donde la región del marco de lectura abierto del gen que codifica el TGF-R_{II} o la región del ARNm que codifica el TGF-R_{II} comprende la secuencia **TGGTCCATTC** (Seq. ID No. 4) o la secuencia **CCCTAAACAC** (Seq. ID No. 5) o la secuencia **ACTACCAAAT** (Seq. ID No. 6) o la secuencia **GGACGCGTAT** (Seq. ID No. 7) o la secuencia **GTCTATGACG** (Seq. ID No. 8) o la secuencia **TTATTAATGC** (Seq. ID No. 9), y el oligonucleótido antisentido comprende una secuencia complementaria de la secuencia **TGGTCCATTC** (Seq. ID No. 4) o la secuencia **CCCTAAACAC** (Seq. ID No. 5) o la secuencia **ACTACCAAAT** (Seq. ID No. 6) o la secuencia **GGACGCGTAT** (Seq. ID No. 7) o la secuencia **GTCTATGACG** (Seq. ID No. 8) o la secuencia **TTATTAATGC** (Seq. ID No. 9) respectivamente y sales e isómeros ópticos de dicho oligonucleótido antisentido.

65 [0015] Preferiblemente, la presente divulgación está dirigida a oligonucleótidos antisentido que consisten en 10 a 28

nucleótidos y al menos dos de los 10 a 28 nucleótidos son LNA y el oligonucleótido antisentido es capaz de hibridar con una región del gen que codifica el TGF-R_{II} o con una región del ARNm que codifica el TGF-R_{II}, en donde la región del gen que codifica el TGF-R_{II} o la región del ARNm que codifica el TGF-R_{II} comprende la secuencia **TGGTCCATTC** (Seq. ID No. 4), y el oligonucleótido antisentido comprende una secuencia capaz de hibridar con dicha secuencia **TGGTCCATTC** (Seq. ID No. 4) y sales e isómeros ópticos de dicho oligonucleótido antisentido.

[0016] Un poco rediseñada, la presente divulgación está dirigida a oligonucleótidos antisentido que consisten en 10 a 28 nucleótidos y al menos dos de los 10 a 28 nucleótidos son LNA y el oligonucleótido antisentido es capaz de hibridar con una región del marco de lectura abierto del gen que codifica el TGF-R_{II} o con una región del ARNm que codifica el TGF-R_{II}, en donde la región del marco de lectura abierto del gen que codifica el TGF-R_{II} o la región del ARNm que codifica el TGF-R_{II} comprende la secuencia **TGGTCCATTC** (Seq. ID No. 4), y el componente de oligonucleótido antisentido - presenta una secuencia capaz de hibridar con dicha secuencia **TGGTCCATTC** (Seq. ID No. 4) y sales e isómeros ópticos de dicho oligonucleótido antisentido.

[0017] Alternativamente, la presente invención está dirigida a oligonucleótidos antisentido que consta de 10 a 28 nucleótidos y al menos dos de los 10 a 28 nucleótidos son LNA y el oligonucleótido antisentido es capaz de hibridar con una región del gen que codifica el TGF-R_{II} o con una región del ARNm que codifica el TGF-R_{II}, en donde la región del gen que codifica el TGF-R_{II} o la región del ARNm que codifica el TGF-R_{II} comprende la secuencia **TGGTCCATTC** (Seq. ID No. 4), y el oligonucleótido antisentido comprende una secuencia complementaria a la secuencia **TGGTCCATTC** (Seq. ID No. 4) y sales e isómeros ópticos de dicho oligonucleótido antisentido.

[0018] Un poco rediseñado, que consta de 10 a 28 nucleótidos y al menos dos de los 10 a 28 nucleótidos son LNA y el oligonucleótido antisentido es capaz de hibridar con una región del marco de lectura abierto del gen que codifica el TGF-R_{II} o con una región del ARNm que codifica el TGF-R_{II}, en donde la región del marco de lectura abierto del gen que codifica el TGF-R_{II} o la región del ARNm que codifica el TGF-R_{II} comprende la secuencia **TGGTCCATTC** (Seq. ID No. 4), y el oligonucleótido antisentido comprende una secuencia complementaria a la secuencia **TGGTCCATTC** (Seq. ID No. 4) y sales e isómeros ópticos de dicho oligonucleótido antisentido.

[0019] Los oligonucleótidos antisentido de la presente invención comprenden preferiblemente de 2 a 10 unidades de LNA, más preferiblemente de 3 a 9 unidades de LNA y aún más preferiblemente de 4 a 8 unidades de LNA y también preferiblemente al menos 6 unidades no de LNA, más preferiblemente al menos 7 unidades no de LNA y lo más preferiblemente al menos 8 unidades no de LNA. Las unidades no de LNA son preferiblemente unidades de ADN. Las unidades LNA se colocan preferiblemente en el extremo terminal 3' (también denominado terminal 3') y en el extremo terminal 5' (también denominado terminal 5'). Preferiblemente, al menos una y más preferiblemente al menos dos unidades de LNA están presentes en el extremo terminal 3' y/o en el extremo terminal 5'.

Por lo tanto, se prefieren los oligonucleótidos antisentido de la presente invención que contienen de 3 a 10 unidades de LNA y que contienen especialmente de 1 a 5 unidades de LNA en el extremo terminal 5' y de 1 a 5 unidades de LNA en el extremo terminal 3' del oligonucleótido antisentido y entre las unidades de LNA al menos 7 y más preferiblemente al menos 8 unidades de ADN.

Además, los oligonucleótidos antisentido pueden contener nucleobases comunes tales como adenina, guanina, citosina, timina y uracilo, así como derivados comunes de los mismos. Los oligonucleótidos antisentido de la presente invención también pueden contener puentes internucleotídicos modificados tales como fosforotioato o fosforoditioato en lugar de puentes de fosfato. Dichas modificaciones pueden estar presentes solo en los segmentos de LNA o solo en el segmento no LNA del oligonucleótido antisentido.

[0020] Por lo tanto, la presente divulgación también se dirige a oligonucleótidos antisentido que consisten en 12 a 24 nucleótidos y al menos tres de los 12 a 24 nucleótidos son LNA y el oligonucleótido antisentido es capaz de hibridar con una región del gen que codifica el TGF-R_{II} o con una región del ARNm que codifica el TGF-R_{II}, en donde la región del gen que codifica el TGF-R_{II} o la región del ARNm que codifica el TGF-R_{II} comprende la secuencia **CTGGTCCATTC** (Seq. ID No. 296), **TGGTCCATTCA** (Seq. ID No. 297), **CTGGTCCATTCA** (Seq. ID No. 298), **TCCCTAAACAC** (Seq. ID No. 299), **CCCTAAACACT** (Seq. ID No. 300), **TCCCTAAACACT** (Seq. ID No. 301), **CACTACCAAAT** (Seq. ID No. 302), **ACTACCAAATA** (Seq. ID No. 303), **CACTACCAAATA** (Seq. ID No. 304), **TGGACGCGTAT** (Seq. ID No. 305), **GGACGCGTATC** (Seq. ID No. 306), **TGGACGCGTATC** (Seq. ID No. 307), **GGTCTATGACG** (Seq. ID No. 308), **GTCTATGACGA** (Seq. ID No. 309), **GGTCTATGACGA** (Seq. ID No. 310), **TTTATTAATGC** (Seq. ID No. 311), **TTATTAATGCC** (Seq. ID No. 312), o **TTTATTAATGCC** (Seq. ID No. 313), y el oligonucleótido antisentido comprende una secuencia capaz de hibridar con dicha secuencia **CTGGTCCATTC** (Seq. ID No. 296), **TGGTCCATTCA** (Seq. ID No. 297), **CTGGTCCATTCA** (Seq. ID No. 298), **TCCCTAAACAC** (Seq. ID No. 299), **CCCTAAACACT** (Seq. ID No. 300), **TCCCTAAACACT** (Seq. ID No. 301), **CACTACCAAAT** (Seq. ID No. 302), **ACTACCAAATA** (Seq. ID No. 303), **CACTACCAAATA** (Seq. ID No. 304), **TGGACGCGTAT** (Seq. ID No. 305), **GGACGCGTATC** (Seq. ID No. 306), **TGGACGCGTATC** (Seq. ID No. 307), **GGTCTATGACG** (Seq. ID No. 308), **GTCTATGACGA** (Seq. ID No. 309), **GGTCTATGACGA** (Seq. ID No. 310), **TTTATTAATGC** (Seq. ID No. 311), **TTATTAATGCC** (Seq. ID No. 312), o **TTTATTAATGCC** (Seq. ID No. 313) respectivamente y sales e isómeros ópticos de dicho oligonucleótido antisentido.

[0021] Alternativamente, la presente divulgación está dirigida a oligonucleótidos antisentido que consisten en 12 a 24 nucleótidos y al menos tres de los 12 a 24 nucleótidos son LNA y el oligonucleótido antisentido es capaz de

hibridar con una región del gen que codifica el TGF-R_{II} o con una región del ARNm que codifica el TGF-R_{II}, en donde la región del gen que codifica el TGF-R_{II} o la región del ARNm que codifica el TGF-R_{II} comprende la secuencia **CTGGTCCATTTC** (Seq. ID No. 296), **TGGTCCATTCA** (Seq. ID No. 297), **CTGGTCCATTCA** (Seq. ID No. 298), **TCCCTAAACAC** (Seq. ID No. 299), **CCCTAAACACT** (Seq. ID No. 300), **TCCCTAAACACT** (Seq. ID No. 301), **CACTACCAAAT** (Seq. ID No. 302), **ACTACCAAATA** (Seq. ID No. 303), **CACTACCAAATA** (Seq. ID No. 304), **TGGACGCGTAT** (Seq. ID No. 305), **GGACGCGTATC** (Seq. ID No. 306), **TGGACGCGTATC** (Seq. ID No. 307), **GGTCTATGACG** (Seq. ID No. 308), **GTCTATGACGA** (Seq. ID No. 309), **GGTCTATGACGA** (Seq. ID No. 310), **TTATTAATGTC** (Seq. ID No. 311), **TTATTAATGCC** (Seq. ID No. 312), o **TTATTAATGCC** (Seq. ID No. 313), y el oligonucleótido antisentido comprende una secuencia complementaria a la secuencia **CTGGTCCATTTC** (Seq. ID No. 296), **TGGTCCATTCA** (Seq. ID No. 297), **CTGGTCCATTCA** (Seq. ID No. 298), **TCCCTAAACAC** (Seq. ID No. 299), **CCCTAAACACT** (Seq. ID No. 300), **TCCCTAAACACT** (Seq. ID No. 301), **CACTACCAAAT** (Seq. ID No. 302), **ACTACCAAATA** (Seq. ID No. 303), **CACTACCAAATA** (Seq. ID No. 304), **TGGACGCGTAT** (Seq. ID No. 305), **GGACGCGTATC** (Seq. ID No. 306), **TGGACGCGTATC** (Seq. ID No. 307), **GGTCTATGACG** (Seq. ID No. 308), **GTCTATGACGA** (Seq. ID No. 309), **GGTCTATGACGA** (Seq. ID No. 310), **TTATTAATGTC** (Seq. ID No. 311), **TTATTAATGCC** (Seq. ID No. 312), o **TTATTAATGCC** (Seq. ID No. 313) respectivamente y sales e isómeros ópticos de dicho oligonucleótido antisentido.

[0022] La presente divulgación también está dirigida a oligonucleótidos antisentido que consisten en 12 a 24 nucleótidos y al menos tres de los 12 a 24 nucleótidos son LNA y el oligonucleótido antisentido es capaz de hibridar con una región del gen que codifica el TGF-R_{II} o con una región del ARNm que codifica el TGF-R_{II}, en donde la región del gen que codifica el TGF-R_{II} o la región del ARNm que codifica el TGF-R_{II} comprende la secuencia **CTGGTCCATTTC** (Seq. ID No. 296), **TGGTCCATTCA** (Seq. ID No. 297), o **CTGGTCCATTCA** (Seq. ID No. 298), y el oligonucleótido antisentido comprende una secuencia capaz de hibridar con dicha secuencia **CTGGTCCATTTC** (Seq. ID No. 296), **TGGTCCATTCA** (Seq. ID No. 297), o **CTGGTCCATTCA** (Seq. ID No. 298) respectivamente, y sales e isómeros ópticos de dicho oligonucleótido antisentido.

[0023] Ligeramente redactada, la presente divulgación también se dirige a oligonucleótido(s) antisentido que consta de 12 a 24 nucleótidos y al menos tres de los 12 a 24 nucleótidos son LNA y el oligonucleótido antisentido es capaz de hibridar con una región del gen que codifica el TGF-R_{II} o con una región del ARNm que codifica el TGF-R_{II}, en donde la región del gen que codifica el TGF-R_{II} o la región del ARNm que codifica el TGF-R_{II} comprende la secuencia **CTGGTCCATTTC** (Seq. ID No. 296), **TGGTCCATTCA** (Seq. ID No. 297), o **CTGGTCCATTCA** (Seq. ID No. 298), y el oligonucleótido antisentido comprende una secuencia complementaria a la secuencia **CTGGTCCATTTC** (Seq. ID No. 296), **TGGTCCATTCA** (Seq. ID No. 297), o **CTGGTCCATTCA** (Seq. ID No. 298) respectivamente y sales e isómeros ópticos de dicho oligonucleótido antisentido.

[0024] Preferiblemente, la presente descripción también está dirigida a oligonucleótidos antisentido que consisten en 12 a 24 nucleótidos y al menos tres de los 12 a 24 nucleótidos son LNA y el oligonucleótido antisentido es capaz de hibridar con una región del gen que codifica el TGF-R_{II} o con una región del ARNm que codifica el TGF-R_{II}, en donde la región del gen que codifica el TGF-R_{II} o la región del ARNm que codifica el TGF-R_{II} comprende la secuencia **TCCCTAAACAC** (Seq. ID No. 299), **CCCTAAACACT** (Seq. ID No. 300), o **TCCCTAAACACT** (Seq. ID No. 301), y el oligonucleótido antisentido comprende una secuencia capaz de hibridar con dicha secuencia **TCCCTAAACAC** (Seq. ID No. 299), **CCCTAAACACT** (Seq. ID No. 300), o **TCCCTAAACACT** (Seq. ID No. 301) respectivamente y sales e isómeros ópticos de dicho oligonucleótido antisentido.

[0025] Ligeramente redactada, la presente divulgación también se dirige a oligonucleótidos antisentido que consta de 12 a 24 nucleótidos y al menos tres de los 12 a 24 nucleótidos son LNA y el oligonucleótido antisentido es capaz de hibridar con una región del gen que codifica el TGF-R_{II} o con una región del ARNm que codifica el TGF-R_{II}, en donde la región del gen que codifica el TGF-R_{II} o la región del ARNm que codifica el TGF-R_{II} comprende la secuencia **TCCCTAAACAC** (Seq. ID No. 299), **CCCTAAACACT** (Seq. ID No. 300), o **TCCCTAAACACT** (Seq. ID No. 301), y el oligonucleótido antisentido comprende una secuencia complementaria a la secuencia **TCCCTAAACAC** (Seq. ID No. 299), **CCCTAAACACT** (Seq. ID No. 300), o **TCCCTAAACACT** (Seq. ID No. 301) respectivamente y sales e isómeros ópticos de dicho oligonucleótido antisentido.

[0026] Preferiblemente, la presente descripción también está dirigida a oligonucleótidos antisentido que consisten en 12 a 24 nucleótidos y al menos tres de los 12 a 24 nucleótidos son LNA y el oligonucleótido antisentido es capaz de hibridar con una región del gen que codifica el TGF-R_{II} o con una región del ARNm que codifica el TGF-R_{II}, en donde la región del gen que codifica el TGF-R_{II} o la región del ARNm que codifica el TGF-R_{II} comprende la secuencia **CACTACCAAAT** (Seq. ID No. 302), **ACTACCAAATA** (Seq. ID No. 303), o **CACTACCAAATA** (Seq. ID No. 304), y el oligonucleótido antisentido comprende una secuencia capaz de hibridar con dicha secuencia **CACTACCAAAT** (Seq. ID No. 302), **ACTACCAAATA** (Seq. ID No. 303), o **CACTACCAAATA** (Seq. ID No. 304) respectivamente y sales e isómeros ópticos de dicho oligonucleótido antisentido.

[0027] Ligeramente redactada, la presente divulgación también se dirige a oligonucleótido(s) antisentido que consta de 12 a 24 nucleótidos y al menos tres de los 12 a 24 nucleótidos son LNA y el oligonucleótido antisentido es capaz de hibridar con una región del gen que codifica el TGF-R_{II} o con una región del ARNm que codifica el TGF-R_{II}, en donde la región del gen que codifica el TGF-R_{II} o la región del ARNm que codifica el TGF-R_{II} comprende la

secuencia **CACTACCAAAT** (Seq. ID No. 302), **ACTACCAAATA** (Seq. ID No. 303), o **CACTACCAAATA** (Seq. ID No. 304), y el oligonucleótido antisentido comprende una secuencia complementaria a la secuencia **CACTACCAAAT** (Seq. ID No. 302), **ACTACCAAATA** (Seq. ID No. 303), o **CACTACCAAATA** (Seq. ID No. 304) respectivamente y sales e isómeros ópticos de dicho oligonucleótido antisentido.

5
 [0028] Preferiblemente, la presente descripción también está dirigida a oligonucleótidos antisentido que consisten en 12 a 24 nucleótidos y al menos tres de los 12 a 24 nucleótidos son LNA y el oligonucleótido antisentido es capaz de hibridar con una región del gen que codifica el TGF-R_{II} o con una región del ARNm que codifica el TGF-R_{II}, en donde la región del gen que codifica el TGF-R_{II} o la región del ARNm que codifica el TGF-R_{II} comprende la secuencia
 10 **TGGACGCGGTAT** (Seq. ID No. 305), **GGACGCGTATC** (Seq. ID No. 306), o **TGGACGCGTATC** (Seq. ID No. 307), y el oligonucleótido antisentido comprende una secuencia capaz de hibridar con dicha secuencia **TGGACGCGGTAT** (Seq. ID No. 305), **GGACGCGTATC** (Seq. ID No. 306), o **TGGACGCGTATC** (Seq. ID No. 307) respectivamente y sales e isómeros ópticos de dicho oligonucleótido antisentido.

15
 [0029] Ligeramente redactada, la presente divulgación también se dirige a oligonucleótido(s) antisentido que consta de 12 a 24 nucleótidos y al menos tres de los 12 a 24 nucleótidos son LNA y el oligonucleótido antisentido es capaz de hibridar con una región del gen que codifica el TGF-R_{II} o con una región del ARNm que codifica el TGF-R_{II}, en donde la región del gen que codifica el TGF-R_{II} o la región del ARNm que codifica el TGF-R_{II} comprende la
 20 secuencia **TGGACGCGGTAT** (Seq. ID No. 305), **GGACGCGTATC** (Seq. ID No. 306), o **TGGACGCGTATC** (Seq. ID No. 307), y el oligonucleótido antisentido comprende una secuencia complementaria a la secuencia **TGGACGCGGTAT** (Seq. ID No. 305), **GGACGCGTATC** (Seq. ID No. 306), o **TGGACGCGTATC** (Seq. ID No. 307) respectivamente y sales e isómeros ópticos de dicho oligonucleótido antisentido.

25
 [0030] Preferiblemente, la presente descripción también está dirigida a oligonucleótidos antisentido que consisten en 12 a 24 nucleótidos y al menos tres de los 12 a 24 nucleótidos son LNA y el oligonucleótido antisentido es capaz de hibridar con una región del gen que codifica el TGF-R_{II} o con una región del ARNm que codifica el TGF-R_{II}, en donde la región del gen que codifica el TGF-R_{II} o la región del ARNm que codifica el TGF-R_{II} comprende la secuencia
 30 **GGTCTATGACG** (Seq. ID No. 308), **GTCTATGACGA** (Seq. ID No. 309), o **GGTCTATGACGA** (Seq. ID No. 310), y el oligonucleótido antisentido comprende una secuencia capaz de hibridar con dicha secuencia **GGTCTATGACG** (Seq. ID No. 308), **GTCTATGACGA** (Seq. ID No. 309), o **GGTCTATGACGA** (Seq. ID No. 310) respectivamente y sales e isómeros ópticos de dicho oligonucleótido antisentido.

35
 [0031] Ligeramente redactada, la presente divulgación también está dirigida a oligonucleótidos antisentido que consisten en 12 a 24 nucleótidos y al menos tres de los 12 a 24 nucleótidos son LNA y el oligonucleótido antisentido es capaz de hibridar con una región del gen que codifica el TGF-R_{II} o con una región del ARNm que codifica el TGF-R_{II}, en donde la región del gen que codifica el TGF-R_{II} o la región del ARNm que codifica el TGF-R_{II} comprende la
 40 secuencia **GGTCTATGACG** (Seq. ID No. 308), **GTCTATGACGA** (Seq. ID No. 309), o **GGTCTATGACGA** (Seq. ID No. 310), y el oligonucleótido antisentido comprende una secuencia complementaria a la secuencia **GGTCTATGACG** (Seq. ID No. 308), **GTCTATGACGA** (Seq. ID No. 309), o **GGTCTATGACGA** (Seq. ID No. 310) respectivamente y sales e isómeros ópticos de dicho oligonucleótido antisentido.

45
 [0032] Preferiblemente, la presente descripción también está dirigida a oligonucleótidos antisentido que consisten en 12 a 24 nucleótidos y al menos tres de los 12 a 24 nucleótidos son LNA y el oligonucleótido antisentido es capaz de hibridar con una región del gen que codifica el TGF-R_{II} o con una región del ARNm que codifica el TGF-R_{II}, en donde la región del gen que codifica el TGF-R_{II} o la región del ARNm que codifica el TGF-R_{II} comprende la
 50 secuencia **TTTATTAATGC** (Seq. ID No. 311), **TTATTAATGCC** (Seq. ID No. 312), o **TTTATTAATGCC** (Seq. ID No. 313), y el oligonucleótido antisentido comprende una secuencia capaz de hibridar con dicha secuencia **TTTATTAATGC** (Seq. ID No. 311), **TTATTAATGCC** (Seq. ID No. 312), o **TTTATTAATGCC** (Seq. ID No. 313) respectivamente y sales e isómeros ópticos de dicho oligonucleótido antisentido.

55
 [0033] Ligeramente redactada, la presente divulgación también se dirige a oligonucleótido(s) antisentido que consta de 12 a 24 nucleótidos y al menos tres de los 12 a 24 nucleótidos son LNA y el oligonucleótido antisentido es capaz de hibridar con una región del gen que codifica el TGF-R_{II} o con una región del ARNm que codifica el TGF-R_{II}, en donde la región del gen que codifica el TGF-R_{II} o la región del ARNm que codifica el TGF-R_{II} comprende la
 60 secuencia **TTTATTAATGC** (Seq. ID No. 311), **TTATTAATGCC** (Seq. ID No. 312), o **TTTATTAATGCC** (Seq. ID No. 313), y el oligonucleótido antisentido comprende una secuencia complementaria a la secuencia **TTTATTAATGC** (Seq. ID No. 311), **TTATTAATGCC** (Seq. ID No. 312), o **TTTATTAATGCC** (Seq. ID No. 313) respectivamente y sales e isómeros ópticos de dicho oligonucleótido antisentido.

65
 [0034] Los oligonucleótidos antisentido de la presente invención comprenden preferiblemente de 3 a 10 unidades de LNA, más preferiblemente de 3 a 9 unidades de LNA y aún más preferiblemente de 4 a 8 unidades de LNA y también preferiblemente al menos 6 unidades no de LNA, más preferiblemente al menos 7 unidades no de LNA y lo más preferiblemente al menos 8 unidades no de LNA. Las unidades no de LNA son preferiblemente unidades de ADN. Las unidades LNA se colocan preferiblemente en el extremo terminal 3' (también denominado terminal 3') y en el extremo terminal 5' (también denominado terminal 5'). Preferiblemente, al menos una y más preferiblemente al menos dos unidades de LNA están presentes en el extremo terminal 3' y/o en el extremo terminal 5'.

Por lo tanto, se prefieren los oligonucleótidos antisentido de la presente invención que contienen de 3 a 10 unidades de LNA y que contienen especialmente de 1 a 5 unidades de LNA en el extremo terminal 5' y de 1 a 5 unidades de LNA en el extremo terminal 3' del oligonucleótido antisentido y entre las unidades de LNA al menos 7 y más preferiblemente al menos 8 unidades de ADN.

[0035] Además, los oligonucleótidos antisentido pueden contener nucleobases comunes tales como adenina, guanina, citosina, timina y uracilo, así como derivados comunes de los mismos. Los oligonucleótidos antisentido de la presente invención también pueden contener puentes internucleotídicos modificados tales como fosforotioato o fosforditioato en lugar de puentes de fosfato. Dichas modificaciones pueden estar presentes solo en los segmentos de LNA o solo en el segmento no LNA del oligonucleótido antisentido.

[0036] Por lo tanto, la presente divulgación también está dirigida a oligonucleótidos antisentido que consisten en 14 a 20 más preferiblemente 14 a 18 nucleótidos y al menos cuatro de los 14 a 20 más preferiblemente 14 a 18 nucleótidos son LNA y el oligonucleótido antisentido es capaz de hibridar con una región del gen que codifica el TGF-R_{II} o con una región del ARNm que codifica el TGF-R_{II}, en donde la región del gen que codifica el TGF-R_{II} o la región del ARNm que codifica el TGF-R_{II} comprende la secuencia **ACTGGTCCATTTC** (Seq. ID No. 314), **TGGTCCATTTCAT** (Seq. ID No. 315), **CTGGTCCATTTCAT** (Seq. ID No. 316), **ACTGGTCCATTCA** (Seq. ID No. 317), **ACTGGTCCATTTCAT** (Seq. ID No. 318), **CTCCCTAAACAC** (Seq. ID No. 319), **CCCTAAACACTA** (Seq. ID No. 320), **TCCCTAAACACTA** (Seq. ID No. 321), **CTCCCTAAACACT** (Seq. ID No. 322), **CTCCCTAAACACTA** (Seq. ID No. 323), **ACACTACCAAAT** (Seq. ID No. 324), **ACTACCAAATAG** (Seq. ID No. 325), **CACTACCAAATAG** (Seq. ID No. 326), **ACACTACCAAATA** (Seq. ID No. 327), **ACACTACCAAATAG** (Seq. ID No. 328), **GTGGACGCGTAT** (Seq. ID No. 329), **GGACGCGTATCG** (Seq. ID No. 330), **TGGACGCGTATCG** (Seq. ID No. 331), **GTGGACGCGTATC** (Seq. ID No. 332), **GTGGACGCGTATCG** (Seq. ID No. 333), **CGGTCTATGACG** (Seq. ID No. 334), **GTCTATGACGAG** (Seq. ID No. 335), **GGTCTATGACGAG** (Seq. ID No. 336), **CGGTCTATGACGA** (Seq. ID No. 337), **CGGTCTATGACGAG** (Seq. ID No. 338), **CTTTATTAATGC** (Seq. ID No. 339), **TTATTAATGCCT** (Seq. ID No. 340), **TTTATTAATGCCT** (Seq. ID No. 341), **CTTTATTAATGCC** (Seq. ID No. 342), o **CTTTATTAATGCCT** (Seq. ID No. 343), y el oligonucleótido antisentido comprende una secuencia capaz de hibridar con dicha secuencia **ACTGGTCCATTTC** (Seq. ID No. 314), **TGGTCCATTTCAT** (Seq. ID No. 315), **CTGGTCCATTTCAT** (Seq. ID No. 316), **ACTGGTCCATTCA** (Seq. ID No. 317), **ACTGGTCCATTTCAT** (Seq. ID No. 318), **CTCCCTAAACAC** (Seq. ID No. 319), **CCCTAAACACTA** (Seq. ID No. 320), **TCCCTAAACACTA** (Seq. ID No. 321), **CTCCCTAAACACT** (Seq. ID No. 322), **CTCCCTAAACACTA** (Seq. ID No. 323), **ACACTACCAAAT** (Seq. ID No. 324), **ACTACCAAATAG** (Seq. ID No. 325), **CACTACCAAATAG** (Seq. ID No. 326), **ACACTACCAAATA** (Seq. ID No. 327), **ACACTACCAAATAG** (Seq. ID No. 328), **GTGGACGCGTAT** (Seq. ID No. 329), **GGACGCGTATCG** (Seq. ID No. 330), **TGGACGCGTATCG** (Seq. ID No. 331), **GTGGACGCGTATC** (Seq. ID No. 332), **GTGGACGCGTATCG** (Seq. ID No. 333), **CGGTCTATGACG** (Seq. ID No. 334), **GTCTATGACGAG** (Seq. ID No. 335), **GGTCTATGACGAG** (Seq. ID No. 336), **CGGTCTATGACGA** (Seq. ID No. 337), **CGGTCTATGACGAG** (Seq. ID No. 338), **CTTTATTAATGC** (Seq. ID No. 339), **TTATTAATGCCT** (Seq. ID No. 340), **TTTATTAATGCCT** (Seq. ID No. 341), **CTTTATTAATGCC** (Seq. ID No. 342), o **CTTTATTAATGCCT** (Seq. ID No. 343), respectivamente, y sales e isómeros ópticos de dicho oligonucleótido antisentido.

[0037] Alternativamente, la presente divulgación está dirigida a oligonucleótido(s) antisentido que consiste en 14 a 20 más preferiblemente 14 a 18 nucleótidos y al menos cuatro de los 14 a 20 más preferiblemente 14 a 20 nucleótidos son LNA y el oligonucleótido antisentido es capaz de hibridar con una región del gen que codifica el TGF-R_{II} o con una región del ARNm que codifica el TGF-R_{II}, en donde la región del gen que codifica el TGF-R_{II} o la región del ARNm que codifica el TGF-R_{II} comprende la secuencia **ACTGGTCCATTTC** (Seq. ID No. 314), **TGGTCCATTTCAT** (Seq. ID No. 315), **CTGGTCCATTTCAT** (Seq. ID No. 316), **ACTGGTCCATTCA** (Seq. ID No. 317), **ACTGGTCCATTTCAT** (Seq. ID No. 318), **CTCCCTAAACAC** (Seq. ID No. 319), **CCCTAAACACTA** (Seq. ID No. 320), **TCCCTAAACACTA** (Seq. ID No. 321), **CTCCCTAAACACT** (Seq. ID No. 322), **CTCCCTAAACACTA** (Seq. ID No. 323), **ACACTACCAAAT** (Seq. ID No. 324), **ACTACCAAATAG** (Seq. ID No. 325), **CACTACCAAATAG** (Seq. ID No. 326), **ACACTACCAAATA** (Seq. ID No. 327), **ACACTACCAAATAG** (Seq. ID No. 328), **GTGGACGCGTAT** (Seq. ID No. 329), **GGACGCGTATCG** (Seq. ID No. 330), **TGGACGCGTATCG** (Seq. ID No. 331), **GTGGACGCGTATC** (Seq. ID No. 332), **GTGGACGCGTATCG** (Seq. ID No. 333), **CGGTCTATGACG** (Seq. ID No. 334), **GTCTATGACGAG** (Seq. ID No. 335), **GGTCTATGACGAG** (Seq. ID No. 336), **CGGTCTATGACGA** (Seq. ID No. 337), **CGGTCTATGACGAG** (Seq. ID No. 338), **CTTTATTAATGC** (Seq. ID No. 339), **TTATTAATGCCT** (Seq. ID No. 340), **TTTATTAATGCCT** (Seq. ID No. 341), **CTTTATTAATGCC** (Seq. ID No. 342), o **CTTTATTAATGCCT** (Seq. ID No. 343) y el oligonucleótido antisentido comprende una secuencia complementaria a la secuencia **ACTGGTCCATTTC** (Seq. ID No. 314), **TGGTCCATTTCAT** (Seq. ID No. 315), **CTGGTCCATTTCAT** (Seq. ID No. 316), **ACTGGTCCATTCA** (Seq. ID No. 317), **ACTGGTCCATTTCAT** (Seq. ID No. 318), **CTCCCTAAACAC** (Seq. ID No. 319), **CCCTAAACACTA** (Seq. ID No. 320), **TCCCTAAACACTA** (Seq. ID No. 321), **CTCCCTAAACACT** (Seq. ID No. 322), **CTCCCTAAACACTA** (Seq. ID No. 323), **ACACTACCAAAT** (Seq. ID No. 324), **ACTACCAAATAG** (Seq. ID No. 325), **CACTACCAAATAG** (Seq. ID No. 326), **ACACTACCAAATA** (Seq. ID No. 327), **ACACTACCAAATAG** (Seq. ID No. 328), **GTGGACGCGTAT** (Seq. ID No. 329), **GGACGCGTATCG** (Seq. ID No. 330), **TGGACGCGTATCG** (Seq. ID No. 331), **GTGGACGCGTATC** (Seq. ID No. 332), **GTGGACGCGTATCG** (Seq. ID No. 333), **CGGTCTATGACG** (Seq. ID No. 334), **GTCTATGACGAG** (Seq. ID No. 335), **GGTCTATGACGAG** (Seq. ID No. 336), **CGGTCTATGACGA** (Seq. ID No. 337), **CGGTCTATGACGAG** (Seq. ID No. 338), **CTTTATTAATGC** (Seq. ID No. 339), **TTATTAATGCCT** (Seq. ID No. 340), **TTTATTAATGCCT** (Seq. ID No. 341), **CTTTATTAATGCC** (Seq. ID No. 342), o **CTTTATTAATGCC** (Seq. ID No. 343).

ID No. 342), o **CTTTATTAATGCCT** (Seq. ID No. 343), respectivamente, y sales e isómeros ópticos de dicho oligonucleótido antisentido.

[0038] Preferiblemente, la presente descripción también está dirigida a oligonucleótido(s) antisentido que consiste en 14 a 20 más preferiblemente 14 a 18 nucleótidos y al menos cuatro de los 14 a 20 más preferiblemente 14 a 18 nucleótidos son LNA y el oligonucleótido antisentido es capaz de hibridar con una región del gen que codifica el TGF-R_{II} o con una región del ARNm que codifica el TGF-R_{II}, en donde la región del gen que codifica el TGF-R_{II} o la región del ARNm que codifica el TGF-R_{II} comprende la secuencia **ACTGGTCCATTC** (Seq. ID No. 314), **TGGTCCATTCAT** (Seq. ID No. 315), **CTGGTCCATTCAT** (Seq. ID No. 316), **ACTGGTCCATTCA** (Seq. ID No. 317), **ACTGGTCCATTCAT** (Seq. ID No. 318), y el oligonucleótido antisentido comprende una secuencia capaz de hibridar con dicha secuencia **ACTGGTCCATTC** (Seq. ID No. 314), **TGGTCCATTCAT** (Seq. ID No. 315), **CTGGTCCATTCAT** (Seq. ID No. 316), **ACTGGTCCATTCA** (Seq. ID No. 317), **ACTGGTCCATTCAT** (Seq. ID No. 318), respectivamente, y sales e isómeros ópticos de dicho oligonucleótido antisentido.

[0039] Ligeramente redactada, la presente divulgación está dirigida a oligonucleótido(s) antisentido que consiste en 14 a 20 más preferiblemente 14 a 18 nucleótidos y al menos cuatro de los 14 a 20 más preferiblemente 14 a 18 nucleótidos son LNA y el oligonucleótidos antisentido es capaz de hibridar con una región del gen que codifica el TGF-R_{II} o con una región del ARNm que codifica el TGF-R_{II}, en donde la región del gen que codifica el TGF-R_{II} o la región del ARNm que codifica el TGF-R_{II} comprende la secuencia **ACTGGTCCATTC** (Seq. ID No. 314), **TGGTCCATTCAT** (Seq. ID No. 315), **CTGGTCCATTCAT** (Seq. ID No. 316), **ACTGGTCCATTCA** (Seq. ID No. 317), o **ACTGGTCCATTCAT** (Seq. ID No. 318), y el oligonucleótido antisentido comprende una secuencia complementaria a la secuencia **ACTGGTCCATTC** (Seq. ID No. 314), **TGGTCCATTCAT** (Seq. ID No. 315), **CTGGTCCATTCAT** (Seq. ID No. 316), **ACTGGTCCATTCA** (Seq. ID No. 317), o **ACTGGTCCATTCAT** (Seq. ID No. 318), respectivamente, y sales e isómeros ópticos de dicho oligonucleótido antisentido.

[0040] Preferiblemente, la presente descripción también está dirigida a oligonucleótido(s) antisentido que consiste en 14 a 20 más preferiblemente 14 a 18 nucleótidos y al menos cuatro de los 14 a 20 más preferiblemente 14 a 18 nucleótidos son LNA y el oligonucleótido antisentido es capaz de hibridar con una región del gen que codifica el TGF-R_{II} o con una región del ARNm que codifica el TGF-R_{II}, en donde la región del gen que codifica el TGF-R_{II} o la región del ARNm que codifica el TGF-R_{II} comprende la secuencia **CTCCCTAAACAC** (Seq. ID No. 319), **CCCTAAACACTA** (Seq. ID No. 320), **TCCCTAAACACTA** (Seq. ID No. 321), **CTCCCTAAACACT** (Seq. ID No. 322), o **CTCCCTAAACACTA** (Seq. ID No. 323), y el oligonucleótido antisentido comprende una secuencia capaz de hibridar con dicha secuencia **CTCCCTAAACAC** (Seq. ID No. 319), **CCCTAAACACTA** (Seq. ID No. 320), **TCCCTAAACACTA** (Seq. ID No. 321) **CTCCCTAAACACT** (Seq. ID No. 322), o **CTCCCTAAACACTA** (Seq. ID No. 323), respectivamente, y sales e isómeros ópticos de dichos oligonucleótidos antisentido.

[0041] Ligeramente redactada, la presente divulgación está dirigida a oligonucleótido(s) antisentido que consiste en 14 a 20 más preferiblemente 14 a 18 nucleótidos y al menos cuatro de los 14 a 20 más preferiblemente 14 a 18 nucleótidos son LNA y el oligonucleótidos antisentido es capaz de hibridar con una región del gen que codifica el TGF-R_{II} o con una región del ARNm que codifica el TGF-R_{II}, en donde la región del gen que codifica el TGF-R_{II} o la región del ARNm que codifica el TGF-R_{II} comprende la secuencia **CTCCCTAAACAC** (Seq. ID No. 319), **CCCTAAACACTA** (Seq. ID No. 320), **TCCCTAAACACTA** (Seq. ID No. 321), **CTCCCTAAACACT** (Seq. ID No. 322), o **CTCCCTAAACACTA** (Seq. ID No. 323), y el oligonucleótido antisentido comprende una secuencia complementaria a la secuencia **CTCCCTAAACAC** (Seq. ID No. 319), **CCCTAAACACTA** (Seq. ID No. 320), **TCCCTAAACACTA** (Seq. ID No. 321), **CTCCCTAAACACT** (Seq. ID No. 322), o **CTCCCTAAACACTA** (Seq. ID No. 323), respectivamente, y sales e isómeros ópticos de dichos oligonucleótido antisentido.

[0042] Preferiblemente, la presente descripción también está dirigida a oligonucleótidos antisentido que consiste en 14 a 20 más preferiblemente 14 a 18 nucleótidos y al menos cuatro de los 14 a 20 más preferiblemente 14 a 18 nucleótidos son LNA y el oligonucleótido antisentido es capaz de hibridar con una región del gen que codifica el TGF-R_{II} o con una región del ARNm que codifica el TGF-R_{II}, en donde la región del gen que codifica el TGF-R_{II} o la región del ARNm que codifica el TGF-R_{II} comprende la secuencia **ACACTACCAAAT** (Seq. ID No. 324), **ACTACCAAATAG** (Seq. ID No. 325), **CACTACCAAATAG** (Seq. ID No. 326), **ACACTACCAAATA** (Seq. ID No. 327) o **ACACTACCAAATAT** (Seq. ID No. No. 328), y el oligonucleótido antisentido comprende una secuencia capaz de hibridar con dicha secuencia **ACACTACCAAAT** (Seq. ID No. 324), **ACTACCAAATAG** (Seq. ID No. 325), **CACTACCAAATAG** (Seq. ID No. 326) **ACACTACCAAATA** (Seq. ID No. 327), o **ACACTACCAAATAT** (Seq. ID No. 328), respectivamente, y sales e isómeros ópticos de dichos oligonucleótidos antisentido.

Ligeramente redactada, la presente divulgación está dirigida a oligonucleótido(s) antisentido que consisten en 14 a 20 más preferiblemente 14 a 18 nucleótidos y al menos cuatro de los 14 a 20 más preferiblemente 14 a 18 nucleótidos son LNA y el oligonucleótido antisentido es capaz de hibridación con una región del gen que codifica el TGF-R_{II} o con una región del ARNm que codifica el TGF-R_{II}, en donde la región del gen que codifica el TGF-R_{II} o la región del ARNm que codifica el TGF-R_{II} comprende la secuencia **ACACTACCAAAT** (Seq. ID No. 324), **ACTACCAAATAG** (Seq. ID No. 325), **CACTACCAAATAT** (Seq. ID No. 326), **ACACTACCAAATA** (Seq. ID No. 327), o **ACACTACCAAATAT** (Seq. ID No. 328), y el oligonucleótido antisentido comprende una secuencia complementaria a la secuencia **ACACTACCAAAT** (Seq. ID No. 324), **ACTACCAAATAG** (Seq. ID No. 325), **CACTACCAAATAG** (Seq. ID No. 326), **ACACTACCAAATA** (Seq. ID No. 327), o **ACACTACCAAATAT** (Seq. ID No. 328), respectivamente, y sales e isómeros ópticos de dichos oligonucleótidos antisentido.

No. 328), respectivamente, y sales e isómeros ópticos de dicho oligonucleótido antisentido.

[0043] Preferiblemente, la presente descripción también está dirigida a oligonucleótidos antisentido que consisten en 14 a 20 más preferiblemente 14 a 18 nucleótidos y al menos cuatro de los 14 a 20 más preferiblemente 14 a 18 nucleótidos son LNA y el oligonucleótido antisentido es capaz de hibridar con una región del gen que codifica el TGF-R_{II} o con una región del ARNm que codifica el TGF-R_{II}, en donde la región del gen que codifica el TGF-R_{II} o la región del ARNm que codifica el TGF-R_{II} comprende la secuencia **GTGGACGCGTAT** (Seq. ID N° 329), **GGACGCGTATCG** (Seq. ID N° 330), **TGGACGCGTATCG** (Seq. ID N° 331), **GTGGACGCGTATC** (Seq. ID N° 332), o **GTGGACGCGTATCG** (Seq. ID No. 333), y el oligonucleótido antisentido comprende una secuencia capaz de hibridar con dicha secuencia **GTGGACGCGTAT** (Seq. ID No. 329), **GGACGCGTATCG** (Seq. ID No. 330), **TGGACGCGTATCG** (Seq. ID No. 331), **GTGGACGCGTATC** (Seq. ID No. 332), o **GTGGACGCGTATCG** (Seq. ID No. 333), respectivamente, y sales e isómeros ópticos de dicho oligonucleótido antisentido.

[0044] Ligeramente redactada, la presente divulgación está dirigida a oligonucleótido(s) antisentido que consiste en 14 a 20 más preferiblemente 14 a 18 nucleótidos y al menos cuatro de los 14 a 20 más preferiblemente 14 a 18 nucleótidos son LNA y el oligonucleótidos antisentido es capaz de hibridar con una región del gen que codifica el TGF-R_{II} o con una región del ARNm que codifica el TGF-R_{II}, en donde la región del gen que codifica el TGF-R_{II} o la región del ARNm que codifica el TGF-R_{II} comprende la secuencia **GTGGACGCGTAT** (Seq. ID N° 329), **GGACGCGTATCG** (Seq. ID N° 330), **TGGACGCGTATCG** (Seq. ID N° 331), **GTGGACGCGTATC** (Seq. ID N° 332), o **GTGGACGCGTATCG** (Seq. ID No. 333), y el oligonucleótido antisentido comprende una secuencia complementaria a la secuencia **GTGGACGCG-TAT** (Seq. ID No. 329), **GGACGCGTATCG** (Seq. ID No. 330), **TGGACGCGTATCG** (Seq. ID No. 331), **GTGGACGCGTATC** (Seq. ID No. 332), o **GTGGACGCGTATCG** (Seq. ID No. 333), respectivamente, y sales e isómeros ópticos de dichos oligonucleótidos antisentido.

[0045] Preferiblemente, la presente descripción también está dirigida a oligonucleótido(s) antisentido que consiste en 14 a 20 más preferiblemente 14 a 18 nucleótidos y al menos cuatro de los 14 a 20 más preferiblemente 14 a 18 nucleótidos son LNA y el oligonucleótido antisentido es capaz de hibridar con una región del gen que codifica el TGF-R_{II} o con una región del ARNm que codifica el TGF-R_{II}, en donde la región del gen que codifica el TGF-R_{II} o la región del ARNm que codifica el TGF-R_{II} comprende la secuencia **CGGTCTATGACG** (Seq. ID No. 334), **GTCTATGACGAG** (Seq. ID No. 335), **GGTCTATGACGAG** (Seq. ID No. 336), **CGGTCTATGACGA** (Seq. ID No. 337), o **CGGTCTATGACGAG** (Seq. ID No. 338), y el oligonucleótido antisentido comprende una secuencia capaz de hibridar con dicha secuencia **CGGTCTATGACG** (Seq. ID No. 334), **GTCTATGACGAG** (Seq. ID No. 335), **GGTCTATGACGAG** (Seq. ID No. 336), **CGGTCTATGACGA** (Seq. ID No. 337), o **CGGTCTATGACGAG** (Seq. ID No. 338), respectivamente, y sales e isómeros ópticos de dicho oligonucleótido antisentido.

[0046] Ligeramente redactada, la presente divulgación está dirigida a oligonucleótido(s) antisentido que consiste en 14 a 20 más preferiblemente 14 a 18 nucleótidos y al menos cuatro de los 14 a 20 más preferiblemente 14 a 18 nucleótidos son LNA y el oligonucleótidos antisentido es capaz de hibridar con una región del gen que codifica el TGF-R_{II} o con una región del ARNm que codifica el TGF-R_{II}, en donde la región del gen que codifica el TGF-R_{II} o la región del ARNm que codifica el TGF-R_{II} comprende la secuencia **CGGTCTATGACG** (Seq. ID No. 334), **GTCTATGACGAG** (Seq. ID No. 335), **GGTCTATGACGAG** (Seq. ID No. 336), **CGGTCTATGACGA** (Seq. ID No. 337), o **CGGTCTATGACGAG** (Seq. ID No. 338), y el oligonucleótido antisentido comprende una secuencia complementaria a la secuencia **CGGTCTATGACG** (Seq. ID No. 334), **GTCTATGACGAG** (Seq. ID No. 335), **GGTCTATGACGAG** (Seq. ID No. 336), **CGGTCTATGACGA** (Seq. ID No. 337), o **CGGTCTATGACGAG** (Seq. ID No. 338), respectivamente, y sales e isómeros ópticos de dichos oligonucleótidos antisentido.

[0047] Preferiblemente, la presente descripción también está dirigida a oligonucleótido(s) antisentido que consiste en 14 a 20 más preferiblemente 14 a 18 nucleótidos y al menos cuatro de los 14 a 20 más preferiblemente 14 a 18 nucleótidos son LNA y el oligonucleótido antisentido es capaz de hibridar con una región del gen que codifica el TGF-R_{II} o con una región del ARNm que codifica el TGF-R_{II}, en donde la región del gen que codifica el TGF-R_{II} o la región del ARNm que codifica el TGF-R_{II} comprende la secuencia **CTTTATTAATGC** (Seq. ID No. 339), **TTATTAATGCCT** (Seq. ID No. 340), **TTTATTAATGCCT** (Seq. ID No. 341), **CTTTATTAATGCC** (Seq. ID No. 342), o **CTTATTAATGCCT** (Seq. ID No. 343), y el oligonucleótido antisentido comprende una secuencia capaz de hibridar con dicha secuencia **CTTTATTAATGC** (Seq. ID No. 339), **TTATTAATGCCT** (Seq. ID No. 340), **TTTATTAATGCCT** (Seq. ID No. 341), **CTTTATTAATGCC** (Seq. ID No. 342), o **CTTATTAATGCCT** (Seq. ID No. 343), respectivamente, y sales e isómeros ópticos de dichos oligonucleótidos antisentido.

[0048] Ligeramente redactada, la presente divulgación está dirigida a oligonucleótido(s) antisentido que consiste en 14 a 20 más preferiblemente 14 a 18 nucleótidos y al menos cuatro de los 14 a 20 más preferiblemente 14 a 18 nucleótidos son LNA y el oligonucleótido antisentido es capaz de hibridar con una región del gen que codifica el TGF-R_{II} o con una región del ARNm que codifica el TGF-R_{II}, en donde la región del gen que codifica el TGF-R_{II} o la región del ARNm que codifica el TGF-R_{II} comprende la secuencia **CTTTATTAATGC** (Seq. ID No. 339), **TTATTAATGCCT** (Seq. ID No. 340), **TTTATTAATGCCT** (Seq. ID No. 341), **CTTTATTAATGCC** (Seq. ID No. 342), o **CTTATTAATGCCT** (Seq. ID No. 343), y el oligonucleótido antisentido comprende una secuencia complementaria a la secuencia **CTTTATTAATGC** (Seq. ID No. 339), **TTATTAATGCCT** (Seq. ID No. 340), **TTTATTAATGCCT** (Seq. ID No. 341), **CTTTATTAATGCC** (Seq. ID No. 342), o **CTTATTAATGCCT** (Seq. ID No. 343), respectivamente, y sales e

AGTGCAAATGTTA, -AGTGCAAATGTT, -AGTGCAAATGT, -AGTGCAAATG, -AGTGCAAAT, -AGTGCAAAA, -AGTGCAA, -AGTGCA, -AGT- GC, -AGTG, -AGT, -AG, o -A;

N¹¹ representa: TGCCCCAGAAGAGCTATTTGGTAG-, GCCCCAGAAGAGCTATTTGGTAG-,
CCCCAGAAGAGCTATTTGGTAG-, CCCAGAAGAGCTATTTGGTAG-, CCAGAAGAGCTATTTGGTAG-,

5 CAGAAGAGCTATTTGGTAG-, AGAAGAGCTATTTGGTAG-, GAAGAGCTATTTGGTAG-, AAGAGCTATTTGGTAG-,
AGAGCTATTTGGTAG-, GAGCTATTTGGTAG-, AGCTATTTGGTAG-, GCTATTTGGTAG-, CTATTTGGTAG-,
TATTTGGTAG-, ATTTGGTAG-, TTTGGTAG-, TTGGTAG-, TGGTAG-, TGGTAG-, GGTAG-, GTAG-, TAG-, AG- o G-

N¹² representa: -GAGCCGTCTTCAGGAATCTTCTCC, -GAGCCGTCTTCAGGAATCTTCTC, -
GAGCCGTCTTCAGGAATCTTCT, -GAGCCGTCTTCAGGAATCTTC, -GAGCCGTCTTCAGGAATCTT, -

10 GAGCCGTCTTCAGGAATCT, -GAGCCGTCTTCAGGAATC, -GAGCCGTCTTCAGGAAT, -GAGCCGTCTTCAGGAA,
-GAGCCGTCTTCAGGA, -GAGCCGTCTTCAGG, -GAGCCGTCTTCAG, -GAGCCGTCTTCA, -GAGCCGTCTTC, -
GAGCCGTCTT, -GAGCCGTCT, -GAGCCGTC, -GAGCCGT, -GAGCCG, -GAGCC, -GAGC, -GAG, -GA, o -G;
y sales e isómeros ópticos del oligonucleótido antisentido.

15 **[0052]** Por lo tanto, la presente divulgación está dirigida a oligonucleótidos antisentido que consisten en 10 a 28
nucleótidos y al menos dos de los 10 a 28 nucleótidos son LNA y el oligonucleótido antisentido es capaz de hibridar
con una región del gen que codifica el TGF-R_{II} o con una región del ARNm que codifica el TGF-R_{II}, en donde el
oligonucleótido antisentido está representado por la siguiente secuencia 5'-N¹-**GTCATAGA**-N²-3' (Seq. ID No. 12) o
20 5'-N³-**ACGCGTCC**-N⁴-3' (Seq. ID No. 98) o 5'-N¹¹-**TGTTTAGG**-N¹²-3' (Seq. ID No. 10) o 5'-N⁵-**TTTGGTAG**-N⁶-3'
(Seq. ID No. 11) o 5'-N⁷-**AATGGACC**-N⁸-3' (Seq. ID No. 100) o 5'-N⁹-**ATTAATAA**-N¹⁰-3' (Seq. ID No. 101), en donde
los residuos N¹ a N¹² tienen los significados especialmente los significados limitados adicionales descritos en este
documento y las sales e isómeros ópticos de dicho oligonucleótido antisentido.

25 **[0053]** Además, la presente invención está dirigida a oligonucleótidos antisentido que constan de 10 a 28
nucleótidos y al menos dos de los 10 a 28 nucleótidos son LNA y el oligonucleótido antisentido es capaz de hibridar
con una región del gen codificando el TGF-R_{II} o con una región del ARNm codificando el TGF-R_{II}, en donde el
oligonucleótido antisentido está representado por la siguiente secuencia 5'-N⁷-**AATGGACC**-N⁸-3' (Seq. ID No. 100),
en donde

30 N⁷ representa: TGAATCTTGAATATCTCATG-, GAATCTTGAATATCTCATG-, AATCTTGAATATCTCATG-,
ATCTTGAATATCTCATG-, TCTTGAATATCTCATG-, CTTGAATATCTCATG-, TTGAATATCTCATG-,
TGAATATCTCATG-, GAATATCTCATG-, AATATCTCATG-, ATATCTCATG-, TATCTCATG-, ATCTCATG-,
TCTCATG-, CTCATG-, TCATG, CATG, ATG, TG o G;

35 N⁸ representa: -AGTATTCTAGAACTCACCA, -AGTATTCTAGAACTCACC, -AGTATTCTAGAACTCAC, -
AGTAT- TCTAGAACTCA, -AGTATTCTAGAACTC, -AGTATTCTAGAACT, -AGTATTCTAGAAAC, -
AGTATTCTAGAAA, -AGTATTCTAGAA, -AGTATTCTAGA, -AGTATTCTAG, -AGTATTCTA, -AGTATTCT, -
AGTATTC, -AGTATT, -AGTAT, -AGTA, -AGT, -AG, o -A;
y sales e isómeros ópticos del oligonucleótido antisentido.

40 **[0054]** Los oligonucleótidos antisentido de fórmula S6 (Seq. ID No. 100) comprenden preferiblemente de 2 a 10
unidades de LNA, más preferiblemente de 3 a 9 unidades de LNA y aún más preferiblemente de 4 a 8 unidades de
LNA y también preferiblemente al menos 6 no LNA. Unidades de LNA, más preferiblemente al menos 7 unidades no
de LNA y lo más preferiblemente al menos 8 unidades no de LNA. Las unidades no de LNA son preferiblemente
unidades de ADN. Las unidades LNA se colocan preferiblemente en el extremo terminal 3' (también denominado
45 terminal 3') y en el extremo terminal 5' (también denominado terminal 5'). Preferiblemente, al menos una y más
preferiblemente al menos dos unidades de LNA están presentes en el extremo terminal 3' y/o en el extremo terminal
5'.

Por lo tanto, se prefieren los oligonucleótidos antisentido de la presente invención diseñados como GAPmeros que
contienen de 2 a 10 unidades de LNA y que contienen especialmente de 1 a 5 unidades de LNA en el extremo
terminal 5' y de 1 a 5 unidades de LNA en el extremo terminal 3' del oligonucleótido antisentido y entre las unidades
50 de LNA al menos 7 y más preferiblemente al menos 8 unidades de ADN. Más preferiblemente, los oligonucleótidos
antisentido comprenden de 2 a 4 unidades de LNA en el extremo terminal 5' y de 2 a 4 unidades de LNA en el
extremo terminal 3' y aún más preferiblemente comprenden de 3 a 4 unidades de LNA en el extremo terminal 5' y de
3 a 4 unidades LNA en el extremo terminal 3' y contienen preferiblemente al menos 7 unidades no de LNA y lo más
preferiblemente al menos 8 unidades no de LNA tales como unidades de ADN entre ambos segmentos de LNA.

55 **[0055]** Además, los oligonucleótidos antisentido pueden contener nucleobases comunes tales como adenina,
guanina, citosina, timina y uracilo, así como derivados comunes de los mismos, tales como 5-metilcitosina o 2-
aminoadenina. Los oligonucleótidos antisentido de la presente invención también pueden contener puentes
internucleotídicos modificados tales como fosforotioato o fosforoditioato en lugar de puentes de fosfato. Dichas
60 modificaciones pueden estar presentes solo en los segmentos de LNA o solo en el segmento no LNA del
oligonucleótido antisentido. Como unidades de LNA, se prefieren especialmente los residuos b¹ a b⁹ como se
describe en este documento.

65 **[0056]** De este modo, se prefieren oligonucleótidos antisentido de la fórmula (S6):
5'-N⁷-**AATGGACC**-N⁸-3' (Seq. ID No. 100)
en donde

N⁷ representa: TGAATCTTGAATATCTCATG-, GAATCTTGAATATCTCATG-, AATCTTGAATATCTCATG-, ATCTTGAATATCTCATG-, TCTTGAATATCTCATG-, CTTGAATATCTCATG-, TTGAATATCTCATG-, TGAATATCTCATG-, GAATATCTCATG-, AATATCTCATG-, ATATCTCATG-, TATCTCATG-, ATCTCATG-, TCTCATG-, CTCATG-, TCATG-, CATG-, ATG-, TG-, o G-;

5 y
N⁸ se selecciona de: -AGTATTCTAGAACTCACCA, -AGTATTCTAGAACTCACC, -AGTATTCTAGAACTCAC, -AG- TATTCTAGAACTCA, -AGTATTCTAGAACTC, -AGTATTCTAGAACT, -AGTATTCTAGAAAC, -AGTATTCTA- GAAA, -AGTATTCTAGAA, -AGTATTCTAGA, -AGTATTCTAG, -AGTATTCTA, -AGTATTCT, -AGTATTCT, -AGTATT, -AGTAT, -AGTA, -AGT, -AG, o -A.

10 **[0057]** Preferiblemente, el oligonucleótido antisentido de fórmula general (S6) tiene entre 10 y 28 nucleótidos y al menos un nucleótido LNA en el extremo 3' y al menos un nucleótido LNA en el extremo 5'. Como los nucleótidos de LNA (unidades de LNA), especialmente estos descritos en el capítulo "Locked Nucleic Acids (LNA®)" y, preferiblemente, en el capítulo "Preferred LNA", son adecuados y como puentes de nucleótidos, especialmente estos descritos en el capítulo "Internucleotide Linkages (IL)" son adecuados.

15 **[0058]** Más preferiblemente, el oligonucleótido antisentido de fórmula general (S6) tiene entre 11 y 24 nucleótidos y al menos dos nucleótidos de LNA en el extremo 3' y al menos dos nucleótidos de LNA en el extremo 5'.
Aún más preferiblemente, el oligonucleótido antisentido de fórmula general (S6) tiene entre 12 y 20, más preferiblemente entre 13 y 19 y aún más preferiblemente entre 14 y 18 nucleótidos y entre 2 y 5, preferiblemente 3 y 5 y más preferiblemente entre 3 y 4 unidades de LNA en el extremo terminal 3' y entre 2 y 5, preferiblemente 3 y 5 y más preferiblemente entre 3 y 4 unidades de LNA en el extremo terminal 5'. Preferiblemente, los oligonucleótidos antisentido son GAPmeros de la forma LNA segmento A - segmento de ADN - LNA segmento B. Preferiblemente los oligonucleótidos antisentido contienen al menos 6, más preferiblemente al menos 7 y lo más preferiblemente al menos 8 unidades no de LNA tales como unidades de ADN entre los dos segmentos de LNA. Las nucleobases adecuadas para las unidades no de LNA y las unidades LNA se describen en el capítulo "Nucleobases".

20 **[0059]** Se prefieren adicionalmente oligonucleótidos antisentido de la fórmula (S6):
5'-N⁷-**AATGGACC**-N⁸-3'
en donde

30 N⁷ representa: AATCTTGAATATCTCATG-, ATCTTGAATATCTCATG-, TCTTGAATATCTCATG-, CTTGAATATCTCATG-, TTGAATATCTCATG-, TGAATATCTCATG-, GAATATCTCATG-, AATATCTCATG-, ATATCTCATG-, TATCTCATG-, ATCTCATG-, TCTCATG-, CTCATG-, TCATG-, CATG-, ATG-, TG-, o G-; y
N⁸ se selecciona de: -AGTATTCTAGAACTCAC, -AGTATTCTAGAACTCA, -AGTATTCTAGAACTC, -AGTATTCTA- GAACT, -AGTATTCTAGAAAC, -AGTATTCTAGAAA, -AGTATTCTAGAA, -AGTATTCTAGA, -AGTATTCTAG, -AG- TATTCTA, -AGTATTCT, -AGTATTCT, -AGTATTCT, -AGTATT, -AGTAT, -AGTA, -AGT, -AG, o -A.

35 **[0060]** También se prefieren los oligonucleótidos antisentido de la fórmula (S6):
5'-N⁷-**AATGGACC**-N⁸-3'
en donde

40 N⁷ representa: TGAATATCTCATG-, GAATATCTCATG-, AATATCTCATG-, ATATCTCATG-, TATCTCATG-, ATCTCATG-, TCTCATG-, CTCATG-, TCATG-, CATG-, ATG-, TG-, o G-; y
N⁸ se selecciona de: -AGTATTCTAGAAA, -AGTATTCTAGAA, -AGTATTCTAGA, -AGTATTCTAG, -AGTATTCTA, -AG- TATTCT, -AGTATTCT, -AGTATTCT, -AGTATT, -AGTAT, -AGTA, -AGT, -AG, o -A.

45 **[0061]** También se prefieren los oligonucleótidos antisentido de la fórmula (S6):
5'-N⁷-**AATGGACC**-N⁸-3'
en donde

50 N⁷ representa: ATCTCATG-, TCTCATG-, CTCATG-, TCATG-, CATG-, ATG-, TG-, o G-; y
N⁸ se selecciona entre: -AGTATTCT, -AGTATTCT, -AGTATT, -AGTAT, -AGTA, -AGT, -AG o -A.

55 **[0062]** Preferiblemente, la presente invención está dirigida a oligonucleótidos antisentido que consiste en 12 a 24 nucleótidos y al menos tres de los 12 a 24 nucleótidos son LNA y el oligonucleótido antisentido es capaz de hibridar con una región del gen codificando el TGF-R_I o con una región del ARNm que codifica el TGF-R_{II}, en donde el oligonucleótido antisentido está representado por la siguiente secuencia 5'-N^{7A}-**GAATGGACCA**-N^{8A}-3' (Seq. ID No. 73), en donde

60 N^{7A} representa: TGAATCTTGAATATCTCAT-, GAATCTTGAATATCTCAT-, AATCTTGAATATCTCAT-, ATCTTGAATATCTCAT-, TCTTGAATATCTCAT-, CTTGAATATCTCAT-, TTGAATATCTCAT-, TGAATATCTCAT-, GAATATCTCAT-, AATATCTCAT-, ATATCTCAT-, TATCTCAT-, ATCTCAT-, TCTCAT-, CTCAT-, TCAT-, CAT-, AT-, o T-;

65 N^{8A} representa: -GTATTCTAGAACTCACCA, -GTATTCTAGAACTCACC, -GTATTCTAGAACTCAC, -GTATTCTA- GAACTCA, -GTATTCTAGAACTC, -GTATTCTAGAACT, -GTATTCTAGAAAC, -GTATTCTAGAAA, -GTATTCTA- GAA, -GTATTCTAGA, -GTATTCTAG, -GTATTCTA, -GTATTCT, -GTATTCT, -GTATT, -GTAT, -GTA, -GT, or -G;
y sales e isómeros ópticos del oligonucleótido antisentido.

[0063] Preferiblemente, N^{7A} representa: AATCTTGAATATCTCAT-, ATCTTGAATATCTCAT-, TCTTGAATATCTCAT, CTTGAATATCTCAT-, TTGAATATCTCAT-, TGAATATCTCAT-, GAATATCTCAT-, AATATCTCAT-, ATATCTCAT-, TATCTCAT-, ATCTCAT-, TCTCAT-, CTCAT-, TCAT-, CAT-, AT- o T-;

y

5 N^{8A} representa: - GTATTCTAGAACTCAC, -GTATTCTAGAACTCA, -GTATTCTAGAACTC, -GTATTCTAGAACT, -GTATTCTAGAAAC, -GTATTCTAGAAA, -GTATTCTAGAA, -GTATTCTAGA, -GTATTCTAG, -GTATTCTA, -GTATTCT, -GTATTC, -GTATT, -GTAT, -GTA, -GT, or -G.

[0064] Más preferiblemente, N^{7A} representa: TGAATATCTCAT-, GAATATCTCAT-, AATATCTCAT-, ATATCTCAT-, TATCTCAT-, ATCTCAT-, TCTCAT-, CTCAT-, TCAT-, CAT-, AT-, or T-; y

10 N^{8A} representa: -GTATTCTAGAAA, -GTATTCTAGAA, -GTATTCTAGA, -GTATTCTAG, -GTATTCTA, -GTATTCT, -GTATTC, -GTATT, -GTAT, -GTAT, -GT, o -G.

[0065] Todavía más preferiblemente, N^{7A} representa: ATCTCAT-, TCTCAT-, CTCAT-, TCAT-, CAT-, AT- o T-; y N^{8A} representa: -GTATTCT, -GTATTC, -GTATT, -GTAT, -GTA, -GT, o -G.

15

[0066] Preferiblemente, el oligonucleótido antisentido de fórmula general (S6A/Seq. ID No. 73) tiene entre 12 y 24 nucleótidos y al menos un nucleótido LNA en el extremo 3' y al menos un nucleótido LNA en el extremo 5'. Como los nucleótidos de LNA (unidades de LNA), especialmente estos descritos en el capítulo "Ácidos nucleicos bloqueados (LNA®)" y, preferiblemente, en el capítulo "LNA preferidos", son adecuados y como puentes de nucleótidos, especialmente estos descritos en el capítulo "Enlaces de nucleótidos (IL)" son adecuados

20

[0067] Más preferiblemente, el oligonucleótido antisentido de fórmula general (S6A) tiene entre 12 y 22 nucleótidos y al menos dos nucleótidos LNA en el extremo 3' y al menos dos nucleótidos LNA en el extremo 5'.

25 Aún más preferiblemente, el oligonucleótido antisentido de fórmula general (S6A) tiene entre 12 y 20, más preferiblemente entre 13 y 19 y aún más preferible entre 14 y 18 nucleótidos y entre 2 y 5, preferiblemente 3 y 5 y más preferiblemente entre 3 y 4 unidades de LNA en el extremo terminal 3' y entre 2 y 5, preferiblemente 3 y 5 y más preferiblemente entre 3 y 4 unidades de LNA en el extremo terminal 5'. Preferiblemente, los oligonucleótidos antisentido son GAPmeros de la forma LNA segmento A - segmento de ADN - LNA segmento B. Preferiblemente los oligonucleótidos antisentido contienen al menos 6, más preferiblemente al menos 7 y lo más preferiblemente al menos 8 unidades no de LNA tales como unidades de ADN entre los dos segmentos de LNA. Las nucleobases adecuadas para las unidades no de LNA y las unidades LNA se describen en el capítulo "Nucleobases".

30

[0068] Otro aspecto de la presente divulgación se refiere a oligonucleótidos antisentido que tienen una longitud de 10 a 28 nucleótidos, preferiblemente de 10 a 24 nucleótidos, más preferiblemente de 11 a 22 nucleótidos o de 12 a 20 nucleótidos, aún más preferiblemente de 13 a 19 nucleótidos, y lo más preferiblemente 14 a 18 nucleótidos, en donde al menos dos de los nucleótidos, preferiblemente al menos tres de los nucleótidos, y más preferiblemente al menos cuatro de los nucleótidos son LNA y la secuencia del oligonucleótido antisentido de los 10 a 28 nucleótidos, preferiblemente de 10 a 24 nucleótidos, más preferiblemente de 11 a 22 nucleótidos o de 12 a 20 nucleótidos, aún más preferiblemente de 13 a 19 nucleótidos, y más preferiblemente de 14 a 18 nucleótidos, se seleccionan del grupo de secuencias de 10 a 28 nucleótidos, preferiblemente 10 a 24 nucleótidos, más preferiblemente de 11 a 22 nucleótidos o de 12 a 20 nucleótidos, aún más preferiblemente de 13 a 19 nucleótidos, y lo más preferiblemente de 14 a 18 nucleótidos contenidos en una secuencia seleccionada del siguiente grupo:

35

45 GAATCTTGAATATCTCATGAATGGACCAGTATTCTAGAAAC
(Seq. ID No. 75: 383-423 de Seq. ID No. 1),

TTCATATTTATATACAGGCATTAATAAAGTGCAAATGTTAT
(Seq. ID No. 77: 2245-2285 de Seq. ID No. 1),

50

TGAGGAAGTGCTAACACAGCTTATCCTATGACAATGTCAAAG
(Seq. ID No. 78: 2315-2356 de Seq. ID No. 1),

55 GCCTGCCCCAGAAGAGCTATTTGGTAGTGTAGGGAGCCGTCTTCAGG
(Seq. ID No. 79: 2528-2576 de Seq. ID No. 1),

CGCAGGTCCTCCCAGCTGATGACATGCCGCGTCAGGTACTIONCTGTAGGT
(Seq. ID No. 81: 3205-3253 de Seq. ID No. 1),

60

ATGTCGTTATTAACCGACTTCTGAACGTGCGGTGGGATCGTGCTGGCGATACGCGTCCACAGGA
CGATGTGCAGCGGC

(Seq. ID No. 83: 4141-4218 de Seq. ID No. 1),

65

ES 2 705 066 T3

GGCCACAGGCCCCCTGAGCAGCCCCCGACCCATGGCAGACCCCGCTGCTCGTCATAGACCGAGC
CCCCAGCGCAG

5 (Seq. ID No. 84: 4216-4289 de Seq. ID No. 1),

10 ATGTCGTTATTAACCGACTTCTGAACGTGCGGTGGGATCGTGCTGGCGATACGCGTCCACAGGA
CGATGTGCAGCGGCCACAGGCCCCCTGAGCAGCCCCCGACCCATGGCAGACCCCGCTGCTCGTC
ATAGACCGAGCCCCCAGCGCAG

15 (Seq. ID No. 86: 4141-4289 de Seq. ID No. 1)

TTGAATATCTCATGAATGGACCAGTATTCTA
(Seq. ID No. 87: 388-418 de Seq. ID No. 1),

20 CAAGTGAATTTCTAGGCGCCTCTATGCTACTG
(Seq. ID No. 88: 483-515 de Seq. ID No. 1),

25 ATTTATATACAGGCATTAATAAAGTGCAAAT
(Seq. ID No. 89: 2250-2280 de Seq. ID No. 1),

AAGTGCTAACACAGCTTATCCTATGACAATGT
(Seq. ID No. 90: 2320-2351 de Seq. ID No. 1),

30 CCCCAGAAGAGCTATTTGGTAGTGTTTAGGGAGCCGTCT (Seq. ID No. 91: 2533-2571 de Seq. ID No. 1),

CTGGTCGCCCTCGATCTCTCAACACGTTGTCCCTTCATGCTTTTCGACACAGGGGTGCTCCCGCAC
CTTGAACCAAATG

35 (Seq. ID No. 92: 2753-2830 de Seq. ID No. 1),

GTCTCCAGCTGATGACATGCCGCGTCAGGTAATCCTG
(Seq. ID No. 93: 3210-3248 de Seq. ID No. 1),

40 CTCAGCTTCTGCTGCCGGTTAACGCGGTAGCAGTAGAAGA
(Seq. ID No. 94: 3655-3694 de la ID de Noq. 1),

45 GTTATTAACCGACTTCTGAACGTGCGGTGGGATCGTGCTGGCGATACGCGTCCACAGGACGATG
TGCA

(Seq. ID No. 95: 4146-4213 de Seq. ID No. 1),

50 CAGGCCCCCTGAGCAGCCCCCGACCCATGGCAGACCCCGCTGCTCGTCATAGACCGAGCCCCCAG
(Seq. ID No. 96: 4221-4284 de Seq. ID No. 1),

55 CACGCGCGGGGGTGTGCTCGCTCCGTGCGCGGAGTGACTCACTCAACTTCA
(Seq. ID No. 97: 4495-4546 de Seq. ID No. 1),

en donde el oligonucleótido antisentido es capaz de hibridarse selectivamente con respecto al transcriptoma humano completo solo con el gen que codifica TGF-R_{II} o con el ARNm que codifica TGF-R_{II} y las sales e isómeros ópticos de dicho oligonucleótido antisentido.

60 **[0069]** Dicho oligonucleótido antisentido que tiene una secuencia contenida en las secuencias nº 75, 77, 78, 79, 81, 83, 84, 86 - 97 tienen entre 2 y 5, preferiblemente 3 y 5 y más preferiblemente entre 3 y 4 unidades de LNA en el extremo terminal 3' y entre 2 y 5, preferiblemente 3 y 5 y más preferiblemente entre 3 y 4 unidades de LNA en el extremo terminal 5' y tienen preferiblemente la estructura de GAPmeros de la forma LNA segmento A - segmento de ADN - LNA segmento B. Como nucleótidos LNA (unidades LNA), especialmente los descritos en el capítulo "Locked Nucleic Acids (LNA®)" y preferiblemente en el capítulo "LNA preferidos" son adecuados y como puentes

internucleotídicos, especialmente los descritos en el capítulo "Enlaces entre nucleótidos (IL)" son adecuados. Preferiblemente, dichos oligonucleótidos antisentido contienen al menos 6, más preferiblemente al menos 7 y lo más preferiblemente al menos 8 unidades no de LNA tales como unidades de ADN entre los dos segmentos de LNA. Las nucleobases adecuadas para las unidades no de LNA y las unidades LNA se describen en el capítulo "Nucleobases". Los ejemplos adecuados para dichos oligonucleótidos antisentido están representados por las fórmulas (S1) a (S7), (S1A) a (S4A), (S6A) y (S7A).

[0070] La **Seq. ID No. 1** representa la cadena antisentido del ADNc (ADNc) (secuencia antisentido 5'-3') del factor de crecimiento transformante Homo sapiens, receptor beta II (TGF-R_{II}), variante de transcripción 2.

[0071] La **Seq. ID No. 2** representa la cadena con sentido del ADNc (secuencia sentido 5'-3') del factor de crecimiento transformante Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGF-R_{II}), variante de transcripción 2. Alternativamente, también se puede considerar la secuencia de Seq. ID No. 2 para representar la secuencia del ARNm del factor de crecimiento transformante Homo sapiens, receptor beta II (TGF-R_{II}), variante de transcripción 2 (Seq. ID No. 3), pero escrito en el código de ADN, es decir, representado en código G, C, A, T, y no en el código de ARN.

[0072] La **Seq. ID No. 3** representa el ARNm (secuencia de sentido 5'-3') del factor de crecimiento transformante Homo sapiens, receptor beta II (TGF-R_{II}), variante de transcripción 2. Es evidente que el ARNm se muestra en Seq. ID No. 3 está escrito en el código de ARN, es decir, representado en los códigos G, C, A, U.

[0073] Se entenderá que "cadena de ADN codificante", como se usa en este documento, se refiere a la cadena de ADN que es idéntica al ARNm (excepto que está escrito en el código de ADN) y que abarca los codones que se usaron para la traducción de proteínas. No se utiliza como plantilla para la transcripción en ARNm. Por lo tanto, los términos "cadena de ADN codificante", "cadena de ADN con sentido" y "cadena de ADN sin molde" se pueden usar indistintamente. Además, "cadena de ADN no codificante", como se usa en el presente documento, se refiere a la cadena de ADN que es complementaria a la "cadena de ADN codificante" y sirve como plantilla para la transcripción del ARNm. Por lo tanto, los términos "cadena de ADN no codificante", "cadena de ADN antisentido" y "cadena de ADN plantilla" se pueden usar indistintamente.

[0074] El término "oligonucleótido antisentido" se refiere a un oligómero o polímero de ácido ribonucleico (ARN) o ácido desoxirribonucleico (ADN) o miméticos o variantes de los mismos, como un oligonucleótido antisentido que tiene un enlace internucleotídico modificado como un enlace fosforotioato y/o una o más nucleobases modificadas, tales como 5-metilcitosina y/o una o más unidades nucleotídicas modificadas, tales como LNA, como β-D-oxi-LNA. El término "oligonucleótido antisentido" incluye oligonucleótidos compuestos por nucleobases, azúcares e enlaces internucleotídicos covalentes (esqueleto) naturales, así como oligonucleótidos que tienen porciones no naturales que funcionan de manera similar. Tales oligonucleótidos modificados o sustituidos son a menudo preferidos sobre las formas nativas, debido a las propiedades deseables tales como, por ejemplo, captación celular mejorada, afinidad aumentada por la diana de ácido nucleico y estabilidad aumentada en presencia de nucleasas. Los oligonucleótidos antisentido son ARN catalíticos cortos u oligonucleótidos catalíticos que hibridan con el ácido nucleico diana e inhiben su expresión.

[0075] El término "nucleósido" es bien conocido por un experto y se refiere a un resto de azúcar pentosa como la ribosa, desoxirribosa o una ribosa modificada o bloqueada o una desoxirribosa modificada o bloqueada como los LNA que se describen a continuación con detalle. Una nucleobase está unida al átomo de carbono glicosídico (posición 1' de la pentosa) y se forma un enlace internucleotídico entre el átomo de oxígeno o azufre 3' y preferiblemente el átomo de oxígeno 3' de un nucleósido y el átomo de oxígeno o azufre 3' y preferiblemente el átomo de oxígeno 5' del nucleósido adyacente, mientras que el enlace internucleotídico no pertenece al nucleósido (ver Fig. 2).

[0076] El término "nucleótido" es bien conocido por un experto y se refiere a un resto de azúcar pentosa como la ribosa, desoxirribosa o una ribosa modificada o bloqueada o una desoxirribosa modificada o bloqueada como los LNA que se describen a continuación con detalle. Una nucleobase está unida al átomo de carbono glicosídico (posición 1' de la pentosa) y se forma un enlace internucleotídico entre el átomo de oxígeno o azufre 3' y, preferiblemente, el átomo de oxígeno 3' de un nucleótido y el átomo de oxígeno o azufre 5' y preferiblemente el átomo de oxígeno 5' del nucleótido adyacente, mientras que el enlace internucleotídico es una parte del nucleótido (ver Fig. 2).

Nucleobases

[0077] El término "nucleobase" se abrevia aquí con "B" y se refiere a las cinco bases de nucleótidos estándar adenina (A), timina (T), guanina (G), citosina (C) y uracilo (U) también en cuanto a modificaciones o análogos de los mismos o análogos con capacidad para formar un par de bases de Watson-Crick con bases en la cadena complementaria. Las nucleobases modificadas incluyen otras nucleobases sintéticas y naturales tales como 5-metilcitosina (C*), 5-hidroximetilcitosina, N4-metilcitosina, xantina, hipoxantina, 7-deazaxantina, 2-aminoadenina, 6-metiladenina, 6-metilguanina, 6-etiladenina, 6-etil-guanina, 2-propiladenina, 2-propilguanina, 6-carboxiuracilo, 5-

halouracilo, 5,6-dihidrouracilo, 5-halocitosina, 5-propinil uracilo, 5-propinil citosina, 6-aza uracilo, 6-aza citosina, 6-aza timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 8-fluoroadenina, 8-cloroadenina, 8-bromoadenina, 8-yodoadenina, 8-aminoadenina, 8-tiodenina, 8-tioalquilazina, 8-hidroxiladenina, 8-fluoroguanina, 8-cloroguanina, 8-bromoguanina, 8-yodoguanina, 8-aminoguanina, 8-tiolguanina, 8-tioalquilguanina, 8-hidroxilguanina, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, 5-trifluorometiluracilo, 5-fluorocitosina, 5-bromocitosina, 5-clorocitosina, 5-yodocitosina, 5-trifluorometilertostina 7-metiladenina, 8-azaguanina, 8-azaadenina, 7-deazaguanina, 7-deazaadenina, 7-deaza-8-azaadenina, 3-deazaguanina, 3-deazaadenina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitina, etc., siendo preferidas las sustituciones de 5-metilcitosina y/o 2-aminoadenina, ya que se ha demostrado que estas modificaciones aumentan la estabilidad del dúplex de ácido nucleico.

[0078] Los oligonucleótidos antisentido preferidos de la presente invención pueden comprender análogos de nucleobases. La nucleobase de una sola unidad de nucleótido del oligonucleótido antisentido podría reemplazarse por un análogo de una nucleobase o dos, tres, cuatro, cinco o incluso todas las nucleobases en un oligonucleótido antisentido podría reemplazarse por los análogos de nucleobases, como metilcitosina, o N6-metiladenina o 2-aminoadenina. Preferiblemente, las unidades de LNA podrían estar conectadas a análogos de nucleobases tales como 5-metilcitosina.

[0079] Se reconocerá que cuando se hace referencia a una secuencia de nucleótidos o monómeros, a lo que se hace referencia, es la secuencia de bases, como A, T, G, C o U. Sin embargo, excepto los ejemplos específicos descritos en las Tablas 3 a 8, la representación de los oligonucleótidos antisentido por el código de letras A, T, G, C y U debe entenderse que dicho oligonucleótido antisentido puede contener cualquiera de las nucleobases como se describe en este documento, cualquiera de los grupos extremos 3' como se describe en el presente documento, cualquiera de los grupos terminales 5' como se describe en el presente documento, y cualquiera de los enlaces internucleotídicos (también denominados puentes entre nucleótidos) como se describe en el presente documento. Los nucleótidos A, T, G, C y U también deben entenderse como nucleótidos de LNA o nucleótidos de no LNA, tales como preferiblemente nucleótidos de ADN.

Solo con respecto a los ejemplos específicos descritos en las Tablas 4 a 9, las nucleobases, las unidades LNA, las unidades no de LNA, los enlaces internucleotídicos y los grupos finales se especifican más detalladamente como se describe en el capítulo "Leyenda" antes de la Tabla 2.

[0080] Se ha demostrado que los oligonucleótidos antisentido, así como las sales de los oligonucleótidos antisentido, como se describe en el presente documento, son complementarios de la diana, que es el gen que codifica el TGF-R_{II} o el ARNm que codifica el TGF-R_{II}, es decir, hibrida suficientemente bien y con suficiente especificidad y especialmente selectividad para dar el efecto inhibitorio deseado.

[0081] El término "sal" se refiere a sales fisiológicamente y/o farmacéuticamente aceptables de los oligonucleótidos antisentido de la presente invención. Los oligonucleótidos antisentido contienen nucleobases como adenina, guanina, timina, citosina o derivados de los mismos que son básicos y que forman una sal como una sal de cloruro o mesilato. El enlace internucleotídico contiene preferiblemente un átomo de oxígeno o azufre cargado negativamente que forma sales como la sal de sodio, litio o potasio. Por lo tanto, las sales de adición de bases farmacéuticamente aceptables se forman con bases inorgánicas o bases orgánicas. Ejemplos de bases orgánicas e inorgánicas adecuadas son las bases derivadas de iones metálicos, por ejemplo, aluminio, iones de metales alcalinos, tales como iones de sodio o potasio, metales alcalinotérreos tales como calcio o magnesio, o un ion de sal de amina o hidróxidos de álcali o alcalinotérreos, -carbonatos o -bicarbonatos. Los ejemplos incluyen LiOH acuoso, NaOH, KOH, NH₄OH, carbonato de potasio, amoníaco y bicarbonato de sodio, sales de amonio, aminas primarias, secundarias y terciarias, tales como, por ejemplo, hidróxido de tetraalquilamonio, alquilaminas inferiores tales como metilamina, t-butilamina, procaína, etanolamina, arilalquilaminas como dibenzilamina y N,N-dibenciletilendiamina, alquiltiperidinas inferiores tales como N-etiltiperidina, cicloalquilaminas tales como las partes de los dispositivos, las partes de los dispositivos, las partes de los dispositivos, las partes de los aparatos, las partes de los aparatos, las partes de los aparatos, las partes de las partes de los animales, las partes de las partes de las personas o las personas que se encuentran en la zona. o sales derivadas de aminoácidos como arginina, lisina, ornitina o amidas de aminoácidos originalmente neutros o ácidos, cloroprocaína, colina, procaína o similares.

[0082] Ya que los oligonucleótidos antisentido son básicos, forman sales farmacéuticamente aceptables con ácidos orgánicos e inorgánicos. Ejemplos de ácidos adecuados para dicha formación de sales de adición de ácido son ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido acético, ácido cítrico, ácido oxálico, ácido malónico, ácido salicílico, ácido p-aminosalicílico, ácido málico, ácido fumárico, ácido cúbico, ácido ascórbico, ácido maleico, ácido sulfónico, ácido fosfónico, ácido perclórico, ácido nítrico, ácido fórmico, ácido propiónico, ácido glucónico, ácido láctico, ácido tartárico, ácido hidroximaleico, ácido pirúvico, ácido fenilacético, ácido benzoico, ácido aminobenzoico, ácido p-hidroxibenzoico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido nitroso, ácido hidroxietanosulfónico, ácido etilensulfónico, ácido p-toluensulfónico, ácido naftilsulfónico, ácido sulfanílico, ácido canfosulfónico, ácido china, ácido mandélico, ácido O-metilmélico, hidrógeno ácido bencenosulfónico, ácido pírrico, ácido adípico, ácido D-o-toliltartárico, ácido tartrónico, ácido □-toluico, ácido (o, m, p)-tolúico, ácido naftilamina sulfónico y otros ácidos minerales o carboxílicos bien conocidos para los expertos en la técnica. Las sales se preparan poniendo en contacto la forma de base libre con una cantidad suficiente del ácido deseado para producir una sal de la manera convencional.

[0083] En el contexto de esta invención, "hibridación" significa hibridación de ácido nucleico, en donde un ácido nucleico monocatenario (ADN o ARN) interactúa con otro ácido nucleico monocatenario que tiene una secuencia muy similar o incluso complementaria. De este modo, la interacción tiene lugar por enlaces de hidrógeno entre nucleobases específicos (apareamiento de bases).

[0084] Como se usa en el presente documento, el término "complementariedad" (complementariedad de pares de bases de ADN y ARN) se refiere a la capacidad de emparejamiento preciso entre dos ácidos nucleicos. Los nucleótidos en un par de bases son complementarios cuando su forma les permite unirse entre sí mediante enlaces de hidrógeno. Por lo tanto, forma el par de adenina y timidina (o uracilo) dos enlaces de hidrógeno y el par de citosina-guanina forma tres enlaces de hidrógeno. "Secuencias complementarias", como se usa en este documento, significa secuencias de ADN o ARN, de modo que cuando se alinean antiparalelas entre sí, las bases de nucleótidos en cada posición en las secuencias serán complementarias, al igual que mirar en el espejo y ver lo contrario.

[0085] El término "específicamente hibridable" como se usa en este documento indica un grado suficiente de complementariedad o apareamiento de bases preciso del oligonucleótido antisentido a la secuencia diana de modo que se produzca una unión estable y específica entre el oligonucleótido antisentido y la diana de ADN o ARN. La secuencia de un oligonucleótido de acuerdo con la invención no necesita ser 100% complementaria a la de su ácido nucleico diana para ser específicamente hibridable, aunque se prefiere una complementariedad del 100%. Por lo tanto, "100% de complementariedad" significa que el oligonucleótido antisentido se hibrida con la diana en toda su longitud completa o completa sin desajuste. En otras palabras, dentro de la presente invención se define que un compuesto antisentido se puede hibridar específicamente cuando la unión del compuesto a la molécula de ADN o ARN diana tiene lugar en condiciones fisiológicas o patológicas, pero la unión no específica del oligonucleótido antisentido a las secuencias diana son altamente improbables o incluso imposibles.

[0086] Por lo tanto, la presente invención se refiere preferiblemente a oligonucleótidos antisentido, en donde los oligonucleótidos antisentido se unen con 100% de complementariedad al ARNm que codifica TGF-R_{II} y no se unen a ninguna otra región en el transcriptoma humano completo. Más preferido, la presente invención se refiere a oligonucleótidos antisentido, en los que los oligonucleótidos antisentido tienen una complementariedad del 100% sobre su longitud completa al ARNm que codifica TGF-R_{II} y no tienen efectos fuera del objetivo. Alternativamente, la presente invención se refiere preferiblemente a oligonucleótidos antisentido que tienen una complementariedad del 100% con el ARNm que codifica TGF-R_{II} pero no una complementariedad con otro ARNm del transcriptoma humano. Por lo tanto, el término "transcriptoma humano" se refiere al conjunto total de transcripciones en el organismo humano, lo que significa transcripciones de todos los tipos de células y condiciones ambientales (en cualquier momento).

Especificidad

[0087] Los oligonucleótidos antisentido de la presente invención tienen en común que son específicos con respecto a la región en la que se unen al gen o al ARNm que codifica TGF-R_{II}. De acuerdo con la presente invención, se prefiere que dentro del transcriptoma humano, los oligonucleótidos antisentido tengan una complementariedad del 100% sobre su longitud completa solo con el ARNm que codifica TGF-R_{II}. Además, un objetivo de la presente invención era encontrar oligonucleótidos antisentido sin reactividad cruzada dentro del transcriptoma de mamíferos distintos de los monos; en particular, los oligonucleótidos antisentido solo tienen reactividad cruzada con el transcriptoma de los grandes simios. Esto debería evitar los efectos secundarios. Por lo tanto, los oligonucleótidos antisentido de la presente invención son altamente específicos con respecto a la hibridación con el gen o con el ARNm que codifica TGF-R_{II}. Los oligonucleótidos antisentido de la invención se unen preferiblemente en su longitud completa con una complementariedad del 100% específica al gen que codifica TGF-R_{II} o al ARNm que codifica TGF-R_{II} y no se unen a ninguna otra región en el transcriptoma humano completo. Esto significa que los oligonucleótidos antisentido de la presente invención se hibridan con la diana (ARNm de TGF-R_{II}) sin desajuste.

[0088] El término "ARNm", como se usa en el presente documento, puede abarcar tanto el ARNm que contiene intrones (también denominados Pre-ARNm) como el ARNm que no contiene ningún intrón.

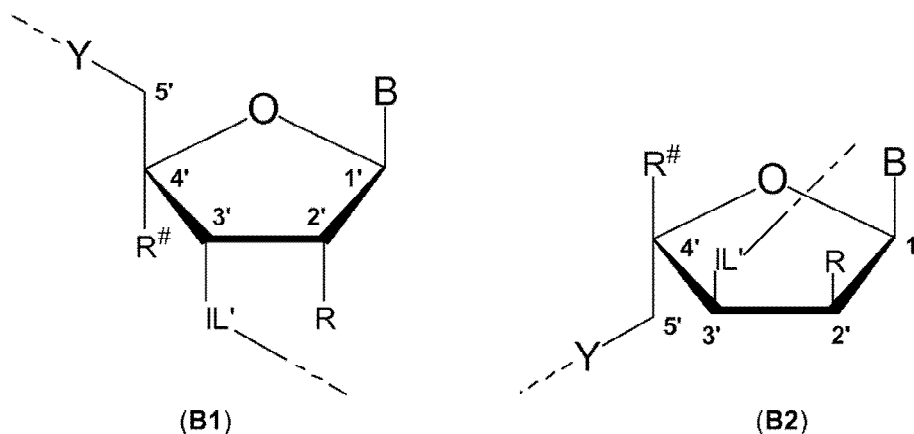
[0089] Los oligonucleótidos antisentido de la presente invención pueden unirse o hibridarse con el Pre-ARNm y/o con el ARNm. Eso significa que los oligonucleótidos antisentido pueden unirse o hibridarse en una región intrón o dentro de una región intrón del Pre-ARNm o pueden unirse o hibridarse en una región intrón-exón superpuesta del Pre-ARNm o pueden unirse o hibridarse en una región de exón o dentro de una región de exón del Pre-ARNm y la región de exón del ARNm (ver Fig. 1). Se prefieren los oligonucleótidos antisentido que pueden unirse o hibridarse con Pre-ARNm y ARNm. La unión o hibridación de los oligonucleótidos antisentido (ASO) al Pre-ARNm inhibe la formación del tapa 5', inhibe el empalme del Pre-ARNm para obtener el ARNm y activa la ARNasa H que escinde el Pre-ARNm. La unión o hibridación de los oligonucleótidos antisentido (ASO) al ARNm activa la ARNasa H, que corta el ARNm e inhibe la unión de las subunidades ribosómicas.

[0090] Los oligonucleótidos antisentido de la presente invención consisten en al menos 10 y no más de 28, preferiblemente no más de 24 y más preferiblemente no más de 20 nucleótidos y consecuentemente consisten de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 nucleótidos, preferiblemente de 11 a 20, o de 11 a 19, o de 12 a 19, o de

13 a 19, o de 13 a 18 nucleótidos y más preferiblemente de 14 a 18 nucleótidos, en donde al menos dos, preferiblemente tres de estos nucleótidos son ácidos nucleicos bloqueados (LNA). También son posibles oligonucleótidos antisentido más cortos, es decir, oligonucleótidos antisentido que tienen menos de 10 nucleótidos, pero cuanto más cortos son los oligonucleótidos antisentido, mayor es el riesgo de que la hibridación ya no sea lo suficientemente fuerte y que la selectividad disminuya o se pierda. Los oligonucleótidos antisentido no selectivos corren el riesgo de unirse a regiones no deseadas en el transcriptoma humano y a los ARNm no deseados que codifican otras proteínas distintas del TGF-R_{II}, lo que provoca efectos secundarios no deseados. También son posibles oligonucleótidos antisentido más largos que tienen más de 20 nucleótidos, pero aumentar la longitud hace que la síntesis de tales oligonucleótidos antisentido sea aún más complicada y costosa sin ningún beneficio adicional para aumentar la selectividad o la fuerza de hibridación o una mejor estabilidad con respecto a la degradación.

[0091] Por lo tanto, la presente invención está dirigida a oligonucleótidos antisentido que consisten en 10 a 20 nucleótidos, en donde al menos dos nucleótidos y preferiblemente los nucleótidos terminales 3' y 5' son LNA. Por lo tanto, se prefiere que al menos el nucleótido 3' terminal sea un LNA y también que al menos el nucleótido terminal 5' sea un LNA. En el caso de que estén presentes más de 2 LNA, se prefiere que los LNA adicionales estén vinculados al LNA terminal 3' o 5', ya que es el caso en los separadores de espacios abiertos, como se describe en el presente documento.

[0092] Un bloque de construcción de nucleótidos presente en un oligonucleótido antisentido de la presente invención puede representarse por la siguiente fórmula general (B1) y (B2):



en donde

B representa una nucleobase;

IL' representa -X''-P(=X')(X-);

R representa -H, -F, -OH, -NH₂, -OCH₃, -OCH₂CH₂OCH₃ y R# representa -H; o R y R# forman juntos el puente -R#-R- que se selecciona entre -CH₂-O-, -CH₂-S-, -CH₂-NH-, -CH₂-N(CH₃)-, -CH₂-N(C₂H₅)-, -CH₂-CH₂-O-, -CH₂-CH₂-S-, -CH₂-CH₂-NH-, -CH₂-CH₂-N(CH₃)-, o -CH₂-CH₂-N(C₂H₅)-;

X' representa =O o =S;

X representa -O-, -OH, -OR^H, -NHR^H, -N(R^H)₂, -OCH₂CH₂OR^H, -OCH₂CH₂SR^H, -BH₃-, -R^H, -SH, -SR^H, o -S-;

X'' representa -O-, -NH-, -NR^H-, -CH₂-, o -S-;

Y es -O-, -NH-, -NRH-, -CH₂- o -S-;

R^H se selecciona entre hidrógeno y alquil C₁₋₄ y preferiblemente -CH₃ o -C₂H₅ y lo más preferiblemente -CH₃.

[0093] Preferiblemente X representa -O-, -OH, -OCH₃, -NH(CH₃), -N(CH₃)₂, -OCH₂CH₂OCH₃, -OCH₂CH₂SCH₃, -BH₃-, -CH₃-, -SH, -SCH₃ o S-; y más preferiblemente -O-, -OH, -OCH₃, -N(CH₃)₂, -OCH₂CH₂OCH₃, -BH₃-, -SH, -SCH₃, o -S-. IL' representa preferiblemente -O-P(O)(O)-, -O-P(O)(S)-, -O-P(S)(S)-, -S-P(O)(O)-, -S-P(O)(S)-, -S-P(S)(S)-, -O-P(O)(O)-, -O-P(O)(S)-, -S-P(O)(O)-, -O-P(O)(R^H)-, -O-P(O)(OR^H)-, -O-P(O)(NHR^H)-, -O-P(O)[N(R^H)₂]-, -O-P(O)(BH₃)-, -O-P(O)(OCH₂CH₂OR^H)-, -O-P(O)(OCH₂CH₂SR^H)-, -O-P(O)(O)-, -NR^H-P(O)(O)-, en donde R^H se selecciona entre hidrógeno y alquil C₁₋₄,

[0094] El grupo -O-P(O)(R^H)-O- es preferiblemente -O-P(O)(CH₃)-O- o -O-P(O)(C₂H₅)-O- y lo más preferiblemente -O-P(O)(CH₃)-O-.

El grupo -O-P(O)(OR^H)-O- es preferiblemente -O-P(O)(OCH₃)-O- o -O-P(O)(OC₂H₅)-O- y más preferiblemente -O-P(O)(OCH₃)-O-.

El grupo -O-P(O)(NHR^H)-O- es preferiblemente -O-P(O)(NHCH₃)-O- o -O-P(O)(NHC₂H₅)-O- y lo más preferiblemente -O-P(O)(NHCH₃)-O-.

El grupo -O-P(O)[N(R^H)₂]-O- es preferiblemente -O-P(O)[N(CH₃)₂]-O- o -O-P(O)[N(C₂H₅)₂]-O- y lo más

preferiblemente -O-P(O)[N(CH₃)₂]-O-.

El grupo -O-P(O)(OCH₂CH₂OR^H)-O- es preferiblemente -O-P(O)(OCH₂CH₂OCH₃)-O- o -O-P(O)(OCH₂CH₂OC₂H₅)-O- y lo más preferiblemente -O-P(O)(OCH₂CH₂OCH₃)-O-.

5 El grupo -O-P(O)(OCH₂CH₂SR^H)-O- es preferiblemente -O-P(O)(OCH₂CH₂SCH₃)-O- o -O-P(O)(OCH₂CH₂SC₂H₅)-O- y más preferiblemente -O-P(O)(OCH₂CH₂SCH₃)-O-.

El grupo -O-P(O)(O-)-NR^H- es preferiblemente -O-P(O)(O-)-NH- o -O-P(O)(O-)-N(CH₃)- y lo más preferiblemente -OP(O)(O-)-NH-.

10 El grupo -NRH-P(O)(O-)-O- es preferiblemente -NH-P(O)(O-)-O- o -N(CH₃)-P(O)(O-)-O- y lo más preferiblemente -NH-P(O)(O-)-O-.

15 **[0095]** Incluso más preferiblemente, IL' representa -O-P(O)(O⁻)-, -O-P(O)(S⁻)-, -O-P(S)(S⁻)-, -O-P(O)(NHR^H)-, o -O-P(O)[N(R^H)₂]-, y aún más preferiblemente IL' representa -O-P(O)(O⁻)-, -O-P(O)(S⁻)-, o -OP(S)(S⁻)-, y más preferiblemente IL' representa -O-P(O)(S⁻)-, o -O-P(S)(S⁻)-.

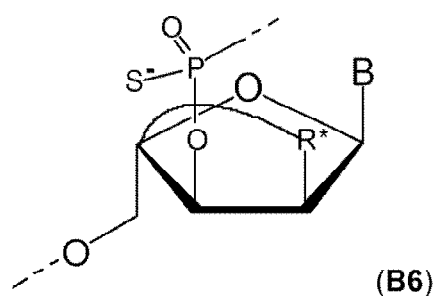
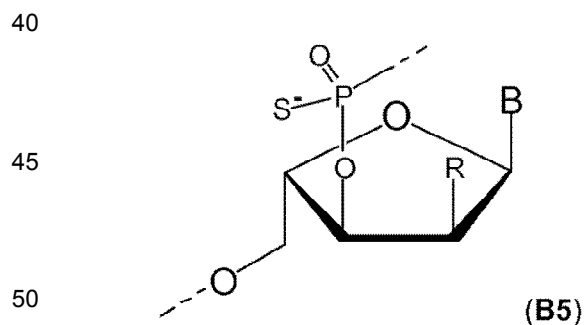
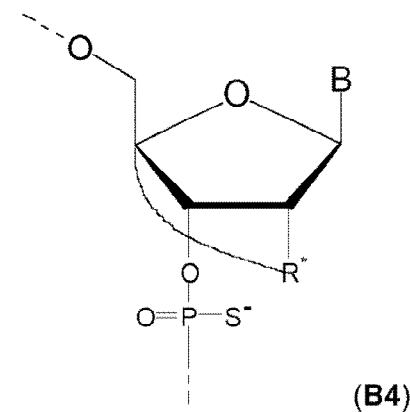
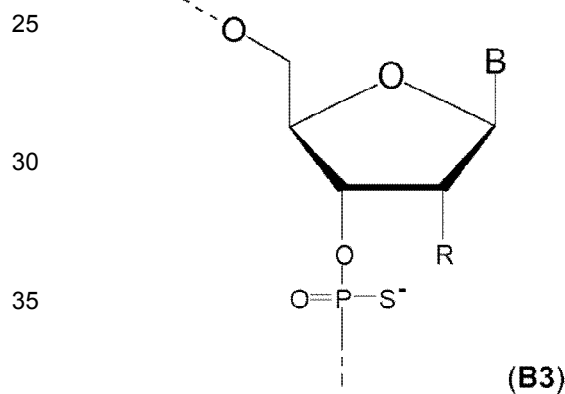
15 **[0096]** Preferentemente, Y representa -O-.

Preferiblemente, B representa una nucleobase estándar seleccionada de A, T, G, C, U.

Preferiblemente, IL representa -OP(=O)(S⁻)- o -OP(=S)(S⁻)-.

20 **[0097]** Las definiciones anteriores de B, Y e IL' se aplican también a la fórmula b¹ a b⁹.

20 **[0098]** Por lo tanto, se prefieren las siguientes fórmulas generales (B3) a (B⁶):

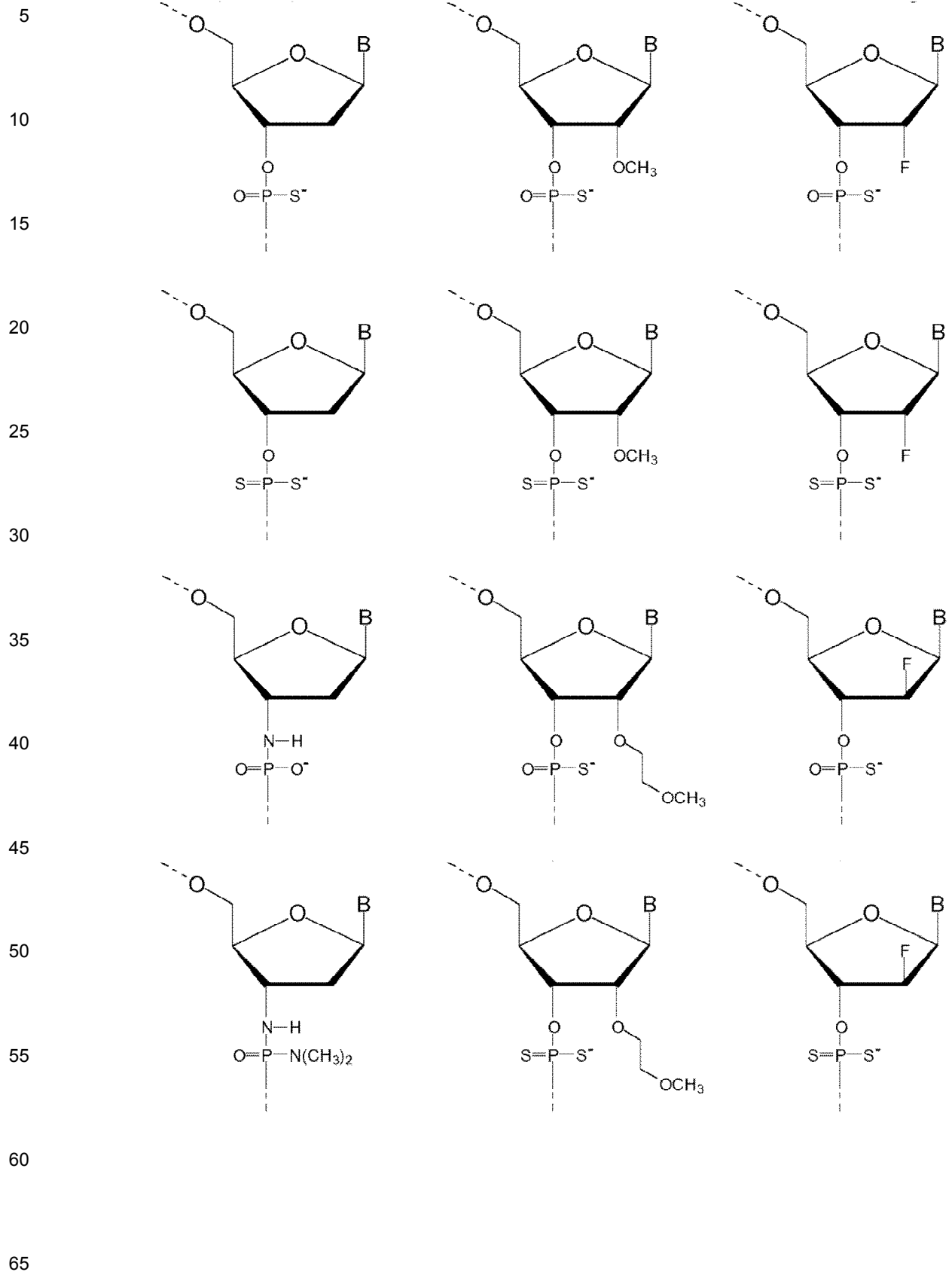


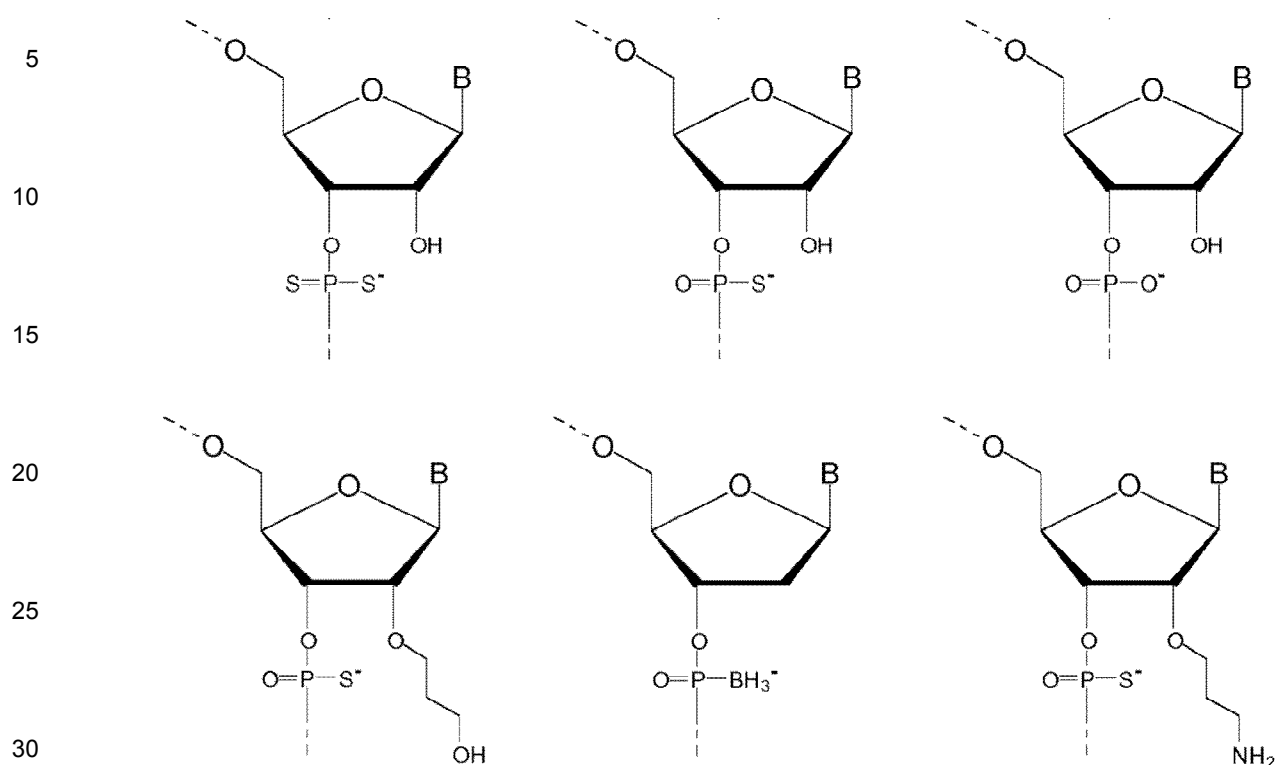
en donde

55 B representa una nucleobase y preferiblemente A, T, G, C, U;
R representa -H, -F, -OH, -NH₂, -N(CH₃)₂, -OCH₃, -OCH₂CH₂OCH₃, -OCH₂CH₂CH₂OH, -OCH₂CH₂CH₂NH₂ y preferiblemente -H;

60 R* representa el resto -R[#]-R- como se define a continuación y, por ejemplo, se selecciona preferiblemente de -C(R^aR^b)-O-, -C(R^aR^b)-NR^c-, -C(R^aR^b)-S-, y -C(R^aR^b)-C(R^aR^b)-O-, en donde los sustituyentes R^a, R^b y R^c tienen los significados que se definen aquí. Más preferiblemente, R* se selecciona de -CH₂-O-, -CH₂-S-, -CH₂-NH-, -CH₂-N(CH₃)-, -CH₂-CH₂-O-, o -CH₂-CH₂-S-, y más preferiblemente -CH₂-O-, -CH₂-S-, -CH₂-CH₂-O-, o -CH₂-CH₂-S-, y aún más preferiblemente -CH₂-O-, -CH₂-S-, o -CH₂-CH₂-O-, y aún más preferiblemente -CH₂-O- o -CH₂-S-, y lo más preferiblemente -CH₂-O-.

65 **[0099]** Los ejemplos de nucleótidos preferidos que son unidades no de LNA son los siguientes:





Enlaces Internucleotídicos (IL)

[0100] Los monómeros de los oligonucleótidos antisentido descritos en el presente documento se acoplan entre sí mediante un enlace internucleotídico. Adecuadamente, cada monómero está unido al monómero adyacente 3' a través de un enlace internucleotídico. El experto en la materia entenderá que, en el contexto de la presente invención, el monómero 5' al final de un oligómero no comprende un enlace internucleotídico 5', aunque puede comprender o no un grupo terminal 5'. El término "enlace internucleotídico" pretende significar un grupo capaz de acoplar covalentemente dos nucleótidos, dos análogos de nucleótidos como dos LNA, y un nucleótido y un análogo de nucleótido como un LNA. Los ejemplos específicos y preferidos incluyen grupos fosfato y grupos fosforotioato.

Los nucleótidos de los oligonucleótidos antisentido de la presente invención o las secuencias de nucleótidos contiguas de los mismos se acoplan entre sí mediante enlaces internucleotídicos. Adecuadamente, cada nucleótido está unido a través de la posición 5' al nucleótido adyacente 3' a través de un enlace internucleotídico.

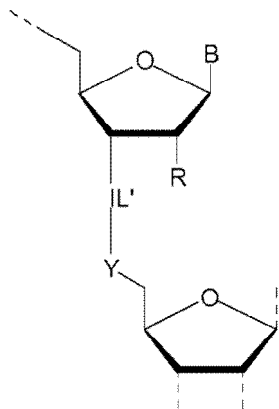
Los oligonucleótidos antisentido pueden modificarse de varias maneras diferentes. Las modificaciones dentro del esqueleto son posibles y se refieren a oligonucleótidos antisentido en los que los grupos fosfato (también denominados grupos fosfodiéster) en su esqueleto internucleotídico están parcialmente o completamente reemplazados por otros grupos. Los esqueletos de oligonucleótido antisentido modificados preferidos incluyen, por ejemplo, fosforotioatos, fosforotioatos quirales, fosforoditioatos, fosfortriéster, aminoalquilfosfortriésteres, metil, etil y fosfonatos de alquil C₃-C₁₀, incluyendo fosfonatos de 3'-alquileo y fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidatos incluyendo fosforamidato 3'-amino y aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionalquilfosfonatos, tionalquilfosfortriésteres y boranofosfatos que tienen enlaces 3'-5' normales, análogos enlazados 2'-5' de los mismos, y aquellos que tienen polaridad invertida, en los que los pares adyacentes de unidades de nucleótidos son 3'-5' a 5'-3' o 2'-5' a 5'-2' enlazados. Varias sales, sales mixtas y formas de ácidos libres de los mismos también se incluyen y describen en este documento con más detalle.

Los enlaces internucleotídicos adecuados incluyen los enumerados en el documento WO2007/031091, por ejemplo, los enlaces internucleotídicos listados en el primer párrafo de la página 34 del documento WO2007/031091. En algunas realizaciones, es preferible modificar el enlace nucleotídico de su fosfodiéster normal a uno que sea más resistente al ataque de las nucleasas, como el fosforotato o boranofosfato; estos dos, aceptados por la escisión mediada por la RNasa H, también permiten que la vía de inhibición antisentido para reducir la expresión del gen diana.

[0101] El enlace internucleotídico consiste en el grupo IL' que es el grupo unido al átomo de carbono 3' del resto ribosa y el grupo Y que es el grupo unido al átomo de carbono 5' del resto ribosa contiguo como se muestra en la fórmula (IL'Y) a continuación

65

5
10
15



20

[0102] El enlace internucleotídico IL está representado por -L'-Y-. IL' representa -X"-P(=X')(X-)- de manera que IL se representa por -X"-P(=X')(X-)-Y- en donde los sustituyentes X-, X', X" e Y tienen los significados que se describen en este documento.

25

[0103] El enlace internucleotídico IL = -X"-P(=X')(X-)-Y- se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en: -O-P(O)(O)-O-, -OP(O)(S-)-O-, -O-P(S)(S-)-O-, -S-P(O)(O)-O-, -S-P(O)(S-)-O-, -S-P(S)(S-)-O- -O-P(O)(O-)-S-, -O-P(O)(S-)-S-, -S-P(O)(O-)-S-, -O-P(O)(RH)-O-, -O-P(O)(OR^H)-O-, -O-P(O)(NHR^H)-O-, -O-P(O)[N(R^H)₂]-O- -O-P(O)(BH₃-)-O-, -O-P(O)(OCH₂CH₂ORH)-O-, -O-P(O)(OCH₂CH₂SR^H)-O- -O-P(O)(O-)-NR^H-NR^H-P(O)(O)-O-, donde R^H se selecciona entre hidrógeno y alquil C₁₋₄,

30

[0104] El grupo -O-P(O)(R^H)-O- es preferiblemente -O-P(O)(CH₃)-O- o -O-P(O)(C₂H₅)-O- y lo más preferiblemente -O-P(O)(CH₃)-O-.

El grupo -O-P(O)(OR^H)-O- es preferiblemente -O-P(O)(OCH₃)-O- o -O-P(O)(OC₂H₅)-O- y más preferiblemente -O-P(O)(OCH₃)-O-.

El grupo -O-P(O)(NHR^H)-O- es preferiblemente -O-P(O)(NHCH₃)-O o -O-P(O)(NHC₂H₅)-O- y lo más preferiblemente -O-P(O)(NHCH₃)-O-.

35

El grupo -O-P(O)[N(R^H)₂]-O- es preferiblemente -O-P(O)[N(CH₃)₂]-O o -O-P(O)[N(C₂H₅)₂]-O- y lo más preferiblemente -O-P(O)[N(CH₃)₂]-O-.

El grupo -O-P(O)(OCH₂CH₂OR^H)-O- es preferiblemente -O-P(O)(OCH₂CH₂OCH₃)-O- o -O-P(O)(OCH₂CH₂OC₂H₅)-O- y lo más preferiblemente -O-P(O)(OCH₂CH₂OCH₃)-O-.

40

[0105] El grupo -O-P(O)(OCH₂CH₂SR^H)-O- es preferiblemente -O-P(O)(OCH₂CH₂SCH₃)-O- o -O-P(O)(OCH₂CH₂SC₂H₅)-O- y más preferiblemente -OP(O)(OCH₂CH₂SCH₃)-O-.

El grupo -O-P(O)(O-)-NR^H- es preferiblemente -O-P(O)(O-)-NH- o -O-P(O)(O-)-N(CH₃)- y lo más preferiblemente -OP(O)(O-)-NH-.

45

El grupo -NR^H-P(O)(O-)-O- es preferiblemente -NH-P(O)(O-)-O- o -N(CH₃)-P(O)(O-)-O- y lo más preferiblemente -NH-P(O)(O-)-O-.

50

[0106] Incluso más preferiblemente, IL representa -O-P(O)(O-)-O-, -O-P(O)(S-)-O-, -O-P(S)(S-)-O-, -OP(O)(NHR^H)-O-, o -O-P(O)[N(R^H)₂]-O-, y aún más preferiblemente IL representa -O-P(O)(O-)-O-, -O-P(O)(S-)-O-, o -O-P(S)(S-)-O-, y lo más preferiblemente IL representa -O-P(O)(S-)-O-, o -O-P(O)(O-)-O-.

55

[0107] Por tanto, IL es preferiblemente un grupo fosfato (-O-P(O)(O-)-O-), un grupo fosforotioato (-O-P(O)(S-)-O-) o un grupo fosforoditioato (-OP(S)(S-)-O-).

60

[0108] Las unidades de nucleótidos o los nucleósidos de los oligonucleótidos antisentido están conectados entre sí mediante enlaces internucleotídicos, de modo que dentro de un oligonucleótido antisentido pueden estar presentes diferentes enlaces internucleotídicos. Las unidades de LNA están unidas preferiblemente por enlaces internucleotídicos que no son grupos fosfato. Las unidades de LNA están unidas entre sí por un grupo IL que se selecciona preferiblemente de -O-P(O)(S-)-O-, -O-P(S)(S-)-O-, -O-P(O)(NHR^H)-O-, y -O-P(O)[N(R^H)₂]-O y más preferiblemente de -O-P(O)(S-)-O- y -O-P(S)(S-)-O-.

65

[0109] Las unidades no de LNA están unidas entre sí por un grupo IL que se selecciona preferiblemente entre -O-P(O)(O-)-O-, -O-P(O)(S-)-O-, -O-P(S)(S-)-O-, -O-P(O)(NHR^H)-O-, y -O-P(O)[N(R^H)₂]-O- y más preferiblemente de -O-P(O)(O-)-O-, -O-P(O)(S-)-O- y -O-P(S)(S-)-O-.

70

[0110] Una unidad no LNA está unida a una unidad LNA por un grupo IL que se selecciona preferiblemente de -O-P(O)(S-)-O-, -OP(s)(S-)-O-, -O-P(O)(NHR^H)-O-, y -O-P(O)[N(R^H)₂]-O- y más preferiblemente de -O-P(O)(S-)-O- y -O-

P(S)(S)-O-

[0111] El término "unidad LNA" como se usa en este documento se refiere a un nucleótido que está bloqueado, es decir, a un nucleótido que tiene una estructura bicíclica y especialmente una estructura de ribosa bicíclica y más especialmente una estructura de ribosa bicíclica como se muestra en la fórmula general (II). El puente "bloquea" la ribosa en la conformación 3'-endo (Norte). El resto ribosa de un nucleótido LNA se modifica con un puente adicional que conecta el oxígeno 2' y el carbono 4'. Los términos alternativamente utilizados para LNA son nucleótidos bicíclicos o nucleótidos puenteados, por lo tanto, un término alternativo para la unidad de LNA es la unidad de nucleótido bicíclico o unidad de nucleótido puenteada.

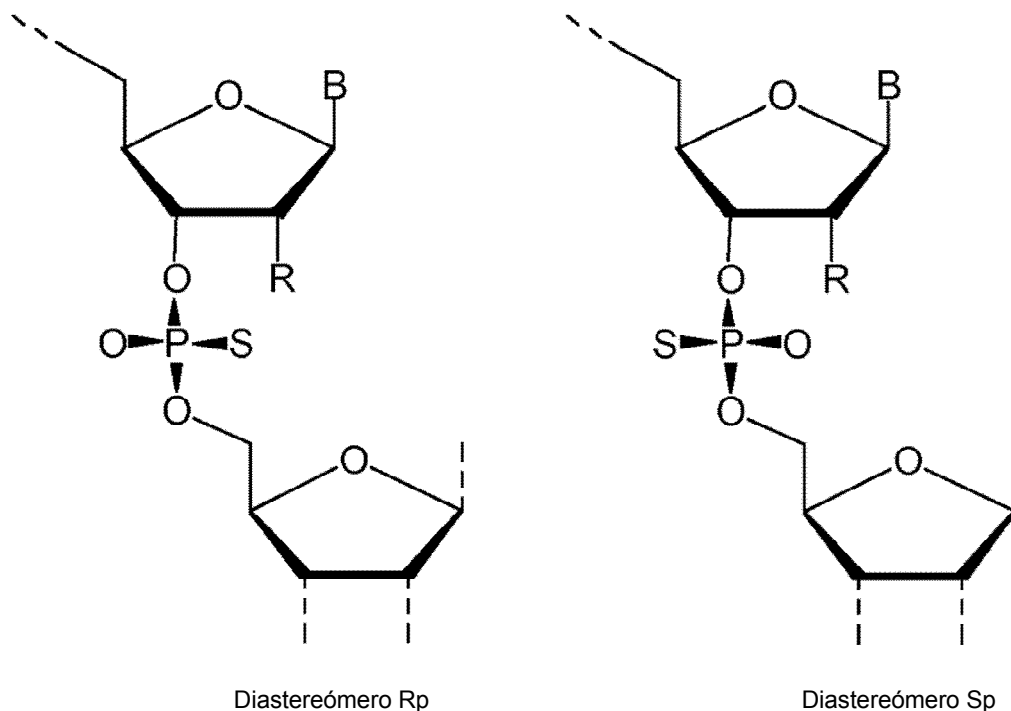
[0112] El término "unidad no LNA", como se usa en este documento, se refiere a un nucleótido que no está bloqueado, es decir, a un nucleótido que no tiene un resto de azúcar bicíclico y especialmente no tiene estructura de ribosa bicíclica y más especialmente no tiene estructura de ribosa bicíclica como se muestra en general fórmula (II). Las unidades no de LNA son más preferiblemente unidades de ADN.

[0113] El término "unidad de ADN", como se usa en el presente documento, se refiere a un nucleótido que contiene una 2-desoxirribosa como azúcar. Por lo tanto, el nucleótido está hecho de una nucleobase y una 2-desoxirribosa.

[0114] El término "unidad" como se usa en el presente documento se refiere a una parte o un fragmento o un resto de un oligonucleótido antisentido de la presente invención. Por lo tanto, una "unidad" no es una molécula completa, es una parte o un fragmento o un resto de un oligonucleótido antisentido que tiene al menos una posición para un enlace covalente a otra parte o fragmento o resto del oligonucleótido antisentido. Por ejemplo, las estructuras generales (B1) a (B6) son unidades, ya que pueden unirse covalentemente a través del grupo Y e IL' o -O- y -O-P(O)(S)- respectivamente. Preferiblemente, una unidad es un resto que consiste en una estructura de pentosa, una nucleobase conectada a la estructura de pentosa, un grupo radical 5' y un grupo radical IL'.

[0115] El término "bloque de construcción" o "monómero" como se usa en el presente documento se refiere a una molécula y especialmente a un nucleósido que se usa en la síntesis de un oligonucleótido antisentido de la presente invención. Ejemplos son las moléculas de LNA de fórmula general (I), en donde Y representa un grupo 5'-terminal e IL' representa un grupo 3'-terminal.

[0116] Además, se prefieren oligonucleótidos antisentido diastereoméricos puros. Los preferidos son los dímeros Sp y Rp como se muestra en el lado derecho de la mano:



[0117] Se prefieren los enlaces internucleotídicos adecuados que contienen azufre(s) como se proporcionan en el presente documento.

[0118] Se prefieren los restos de fosforotioato en el esqueleto donde al menos el 50% de los enlaces internucleotídicos son grupos fosforotioato. También se prefiere que las unidades de LNA, si están presentes, estén unidas a través de fosforotioatos como enlaces internucleotídicos. El más preferido es un esqueleto de fosforotioato completo, es decir, el más preferido es cuando todas las unidades de nucleótidos y también las unidades de LNA (si están presentes) se unen entre sí mediante grupos de fosforotioato que se definen del siguiente modo: -O-P(O)(S)-O- que es sinónimo de -OP(O,S)-O- o -OP(O⁻)(s)-O-.

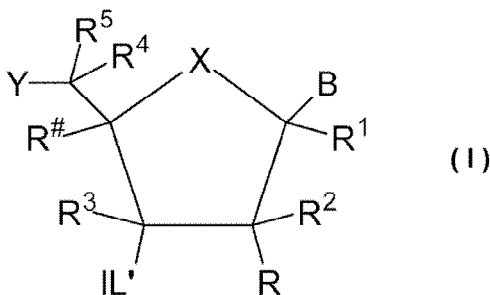
[0119] En el caso de que el oligonucleótido antisentido sea un **gápmero**, se prefiere que las regiones LNA tengan enlaces internucleotídicos seleccionados entre -O-P(O)(S)-O- y -O-P(S)(S)-O- y que la región no LNA, la parte media, tiene enlaces internucleotídicos seleccionados entre -O-P(O)(O⁻)-O-, -O-P(O)(S)-O- y -O-P(S)(S)-O- y que las regiones LNA están conectadas a la región no LNA a través de enlaces internucleotídicos seleccionados de -O-P(O)(O⁻)-O-, -O-P(O)(S)-O- y -O-P(S)(S)-O-.

[0120] Es aún más preferido si todos los enlaces internucleotídicos que son 9 en un 10-mer y 19 en un 20-mer se seleccionan entre -O-P(O)(S)-O- y -O-P(S)(S)-O-. Aún más preferido es que todos los enlaces internucleotídicos sean grupos fosforotioato (-O-P(O)(S)-O-) o sean grupos fosforoditioato (-OP(S)(S)-O-).

Ácidos nucleicos bloqueados (LNA®)

[0121] Se prefiere especialmente que algunos de los nucleótidos de la fórmula general (B1) o (B2) en el sentido los oligonucleótidos son reemplazados por los llamados LNA (ácidos nucleicos bloqueados). La abreviatura LNA es una marca registrada, pero aquí el término "LNA" se usa únicamente de manera descriptiva. Preferiblemente, los nucleótidos terminales se reemplazan por LNA y más preferiblemente los últimos 1 a 4 nucleótidos en el extremo 3' y/o los últimos 1 a 4 nucleótidos en el extremo 5' se reemplazan por LNA. También se prefiere tener al menos el nucleótido terminal en el extremo 3' y en el extremo 5' sustituido por un LNA cada uno.

[0122] El término "LNA", como se usa en el presente documento, se refiere a un análogo de nucleótido bicíclico, conocido como "ácido nucleico bloqueado". Puede referirse a un monómero de LNA o, cuando se usa en el contexto de un "oligonucleótido antisentido de LNA" o un "oligonucleótido antisentido que contiene LNA", LNA se refiere a un oligonucleótido que contiene uno o más análogos de nucleótidos bicíclicos. Los nucleótidos de LNA se caracterizan por la presencia de un grupo enlazador (como un puente) entre C2' y C4' del anillo de azúcar ribosa, por ejemplo, como se muestra como R[#] - R biradical como se describe a continuación. El LNA utilizado en los oligonucleótidos antisentido de la presente invención tiene preferiblemente la estructura de la fórmula general (I)



en donde para todos los centros quirales, los grupos asimétricos se pueden encontrar en orientación R o S;

en donde X se selecciona de -O-, -S-, -N(R^N)-, -C(R₆R₇)-, y preferiblemente X es -O-;

B se selecciona de hidrógeno, alcoxi C₁₋₄ opcionalmente sustituido, alquil C₁₋₄ opcionalmente sustituido, aciloxi C₁₋₄ opcionalmente sustituido, nucleobases y análogos de nucleobases, y preferiblemente B es una nucleobase o un análogo de nucleobase y el más preferido una nucleobase estándar;

Y representa una parte de un enlace internucleotídico a un nucleótido adyacente en caso de que el resto de fórmula general (I) sea una unidad LNA de un oligonucleótido antisentido de la presente invención, o un **grupo 5'-terminal** en caso de que el resto de fórmula general (I) es un monómero o bloque de construcción para sintetizar un oligonucleótido antisentido de la presente invención. El átomo de carbono 5' incluye opcionalmente el sustituyente R⁴ y R⁵;

IL' representa una parte de un enlace internucleotídico a un nucleótido adyacente en caso de que el resto de fórmula general (I) sea una unidad LNA de un oligonucleótido antisentido de la presente invención, o un grupo 3'-terminal en el caso de que el resto sea de tipo general la fórmula (I) es un monómero o bloque de construcción para sintetizar un oligonucleótido antisentido de la presente invención.

R[#] y R juntos representan un grupo enlazador bivalente que consta de 1 a 4 grupos o átomos seleccionados de -C(R^aR^b)-, -C(R^a)=C(R^b)-, -C(R^a)=N-, -O-, -Si(R^a)₂-, -S-, -SO₂-, -N(R^c)-, y >C=Z, donde Z se selecciona entre -O-, -S- y -N(R^a)-, y R^a, R^b y R^c se seleccionan independientemente entre hidrógeno, alquil C₁₋₁₂ opcionalmente sustituido, alqueno C₂₋₆ opcionalmente sustituido, alquino C₂₋₆ opcionalmente sustituido, hidroxil, alcoxi C₁₋₁₂

opcionalmente sustituido, alcoxi alquil C₁₋₆ C₁₋₆, alquenioloxi C₂₋₆, carboxi, alcoxicarbonil C₁₋₁₂, alquilcarbonil C₁₋₁₂, formilo, aril, arilxi-carbonil, arilxi, arilcarbonil, heteroaril, heteroarilxi-carbonil, heteroarilxi, heteroarilcarbonil, amino, mono- y di(alquil C₁₋₆)amino, carbamoilo, mono- y di(alquil C₁₋₆)amino-carbonil, amino-alquilenil C₁₋₆-aminocarbonil, mono- y di(alquil C₁₋₆)amino-C₁-alquilenil-aminocarbonil, alquil C₁₋₆-carbonilamino, carbamido, alcanoiloxi C₁₋₆, sulfono, alquilsulfoniloxi C₁₋₆, nitro, azido, sulfanilo, alquiltio C₁₋₆, halógeno, donde aril y heteroaril pueden estar opcionalmente sustituidos y donde dos sustituyentes geminales R^a y R^b juntos pueden representar metileno opcionalmente sustituido (=CH₂), en donde para todos los centros quirales, los grupos asimétricos se pueden encontrar en la orientación R o S, y;

cada uno de los sustituyentes R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶ y R⁷, que están presentes, se selecciona independientemente de hidrógeno, alquil C₁₋₁₂ opcionalmente sustituido, alqueniolo C₂₋₆ opcionalmente sustituido, alquinilo C₂₋₆ opcionalmente sustituido, hidroxilo, alcoxi C₁₋₁₂, alcoxi alquil C₁₋₆ C₁₋₆, alquenioloxi C₂₋₆, carboxi, alcoxicarbonil C₁₋₁₂, alquilcarbonil C₁₋₁₂, formilo, aril, arilxi-carbonil, arilxi, arilcarbonil, heteroaril, heteroarilxicarbonil, heteroarilxi, heteroarilcarbonil, amino, mono- y di(alquil C₁₋₆)amino, carbamoilo, mono y di(alquil C₁₋₆)amino-carbonil, amino-C₁₋₆-alquil-aminocarbonil, mono- y di(alquil C₁₋₆)amino-alquil-C₁₋₆-aminocarbonil, alquil-C₁₋₆-carbonilamino, carbamido, alquilano alquil C₁₋₆Xi, sulfono, C₁₋₆-alquilsulfoniloxi, nitro, azido, sulfanilo, alquiltio C₁₋₆, halógeno, donde aril y heteroaril pueden estar opcionalmente sustituidos, y donde dos sustituyentes geminales juntos pueden designar oxo, tioxo, imino, o metileno opcionalmente sustituido; en donde R^N se selecciona entre hidrógeno y alquil C₁₋₄, y donde dos sustituyentes adyacentes (no geminales) pueden designar un enlace adicional que resulta en un doble enlace; y R^N, cuando está presente y no está involucrado en un tratamiento birradical, se selecciona entre hidrógeno y alquil C₁₋₄; y sales básicas y sales de adición de ácido de los mismos. Para todos los centros quirales, los grupos asimétricos se pueden encontrar en orientación R o S.

[0123] En realizaciones preferidas, R[#] y R juntos representan un birradical que consiste en grupos seleccionados del grupo que consiste en -C(R^aR^b)-C(R^aR^b)-, -C(R^aR^b)-O-, -C(R^aR^b)-NR^c-, -C(R^aR^b)-S-, y -C(R^aR^b)-C(R^aR^b)-O-, en donde cada R^a, R^b y R^c pueden seleccionarse opcionalmente independientemente.

En algunas realizaciones, R^a y R^b pueden seleccionarse opcionalmente independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y alquil C₁₋₆, tal como metilo, y el preferido es hidrógeno.

En realizaciones preferidas, R¹, R², R³, R⁴ y R⁵ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, alquil C₁₋₆, alquil C₁₋₆ sustituido, alqueniolo C₂₋₆, alqueniolo C₂₋₆ sustituido, alquinilo C₂₋₆ o alquinilo C₂₋₆ sustituido, alcoxi C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆ sustituido, acilo, acilo sustituido, aminoalquil C₁₋₆ o aminoalquil C₁₋₆ sustituido. Para todos los centros quirales, los grupos asimétricos se pueden encontrar en orientación R o S.

En realizaciones preferidas, R¹, R², R³, R⁴ y R⁵ son hidrógeno.

En algunas realizaciones, R¹, R² y R³ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, alquil C₁₋₆, alquil C₁₋₆ sustituido, alqueniolo C₂₋₆, alqueniolo C₂₋₆ sustituido, alquinilo C₂₋₆ o alquinilo C₂₋₆ sustituido, alcoxi C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆ sustituido, acilo, acilo sustituido, aminoalquil C₁₋₆ o aminoalquil C₁₋₆ sustituido. Para todos los centros quirales, los grupos asimétricos se pueden encontrar en orientación R o S. En realizaciones preferidas, R¹, R² y R³ son hidrógeno.

En realizaciones preferidas, R⁴ y R⁵ se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en -H, -CH₃, -CH₂-CH₃, -CH₂-O-CH₃ y -CH=CH₂. Adecuadamente en algunas realizaciones, R⁴ o R⁵ son hidrógeno, mientras que el otro grupo (R⁴ o R⁵ respectivamente) se selecciona del grupo que consiste en alquil C₁₋₆, alqueniolo C₂₋₆, alquinilo C₂₋₆, alquil C₁₋₆ sustituido, alquil C₁₋₆, alqueniolo C₂₋₆ sustituido, alquinilo C₂₋₆ sustituido o acilo sustituido (-C(=O)-); en donde cada grupo sustituido es mono o poli sustituido con grupos sustituyentes seleccionados independientemente de halógeno, alquil C₁₋₆, alquil C₁₋₆ sustituido, alqueniolo C₂₋₆, alqueniolo C₂₋₆ sustituido, alquinilo C₂₋₆, alquinilo C₂₋₆ sustituido, -OJ₁, -SJ₁, -NJ₁J₂, -N₃, -COOJ₁, -CN, -O-C(=O)NJ₁J₂, -N(H)C(=NH)NJ₁J₂ o -N(H)C(=X)N(H)J₂, en donde X es O o S; y cada J₁ y J₂ es, independientemente -H, alquil C₁₋₆, alquil C₁₋₆ sustituido, alqueniolo C₂₋₆, alqueniolo C₂₋₆ sustituido, alquinilo C₂₋₆, alquinilo C₂₋₆ sustituido, aminoalquil C₁₋₆, aminoalquil C₁₋₆ sustituido o un grupo protector. En algunas realizaciones, R⁴ o R⁵ es alquil C₁₋₆ sustituido. En algunas realizaciones, R⁴ o R⁵ es metileno sustituido, en donde los grupos sustituyentes preferidos incluyen uno o más grupos seleccionados independientemente de -F, -NJ₁J₂, -N₃, -CN, -OJ₁, -SJ₁, -OC(=O)NJ₁J₂, -N(H)C(=NH)NJ₁J₂ o -N(H)C(=O)N(H)J₂. En algunas realizaciones, cada J₁ y J₂ es, independientemente, -H o alquil C₁₋₆. En algunas realizaciones, R⁴ o R⁵ es metilo, etilo o metoximetilo. En algunas realizaciones, R⁴ o R⁵ es metilo. En una realización adicional, ya sea R⁴ o R⁵ es etilenilo. En algunas realizaciones, R⁴ o R⁵ es acilo sustituido. En algunas realizaciones, R⁴ o R⁵ es -OC(=O)NJ₁J₂. Para todos los centros quirales, los grupos asimétricos se pueden encontrar en orientación R o S. Dichos nucleótidos bicíclicos modificados en 5' se describen en el documento WO 2007/134181 A.

[0124] En algunas realizaciones, B es una nucleobase, que incluye análogos de nucleobase y nucleobases de origen natural, como una purina o pirimidina, o una purina sustituida o pirimidina sustituida, como una nucleobase mencionada aquí, tal como una nucleobase seleccionada del grupo compuesto de adenina, citosina, timina, adenina, uracilo y/o una nucleobase modificada o sustituida, como 5-tiazolo-uracilo, 2-tio-uracilo, 5-propinil-uracilo, 2'tio-timina, 5-metil citosina, 5-tiozolo-citosina, 5-propinil-citosina y 2,6-diaminopurina.

[0125] En realizaciones preferidas, R[#] y R juntos representan un birradical seleccionado de -C(R^aR^b)-O-, -C(R^aR^b)-C(R^cR^d)-O-, -C(R^aR^b)-C(R^cR^d)-C(R^eR^f)-O-, -C(R^aR^b)-O-C(R^dR^e)-, -C(R^aR^b)-O-C(R^dR^e)-O-, -C(R^aR^b)-C(R^dR^e)-, -C(R^aR^b)-C(R^cR^d)-C(R^eR^f)-, -C(R^a)=C(R^b)-C(R^dR^e)-, -C(R^aR^b)-N(R^c)-, -C(R^aR^b)-C(R^dR^e)-N(R^c)-, -C(R^aR^b)-N(R^c)-O-, -

C(R^aR^b)-S-, y -C(R^aR^b)-C(R^dR^e)-S-, en donde R^a, R^b, R^c, R^d, R^e, y R^f cada uno se selecciona independientemente de hidrógeno, alquil C₁₋₁₂ opcionalmente sustituido, alquenilo C₂₋₆ opcionalmente sustituido, alquinilo C₂₋₆ opcionalmente sustituido, hidroxi, alcoxi C₁₋₁₂, alcoxi alquil C₁₋₆ C₁₋₆, alquenilo C₂₋₆, carboxi, alcoxicarbonil C₁₋₁₂ alquilcarbonil C₁₋₁₂, formilo, aril, arilxi-carbonil, arilxi, arilcarbonil, heteroaril, heteroarilxi-carbonil, heteroarilxi, heterarilcarbonil, amino, mono- y di(alquil C₁₋₆)amino, carbamoilo, mono- y di(alquil C₁₋₆)-amino-carbonil, amino-alquil C₁₋₆-aminocarbonil, mono- y di(alquil C₁₋₆)amino-alquil C₁₋₆-aminocarbonil, alquil-carbonilamino C₁₋₆, carbamida, alcanoiloxi C₁₋₆, sulfono, alquilsulfoniloxi C₁₋₆, nitro, azido, sulfanilo, alquilito C₁₋₆, halógeno, donde aril y heteroaril pueden estar opcionalmente sustituidos y donde dos sustituyentes geminales R^a y R^b juntos pueden designar metileno opcionalmente sustituido (=CH₂). Para todos los centros quirales, los grupos asimétricos se pueden encontrar en orientación R o S.

[0126] En una realización adicional, R[#] y R designan juntos un grupo birradical (grupo bivalente) seleccionado entre -CH₂-O-, -CH₂-S-, -CH₂-NH-, -CH₂-N(CH₃)-, -CH₂-CH₂-O-, -CH₂-CH(CH₃)-, -CH₂-CH₂-S-, -CH₂-CH₂-NH-, -CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-O-, -CH₂-CH₂-CH(CH₃)-, -CH=CH-CH₂-, -CH₂-O-CH₂-O-, -CH₂-NH-O-, -CH₂-N(CH₃)-O-, -CH₂-O-CH₂-, -CH(CH₃)-O-, -CH(CH₂-O-CH₃)-O-, -CH₂-CH₂-, y -CH=CH-. Para todos los centros quirales, se pueden encontrar grupos asimétricos en orientación R o S.

[0127] En algunas realizaciones, R[#] y R juntos designan el -C(R^aR^b)-N(R^c)-O- biradical, en el que R^a y R^b se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, alquil C₁₋₆, alquil C₁₋₆ sustituido, alquenilo C₂₋₆, alquenilo C₂₋₆ sustituido, alquinilo C₂₋₆ o alquinilo C₂₋₆ sustituido, alcoxilo C₁₋₆, alcoxilo C₁₋₆ sustituido, acilo, acilo sustituido, aminoalquil C₁₋₆ o aminoalquil C₁₋₆ sustituido, tal como hidrógeno, y; en donde R^c se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, alquil C₁₋₆, alquil C₁₋₆ sustituido, alquenilo C₂₋₆, alquenilo C₂₋₆ sustituido, alquinilo C₂₋₆ o alquinilo C₂₋₆ sustituido, alcoxi C₁₋₆, alcoxilo C₁₋₆ sustituido, acilo, acilo sustituido, aminoalquil C₁₋₆ o aminoalquil C₁₋₆ sustituido, y preferiblemente hidrógeno.

En realizaciones preferidas, R[#] y R juntos representan -C(R^aR^b)-O-C(R^dR^e)-O- biradical, en donde R^a, R^b, R^d y R^e se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, alquil C₁₋₆, alquil C₁₋₆ sustituido, alquenilo C₂₋₆, alquenilo C₂₋₆ sustituido, alquinilo C₂₋₆ o alquinilo C₂₋₆ sustituido, alcoxilo C₁₋₆, alcoxilo C₁₋₆ sustituido, acilo, acilo sustituido, aminoalquil C₁₋₆ o aminoalquil C₁₋₆ sustituido, y preferiblemente hidrógeno.

En realizaciones preferidas, R[#] y R forman el -CH(Z)-O- biradical, en donde Z se selecciona del grupo que consiste en alquil C₁₋₆, alquenilo C₂₋₆, alquinilo C₂₋₆, alquil C₁₋₆ sustituido, alquenilo C₂₋₆ sustituido, alquinilo C₂₋₆ sustituido, acilo, acilo sustituido, amida sustituida, tiol o tio sustituido; y en donde cada uno de los grupos sustituidos es, independientemente, mono o poli sustituido con grupos sustituyentes opcionalmente protegidos independientemente seleccionados de halógeno, oxo, hidroxilo, -OJ₁, -NJ₁J₂, -SJ₁, -N₃, -OC(=X)J₁, -OC(=X)NJ₁J₂, -NJ₃C(=X)NJ₁J₂ y -CN, en donde cada J₁, J₂ y J₃ es, independientemente, -H o alquil C₁₋₆, y X es O, S o NJ₁. En realizaciones preferidas, Z es alquil C₁₋₆ o alquil C₁₋₆ sustituido. En realizaciones preferidas adicionales, Z es metilo. En realizaciones preferidas, Z es alquil C₁₋₆ sustituido. En realizaciones preferidas, dicho grupo sustituyente es alcoxi C₁₋₆. En algunas realizaciones, Z es CH₃OCH₂-. Para todos los centros quirales, los grupos asimétricos se pueden encontrar en orientación R o S. Tales nucleótidos bicíclicos se describen en el documento US 7.399.845. En realizaciones preferidas, R¹, R², R³, R⁴ y R⁵ son hidrógeno. En realizaciones preferidas, R¹, R² y R³ son hidrógeno, y uno o ambos de R⁴, R⁵ pueden ser distintos de hidrógeno como se menciona anteriormente y en el documento WO 2007/134181.

En realizaciones preferidas, R[#] y R juntos representan un biradical que comprende un grupo amino sustituido en el puente tal como el CH₂-N(R^c) biradical, en donde R^c es alquil C₁₋₁₂. En realizaciones preferidas, R[#] y R juntos representan un biradical -Cq₃q₄-NOR-, en donde q₃ y q₄ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, alquil C₁₋₆, alquil C₁₋₆ sustituido, alquenilo C₂₋₆, alquenilo C₂₋₆ sustituido, alquinilo C₂₋₆ o alquinilo C₂₋₆ sustituido, alcoxilo C₁₋₆, alcoxilo C₁₋₆ sustituido, acilo, acilo sustituido, aminoalquil C₁₋₆ o aminoalquil C₁₋₆ sustituido; en donde cada grupo sustituido es, independientemente, mono o poli sustituido con grupos sustituyentes seleccionados independientemente de halógeno, -OJ₁, -SJ₁, -NJ₁J₂, -COOJ₁, -CN, -OC(=O)NJ₁J₂, -NH-C(=NH)NJ₁J₂ o -NH-C(=X)NHJ₂, en donde X es O o S; y cada uno de J₁ y J₂ es, independientemente, -H, alquil C₁₋₆, alquenilo C₂₋₆, alquinilo C₂₋₆, aminoalquil C₁₋₆ o un grupo protector. Para todos los centros quirales, los grupos asimétricos se pueden encontrar en orientación R o S. Dichos nucleótidos bicíclicos se describen en el documento WO2008/150729. En realizaciones preferidas, R¹, R², R³, R⁴ y R⁵ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, alquil C₁₋₆, alquil C₁₋₆ sustituido, alquenilo C₂₋₆, C₂₋₆ sustituido, alquenilo, alquinilo C₂₋₆ o alquinilo C₂₋₆ sustituido, alcoxilo C₁₋₆, alcoxilo C₁₋₆ sustituido, acilo, acilo sustituido, aminoalquil C₁₋₆ o aminoalquil C₁₋₆ sustituido. En realizaciones preferidas, R¹, R², R³, R⁴ y R⁵ son hidrógeno. En realizaciones preferidas, R¹, R² y R³ son hidrógeno y uno o ambos de R⁴, R⁵ pueden ser distintos de hidrógeno como se menciona anteriormente y en el documento WO 2007/134181.

En realizaciones preferidas, R[#] y R juntos representan un grupo biradical (grupo bivalente) -C(R^aR^b)-O-, en donde R^a y R^b son cada uno independientemente halógeno, alquil C₁₋₁₂, alquil C₁₋₁₂ sustituido, C₂₋₆-alquenilo, alquenilo C₂₋₆ sustituido, alquinilo C₂₋₆, alquinilo C₂₋₆ sustituido, alcoxi C₁₋₁₂, alcoxi C₁₋₁₂ sustituido, -OJ₁, -SJ₁, -S(O)J₁, -SO₂-J₁, -NJ₁J₂, -N₃, -CN, -C(=O)OJ₁, -C(=O)NJ₁J₂, -C(=O)J₁, -OC(=O)NJ₁J₂, -NH-C(=NH)NJ₁J₂, -NH-C(=O)NJ₁J₂, o -NH-C(=S)NJ₁J₂; o R^a y R^b juntos son =C(q₃)(q₄); q₃ y q₄ son cada uno, independientemente, -H, halógeno, alquil C₁₋₁₂ o alquil C₁₋₁₂ sustituido; cada grupo sustituido es, independientemente, mono o poli sustituido con grupos sustituyentes seleccionados independientemente de halógeno, alquil C₁₋₆, alquil C₁₋₆ sustituido, alquenilo C₂₋₆, alquenilo C₂₋₆ sustituido, alquinilo C₂₋₆, alquinilo C₂₋₆ sustituido, alcoxilo C₁₋₆, alcoxilo C₁₋₆ sustituido, acilo, acilo sustituido, aminoalquil C₁₋₆ o aminoalquil C₁₋₆ sustituido, -OJ₁, -SJ₁, -NJ₁J₂, -N₃, -CN, -C(=O)OJ₁, -C(=O)NJ₁J₂, -C(=O)J₁, -OC(=O)NJ₁J₂, -NH-C(=O)NJ₁J₂, o -NH-C(=S)NJ₁J₂; cada J₁ y J₂ es independientemente, -H, alquil C₁₋₆, alquil C₁₋₆ sustituido, alquenilo C₂₋₆, alquenilo C₂₋₆ sustituido, alquinilo C₂₋₆, alquinilo C₂₋₆ sustituido, aminoalquil C₁₋₆, aminoalquil C₁₋₆ sustituido o un grupo protector.

Tales compuestos se describen en el documento WO2009006478A.

[0128] En realizaciones preferidas, R[#] y R forman el -Q- birradical, en donde Q es -C(q₁)(q₂)C(q₃)(q₄)-, -C(q₁)=C(q₃)-, -C[=C(q₁)(q₂)]-C(q₃)(q₄)- o -C(q₁)(q₂)-C[=C(q₃)(q₄)]-; q₁, q₂, q₃, q₄ son cada uno independientemente entre sí -H, halógeno, alquil C₁₋₁₂, alquil C₁₋₁₂ sustituido, alqueno C₂₋₆, alcoxi C₁₋₁₂ sustituido, -OJ₁, -SJ₁, -S(O)J₁, -SO₂-J₁, -NJ₁J₂, -N₃, -CN, -C(=O)OJ₁ -C(=O)NJ₁J₂, -C(=O)J₁, -OC(=O)NJ₁J₂, -NH-C(=NH)NJ₁J₂, -NH-C(=O)NJ₁J₂, o -NH-C(=S)NJ₁J₂; cada J₁ y J₂ es independientemente uno del otro -H, alquil C₁₋₆, alqueno C₂₋₆, alquino C₂₋₆, aminoalquil C₁₋₆ o un grupo protector; y opcionalmente cuando Q es -C(q₁)(q₂)C(q₃)(q₄)- y uno de q₃ o q₄ es -CH₃, entonces al menos uno de los otros de q₃ o q₄ o uno de q₁ y q₂ es otro que -H. En realizaciones preferidas, R¹, R², R³, R⁴ y R⁵ son hidrógeno. Para todos los centros quirales, los grupos asimétricos se pueden encontrar en orientación R o S. Dichos nucleótidos bicíclicos se describen en el documento WO2008/154401. En realizaciones preferidas, R¹, R², R³, R⁴ y R⁵ se seleccionan independientemente entre sí del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, alquil C₁₋₆, alquil C₁₋₆ sustituido, alqueno C₂₋₆, alquil alqueno C₂₋₆ sustituido, alquino C₂₋₆ o alquino C₂₋₆ sustituido, alcoxi C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆ sustituido, acilo, acilo sustituido, aminoalquil C₁₋₆ o aminoalquil C₁₋₆ sustituido. En realizaciones preferidas, R¹, R², R³, R⁴ y R⁵ son hidrógeno. En realizaciones preferidas, R¹, R² y R³ son hidrógeno y uno o ambos de R⁴, R⁵ pueden ser distintos de hidrógeno como se menciona anteriormente y en los documentos WO 2007/134181 o WO2009/067647 (análogos de ácidos nucleicos alfa-L-bicíclicos).

Como se usa en el presente documento, el término "alquil C₁₋₆" se refiere a -CH₃, -C₂H₅, -C₃H₇, -CH(CH₃)₂, -C₄H₉, -CH₂-CH(CH₃)₂, -CH(CH₃)-C₂H₅, -C(CH₃)₃, -C₅H₁₁, -CH(CH₃)-C₃H₇, -CH₂-CH(CH₃)-C₂H₅, -CH(CH₃)-CH(CH₃)₂, -C(CH₃)₂-C₂H₅, -CH₂-C(CH₃)₃, -CH(C₂H₅)₂, -C₂H₄-CH(CH₃)₂, -C₆H₁₃, -C₃H₆-CH(CH₃)₂, -C₂H₄-CH(CH₃)-C₂H₅, -CH(CH₃)-C₄H₉, -CH₂-CH(CH₃)-C₃H₇, -CH(CH₃)-CH₂-CH(CH₃)₂, -CH(CH₃)-CH(CH₃)-C₂H₅, -CH₂-CH(CH₃)-CH(CH₃)₂, -CH₂-C(CH₃)₂-C₂H₅, -C(CH₃)₂-C₃H₇, -C(CH₃)₂-CH(CH₃)₂, -C₂H₄-C(CH₃)₃, -CH₂-CH(CH₃)₂-C(CH₃)₃. El término "alquil C₁₋₆" también incluirá "cicloalquil C₁₋₆" como ciclo-C₃H₅, ciclo-C₄H₇, ciclo-C₅H₉ y ciclo-C₆H₁₁.

Se prefieren -CH₃, -C₂H₅, -C₃H₇, -CH(CH₃)₂, -C₄H₉, -CH₂-CH(CH₃)₂, -CH(CH₃)-C₂H₅, -C(CH₃)₃, y -C₅H₁₁. Especialmente preferidos son -CH₃, -C₂H₅, -C₃H₇ y -CH(CH₃)₂.

El término "alquil C₁₋₆" también incluirá "cicloalquil C₁₋₆" como ciclo-C₃H₅, ciclo-C₄H₇, ciclo-C₅H₉ y ciclo-C₆H₁₁. Como se usa en el presente documento, el término "alquil C₁₋₁₂" se refiere a alquil C₁₋₆, -C₇H₁₅, -C₈H₁₇, -C₉H₁₉, -C₁₀H₂₁, -C₁₁H₂₃, -C₁₂H₂₅. Como se usa en el presente documento, el término "alqueno C₁₋₆" se refiere a -CH₂-, -C₂H₄-, -CH(CH₃)-, -C₃H₆-, -CH₂-CH(CH₃)-, -CH(CH₃)-CH₂-, -C(CH₃)₂-, -C₄H₈-, -CH₂-C(CH₃)₂-, -C(CH₃)₂-CH₂-, -C₂H₄-CH(CH₃)-, -CH(CH₃)-C₂H₄-, -CH₂-CH(CH₃)-CH₂-, -CH(CH₃)-CH(CH₃)-, -C₅H₁₀-, -CH(CH₃)-C₃H₆-, -CH₂-CH(CH₃)-C₂H₄-, -C₂H₄-CH(CH₃)-CH₂-, -C₃H₆-CH(CH₃)-, -C₂H₄-C(CH₃)₂-, -C(CH₃)₂-C₂H₄-, -CH₂-C(CH₃)₂-CH₂-, -CH₂-CH(CH₃)-CH(CH₃)-, -CH(CH₃)-CH₂-CH(CH₃)-, -CH(CH₃)-CH(CH₃)-CH₂-, -CH(CH₃)-CH(CH₃)-CH(CH₃)-, -C(CH₃)₂-C₃H₆-, -CH₂-C(CH₃)₂-C₂H₄-, -C₂H₄-C(CH₃)₂-CH₂-, -C₃H₆-C(CH₃)₂-, -CH(CH₃)-C₄H₈-, -C₆H₁₂-, -CH₂-CH(CH₃)-C₃H₆-, -C₂H₄-CH(CH₃)-C₂H₄-, -C₃H₆-CH(CH₃)-CH₂-, -C₄H₈-CH(CH₃)-, -C₂H₄-CH(CH₃)-CH(CH₃)-, -CH₂-CH(CH₃)-CH(CH₃)-CH₂-, -CH₂-CH(CH₃)-CH₂-CH(CH₃)-, -CH(CH₃)-C₂H₄-CH(CH₃)-, -CH(CH₃)-CH₂-CH(CH₃)-CH₂-, y -CH(CH₃)-CH(CH₃)-C₂H₄-.

[0129] Como se usa en el presente documento, el término "alqueno C₂₋₆" se refiere a -CH=CH₂, -CH₂-CH=CH₂, -C(CH₃)=CH₂, -CH=CH-CH₃, -C₂H₄-CH=CH₂, -CH₂-CH=CH-CH₃, -CH=CH-C₂H₅, -CH₂-C(CH₃)=CH₂, -CH(CH₃)-CH=CH, -CH=C(CH₃)₂, -C(CH₃)=CH-CH₃, -CH=CH-CH=CH₂, -C₃H₆-CH=CH₂, -C₂H₄-CH=CH-CH₃, -CH₂-CH=CH-C₂H₅, -CH=CH-C₃H₇, -CH₂-CH=CH-CH=CH₂, -CH=CH-CH=CH-CH₃, -CH=CH-CH₂-CH=CH₂, -C(CH₃)=CH-CH=CH₂, -CH=C(CH₃)-CH=CH₂, -CH=CH-C(CH₃)=CH₂, -C₂H₄-C(CH₃)=CH₂, -CH₂-CH(CH₃)-CH=CH₂, -CH(CH₃)-CH₂-CH=CH₂, -CH₂-CH=C(CH₃)₂, -CH₂-C(CH₃)=CH-CH₃, -CH(CH₃)-CH=CH-CH₃, -CH=CH-CH(CH₃)₂, -CH=C(CH₃)-C₂H₅, -C(CH₃)=CH-C(CH₃)₂, -C(CH₃)=C(CH₃)₂, -C(CH₃)₂-CH=CH₂, -CH(CH₃)-C(CH₃)=CH₂, -C(CH₃)=CH-CH=CH₂, -CH=C(CH₃)-CH=CH₂, -CH=CH-C(CH₃)=CH₂, -C₄H₈-CH=CH₂, -C₃H₆-CH=CH-CH₃, -C₂H₄-CH=CH-C₂H₅, -CH₂-CH=CH-C₃H₇, -CH=CH-C₄H₉, -C₃H₆-C(CH₃)=CH₂, -C₂H₄-CH(CH₃)-CH=CH₂, -CH₂-CH(CH₃)-CH₂-CH=CH₂, -CH(CH₃)-C₂H₄-CH=CH₂, -C₂H₄-CH=C(CH₃)₂, -C₂H₄-C(CH₃)=CH-CH₃, -CH₂-CH(CH₃)-CH=CH-CH₃, -CH(CH₃)-CH₂-CH=CH-CH₃, -CH₂-CH=CH-CH(CH₃)₂, -CH₂-CH=C(CH₃)-C₂H₅, -CH₂-C(CH₃)=CH-C₂H₅, -CH(CH₃)-CH=CH-C₂H₅, -CH=CH-CH₂-CH(CH₃)₂, -CH=CH-CH(CH₃)-C₂H₅, -CH=C(CH₃)-C₃H₇, -C(CH₃)=CH-C₃H₇, -CH₂-CH(CH₃)-C(CH₃)=CH₂, -CH(CH₃)-CH₂-C(CH₃)=CH₂, -CH(CH₃)-CH(CH₃)-CH=CH₂, -CH₂-C(CH₃)₂-CH=CH₂, -C(CH₃)₂-CH₂-CH=CH₂, -CH₂-C(CH₃)=C(CH₃)₂, -CH(CH₃)-CH=C(CH₃)₂, -C(CH₃)₂-CH=C(CH₃)₂, -CH(CH₃)-C(CH₃)=CH-CH₃, -CH(CH₃)-C(CH₃)=CH-CH₃, -C(CH₃)=CH-CH(CH₃)₂, -C(CH₃)=C(CH₃)-C₂H₅, -CH(CH₃)-C(C₂H₅)=CH₂, -CH₂-C(C₃H₇)=CH₂, -CH₂-C(C₂H₅)=CH-CH₃, -CH(C₂H₅)-CH=CH-CH₃, -C(C₄H₉)=CH₂, -C(C₃H₇)=CH-CH₃, -C(C₂H₅)=CH-C₂H₅, -C(C₂H₅)=C(CH₃)₂, -C[C(CH₃)₃]=CH₂, -C[CH(CH₃)(C₂H₅)]=CH₂, -C[CH₂-CH(CH₃)₂]=CH₂, -C₂H₄-CH=CH-CH=CH₂, -CH₂-CH=CH-CH₂-CH=CH₂, -CH=CH-C₂H₄-CH=CH₂, -CH₂-CH=CH-CH=CH-CH₃, -CH=CH-CH₂-CH=CH-CH₃, -CH=CH-CH=CH-C₂H₅, -CH₂-CH=CH-C(CH₃)=CH₂, -CH₂-CH=C(CH₃)-CH=CH₂, -CH₂-C(CH₃)=CH-CH=CH₂, -CH(CH₃)-CH=CH-CH=CH₂, -CH=CH-CH₂-C(CH₃)=CH₂, -CH=CH-CH(CH₃)-CH=CH₂, -CH=C(CH₃)-CH₂-CH=CH₂, -C(CH₃)=CH-CH₂-CH=CH₂, -CH=CH-CH=C(CH₃)₂, -CH=CH-C(CH₃)=CH-CH₃, -CH=C(CH₃)-CH-CH=CH₂, -C(CH₃)=CH-CH-CH=CH₂, -CH=CH-CH=C(CH₃)₂, -CH=CH-C(CH₃)=CH-CH₃, -CH=C(CH₃)-CH-CH-CH₃, -C(CH₃)=CH-CH-CH=CH₂, -CH=C(CH₃)-C(CH₃)=CH₂, -C(CH₃)=C(CH₃)-CH=CH₂, y -CH=CH-CH=CH-CH=CH₂.

[0130] Se prefieren -CH=CH₂, -CH₂-CH=CH₂, -C(CH₃)=CH₂, -CH=CH-CH₃, -C₂H₄-CH=CH₂, -CH₂-CH=CH-CH₃. Especialmente preferidos son -CH=CH₂, -CH₂-CH=CH₂, y -CH=CH-CH₃.

[0131] Como se usa en el presente documento, el término "alquino C₂₋₆" se refiere a -C≡CH, -C≡C-CH₃, -CH₂-C≡CH, -C₂H₄-C≡CH, -CH₂-C≡C-CH₃, -C≡C-C₂H₅, -C₃H₆-C≡CH, -C₂H₄-C≡C-CH₃, -CH₂-C≡C₂H₅, -C≡C-C₃H₇, -CH(CH₃)-C≡CH, -CH₂-CH(CH₃)-C≡CH, -CH(CH₃)-CH₂-C≡CH, -CH(CH₃)-C≡C-CH₃, -C₄H₈-C≡CH, -C₃H₆-C≡C-CH₃, -

- $C_2H_4-C=C-C_2H_5$, $-CH_2-C=C-C_3H_7$, $-C=C-C_4H_9$, $-C_2H_4-CH(CH_3)-C=CH$, $-CH_2-CH(CH_3)-CH_2-C=CH$, $-CH(CH_3)-C_2H_4-C=CH$, $-CH_2-CH(CH_3)-C=C-CH_3$, $-CH(CH_3)-CH_2-C=C-CH_3$, $-CH(CH_3)-C=C-C_2H_5$, $-CH_2-C=C-CH(CH_3)_2$, $-C=C-CH(CH_3)-C_2H_5$, $-C=C-CH_2-CH(CH_3)_2$, $-C=C-C(CH_3)_3$, $-CH(C_2H_5)-C=C-CH_3$, $-C(CH_3)_2-C=C-CH_3$, $-CH(C_2H_5)-CH_2-C=CH$, $-CH_2-CH(C_2H_5)-C=CH$, $-C(CH_3)_2-CH_2-C=CH$, $-CH_2-C(CH_3)_2-C=CH$, $-CH(CH_3)-CH(CH_3)-C=CH$, $-CH(C_3H_7)-C=CH$, $-C(CH_3)(C_2H_5)-C=CH$, $-C=C-C=CH$, $-CH_2-C=CC=CH$, $-C=C-C=C-CH_3$, $-CH(C=CH)_2$, $-C_2H_4-C=C-C=CH$, $-CH_2-C=C-CH_2-C=CH$, $-C=C-C_2H_4-C=CH$, $-CH_2-C=C-C=C-CH_3$, $-C=C-CH_2-C=C-CH_3$, $-C=CCC-C_2H_5$, $-C=C-CH(CH_3)-C=CH$, $-CH(CH_3)-C=C-C=CH$, $-CH(C=CH)-CH_2-C=CH$, $-C(C=CH)_2-CH_3$, $-CH_2-CH(C=CH)_2$, $-CH(C=CH)-C=C-CH_3$.
 Los preferidos son $-C=CH$ y $-C=C-CH_3$.
- 10 **[0132]** El término "alcoxilo C_{1-6} " se refiere a "alquil C_1-C_6-O ".
- [0133]** El término "alcoxilo C_{1-12} " se refiere a "alquil $C_1-C_{12}-O$ ".
- 15 **[0134]** El término "aminoalquil C_{1-6} " se refiere a "alquil $H_2-C_1-C_6$ ".
- [0135]** El término "alquenilo C_2-C_6 " se refiere a "alquencil C_2-C_6-O ".
- [0136]** El término "alquilcarbonil C_{1-6} " se refiere a "alquil C_1-C_6-CO ". También se conoce como "acilo".
- 20 **[0137]** El término "alquilcarbonil C_{1-12} " se refiere a "alquil $C_1-C_{12}-CO$ ". También se conoce como "acilo".
- [0138]** El término "alcoxycarbonil C_{1-6} " se refiere a "alquil C_1-C_6-O-CO ".
- [0139]** El término "alcoxycarbonil C_{1-12} " se refiere a "alquil $C_1-C_{12}-O-CO$ ".
- 25 **[0140]** El término "alcanoilo C_1-C_6 " se refiere a "alquil C_1-C_6-CO-O ".
- [0141]** El término "alquiltio C_{1-6} " se refiere a "alquil C_1-C_6-S ".
- 30 **[0142]** El término "alquilsulfonilo C_{1-6} " se refiere a "alquil $C_1-C_6-SO_2-O$ ".
- [0143]** El término "alquilcarbonilamino C_{1-6} " se refiere a "alquil $C_1-C_6-CO-NH$ ".
- [0144]** El término "alquilamino C_{1-6} " se refiere a "alquil C_1-C_6-NH ".
- 35 **[0145]** El término " $(C_{1-6})_2$ alquilamino" se refiere a un grupo dialquilamino como "[alquil C_1-C_6][alquil C_1-C_6]N".
- [0146]** El término "alquilaminocarbonil C_{1-6} " se refiere a "alquil $C_1-C_6-NH-CO$ ".
- 40 **[0147]** El término " $(C_{1-6})_2$ alquilaminocarbonil" se refiere a un grupo dialquilaminocarbonil como "[alquil C_1-C_6][alquil C_1-C_6]N-CO".
- [0148]** El término "amino-alquilaminocarbonil C_{1-6} " se refiere a " H_2N -[alquencil C_1-C_6]-NH-CO".
- 45 **[0149]** El término "alquil C_{1-6} -amino-alquilaminocarbonil C_{1-6} " se refiere a "alquil $C_{1-6}-HN$ -[alquencil C_1-C_6]-NH-CO".
- [0150]** El término " $(C_{1-6})_2$ alquil-amino- C_{1-6} -alquilaminocarbonil" se refiere a "[alquil C_1-C_6][alquil C_1-C_6]N-[alquencil C_1-C_6]-NH-CO".
- 50 **[0151]** El término "aril" se refiere a fenil, toluil, fenil sustituido y toluil sustituido.
 El término "arilxi" se refiere a "aril-O".
 El término "arilcarbonil" se refiere a "aril-CO".
 El término "arilxycarbonil" se refiere a "aril-O-CO".
- 55 **[0152]** El término "heteroaril" se refiere a grupos heteroaromáticos sustituidos o no sustituidos que tienen de 4 a 9 átomos en el anillo, de los cuales 1 a 4 de los cuales se seleccionan de O, N y/o S. Los grupos "heteroaril" preferidos tienen 1 o 2 heteroátomos en un anillo aromático de 5 o 6 miembros. Se incluyen sistemas de anillos mono y bicíclicos. Los grupos "heteroaril" típicos son piridil, furil, tienil, pirrolil, oxazolil, tiazolil, imidazolil, isoxazolil, isotiazolil, oxadiazolil, piridazinil, pirimidil, pirazinil, 1,3,5-triazinil, 1,2,3-triazolil, 1,3,4-tiadiazolil, indolizil, indolil, isoindolil, benzo[b]furil, benzo[b]tienil, indazolil, bencimidazolil, benzotiazolil, purinil, quinolizil, quinolil, isoquinolil, quinazilil, quinoxalinil, 1,8-naftiridinil, tetrahydroquinolil, benzooxazolil, crom-2-onil, indazolil, y similares.
- 60 **[0153]** El término "heteroarilxi" se refiere a "heteroaril-O".
 El término "heteroarilcarbonil" se refiere a "heteroaril-CO".
- 65 El término "heteroarilxycarbonil" se refiere a "heteroaril-O-CO".

[0154] El término "sustituido" se refiere a grupos en los que uno o más átomos de hidrógeno están reemplazados por uno o más de los siguientes sustituyentes: -OH, -OCH₃, -OC₂H₅, -OC₃H₇, -O-ciclo-C₃H₅, -OCH(CH₃)₂, -OCH₂Ph, -F, -Cl, -COCH₃, -COC₂H₅, -COC₃H₇, -CO-ciclo-C₃H₅, -COCH(CH₃)₂, -COOH, -CONH₂, -NH₂, -NHCH₃, -NHC₂H₅, -NHC₃H₇, -NH-ciclo-C₃H₅, -NHCH(CH₃)₂, -N(CH₃)₂, -N(C₂H₅)₂, -N(C₃H₇)₂, -N(ciclo-C₃H₅)₂, -N[CH(CH₃)₂]₂, -SO₃H, -OCF₃, -OC₂F₅, ciclo-C₃H₅, -CH₃, -C₂H₅, -C₃H₇, -CH(CH₃)₂, -CH=CH₂, -CH₂-CH=CH₂, -C=CH y/o -C=C-CH₃.

[0155] En el caso de que la estructura general (I) represente monómeros o bloques de construcción para sintetizar los oligo-nucleótidos antisentido de la presente invención, los grupos terminales Y e IL' se seleccionan independientemente entre sí de hidrógeno, azido, halógeno, ciano, nitro, hidroxilo, PG-O-, AG-O-, mercapto, PG-S-, AG-S-, alquiltio C₁₋₆, amino, PG-N(RH)-, AG-N(RH)-, mono o di(alquilo C₁₋₆)amino, alcoxi C₁₋₆ opcionalmente sustituido, alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido, alqueno C₂₋₆ opcionalmente sustituido, alquenoilo C₂₋₆ opcionalmente sustituido, alquenoilo C₂₋₆ opcionalmente sustituido, alquilo C₂₋₆, alquilo C₂₋₆ opcionalmente sustituido, monofosfato, monotiofosfato, difosfato, trifosfato de ditiofosfato, tritiofosfato, carboxi, sulfono, hidroximetil, PG-O-CH₂-, AG-O-CH₂-, aminometil, PG-N(RH)-CH₂-, AG-N(R^H)-CH₂-, carboximetil, sulfonometil, donde PG es un grupo de protección para -OH, -SH y -NH(R^H), respectivamente, AG es un grupo de activación para -OH, -SH y -NH(R^H), respectivamente, y R^H se selecciona a partir de hidrógeno y alquilo C₁₋₆.

[0156] Los grupos de protección PG de los sustituyentes hidroxilo comprenden tritilo sustituido, tal como 4,4'-dimetoxitritilo (DMT), 4-monometoxitritilo (MMT), 9-(9-fenil)xantenil (pixil) opcionalmente sustituido, metoxitetrahidropirano sustituido opcionalmente (mthp), sililo como trimetilsililo (TMS), triisopropilsililo (TIPS), *tert*-butildimetilsililo (TBDMS), trietilsililo y fenildimetilsililo, *tert*-butiléteres, acetales (incluidos dos grupos hidroxilo), acil tal como acetil o acetilos sustituidos por halógeno, p. ej. cloroacetil o fluoroacetil, isobutiril, pivaloil, benzoil y benzoilos sustituidos, metoximetil (MOM), éteres de bencil o éteres de bencil sustituidos tales como 2,6-diclorobencil (2,6-Cl₂Bzl). Alternativamente, cuando Y o IL' es hidroxilo, pueden protegerse mediante la unión a un soporte sólido opcionalmente a través de un enlazador.

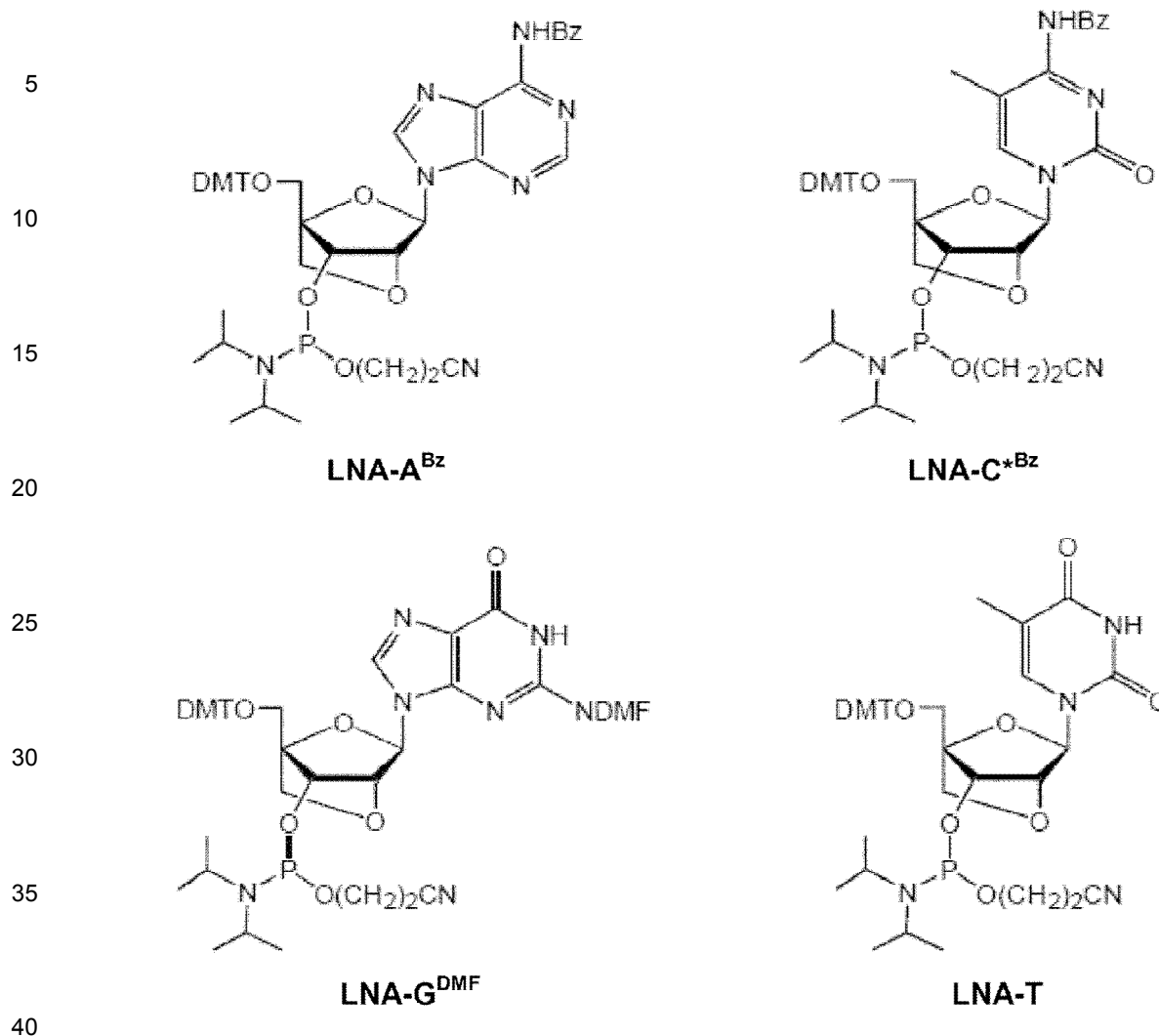
[0157] Cuando Y o IL' es un grupo amino, los ejemplos ilustrativos de los grupos de protección amino son fluorenilmetoxicarbonil (Fmoc), *tert*-butiloxicarbonil (BOC), trifluoroacetil, aliloxicarbonil (asignación o AOC), bencilxicarbonil (Z o Cbz), bencilxicarbonil sustituido tal como 2-cloro bencilxicarbonil (2-ClZ), monometoxitritil (MMT), dimetoxitritil (DMT), ftaloil, y 9-(9-fenil)xantenil (pixil).

[0158] La ley representa un grupo de activación para -OH, -SH y -NH(R^H), respectivamente. Dichos grupos de activación se seleccionan, por ejemplo, entre O-fosforamidita opcionalmente sustituida, O-fosforiltriéster opcionalmente sustituido, O-fosfordiéster opcionalmente sustituido, H-fosfonato opcionalmente sustituido y O-fosfonato opcionalmente sustituido.

[0159] En el presente contexto, el término "fosforamidita" significa un grupo de fórmula -P(OR^x)-N(R^y)₂, en donde R^x designa un grupo alquilo opcionalmente sustituido, por ejemplo, metil, 2-cianoetil o bencil y cada uno de R^y designa grupos alquilo opcionalmente sustituidos, por ejemplo, etil o isopropil, o el grupo -N(R^y)₂ forma un grupo morfolino (-N(CH₂CH₂)₂O). R^x preferiblemente designa 2-cianoetil y los dos R^y son preferiblemente idénticos y designan isopropilo. Por lo tanto, una fosforamidita especialmente relevante es N,N-diisopropil-O-(2-cianoetil)-fosforamidita.

Monómeros de LNA o bloques de construcción de LNA

[0160] Los monómeros de LNA o bloques de construcción de LNA utilizados como materiales de partida en la síntesis de oligonucleótidos antisentido de la presente invención son preferiblemente nucleósidos de LNA de las siguientes fórmulas generale:



[0161] Los bloques de construcción de LNA se proporcionan normalmente como fosoramiditas de LNA con las cuatro nucleobases diferentes: adenina (A), guanina (G), 5-metil-citosina (C*) y timina (T). Los oligonucleótidos antisentido de la presente invención que contienen unidades de LNA se sintetizan mediante química estándar de fosoramidita. En los bloques de construcción del LNA se protegen las nucleobases. Un grupo protector preferido para el grupo amino de la base de purina es un grupo benzoil (Bz), indicado como A^{Bz}. Un grupo protector preferido para el grupo amino de la base de 5-metilpirimidinona es un grupo benzoil (Bz), indicado como C^{*Bz}. Un grupo protector preferido para el grupo amino de la base de purinona es un grupo dimetilformamidina (DMF), una dietilformamidina (DEF), una dipropilformamidina (DPF), una dibutilformamidina (DBF), o un grupo iso-butiril (-CO-CH(CH₃)₂), indicado como G^{DMF}, G^{DEF}, G^{DPF}, G^{DPD}, G^{DBF} o G^{IBu}. Por lo tanto, el grupo -NDMF se refiere a -N=CH-N(CH₃)₂. DMT se refiere a 4,4'-dimetoxitritilo.

[0162] Por lo tanto, **LNA-T** se refiere a 5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-3'-O-(2-cianoetil-N,N-diisopropil)-fosoramidita-timidina LNA. **LNA-C^{*Bz}** se refiere a 5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-3'-O-(2-cianoetil-N,N-diisopropil)fosoramidita-4-N-benzoil-5-metil-2'-citidina LNA. **LNA-A^{Bz}** se refiere a 5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-3'-O-(2-cianoetil-N,N-di-isopropil)fosoramidita-6-N-benzoil-2'-adenosina LNA. **LNA-G^{DMF}** se refiere a 5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-3'-O-(2-cianoetil-N,N-di-isopropil)-fosoramidita-2-N-dimetilformamidina-2'-guanosa LNA. **LNA-G^{IBu}** se refiere a 5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-3'-O-(2-cianoetil-N,N-diisopropil)fosoramidita-2-N-butiril-2'-guanosa LNA.

60 Grupos terminales

[0163] En el caso de que Y represente el grupo 5'-terminal de un oligonucleótido antisentido de la presente invención, el residuo Y también se denomina Y^{5'} y representa: -OH, -O-C₁₋₆-alquil, -S-C₁₋₆-alquil, -O-C₆₋₉-fenil, -O-C₇₋₁₀-bencil, -NH-C₁₋₆-alquil, -N(C₁₋₆-alquil)₂, -O-C₂₋₆-alquenal, -S-C₂₋₆-alquenal, -NH-C₂₋₆-alquenal, -N(C₂₋₆-alquenal)₂, -O-C₂₋₆-alquenal, -S-C₂₋₆-alquenal, -NH-C₂₋₆-alquenal, -N(C₂₋₆-alquenal)₂, -O-C₁₋₆-alquenal-O-C₁₋₆-alquil, -O-[C₁₋₆-alquenal-O]_m-alquil C₁₋₆, -O-CO-alquil C₁₋₆, -O-CO-alquenal C₂₋₆, -O-CO-alquenal C₂₋₆, -OS(O)-alquil C₁₋₆, -O-SO₂-alquil C₁₋₆, -

O-SO₂-O-alquil C₁₋₆, -O-P(O)(O⁻)₂, -O-P(O)(O⁻)(O-alquil C₁₋₆), -O-P(O)(O-alquil C₁₋₆)₂, -O-P(O)(S⁻)₂, -O-P(O)(S-alquil C₁₋₆)₂, -O-P(O)(S⁻)(O-alquil C₁₋₆), -O-P(O)(O⁻)(NH-alquil C₁₋₆), -O-P(O)(O-C₁₋₆-alquil)(NH-alquil C₁₋₆), -O-P(O)(O⁻)[N(alquil C₁₋₆)₂], -O-P(O)(O-alquil C₁₋₆)[N(alquil C₁₋₆)₂], -O-P(O)(O⁻)(BH₃⁻), -O-P(O)(O-alquil C₁₋₆)(BH₃⁻), -O-P(O)(O⁻)(O-C₁₋₆-alquilenil-O-C₁₋₆-alquil), -O-P(O)(O-C₁₋₆-alquilenil-O-C₁₋₆-alquil)₂, -O-P(O)(O⁻)(O-C₁₋₆-alquilenil-S-alquil C₁₋₆), -O-P(O)(O-alquilenil C₁₋₆-S-alquil C₁₋₆)₂, -O-P(O)(O⁻)(OCH₂CH₂O-alquil C₁₋₆), -O-P(O)(OCH₂CH₂O-alquil C₁₋₆)₂, -O-P(O)(O⁻)(OCH₂CH₂S-alquil C₁₋₆), -O-P(O)(OCH₂CH₂S-alquil C₁₋₆)₂, -O-P(O)(O⁻)OC₃H₆OH, -O-P(O)(S⁻)OC₃H₆OH, -OP(S⁻)(S⁻)OC₃H₆OH, en donde el alquil C₁₋₆, alqueno C₂₋₆, C₂₋₆-alquiniil, -O-C₆₋₉-fenil o -O-C₇₋₁₀-bencil pueden estar además sustituidos con -F, -OH, alquil C₁₋₄, alqueno C₂₋₄ y/o alquiniil C₂₋₄ donde m se selecciona entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10,

[0164] Más preferidos son: -OCH₃, -OC₂H₅, -OC₃H₇, -O-ciclo-C₃H₅, -OCH(CH₃)₂, -OC(CH₃)₃, -OC₄H₉, -OPh, -OCH₂-Ph, -O-COCH₃, -O-COC₂H₅, -O-COC₃H₇, -O-CO-ciclo-C₃H₅, -O-COCH(CH₃)₂, -OCF₃, -O-S(O)CH₃, -O-S(O)C₂H₅, -O-S(O)C₃H₇, -O-S(O)-ciclo-C₃H₅, -O-SO₂CH₃, -O-SO₂C₂H₅, -O-SO₂C₃H₇, -O-SO₂-ciclo-C₃H₅, -O-SO₂-OCH₃, -O-SO₂-OC₂H₅, -O-SO₂-OC₃H₇, -O-SO₂-O-ciclo-C₃H₅, -O(CH₂)_nN[(CH₂)_nOH], -O(CH₂)_nN[(CH₂)_n-H], -O-P(O)(O⁻)OC₃H₆OH, -O-P(O)(S⁻)OC₃H₆OH,

aún más preferidos son: -OCH₃, -OC₂H₅, -OCH₂CH₂OCH₃ (también conocidos como MOE), -OCH₂CH₂-N(CH₃)₂ (también conocido como DMAOE), -O[(CH₂)_nO]_mCH₃, -O(CH₂)_nOCH₃, -O(CH₂)_nNH₂, -O(CH₂)_nN(CH₃)₂, -O-P(O)(O⁻)OC₃H₆OH, -O-P(O)(S⁻)OC₃H₆OH,

donde n se selecciona entre 1, 2, 3, 4, 5 o 6; y

donde m se selecciona entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10,

[0165] En el caso de que IL' represente el grupo 3'-terminal de un oligonucleótido antisentido de la presente invención, el residuo IL' también se denomina IL'^{3'} y representa: -OH, -O-alquil C₁₋₆, -S-alquil C₁₋₆, -O-C₆₋₉-fenil, -O-C₇₋₁₀-bencil, -NH-C₁₋₆-alquil, -N(C₁₋₆-alquil)₂, -O-C₂₋₆-alqueniil, -S-C₂₋₆-alqueniil, -NH-C₂₋₆-alqueniil, -N(C₂₋₆-alqueniil)₂, -O-C₂₋₆-alquiniil, -S-C₂₋₆-alquiniil, -NH-C₂₋₆-alquiniil, -N(alqueniil C₂₋₆)₂, -O-alqueniil C₁₋₆-O-alquil C₁₋₆, -O-[alqueniil C₁₋₆-O]_m-alquil C₁₋₆, -O-CO-alquil C₁₋₆, -O-CO-C₂₋₆-alqueniil, -O-CO-C₂₋₆-alquiniil, -O-S(O)-C₁₋₆-alquil, -O-SO₂-C₁₋₆-alquil, -O-SO₂-O-C₁₋₆-alquil, -O-P(O)(O⁻)₂, -O-P(O)(O⁻)(O-alquil C₁₋₆), -O-P(O)(O-alquil C₁₋₆)₂, -O-P(O)(S⁻)₂, -O-P(O)(S-C₁₋₆-alquil)₂, -O-P(O)(S⁻)(O-alquil C₁₋₆), -O-P(O)(O⁻)(NH-alquil C₁₋₆), -O-P(O)(O-alquil C₁₋₆)(NH-alquil C₁₋₆), -O-P(O)(O⁻)[N(alquil C₁₋₆)₂], -O-P(O)(O-C₁₋₆-alquil)[N(alquil C₁₋₆)₂], -O-P(O)(O⁻)(BH₃⁻), -O-P(O)(O-alquil C₁₋₆)(BH₃⁻), -O-P(O)(O⁻)(O-alqueniil C₁₋₆-O-alquil C₁₋₆), -O-P(O)(O-alqueniil C₁₋₆-O-alquil C₁₋₆)₂, -O-P(O)(O⁻)(O-C₁₋₆-alqueniil-S-alquil C₁₋₆), -O-P(O)(O-C₁₋₆-alqueniil-S-C₁₋₆-alquil)₂, -O-P(O)(O⁻)(OCH₂CH₂O-alquil C₁₋₆), -O-P(O)(OCH₂CH₂O-alquil C₁₋₆)₂, -O-P(O)(O⁻)(OCH₂CH₂S-alquil C₁₋₆), -O-P(O)(OCH₂CH₂S-alquil C₁₋₆)₂, -O-P(O)(O⁻)OC₃H₆OH, -O-P(O)(S⁻)OC₃H₆OH, en donde el alquil C₁₋₆, alqueniil C₂₋₆, alquiniil C₂₋₆, -O-C₆₋₉-fenil o -O-C₇₋₁₀-bencil puede ser sustituido adicionalmente por -F, -OH, C₁₋₄-alquil, alqueniil C₂₋₄ y/o alquiniil C₂₋₄, donde m se selecciona de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10,

Más preferidos son: -OCH₃, -OC₂H₅, -OC₃H₇, -O-ciclo-C₃H₅, -OCH(CH₃)₂, -OC(CH₃)₃, -OC₄H₉, -OPh, -OCH₂-Ph, -O-COCH₃, -O-COC₂H₅, -O-COC₃H₇, -O-CO-ciclo-C₃H₅, -O-COCH(CH₃)₂, -OCF₃, -O-S(O)CH₃, -O-S(O)C₂H₅, -O-S(O)C₃H₇, -O-S(O)-ciclo-C₃H₅, -O-SO₂CH₃, -O-SO₂C₂H₅, -O-SO₂C₃H₇, -O-SO₂-ciclo-C₃H₅, -O-SO₂-OCH₃, -O-SO₂-OC₂H₅, -O-SO₂-OC₃H₇, -O-SO₂-O-ciclo-C₃H₅, -O(CH₂)_nN[(CH₂)_nOH], -O(CH₂)_nN[(CH₂)_n-H], -O-P(O)(O⁻)OC₃H₆OH, -O-P(O)(S⁻)OC₃H₆OH,

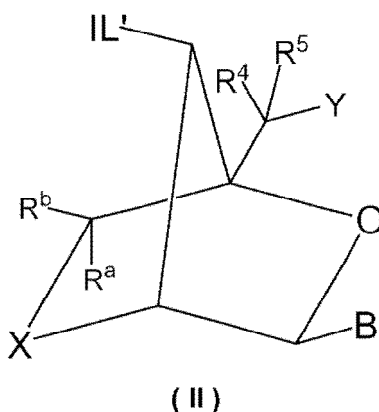
aún más preferidos son: -OCH₃, -OC₂H₅, -OCH₂CH₂OCH₃ (también conocidos como MOE), -OCH₂CH₂-N(CH₃)₂ (también conocido como DMAOE), -O[(CH₂)_nO]_mCH₃, -O(CH₂)_nOCH₃, -O(CH₂)_nNH₂, -O(CH₂)_nN(CH₃)₂, -O-P(O)(O⁻)OC₃H₆OH, -O-P(O)(S⁻)OC₃H₆OH,

donde n se selecciona entre 1, 2, 3, 4, 5 o 6; y

donde m se selecciona entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10,

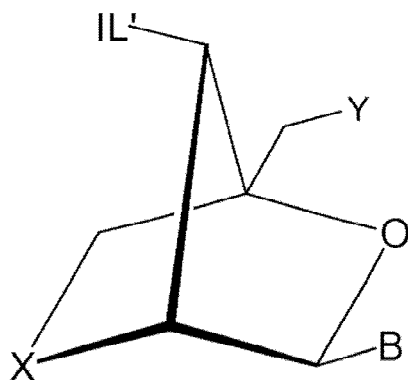
LNA preferidos

[0166] En realizaciones preferidas, las unidades de LNA usadas en los oligonucleótidos antisentido de la presente invención preferiblemente tienen la estructura de fórmula general (II):

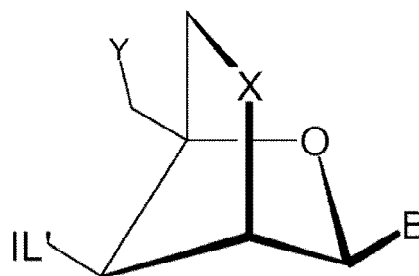


[0167] El resto $-C(R^aR^b)-X-$ representa preferiblemente $-C(R^aR^b)-O-$, $-C(R^aR^b)-NR^c-$, $-C(R^aR^b)-S-$, y $-C(R^aR^b)-C(R^aR^b)-O-$, en donde los sustituyentes R^a , R^b y R^c tienen los significados que se definen en el presente documento y son preferiblemente alquil C_{1-6} y más preferiblemente alquil C_{1-4} . Más preferiblemente, $-C(R^aR^b)-X-$ se selecciona de $-CH_2-O-$, $-CH_2-S-$, $-CH_2-NH-$, $-CH_2-N(CH_3)-$, $-CH_2-CH_2-O-$, o CH_2-CH_2-S- , y más preferiblemente $-CH_2-O-$, $-CH_2-S-$, $-CH_2-CH_2-O-$, o $-CH_2-CH_2-S-$, y aún más preferiblemente $-CH_2-O-$, $-CH_2-S-$, o $-CH_2-CH_2-O-$, y aún más preferiblemente $-CH_2-O-$ o $-CH_2-S-$, y lo más preferiblemente $-CH_2-O-$.

[0168] Todos los centros quirales y los sustituyentes asimétricos (si los hay) pueden estar en R o en orientación S. Por ejemplo, dos isómeros estereoquímicos ejemplares son las isoformas beta-D y alfa-L como se muestra a continuación:

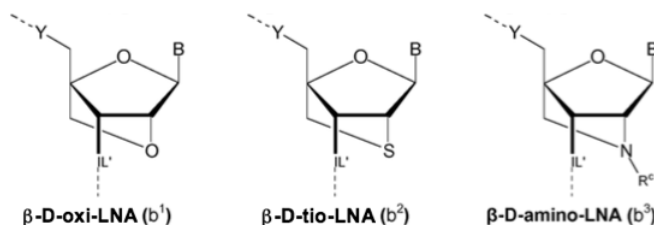


Fórmula (11A)



Fórmula (11B)

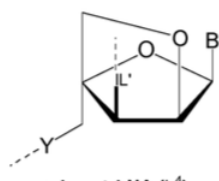
[0169] Las unidades de LNA preferidas se seleccionan de la fórmula general (b¹) a (b⁹):



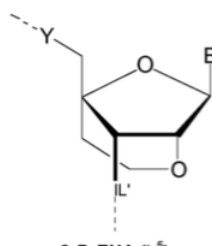
β -D-oxi-LNA (b¹)

β -D-tio-LNA (b²)

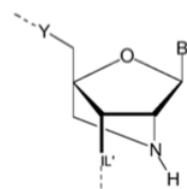
β -D-amino-LNA (b³)



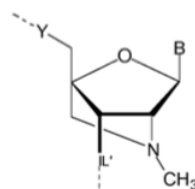
α -L-oxi-LNA (b⁴)



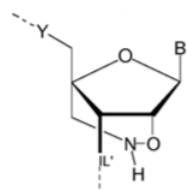
β -D-ENA (b⁵)



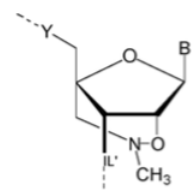
β -D-(NH)-LNA (b⁶)



β -D-(NCH₃)-LNA (b⁷)



β -D-(ONH)-LNA (b⁸)



β -D-(ONCH₃)-LNA (b⁹)

[0170] El término "tio-LNA" comprende un nucleótido bloqueado en el que X en la fórmula general (II) se selecciona entre -S- o -CH₂-S-. Tio-LNA puede estar en configuración tanto beta-D como alfa-L.

5 **[0171]** El término "amino-LNA" comprende un nucleótido bloqueado en el que X en la fórmula general (II) se selecciona de -NH-, -N(R)-, -CH₂-NH-, y -CH₂-N(R)-, donde R se selecciona entre hidrógeno y alquil C₁₋₄, amino-LNA puede estar en configuración tanto beta-D como alfa-L.

10 **[0172]** El término "oxi-LNA" comprende un nucleótido bloqueado en el que X en la fórmula general (II) es -O-. Oxi-LNA puede estar en configuración tanto beta-D como alfa-L.

[0173] El término "ENA" comprende un nucleótido bloqueado en el que X en la fórmula general (II) es -CH₂-O- (donde el átomo de oxígeno de -CH₂-O- está unido a la posición 2' en relación con la base B). R^a y R^b son independientemente entre sí hidrógeno o metilo.

15 **[0174]** En realizaciones ejemplares preferidas, el LNA se selecciona de beta-D-oxi-LNA, alfa-L-oxi-LNA, beta-D-amino-LNA y beta-D-tio-LNA, en particular beta-D-oxi-LNA.

[0175] Aún más preferidos son los siguientes oligonucleótidos antisentido (Tabla 1):

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 705 066 T3

	SP	L	Seq ID No.	Secuencia, 5'-3'
5	89	17	102a	GCGAGTGACTCACTCAA
	90	15	103a	CGAGTGACTCACTCA
	90	16	104a	GCGAGTGACTCACTCA
	90	17	105a	CGCGAGTGACTCACTCA
10	91	14	106a	CGAGTGACTCACTC
	91	16	107a	CGCGAGTGACTCACTC
	91	17	108a	GCGCGAGTGACTCACTC
	92	14	109a	GCGAGTGACTCACT
15	92	16	110a	GCGCGAGTGACTCACT
	92	17	111a	CGCGCGAGTGACTCACT
	93	12	112a	CGAGTGACTCAC
	93	13	113a	GCGAGTGACTCAC
20	93	14	114a	CGCGAGTGACTCAC
	93	16	115a	CGCGCGAGTGACTCAC
	93	17	116a	GCGCGCGAGTGACTCAC
	94	13	117a	CGCGAGTGACTCA
25	94	14	118a	GCGCGAGTGACTCA
	94	15	119a	CGCGCGAGTGACTCA
	94	16	120a	GCGCGCGAGTGACTCA
	94	17	121a	TGCGCGCGAGTGACTCA
30	95	14	122a	CGCGCGAGTGACTC
	95	16	123a	TGCGCGCGAGTGACTC
	95	17	124a	GTGCGCGCGAGTGACTC
	96	13	125a	CGCGCGAGTGACT
35	97	14	126a	TGCGCGCGAGTGAC
	97	16	127a	CGTGCGCGCGAGTGAC
	98	13	128a	TGCGCGCGAGTGA
	107	16	129a	GTCGTCGCTCCGTGCG
40	108	15	130a	GTCGTCGCTCCGTGC
	108	17	131a	GTGTCGTCGCTCCGTGC
	109	13	132a	TCGTCGCTCCGTG
	109	15	133a	TGTCGTCGCTCCGTG
45	110	12	134a	TCGTCGCTCCGT
	110	13	135a	GTCGTCGCTCCGT
	110	14	136a	TGTCGTCGCTCCGT
	110	15	137a	GTGTCGTCGCTCCGT
	110	16	138a	GGTGTGTCGTCGCTCCGT
50	351	16	139a	CGTCATAGACCGAGCC
	351	12	140a	ATAGACCGAGCC
	354	16	141a	GCTCGTCATAGACCGA
	354	13	142a	CGTCATAGACCGA

55

60

65

ES 2 705 066 T3

(continúa)

	SP	L	Seq ID No.	Secuencia, 5'-3'
5	355	14	143a	CTCGTCATAGACCG
	355	15	144a	GCTCGTCATAGACCG
	356	14	145a	GCTCGTCATAGACC
	381	17	146a	CAGCCCCCGACCCATGG
10	382	16	147a	CAGCCCCCGACCCATG
	383	14	148a	AGCCCCCGACCCAT
	384	14	149a	CAGCCCCCGACCCA
	422	17	150a	CGCGTCCACAGGACGAT
15	425	14	151a	CGCGTCCACAGGAC
	429	15	152a	CGATACGCGTCCACA
	431	13	153a	CGATACGCGTCCA
	431	16	154a	TGGCGATACGCGTCCA
20	432	12	155a	CGATACGCGTCC
	432	13	156a	GCGATACGCGTCC
	432	17	157a	GCTGGCGATACGCGTCC
	433	15	158a	CTGGCGATACGCGTC
25	433	12	159a	GCGATACGCGTC
	433	16	160a	GCTGGCGATACGCGTC
	433	14	161a	TGGCGATACGCGTC
	434	13	162a	TGGCGATACGCGT
30	434	14	163a	CTGGCGATACGCGT
	434	12	164a	GGCGATACGCGT
	435	13	165a	CTGGCGATACGCG
	435	12	166a	TGGCGATACGCG
35	437	17	167a	ATCGTGCTGGCGATACG
	449	16	168a	CGTGCGGTGGGATCGT
	449	17	169a	ACGTGCGGTGGGATCGT
	450	17	170a	AACGTGCGGTGGGATCG
40	452	15	171a	AACGTGCGGTGGGAT
	452	17	172a	TGAACGTGCGGTGGGAT
	459	17	173a	CGACTTCTGAACGTGCG
	941	17	174a	TTAACGCGGTAGCAGTA
45	941	16	175a	TAACGCGGTAGCAGTA
	942	17	176a	GTTAACGCGGTAGCAGT
	943	15	177a	TTAACGCGGTAGCAG
	944	13	178a	TAACGCGGTAGCA
	945	12	179a	TAACGCGGTAGC
50	945	13	180a	TTAACGCGGTAGC
	946	12	181a	TTAACGCGGTAG
	946	13	182a	GTTAACGCGGTAG
	946	15	183a	CGGTAAACGCGGTAG
55	946	16	184a	CCGGTTAACGCGGTAG
	947	14	185a	CGGTAAACGCGGTA
	947	13	186a	GGTTAACGCGGTA
	947	15	187a	CCGGTTAACGCGGTA
60	947	16	188a	GCCGGTTAACGCGGTA
	947	17	189a	TGCCGGTTAACGCGGTA
	948	13	190a	CGGTAAACGCGGT
	949	13	191a	CCGGTTAACGCGG
65	949	14	192a	GCCGGTTAACGCGG
	949	15	193a	TGCCGGTTAACGCGG
	950	13	194a	GCCGGTTAACGCG

(continúa)

SP	L	Seq ID No.	Secuencia, 5'-3'
950	15	195a	CTGCCGGTTAACGCG
950	16	196a	GCTGCCGGTTAACGCG
1387	16	197a	ATGCCGCGTCAGGTAC
1392	13	198a	ACATGCCGCGTCA
1393	16	199a	GATGACATGCCGCGTC
1394	12	200a	GACATGCCGCGT
1394	15	201a	GATGACATGCCGCGT
1395	13	202a	ATGACATGCCGCG
1805	17	203a	TCCCGCACCTTGGAAACC
1851	16	204a	CGATCTCTCAACACGT
1851	17	205a	TCGATCTCTCAACACGT
1852	15	206a	CGATCTCTCAACACG
1852	16	207a	TCGATCTCTCAACACG
1852	17	208a	CTCGATCTCTCAACACG
2064	16	209a	GTAGTGTTTAGGGAGC
2072	16	210a	GCTATTTGGTAGTGTT
2284	15	211a	AGCTTATCCTATGAC
2285	14	212a	AGCTTATCCTATGA
2355	17	213a	CAGGCATTAATAAAGTG
4120	16	214a	CTAGGCGCCTCTATGC
4121	14	215a	TAGGCGCCTCTATG
4121	15	216a	CTAGGCGCCTCTATG
4122	13	217a	TAGGCGCCTCTAT
4217	16	218a	CATGAATGGACCAGTA
SP: posición de inicio o nucleótido de inicio en Seq. ID No. 2			
L: longitud de la secuencia			

[0176] Los oligonucleótidos antisentido como se describen en el presente documento, tales como los oligonucleótidos antisentido de las Tablas 1 a 3 y especialmente los oligonucleótidos antisentido de las Tablas 4 a 9, consisten en nucleótidos, preferiblemente nucleótidos de ADN, que son unidades no de LNA (también denominadas aquí nucleótidos no LNA) así como unidades LNA (también denominadas aquí nucleótidos LNA). Aunque no se indica explícitamente, los oligonucleótidos antisentido de las secuencias Seq. ID No.s 102a-218a de la Tabla 1 comprenden de 2 a 4 nucleótidos de LNA (unidades de LNA) en el extremo 3' y de 2 a 4 nucleótidos de LNA (unidades de LNA) en el extremo 5'. Aunque no se indica explícitamente, la "C" en la Tabla 2 que se refiere a las unidades de LNA contiene preferiblemente 5-metilcitosina (C*) como nucleobase.

[0177] Eso significa, siempre y cuando no se indique explícitamente, los oligonucleótidos antisentido de la presente invención o como se describe en este documento mediante la letra código A, C, G, T y U pueden contener cualquier enlace internucleotídico, cualquier grupo final y cualquier nucleobase. como se describe en el presente documento. Además, los oligonucleótidos antisentido de la presente invención o como se desvelan en el presente documento son separadores de espacio de cualquier estructura de interferencia como se desvela en el presente documento con al menos una unidad de LNA en el extremo 3' y al menos una unidad de LNA en el extremo 5'. Además, cualquier unidad de LNA como se describe en el presente documento puede usarse dentro de los oligonucleótidos antisentido de la presente invención o como se describe en el presente documento. Así, por ejemplo, el oligonucleótido antisentido GCTCGTCATAGAC-CGA (Seq. ID No. 13) o CGATACGCGTCCACAG (Seq. ID No. 14) o GTAGTGTTTAGGGAGC (Seq. ID No. 15) o GCTATTTGGTAGGGTT (Seq. ID No. 16) o CATGAATGGACCAGTA (Seq. ID No. 17) o AGGCATTAATAAAGTG (Seq. ID No. 18) contiene al menos una unidad LNA en el extremo 5' y al menos una unidad LNA en el extremo 3', cualquier nucleobase, cualquier grupo de extremo 3', cualquier grupo terminal 5', cualquier estructura gámpero y cualquier enlace internucleotídico como se describe en este documento y cubre también sales e isómeros ópticos de ese oligonucleótido antisentido.

[0178] El uso de unidades LNA se prefiere especialmente en el terminal 3' y el extremo 5' terminal. Por lo tanto, se prefiere si los últimos 1 - 5 nucleótidos en el extremo terminal 3' y también los últimos 1 - 5 nucleótidos en el extremo terminal 5' especialmente de las secuencias descritas en el presente documento y en particular de Seq. ID No.s 102a - 218a de la Tabla 1 son unidades LNA (también denominadas nucleótidos LNA), mientras que entre las unidades 1 - 5 LNA en los extremos 3' y 5' 2 - 14, preferiblemente 3 - 12, más preferiblemente 4 - 10, más preferiblemente 5 - 9, aún más preferiblemente 6 - 8, están presentes unidades no de LNA (también denominadas nucleótidos no LNA). Este tipo de oligonucleótidos antisentido se denominan separadores y se describen con más detalle a continuación. Más preferidos son 2 - 5 nucleótidos de LNA en el extremo 3' y 2 - 5 nucleótidos de LNA en el extremo 5' o 1 - 4 nucleótidos de LNA en el extremo 3' y 1 - 4 nucleótidos de LNA en el extremo 5' y aún más preferidos son 2 - 4 nucleótidos de LNA en el extremo 3' y 2 - 4 nucleótidos de LNA en el extremo 5' de los

oligonucleótidos antisentido con un número de preferiblemente 4 - 10, más preferiblemente 5 - 9, aún más preferiblemente 6 - 8 unidades no de LNA entre las unidades de LNA en los extremos 3' y 5'.

5 **[0179]** Además, como enlaces internucleotídicos entre las unidades LNA y entre las unidades LNA y las unidades no de LNA, se prefiere el uso de fosforotioatos o fosforoditioatos y preferiblemente fosforotioatos.

10 **[0180]** Por lo tanto, más preferidos son oligonucleótidos antisentido en los que más del 50%, preferiblemente más del 60%, más preferiblemente más del 70%, aún más preferiblemente más del 80%, y más preferiblemente más del 90% de los enlaces internucleotídicos son fosforotioatos o fosfatos y más preferiblemente enlaces de fosforotioato y en donde los últimos 1 - 4 o 2 - 5 nucleótidos en el extremo 3' son unidades de LNA y los últimos 1 - 4 o 2 - 5 nucleótidos en el extremo 5' son unidades de LNA y entre las unidades LNA en los extremos de una secuencia de 6 - 14 nucleótidos, preferiblemente 7 - 12, preferiblemente 8 - 11, más preferiblemente 8 - 10 están presentes que son unidades no de LNA, preferiblemente unidades de ADN. Además, se prefiere que estos oligonucleótidos antisentido en forma de gápmersos consisten en un total de 12 a 20, preferiblemente de 12 a 18 nucleótidos.

15 **Gápmersos**

20 **[0181]** Los oligonucleótidos antisentido de la invención pueden consistir en secuencias de nucleótidos que comprenden tanto nucleótidos de ADN que no son unidades de LNA como nucleótidos de LNA, y pueden estar dispuestos en forma de gápmero.

25 **[0182]** Por lo tanto, los oligonucleótidos antisentido de la presente invención son preferiblemente gápmersos de huecos. Un gápmero consiste en una parte media de unidades de nucleótidos de ADN que no están bloqueadas, por lo que son unidades no de LNA. Los nucleótidos de ADN de esta parte media podrían estar vinculados entre sí por los enlaces internucleotídicos (IL) como se describe en el presente documento, que preferiblemente pueden ser grupos fosfato, grupos fosforotioato o grupos fosforoditioato y que pueden contener análogos de nucleobases tales como 5-propinil citosina, 7-metilguanina, 7-metiladenina, 2-aminoadenina, 2-tiotimina, 2-tiocitosina o 5-metilcitosina. Las unidades de ADN o los nucleótidos de ADN no son estructuras de pentosa bicíclicas. La parte media de las unidades no de LNA está flanqueada en el extremo 3' y el extremo 5' por secuencias que consisten en unidades LNA. Así, los gápmersos tienen la fórmula general:

secuencia LNA 1 - secuencia no LNA - secuencia LNA 2 o región A - región B - región C

35 **[0183]** La parte media del oligonucleótido antisentido que consiste en unidades de nucleótidos de ADN que no son unidades de LNA es, cuando se forma en un dúplex con el ARN diana complementario, capaz de reclutar RNasa. Las unidades de nucleótidos terminales 3' y 5' son unidades de LNA que están preferiblemente en configuración alfa-L, siendo particularmente preferidos los beta-D-oxi-LNA y los LNA alfa-L-oxi.

40 **[0184]** Por lo tanto, un gápmero es un oligonucleótido antisentido que comprende un tramo contiguo de nucleótidos de ADN que es capaz de reclutar una RNasa, tal como RNasaH, tal como una región de al menos 6 o 7 nucleótidos de ADN que no son unidades de LNA, denominados aquí parte media o región B, en donde la región B está flanqueada tanto en 5' como en 3' por regiones de análogos de nucleótidos que aumentan la afinidad que son unidades de LNA, tales como entre 1 - 6 unidades de LNA 5' y 3' al tramo contiguo de nucleótidos de ADN que es capaz de reclutar RNasa: estas regiones flanqueantes se denominan regiones A y C, respectivamente.

45 **[0185]** Preferiblemente, el gápmero comprende una secuencia (poli)nucleotídica de fórmula (5' a 3'), A-B-C, u opcionalmente A-B-C-D o D-A-B-C, en donde; la región A (región 5') consta de al menos un análogo de nucleótido, tal como al menos una unidad de LNA, tal como entre 1-6 unidades de LNA, y la región B consiste de al menos cinco nucleótidos de ADN consecutivos que no son unidades de LNA y que son capaces de reclutar RNasa (cuando se forman en un dúplex con una molécula de ARN complementaria, como la diana del ARNm), y la región C (región 3') consiste en al menos un análogo de nucleótido, como al menos una unidad LNA, como entre 1 y 6 unidades de LNA, y la región D, cuando está presente, consta de 1, 2 o 3 unidades de nucleótidos de ADN que son unidades no de LNA.

50 En algunas realizaciones, la región A consta de 1, 2, 3, 4, 5 o 6 unidades de LNA, como entre 2 y 5 unidades de LNA, como 3 o 4 unidades de LNA; y/o la región C consta de 1, 2, 3, 4, 5 o 6 unidades de LNA, como entre 2 y 5 unidades de LNA, como 3 o 4 unidades de LNA. En algunas realizaciones, B consiste en 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 nucleótidos de ADN consecutivos que son capaces de reclutar RNasa, o entre 6-10, o entre 7-9, tal como 8 nucleótidos consecutivos que son capaces de reclutar RNasa. En algunas realizaciones, la región B consiste en al menos una unidad de nucleótido de ADN, tal como 1-12 unidades de nucleótido de ADN, preferiblemente entre 4-12 unidades de nucleótido de ADN, más preferiblemente entre 6-10 unidades de nucleótido de ADN, aún más preferida tal como entre 7 - 10 unidades de nucleótidos de ADN, y lo más preferiblemente 8, 9 o 10 unidades de nucleótidos de ADN que no son unidades de LNA.

55 En algunas realizaciones, la región A consiste en 3 o 4 LNA, la región B consiste en 7, 8, 9 o 10 unidades de nucleótidos de ADN, y la región C consiste en 3 o 4 unidades de LNA. Tales diseños incluyen (A-B-C): 1-7-2, 2-7-1, 2-7-2, 3-7-1, 3-7-2, 1-7-3, 2-7-3, 3-7-3, 2-7-4, 3-7-4, 4-7-2, 4-7-3, 4-7-4, 1-8-1, 1-8-2, 2-8-1, 2-8-2, 1-8-3, 3-8-1, 3-8-3, 2-8-3, 3-8-2, 4-8-1, 4-8-2, 1-8-4, 2-8-4, 3-8-4, 4-8-3, 4-8-4, 1-9-1, 1-9-2, 2-9-1, 2-9-2, 2-9-3, 3-9-2, 3-9-3, 1-9-3, 3-9-1,

4-9-1, 1-9-4, 4-9-2, 2-9-4, 4-9-3, 3-9-4, 4-9-4, 1-10-1, 1-10-2, 2-10-1, 2-10-2, 1-10-3, 3-10-1, 2-10-2, 2-10-3, 3-10-2, 3-10-3, 2-10-4, 4-10-2, 3-10-4, 4-10-3, 4-10-4, 1-11-1, 1-11-2, 2-11-1, 2-11-2, 1-11-3, 3-11-1, 2-11-2, 2-11-3, 3-11-2, 3-11-3, 2-11-4, 4-11-2, 3-11-4, 4-11-3, 4-11-4, y puede incluir además la región D, que puede tener una o 2 unidades de nucleótidos de ADN, que son unidades no de LNA.

5 Se describen diseños de gápmo adicionales en el documento WO2004/046160A y se incorporan aquí como referencia. La solicitud provisional de EE. UU., 60/977409, se refiere a oligonucleótido antisentido gápmo 'más corto', que también son adecuados para la presente invención.

10 **[0186]** En algunas realizaciones, el oligonucleótido antisentido consiste en una secuencia de nucleótidos contigua de un total de 10, 11, 12, 13 o 14 unidades de nucleótidos (unidades de LNA y unidades no de LNA juntas), en donde la secuencia de nucleótidos contigua es de fórmula (5' - 3'), A-B-C, u opcionalmente A-B-C-D o D-A-B-C, en donde A consiste en 1, 2 o 3 unidades LNA, y B consiste en 7, 8 o 9 unidades de nucleótidos de ADN contiguas que son unidades no de LNA y que son capaces de reclutar RNasa cuando se forma en un dúplex con una molécula de ARN complementaria (como una diana de ARNm), y C consiste en 1, 2 o 3 unidades de LNA. Cuando está presente, D
15 consiste en una sola unidad de nucleótidos de ADN que es una unidad no LNA.

[0187] En algunas realizaciones, A consiste en 1 unidad de LNA. En algunas realizaciones, A consiste en 2 unidades de LNA. En algunas realizaciones A consiste en 3 unidades de LNA. En algunas realizaciones, C consiste en 1 unidad de LNA. En algunas realizaciones, C consiste en 2 unidades de LNA. En algunas realizaciones, C
20 consiste en 3 unidades de LNA. En algunas realizaciones, B consiste en 7 unidades de nucleótidos de ADN que son unidades no de LNA. En algunas realizaciones, B consiste en 8 unidades de nucleótidos de ADN. En algunas realizaciones, B consiste en 9 unidades de nucleótidos de ADN. En algunas realizaciones, B consiste en 1 - 9 unidades de nucleótidos de ADN, tales como 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 unidades de nucleótidos de ADN. Las unidades de nucleótidos de ADN son siempre unidades no de LNA. En algunas realizaciones, B comprende 1, 2 o 3 unidades de
25 LNA que están preferiblemente en la configuración alfa-L y que son más preferiblemente unidades de LNA alfa-L-oxi. En algunas realizaciones, el número de nucleótidos presentes en A-B-C se selecciona del grupo que consiste en (unidades LNA - región B - unidades LNA y más preferiblemente unidades de LNA alfa-L-oxi (región A) - región B - (región C) unidades LNA alfa-L-oxi): 1-8-1, 1-8-2, 2-8-1, 2-8-2, 1-8-3, 3-8-1, 3-8-3, 2-8-3, 3-8-2, 4-8-1, 4-8-2, 1-8-4, 2-8-4, 3-8-4, 4-8-3, 4-8-4, 1-9-1, 1-9-2, 2-9-1, 2-9-2, 2-9-3, 3-9-2, 3-9-3, 1-9-3, 3-9-1, 4-9-1, 1-9-4, 4-9-2, 2-9-4, 4-9-3, 3-9-4, 4-9-4, 1-10-1, 1-10-2, 2-10-1, 2-10-2, 1-10-3, 3-10-1, 2-10-2, 2-10-3, 3-10-2, 3-10-3, 2-10-4, 4-10-2, 3-10-4, 4-10-3, 4-10-4, 1-11-1, 1-11-2, 2-11-1, 2-11-2, 1-11-3, 3-11-1, 2-11-2, 2-11-3, 3-11-2, 3-11-3, 2-11-4, 4-11-2, 3-11-4, 4-11-3, 4-11-4. En otras realizaciones preferidas, el número de nucleótidos en A-B-C se selecciona del grupo que
30 consiste en: 3-8-3, 4-8-2, 2-8-4, 3-8-4, 4-8-3, 4-8-4, 3-9-3, 4-9-2, 2-9-4, 4-9-3, 3-9-4, 4-9-4, 3-10-3, 2-10-4, 4-10-2, 3-10-4, 4-10-3, 4-10-4, 2-11-4, 4-11-2, 3-11-4, 4-11-3 y aún más preferidos son: 3-8-3, 3-8-4, 4-8-3, 4-8-4, 3-9-3, 4-9-3, 3-9-4, 4-9-4, 3-10-3, 3-10-4, 4-10-3, 4-10-4, 3-11-4, y 4-11-3.

[0188] También se prefieren los enlaces fosforotioato, fosfato o fosforoditioato y especialmente los enlaces internucleotídicos fosforotioato, en particular para la región abierta B. Los enlaces fosforotioato, fosfato o fosforoditioato y especialmente los enlaces internucleotídicos fosforotioato también se pueden usar para las regiones
40 flanqueantes (A y C, y para enlazar A o C a D, y dentro de la región D, si está presente).

[0189] Las regiones A, B y C, sin embargo, pueden comprender enlaces internucleotídicos distintos de fosforotioato o fosforitioato, tales como enlaces fosfodiéster, particularmente, por ejemplo, cuando el uso de análogos de nucleótidos protege los enlaces internucleotídicos dentro de las regiones A y C de degradación de endo-nucleasas, como cuando las regiones A y C constan de unidades de LNA.
45

Los enlaces internucleotídicos en el oligonucleótido antisentido pueden ser fosfodiéster, fosforotioato, fosforoditioato o boranofosfato para permitir la escisión de RNasa H de RNasa. Se prefiere el fosforotioato o fosforoditio, por una mejor resistencia a las nucleasas y otras razones, tales como la facilidad de fabricación. En un aspecto del oligómero de la invención, las unidades de LNA y/o las unidades no de LNA están unidas entre sí por medio de grupos fosforotioato.
50

Se reconoce que la inclusión de enlaces fosfodiéster, como uno o dos enlaces, en un oligonucleótido antisentido de fosforotioato, particularmente entre o adyacentes a unidades de LNA (típicamente en la región A y C) puede modificar la biodisponibilidad y/o bio-distribución de un oligonucleótido antisentido (ver documento WO2008/053314A). En algunas realizaciones, tales como en las secuencias de los oligonucleótidos antisentido descritos en el presente documento y cuando son adecuados y no están específicamente indicados, todos los grupos de enlaces internucleotídicos restantes son grupos fosfodiéster o grupos fosforotioato, o una mezcla de los mismos.
55

En algunas realizaciones, todos los grupos de enlace internucleotídicos son grupos fosforotioato. Cuando se hace referencia a secuencias de oligonucleótidos antisentido gápmo específicas, tales como las proporcionadas en el presente documento, se entenderá que, en diversas realizaciones, cuando los enlaces son enlaces fosforotioato, pueden usarse enlaces alternativos, tales como los descritos en el presente documento, por ejemplo fosfato (también se pueden usar enlaces denominados fosfodiéster, en particular para enlaces entre análogos de nucleótidos, como las unidades de LNA. Del mismo modo, cuando se hace referencia a secuencias de oligonucleótidos antisentido gápmo específicas, como las proporcionadas en el presente documento, cuando los residuos de C se anotan como citosina modificada con 5'-metil, en varias realizaciones, una o más de las C presentes en el oligómero pueden ser residuos C no modificados.
60
65

Leyenda

[0190] Como se usa en el presente documento, las abreviaturas b, d, s, ss tienen el siguiente significado:

5	b	unidad LNA o nucleótido LNA (cualquiera seleccionado de b ¹ - b ⁷)
	b ¹	β-D-oxi-LNA
	b ²	β-D-tio-LNA
	b ³	β-D-amino-LNA
	b ⁴	α-L-oxi-LNA
10	b ⁵	β-D-ENA
	b ⁶	β-D-(NH)-LNA
	b ⁷	β-D-(NCH ₃)-LNA
	d	2-deoxi, que significa unidades de 2-desoxirribosa (por ejemplo, fórmula B3 o B5 con R = -H)
	C*	metil-C (5-metilcitosina); [por consiguiente, dC* es 5-metil-2'-desoxicitidina]
15	A*	2-aminoadenina [por consiguiente, dA* es 2-amino-2'-desoxiadenosina]
	s	el enlace internucleotídico es un grupo fosforotioato (-O-P(O)(S)-O-)
	ss	el enlace internucleotídico es un grupo fosforoditioato (-OP(S)(S)-O-)
	/5SpC3/	-OP(O)(O)OC ₃ H ₆ OH en el grupo 5'-terminal de un oligonucleótido antisentido
	/3SpC3/	-O-P(O)(O)OC ₃ H ₆ OH en el grupo 3'-terminal de un oligonucleótido antisentido
20	/5SpC3s/	-O-P(O)(S)OC ₃ H ₆ OH en el grupo 5'-terminal de un oligonucleótido antisentido
	/3SpC3s/	-O-P(O)(S)OC ₃ H ₆ OH en el grupo 3'-terminal de un oligonucleótido antisentido

los nucleótidos en **negrita** son nucleótidos de LNA

los nucleótidos que no en **negrita** son nucleótidos no de LNA

25

Secuencias de gápmero

[0191] Se prefieren especialmente los siguientes oligonucleótidos antisentido en forma de aglomerantes como se enumeran en la Tabla 2 a la Tabla 9 y más preferiblemente en la Tabla 4 a 9.

30

35

40

45

50

55

60

65

Tabla 2

SP	L	Seq ID No.	Secuencia, 5'-3'
89	17	102b	GbsCbsGbsAbsdGsdTsdGsdAsdCsdTsdCsdAsdCsTbsCbsAbsAb
90	15	103b	CbsGbsAbsdGsdTsdGsdAsdCsdTsdCsdAsdCsTbsCbsAb
90	16	104b	GbsCbsGbsdAsdGsdTsdGsdAsdCsdTsdCsdAsdCsTbsCbsAb
90	17	105b	CbsGbsCbsGbsdAsdGsdTsdGsdAsdCsdTsdCsdAsCbsTbsCbsAb
91	14	106b	CbsGbsAbsdGsdTsdGsdAsdCsdTsdCsdAsCbsTbsCb
91	16	107b	CbsGbsCbsdGsdAsdGsdTsdGsdAsdCsdTsdCsdAsCbsTbsCb
91	17	108b	GbsCbsGbsCbsdGsdAsdGsdTsdGsdAsdCsdTsdCsAbsCbsTbsCb
92	14	109b	GbsCbsGbsdAsdGsdTsdGsdAsdCsdTsdCsAbsCbsTb
92	16	110b	GbsCbsGbsdCsdGsdAsdGsdTsdGsdAsdCsdTsdCsAbsCbsTb
92	17	111b	CbsGbsCbsGbsdCsdGsdAsdGsdTsdGsdAsdCsdTsCbsAbsCbsTb
93	12	112b	CbsGbsdAsdGsdTsdGsdAsdCsdTsdCsAbsCb
93	13	113b	GbsCbsGbsdAsdGsdTsdGsdAsdCsdTsdCsAbsCb
93	14	114b	CbsGbsCbsdGsdAsdGsdTsdGsdAsdCsdTsCbsAbsCb
93	16	115b	CbsGbsCbsdGsdCsdGsdAsdGsdTsdGsdAsdCsdTsCbsAbsCb
93	17	116b	GbsCbsGbsCbsdGsdCsdGsdAsdGsdTsdGsdAsdCsTbsCbsAbsCb
94	13	117b	CbsGbsCbsdGsdAsdGsdTsdGsdAsdCsdTsCbsAb
94	14	118b	GbsCbsGbsdCsdGsdAsdGsdTsdGsdAsdCsTbsCbsAb
94	15	119b	CbsGbsCbsdGsdCsdGsdAsdGsdTsdGsdAsdCsTbsCbsAb
94	16	120b	GbsCbsGbsdCsdGsdCsdGsdAsdGsdTsdGsdAsdCsTbsCbsAb
94	17	121b	TbsGbsCbsGbsdCsdGsdCsdGsdAsdGsdTsdGsdAsCbsTbsCbsAb
95	14	122b	CbsGbsCbsdGsdCsdGsdAsdGsdTsdGsdAsCbsTbsCb
95	16	123b	TbsGbsCbsdGsdCsdGsdCsdGsdAsdGsdTsdGsdAsCbsTbsCb
95	17	124b	GbsTbsGbsCbsdGsdCsdGsdCsdGsdAsdGsdTsdGsAbsCbsTbsCb
96	13	125b	CbsGbsCbsdGsdCsdGsdAsdGsdTsdGsdAsCbsTb
97	14	126b	TbsGbsCbsdGsdCsdGsdCsdGsdAsdGsdTsGbsAbsCb
97	16	127b	CbsGbsTbsdGsdCsdGsdCsdGsdCsdGsdAsdGsdTsGbsAbsCb
98	13	128b	TbsGbsCbsdGsdCsdGsdCsdGsdAsdGsdTsGbsAb
107	16	129b	GbsTbsCbsdGsdTsdCsdGsdCsdTsdCsdGsdTsGbsCbsGb

ES 2 705 066 T3

(continúa)

				GbsTbsCbsdGsdTsdCsdGsdCsdTsdCsdCsdGsTbsGbsCb		
5			108	15	130b	
			108	17	131b	GbsTbsGbsTbsdCsdGsdTsdCsdGsdCsdTsdCsdCsGbsTbsGbsCb
			109	13	132b	TbsCbsGbsdTsdCsdGsdCsdTsdCsdCsdGsTbsGb
			109	15	133b	TbsGbsTbsdCsdGsdTsdCsdGsdCsdTsdCsdCsGbsTbsGb
10			110	12	134b	TbsCbsdGsdTsdCsdGsdCsdTsdCsdCsGbsTb
			110	13	135b	GbsTbsCbsdGsdTsdCsdGsdCsdTsdCsdCsGbsTb
			110	14	136b	TbsGbsTbsdCsdGsdTsdCsdGsdCsdTsdCsCbsGbsTb
15			110	15	137b	GbsTbsGbsdTsdCsdGsdTsdCsdGsdCsdTsdCsCbsGbsTb
			110	16	138b	GbsGbsTbsdGsdTsdCsdGsdTsdCsdGsdCsdTsdCsCbsGbsTb
			351	16	139b	CbsGbsTbsdCsdAsdTsdAsdGsdAsdCsdCsdGsdAsGbsCbsCb
20			351	12	140b	AbsTbsdAsdGsdAsdCsdCsdGsdAsdGsCbsCb
			354	16	141b	GbsCbsTbsdCsdGsdTsdCsdAsdTsdAsdGsdAsdCsCbsGbsAb
			354	13	142b	CbsGbsTbsdCsdAsdTsdAsdGsdAsdCsdCsGbsAb
25			355	14	143b	CbsTbsdCsdGsdTsdCsdAsdTsdAsdGsdAsCbsCbsGb
			355	14	143c	CbsTbsCbsdGsdTsdCsdAsdTsdAsdGsdAsdCsCbsGb
			355	14	143d	CbsTbsCbsdGsdTsdCsdAsdTsdAsdGsdAsCbsCbsGb
30			355	15	144b	GbsCbsTbsdCsdGsdTsdCsdAsdTsdAsdGsdAsCbsCbsGb
			356	14	145b	GbsCbsTbsdCsdGsdTsdCsdAsdTsdAsdGsAbsCbsCb
			381	17	146b	CbsAbsGbsCbsdCsdCsdCsdCsdGsdAsdCsdCsdCsAbsTbsGbsGb
35			382	16	147b	CbsAbsGbsdCsdCsdCsdCsdGsdAsdCsdCsdCsAbsTbsGb
			382	16	147c	CbsAbsGbsdCsdCsdCsdCsdGsdAsdCsdCsdCsAsTsG
			382	16	147d	CbsAbsGbsdCsdCsdCsdCsdGsdAsdCsdCsCbsAbsTbsGb
40			382	16	147e	CbsAbsGbsCbsdCsdCsdCsdCsdGsdAsdCsdCsdCsAbsTbsGb
			382	16	147f	CbsAbsGbsCbsdCsdCsdCsdCsdGsdAsdCsdCsCbsAbsTbsGb
			383	14	148b	AbsGbsdCsdCsdCsdCsdGsdAsdCsdCsCbsAbsTb
45			383	14	148c	AbsGbsCbsdCsdCsdCsdCsdGsdAsdCsdCsdCsAbsTb
			383	14	148d	AbsGbsCbsdCsdCsdCsdCsdGsdAsdCsdCsCbsAbsTb
			384	14	149	CbsAbsGbsdCsdCsdCsdCsdGsdAsdCsCbsCbsAb
50			422	17	150b	CbsGbsCbsGbsdTsdCsdCsdAsdCsdAsdGsdGsdAsCbsGbsAbsTb
			425	14	151b	CbsGbsCbsdGsdTsdCsdCsdAsdCsdAsdGsGbsAbsCb
			429	15	152b	CbsGbsAbsdTsdAsdCsdGsdCsdGsdTsdCsdCsAbsCbsAb
55			429	15	152c	CbsGbsAbsdTsdAsdCsdGsdCsdGsdTsdCsCbsAbsCbsAb
			429	15	152d	CbsGbsAbsTbsdAsdCsdGsdCsdGsdTsdCsdCsAbsCbsAb
			432	12	155b	CbsGbsdAsdTsdAsdCsdGsdCsdGsdTsCbsCb
60			431	13	153b	CbsGbsAbsdTsdAsdCsdGsdCsdGsdTsdCsCbsAb
			431	13	153c	CbsGbsdAsdTsdAsdCsdGsdCsdGsdTsCbsCbsAb
			431	16	154b	TbsGbsGbsdCsdGsdAsdTsdAsdCsdGsdCsdGsdTsCbsCbsAb
65			432	12	155c	CbsGbsdAsdTsdAsdCsdGsdCsdGsdTsdCsCb

(continúa)

5	432	12	155d	CbsdGsdAsdTsdAsdCsdGsdCsdGsdTsCbsCb
	432	13	156b	GbsCbsGbsdAsdTsdAsdCsdGsdCsdGsdTsCbsCb
	432	17	157b	GbsCbsTbsGbsdGsdCsdGsdAsdTsdAsdCsdGsdCsGbsTbsCbsCb
	433	15	158b	CbsTbsGbsdGsdCsdGsdAsdTsdAsdCsdGsdCsGbsTbsCb
10	433	12	159b	GbsCbsdGsdAsdTsdAsdCsdGsdCsdGsTbsCb
	433	16	160b	GbsCbsTbsdGsdGsdCsdGsdAsdTsdAsdCsdGsdCsGbsTbsCb
	433	14	161b	TbsGbsGbsdCsdGsdAsdTsdAsdCsdGsdCsGbsTbsCb
15	434	12	164b	GbsGbsdCsdGsdAsdTsdAsdCsdGsdCsGbsTb
	434	13	162b	TbsGbsGbsdCsdGsdAsdTsdAsdCsdGsdCsGbsTb
	434	13	162c	TbsGbsdGsdCsdGsdAsdTsdAsdCsdGsCbsGbsTb
20	434	14	163b	CbsTbsGbsdGsdCsdGsdAsdTsdAsdCsdGsCbsGbsTb
	435	13	165b	CbsTbsGbsdGsdCsdGsdAsdTsdAsdCsdGsCbsGb
	435	12	166b	TbsGbsdGsdCsdGsdAsdTsdAsdCsdGsCbsGb
25	437	17	167b	AbsTbsCbsGbsdTsdGsdCsdTsdGsdGsdCsdGsdAsTbsAbsCbsGb
	449	16	168b	CbsGbsTbsdGsdCsdGsdGsdTsdGsdGsdGsdAsTsCbsGbsTb
	449	17	169b	AbsCbsGbsTbsdGsdCsdGsdGsdTsdGsdGsdGsdAsTbsCbsGbsTb
30	450	17	170b	AbsAbsCbsGbsdTsdGsdCsdGsdGsdTsdGsdGsdGsAbsTbsCbsGb
	452	15	171b	AbsAbsCbsdGsdTsdGsdCsdGsdGsdTsdGsdGsGbsAbsTb
	452	17	172b	TbsGbsAbsAbsdCsdGsdTsdGsdCsdGsdGsdTsdGsGbsGbsAbsTb
35	459	17	173b	CbsGbsAbsCbsdTsdTsdCsdTsdGsdAsdAsdCsdGsTbsGbsCbsGb
	941	17	174b	TbsTbsAbsAbsdCsdGsdCsdGsdGsdTsdAsdGsdCsAbsGbsTbsAb
	941	16	175b	TbsAbsAbsdCsdGsdCsdGsdGsdTsdAsdGsdCsdAsGbsTbsAb
40	942	17	176b	GbsTbsTbsAbsdAsdCsdGsdCsdGsdGsdTsdAsdGsCbsAbsGbsTb
	943	15	177b	TbsTbsAbsdAsdCsdGsdCsdGsdGsdTsdAsdGsCbsAbsGb
	944	13	178b	TbsAbsAbsdCsdGsdCsdGsdGsdTsdAsdGsCbsAb
45	945	12	179b	TbsAbsdAsdCsdGsdCsdGsdGsdTsdAsGbsCb
	945	13	180b	TbsTbsAbsdAsdCsdGsdCsdGsdGsdTsdAsGbsCb
	946	12	181b	TbsTbsdAsdAsdCsdGsdCsdGsdGsdTsAbsGb
50	946	13	182b	GbsTbsTbsdAsdAsdCsdGsdCsdGsdGsdTsAbsGb
	946	15	183b	CbsGbsGbsdTsdTsdAsdAsdCsdGsdCsdGsdGsTbsAbsGb
	946	16	184b	CbsCbsGbsdGsdTsdTsdAsdAsdCsdGsdCsdGsdGsTbsAbsGb
	947	14	185b	CbsGbsGbsdTsdTsdAsdAsdCsdGsdCsdGsGbsTbsAb
55	947	13	186b	GbsGbsTbsdTsdAsdAsdCsdGsdCsdGsdGsTbsAb
	947	15	187b	CbsCbsGbsdGsdTsdTsdAsdAsdCsdGsdCsdGsGbsTbsAb
	947	16	188b	GbsCbsCbsdGsdGsdTsdTsdAsdAsdCsdGsdCsdGsGbsTbsAb
60	947	17	189b	TbsGbsCbsCbsdGsdGsdTsdTsdAsdAsdCsdGsdCsGbsGbsTbsAb
	948	13	190b	CbsGbsGbsdTsdTsdAsdAsdCsdGsdCsdGsGbsTb
	949	13	191b	CbsCbsGbsdGsdTsdTsdAsdAsdCsdGsdCsGbsGb

65

ES 2 705 066 T3

(continúa)

5	949	14	192b	GbsCbsCbsdGsdGsdTsdTsdAsdAsdCsdGsCbsGbsGb
	949	15	193b	TbsGbsCbsdCsdGsdGsdTsdTsdAsdAsdCsdGsCbsGbsGb
	950	13	194b	GbsCbsCbsdGsdGsdTsdTsdAsdAsdCsdGsCbsGb
10	950	15	195b	CbsTbsGbsdCsdCsdGsdGsdTsdTsdAsdAsdCsGbsCbsGb
	950	16	196b	GbsCbsTbsdGsdCsdCsdGsdGsdTsdTsdAsdAsdCsGbsCbsGb
	1387	16	197b	AbsTbsGbsdCsdCsdGsdCsdGsdTsdCsdAsdGsdGsTbsAbsCb
15	1392	13	198b	AbsCbsAbsdTsdGsdCsdCsdGsdCsdGsdTsCbsAb
	1393	16	199b	GbsAbsTbsdGsdAsdCsdAsdTsdGsdCsdCsdGsdCsGbsTbsCb
	1393	16	199c	GbsAbsTbsdGsdAsdCsdAsdTsdGsdCsdCsdGsCbsGbsTbsCb
20	1393	16	199d	GbsAbsTbsGbsdAsdCsdAsdTsdGsdCsdCsdGsdCsGbsTbsCb
	1393	16	199e	GbsAbsTbsGbsdAsdCsdAsdTsdGsdCsdCsdGsCbsGbsTbsCb
	1394	12	200b	GbsAbsdCsdAsdTsdGsdCsdCsdGsdCsGbsTb
25	1394	15	201b	GbsAbsTbsdGsdAsdCsdAsdTsdGsdCsdCsdGsCbsGbsTb
	1395	13	202b	AbsTbsGbsdAsdCsdAsdTsdGsdCsdCsdGsCbsGb
	1805	17	203b	TbsCbsCbsCbsdGsdCsdAsdCsdCsdTsdTsdGsdGsAbsAbsCbsCb
30	1851	16	204b	CbsGbsAbsdTsdCsdTsdCsdTsdCsdAsdAsdCsdAsCbsGbsTb
	1851	17	205b	TbsCbsGbsAbsdTsdCsdTsdCsdTsdCsdAsdAsdCsAbsCbsGbsTb
	1852	15	206b	CbsGbsAbsdTsdCsdTsdCsdTsdCsdAsdAsdCsAbsCbsGb
35	1852	16	207b	TbsCbsGbsdAsdTsdCsdTsdCsdTsdCsdAsdAsdCsAbsCbsGb
	1852	17	208b	CbsTbsCbsGbsdAsdTsdCsdTsdCsdTsdCsdAsdAsCbsAbsCbsGb
	2064	16	209b	GbsTbsdAsdGsdTsdGsdTsdTsdTsdAsdGsdGsdGsAbsGbsCb
40	2064	16	209c	GbsTbsAbsGbsdTsdGsdTsdTsdTsdAsdGsdGsdGsAbsGbsCb
	2064	16	209d	GbsTbsAbsdGsdTsdGsdTsdTsdTsdAsdGsdGsdGsAbsGbsCb
	2064	16	209e	GbsTbsAbsdGsdTsdGsdTsdTsdTsdAsdGsdGsdGsAbsGbsCb
45	2064	16	209f	GbsTbsAbsdGsdTsdGsdTsdTsdTsdAsdGsdGsGbsAbsGbsCb
	2064	16	209g	GbsTbsAbsGbsdTsdGsdTsdTsdTsdAsdGsdGsGbsAbsGbsCb
	2064	16	209h	GbsTbsdAsdGsdTsdGsdTsdTsdTsdAsdGsdGsdGsAbsGbsCb
50	2064	16	209i	GbsTbsAbsGbsTbsdGsdTsdTsdTsdAsdGsdGsGbsAbsGbsCb
	2064	16	209j	GbsTbsAbsGbsdTsdGsdTsdTsdTsdAsdGsGbsGbsAbsGbsCb
	2064	16	209k	GbsTbsAbsGbsTbsdGsdTsdTsdTsdAsdGsGbsGbsAbsGbsCb
55	2072	16	210b	GbsCbsdTsdAsdTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdGsdTsGbsTbsTb
	2072	16	210c	GbsCbsTbsdAsdTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdGsdTsdGsTbsTb
	2072	16	210d	GbsCbsTbsdAsdTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdGsdTsGbsTbsTb
60	2072	16	210e	GbsCbsTbsAbsdTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdGsdTsGbsTbsTb
	2072	16	210f	GbsCbsTbsdAsdTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdGsTbsGbsTbsTb
	2072	16	210g	GbsCbsTbsAbsdTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdGsTbsGbsTbsTb
65	2284	15	211b	AbsGbsCbsdTsdTsdAsdTsdCsdCsdTsdAsdTsGbsAbsCb
	2284	15	211c	AbsGbsCbsdTsdTsdAsdTsdCsdCsdTsdAsTbsGbsAbsCb

(continúa)

5	2284	15	211d	AbsGbsCbsTbsdTsdAsdTsdCsdCsdTsdAsdTsdGbsAbsCb
	2285	14	212b	AbsGbsdCsdTsdTsdAsdTsdCsdCsdTsdAsTbsGbsAb
	2285	14	212c	AbsGbsCbsdTsdTsdAsdTsdCsdCsdTsdAsdTsdGbsAb
	2285	14	212d	AbsGbsCbsdTsdTsdAsdTsdCsdCsdTsdAsTbsGbsAb
10	2355	17	213b	CbsAbsGbsdGsdCsdAsdTsdTsdAsdTsdAsdTsdAsdTsdAsGbsTbsGb
	2355	17	213c	CbsAbsGbsGbsdCsdAsdTsdTsdAsdTsdAsdTsdAsdTsdAsGbsTbsGb
	2355	17	213d	CbsAbsGbsdGsdCsdAsdTsdTsdAsdTsdAsdTsdAsdTsdAsAbsGbsTbsGb
15	2355	17	213e	CbsAbsGbsGbsdCsdAsdTsdTsdAsdTsdAsdTsdAsdTsdAsAbsGbsTbsGb
	4217	16	218d	CbsAbsTbsdGsdAsdTsdGsdGsdAsdTsdCsdCsdAsGbsTbsAb
	4217	16	218e	CbsAbsTbsdGsdAsdTsdGsdGsdAsdTsdCsdCsAbsGbsTbsAb
20	4217	16	218f	CbsAbsTbsGbsdAsdTsdGsdGsdAsdTsdCsdCsdAsGbsTbsAb
	4217	16	218g	CbsAbsTbsGbsdAsdTsdGsdGsdAsdTsdCsdCsAbsGbsTbsAb
	4120	16	214	CbsTbsAbsdGsdGsdCsdGsdCsdCsdTsdCsdTsdAsTbsGbsCb
25	4121	14	215b	TbsAbsGbsdGsdCsdGsdCsdCsdTsdCsdTsAbsTbsGb
	4121	15	216b	CbsTbsAbsdGsdGsdCsdGsdCsdCsdTsdCsdTsAbsTbsGb
	4122	13	217b	TbsAbsGbsdGsdCsdGsdCsdCsdTsdCsdTsAbsTb

Tabla 3

SP	L	Seq ID No.	Secuencia, 5'-3'	
35	2064	16	209m	GbsTbsAbsGbsdTsdGsdTsdTsdTsdAsdTsdGsdGsdGsAbsGbsC*b
	2064	16	209n	GbsTbsAbsdGsdTsdGsdTsdTsdTsdAsdTsdGsdGsdGsAbsGbsC*b
	2064	16	209o	GbsTbsAbsdGsdTsdGsdTsdTsdTsdAsdTsdGsdGsdGsAbsGbsC*b
40	2064	16	209p	GbsTbsAbsdGsdTsdGsdTsdTsdTsdAsdTsdGsdGsGbsAbsGbsC*b
	2064	16	209q	GbsTbsAbsGbsdTsdGsdTsdTsdTsdAsdTsdGsdGsGbsAbsGbsC*b
	2064	16	209r	GbsTbsdAsdTsdGsdTsdTsdTsdAsdTsdGsdGsdGsAbsGbsC*b
45	429	15	152e	C*bsGbsAbsTbsdAsdC*sdGsdC*sdGsdTsdC*sdC*sAbsC*bsAb
	4217	16	-218j	C*bsAbsTbsdGsdAsdTsdGsdGsdAsdTsdC*sdC*sAbsGbsTbsAb
	2355	17	213f	C*bsAbsGbsdGsdC*sdAsdTsdTsdAsdTsdAsdTsdAsAbsGbsTbsGb
50	2355	17	213g	C*bsAbsGbsdGsdC*sdAsdTsdTsdAsdTsdAsdTsdAsdTsdAsGbsTbsGb
	432	12	155e	C*bsGbsdAsdTsdAsdTsdC*sdGsdC*sdGsdTsC*bsC*b
	4217	16	218h	C*bsAbsTbsGbsdAsdTsdGsdGsdAsdTsdC*sdC*sAbsGbsTbsAb
55	2072	16	210h	GbsC*bsTbsAbsdTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdTsdGsGbsTbsTb
	2072	16	210i	GbsC*bsdTsdAsdTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdTsdGsGbsTbsTb
	432	12	155f	C*bsGbsdAsdTsdAsdTsdC*sdGsdC*sdGsdTsdC*sC*b
60	2072	16	210j	GbsC*bsTbsdAsdTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdTsdGsTbsTb
	432	12	155g	C*bsdGsdAsdTsdAsdTsdC*sdGsdC*sdGsdTsC*bsC*b
65	431	13	153d	C*bsGbsAbsdTsdAsdTsdGsdC*sdGsdTsdC*sC*bsAb

(continúa)

5	429	15	152f	C*bsGbsAbsdTsdAsdC*sdGsdC*sdGsdTsdC*sdC*sAbsC*bsAb
	4217	16	218i	C*bsAbsTbsGbsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdC*sdC*sdAsGbsTbsAb
	1393	16	199f	GbsAbsTbsdGsdAsdC*sdAsdTsdGsdC*sdC*sdGsdC*sGbsTbsC*b
	2285	14	212e	AbsGbsC*bsdTsdTsdAsdTsdC*sdC*sdTsdAsdTbsGbsAb
10	355	14	143e	C*bsTbsdC*sdGsdTsdC*sdAsdTsdAsdGsdAsC*bsC*bsGb
	2072	16	210k	GbsC*bsTbsdAsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdGsdTsGbsTbsTb
	1393	16	199g	GbsAbsTbsdGsdAsdC*sdAsdTsdGsdC*sdC*sdGsC*bsGbsTbsC*b
15	2355	17	213h	C*bsAbsGbsGbsdC*sdAsdTsdTsdAsdAsdTsdAsdAsAbsGbsTbsGb
	429	15	152g	C*bsGbsAbsdTsdAsdC*sdGsdC*sdGsdTsdC*sC*bsAbsC*bsAb
	2285	14	212f	AbsGbsC*bsdTsdTsdAsdTsdC*sdC*sdTsdAsTbsGbsAb
20	355	14	143f	C*bsTbsC*bsdGsdTsdC*sdAsdTsdAsdGsdAsC*bsC*bsGb
	1393	16	199h	GbsAbsTbsGbsdAsdC*sdAsdTsdGsdC*sdC*sdGsC*bsGbsTbsC*b
	1393	16	199i	GbsAbsTbsGbsdAsdC*sdAsdTsdGsdC*sdC*sdGsdC*sGbsTbsC*b
25	4217	16	218k	C*bsAbsTbsdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdC*sdC*sdAsGbsTbsAb
	2285	14	212g	AbsGbsdC*sdTsdTsdAsdTsdC*sdC*sdTsdAsTbsGbsAb
	434	13	162d	TbsGbsGbsdC*sdGsdAsdTsdAsdC*sdGsdC*sGbsTb
30	383	14	148e	AbsGbsC*bsdC*sdC*sdC*sdGsdAsdC*sdC*sdC*sAbsTb
	431	13	153e	C*bsGbsdAsdTsdAsdC*sdGsdC*sdGsdTsC*bsC*bsAb
	2284	15	211e	AbsGbsC*bsdTsdTsdAsdTsdC*sdC*sdTsdAsdTbsAbsC*b
35	355	14	143g	C*bsTbsC*bsdGsdTsdC*sdAsdTsdAsdGsdAsdC*sC*bsGb
	2284	15	211f	AbsGbsC*bsdTsdTsdAsdTsdC*sdC*sdTsdAsTbsGbsAbsC*b
	383	14	148f	AbsGbsC*bsdC*sdC*sdC*sdGsdAsdC*sdC*sC*bsAbsTb
40	383	14	148g	AbsGbsdC*sdC*sdC*sdC*sdGsdAsdC*sdC*sC*bsAbsTb
	382	16	147g	C*bsAbsGbsdC*sdC*sdC*sdC*sdGsdAsdC*sdC*sdC*sAbsTbsGb
	2072	16	210m	GbsC*bsTbsdAsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdGsTbsGbsTbsTb
45	2072	16	210n	GbsC*bsTbsAbsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdGsTbsGbsTbsTb
	434	13	162e	TbsGbsdGsdC*sdGsdAsdTsdAsdC*sdGsC*bsGbsTb
	2284	15	211g	AbsGbsC*bsTbsdTsdAsdTsdC*sdC*sdTsdAsdTbsAbsC*b
50	382	16	147h	C*bsAbsGbsdC*sdC*sdC*sdC*sdGsdAsdC*sdC*sC*bsAbsTbsGb
	382	16	147i	C*bsAbsGbsC*bsdC*sdC*sdC*sdGsdAsdC*sdC*sdC*sAbsTbsGb
	382	16	147j	C*bsAbsGbsdC*sdC*sdC*sdC*sdGsdAsdC*sdC*sdC*sAbsTbsGb
55	2355	17	213i	C*bsAbsGbsGbsdC*sdAsdTsdTsdAsdAsdTsdAsdAsGbsTbsGb
	382	16	147k	C*bsAbsGbsC*bsdC*sdC*sdC*sdGsdAsdC*sdC*sC*bsAbsTbsGb

Oligonucleótidos antisentido preferidos

60 **[0192]** A continuación se describen oligonucleótidos antisentido preferidos de la presente invención.

[0193] Por lo tanto, la presente divulgación se dirige preferiblemente a un oligonucleótido antisentido en forma de un dispositivo de separación que consiste en de 10 a 28 nucleótidos, preferiblemente de 11 a 24 nucleótidos, más preferiblemente de 12 a 20, y aún más preferiblemente de 13 a 19 o de 14 a 18 nucleótidos y de 1 a 5 de estos nucleótidos en el extremo terminal 5' y de 1 a 5 nucleótidos en el extremo terminal 3' del oligonucleótido antisentido son nucleótidos LNA y entre los nucleótidos LNA en el extremo terminal 5' y el extremo terminal 3' está presente una

nucleótidos LNA en el extremo terminal 5' y el terminal 3' finaliza una secuencia de al menos 6, preferiblemente 7 y más preferiblemente 8 nucleótidos de ADN, y el oligonucleótido antisentido es capaz de hibridar con una región del gen que codifica el TGF-R_{II} o con una región del ARNm que codifica el TGF-R_{II}, en donde el oligonucleótido antisentido está representado por la siguiente secuencia 5'-N⁷-**AATGGACC**-N⁸-3' (Seq. ID No. 100), en donde

5 N⁷ representa: ATCTTGAATATCTCATG-, TCTTGAATATCTCATG-, CTTGAATATCTCATG-, TTGAATATCTCATG-, TGAATATCTCATG-, GAATATCTCATG-, AATATCTCATG-, ATATCTCATG-, TATCTCATG-, ATCTCATG-, TCTCATG-, CTCATG-, TCATG-, CATG-, ATG-, TG-, o G-;

N⁸ representa: -AGTATTCTAGAACTCA, -AGTATTCTAGAACTC, -AGTATTCTAGAACT, -AGTATTCTAGAAAC, -AGTATTCTAGAAA, -AGTATTCTAGAA, -AGTATTCTAGA, -AGTATTCTAG, -AGTATTCTA, -AGTATTCT, -AGTATTC, -AGTATT, -AGTAT, -AGTA, -AGT, -AG, o -A;

10 y sales e isómeros ópticos del oligonucleótido antisentido.

[0195] N⁷ y/o N⁸ también pueden representar cualquiera de las listas limitadas adicionales de residuos 3' y 5' como se describe en este documento. Oligonucleótidos antisentido de gápmero especialmente preferidos que se incluyen en la fórmula general S6:

15 5'-N⁷-**AATGGACC**-N⁸-3' (Seq. ID No. 100) S6
son los siguientes:

20	TATCTCAT GAATGGACCA	(Seq. ID No. 439)
	ATCTCAT GAATGGACCAG	(Seq. ID No. 440)
	TCTCAT GAATGGACCAGT	(Seq. ID No. 441)
	CTCAT GAATGGACCAGTA	(Seq. ID No. 442)
	TCAT GAATGGACCAGTAT	(Seq. ID No. 443)
25	CAT GAATGGACCAGTATT	(Seq. ID No. 444)
	AT GAATGGACCAGTATTC	(Seq. ID No. 445)
	T GAATGGACCAGTATTCT	(Seq. ID No. 446)
	GAATGGACCAGTATTCTA	(Seq. ID No. 447)
	ATCTCAT GAATGGACCA	(Seq. ID No. 448)
30	TCTCAT GAATGGACCAG	(Seq. ID No. 449)
	CTCAT GAATGGACCAGT	(Seq. ID No. 450)
	TCAT GAATGGACCAGTA	(Seq. ID No. 451)
	CAT GAATGGACCAGTAT	(Seq. ID No. 452)
	AT GAATGGACCAGTATT	(Seq. ID No. 453)
35	T GAATGGACCAGTATTC	(Seq. ID No. 454)
	GAATGGACCAGTATTCT	(Seq. ID No. 455)
	TCTCAT GAATGGACCA	(Seq. ID No. 456)
	CTCAT GAATGGACCAG	(Seq. ID No. 457)
	TCAT GAATGGACCAGT	(Seq. ID No. 458)
40	CAT GAATGGACCAGTA	(Seq. ID No. 459)
	AT GAATGGACCAGTAT	(Seq. ID No. 460)
	T GAATGGACCAGTATT	(Seq. ID No. 461)
	GAATGGACCAGTATTC	(Seq. ID No. 462)
	CTCAT GAATGGACCA	(Seq. ID No. 463)
45	TCAT GAATGGACCAG	(Seq. ID No. 464)
	CAT GAATGGACCAGT	(Seq. ID No. 465)
	AT GAATGGACCAGTA	(Seq. ID No. 466)
	T GAATGGACCAGTAT	(Seq. ID No. 467)
50	GAATGGACCAGTATT	(Seq. ID No. 468)
	TCAT GAATGGACCA	(Seq. ID No. 469)
	CAT GAATGGACCAG	(Seq. ID No. 470)
	AT GAATGGACCAGT	(Seq. ID No. 471)
	T GAATGGACCAGTA	(Seq. ID No. 472)
55	GAATGGACCAGTAT	(Seq. ID No. 473)

[0196] Los oligonucleótidos antisentido de fórmula S6 en forma de gápmeros (segmento 1 de LNA - segmento de ADN - segmento 2 de LNA) contienen un segmento de LNA en el extremo terminal 5' que consta de 2 a 5, preferiblemente de 2 a 4 unidades de LNA y contiene un segmento de LNA en el extremo terminal 3' que consta de 2 a 5, preferiblemente de 2 a 4 unidades de LNA y entre los dos segmentos de LNA un segmento de ADN que consiste de 6 a 14, preferiblemente de 7 a 12 y más preferiblemente de 8 a 11 unidades de ADN.

[0197] Los oligonucleótidos antisentido de fórmula S6 contienen los nucleótidos de LNA (unidades de LNA) tal como se describe en el presente documento, especialmente estos descritos en el capítulo "Locked Nucleic Acids (LNA®)" y, preferiblemente, se describen en el capítulo "LNA preferidos". Las unidades de LNA y las unidades de ADN

pueden comprender nucleobases estándar, como adenina (A), citosina (C), guanina (G), timina (T) y uracilo (U), pero también pueden contener nucleobases modificadas como se describe en el capítulo "Nucleobases". Los oligonucleótidos antisentido de fórmula **S6** o los segmentos de LNA y el segmento de ADN del oligonucleótido antisentido pueden contener cualquier enlace internucleotídico como se describe en el presente documento y especialmente estos descritos en el capítulo "Enlaces de nucleótidos (IL)". Los oligonucleótidos antisentido de fórmula **S6** también pueden contener opcionalmente grupos terminales en el extremo terminal 3' y/o el extremo terminal 5' y especialmente estos descritos en el capítulo "Grupos terminales".

[0198] Los experimentos han demostrado que las nucleobases modificadas no aumentan o cambian considerablemente la actividad de los oligonucleótidos antisentido de la invención con respecto a las indicaciones neurológicas y oncológicas probadas. Se ha demostrado que las nucleobases 5-metilcitosina o 2-aminoadenina aumentan aún más la actividad de los oligonucleótidos antisentido de fórmula **S6**, especialmente si se usa 5-metilcitosina en los nucleótidos de LNA solo o en los nucleótidos de LNA y en los nucleótidos de ADN y/o si se usa 2-aminoadenina en los nucleótidos de ADN y no en los nucleótidos de LNA.

[0199] La estructura gámpero preferida de los oligonucleótidos antisentido de fórmula **S6** es la siguiente: 3-8-3, 4-8-2, 2-8-4, 3-8-4, 4-8-3, 4-8-4, 3-9-3, 4-9-2, 2-9-4, 4-9-3, 3-9-4, 4-9-4, 3-10-3, 2-10-4, 4-10-2, 3-10-4, 4-10-3, 4-10-4, 2-11-4, 4-11-2, 3-11-4, 4-11-3 y aún más preferido: 3-8-3, 3-8-4, 4-8-3, 4-8-4, 3-9-3, 4-9-3, 3-9-4, 4-9-4, 3-10-3, 3-10-4, 4-10-3, 4-10-4, 3-11-4 y 4-11-3.

[0200] Como unidades de LNA para los oligonucleótidos antisentido de fórmula **S6**, especialmente β -D-oxi-LNA (**b**¹), β -D-tio-LNA (**b**²), α -L-oxi-LNA (**b**⁴), β -D-ENA (**b**⁵), β -D-(NH)-LNA (**b**⁶), β -D-(NCH₃)-LNA (**b**⁷), β -D-(ONH)-LNA (**b**⁸) y β -D-(ONCH₃)-LNA (**b**⁹) se prefieren. Los experimentos han demostrado que todas estas unidades LNA **b**¹, **b**², **b**⁴, **b**⁵, **b**⁶, **b**⁷, **b**⁸ y **b**⁹ se pueden sintetizar con el esfuerzo requerido y conducen a oligonucleótidos antisentido de estabilidad y actividad comparables. Sin embargo, en base a los ejemplos, las unidades de LNA **b**¹, **b**², **b**⁴, **b**⁵, **b**⁶ y **b**⁷ son más preferidas. Aún más preferidas son las unidades de LNA **b**¹, **b**², **b**⁴, **b**⁶ y **b**⁷, e incluso más preferidas son las unidades de LNA **b**¹ y **b**⁴ y las más preferidas también en relación con la complejidad de la síntesis química es la β -D-oxi LNA (**b**¹).

[0201] Hasta ahora no se pudo encontrar ningún grupo terminal 3' especial o grupo terminal 5' que haya cambiado o aumentado de manera notable la estabilidad o la actividad de las indicaciones oncológicas o neurológicas, de modo que los grupos finales 3' y 5' son posibles pero no se prefieren explícitamente.

[0202] Son posibles varios puentes internucleotídicos o enlaces internucleotídicos. En las fórmulas descritas en el presente documento, el enlace internucleotídico IL está representado por -IL'-Y-. Por lo tanto, IL = -IL'-Y- = -X"-P(=X')(X-)-Y-, en donde IL se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en: -O-P(O)(O')-O-, -O-P(O)(S')-O-, -O-P(S)(S')-O-, -S-P(O)(O')-O-, -S-P(O)(S')-O-, -O-P(O)(O')-S-, -O-P(O)(S')-S-, -S-P(O)(O')-S-, -O-P(O)(CH₃)-O-, -O-P(O)(OCH₃)-O-, -O-P(O)(NH(CH₃))-O-, -O-P(O)[N(CH₃)₂]-O-, -O-P(O)(BH₃)-O-, -O-P(O)(OCH₂CH₂OCH₃)-O-, -O-P(O)(OCH₂CH₂SCH₃)-O-, -O-P(O)(O')-N(CH₃)-, -N(CH₃)-P(O)(O')-O-. Se prefieren los enlaces internucleotídicos IL seleccionados de -O-P(O)(O')-O-, -O-P(O)(S')-O-, -O-P(S)(S')-O-, -S-P(O)(O')-O-, -S-P(O)(S')-O-, -O-P(O)(O')-S-, -O-P(O)(S')-S-, -S-P(O)(O')-S-, -O-P(O)(OCH₃)-O-, -O-P(O)(NH(CH₃))-O-, -O-P(O)[N(CH₃)₂]-O-, -O-P(O)(OCH₂CH₂OCH₃)-O-, y una selección más preferida de -O-P(O)(O')-O-, -O-P(O)(S')-O-, -O-P(S)(S')-O-, -S-P(O)(O')-O-, -S-P(O)(S')-O-, -O-P(O)(O')-S-, -O-P(O)(S')-S-, -S-P(O)(O')-S-, y aún más preferido seleccionado de -O-P(O)(O')-O-, -O-P(O)(S')-O-, -O-P(S)(S')-O-, y lo más preferiblemente seleccionado de -O-P(O)(O')-O- y -O-P(O)(S')-O-.

[0203] Por lo tanto, la presente invención se dirige preferiblemente a un oligonucleótido antisentido en forma de un hueco que consta de 10 a 28 nucleótidos, preferiblemente de 11 a 24 nucleótidos, más preferiblemente de 12 a 20, y aún más preferiblemente de 13 a 19 o de 14 a 18 nucleótidos y 1 a 5 de estos nucleótidos en el extremo terminal 5' y 1 a 5 nucleótidos en el extremo terminal 3' del oligonucleótido antisentido son nucleótidos LNA y entre los nucleótidos LNA en el extremo terminal 5' y el terminal 3' finaliza una secuencia de al menos 6, preferiblemente 7 y más preferiblemente 8 nucleótidos de ADN, y el oligonucleótido antisentido es capaz de hibridar con una región del gen que codifica el TGF-R_{II} o con una región del ARNm que codifica el TGF-R_{II}, donde el oligonucleótido antisentido está representado por la siguiente secuencia 5'-N⁷-**AATGGACC**-N⁸-3' (Seq. ID No. 100), en donde

N⁷ representa: ATCTTGAATATCTCATG-, TCTTGAATATCTCATG-, CTTGAATATCTCATG-, TTGAATATCTCATG-, TGAATATCTCATG-, GAATATCTCATG-, AATATCTCATG-, ATATCTCATG-, TATCTCATG-, ATCTCATG-, TCTCATG-, CTCATG-, TCATG-, CATG-, ATG-, TG-, o G-; y

N⁸ representa: -AGTATTCTAGAACTCA, -AGTATTCTAGAACTC, -AGTATTCTAGAACT, -AGTATTCTAGAAAC, -AGTATTCTAGAAA, -AGTATTCTAGAA, -AGTATTCTAGA, -AGTATTCTAG, -AGTATTCTA, -AGTATTCT, -AGTATTC, -AGTATT, -AGTAT, -AGTA, -AGT, -AG, o -A; y

los nucleótidos de LNA se seleccionan de β -D-oxi-LNA (**b**¹), β -D-tio-LNA (**b**²), α -L-oxi-LNA (**b**⁴), β -D-ENA (**b**⁵), β -D-(NH)-LNA (**b**⁶), β -D-(NCH₃)-LNA (**b**⁷), β -D-(ONH)-LNA (**b**⁸) y β -D-(ONCH₃)-LNA (**b**⁹); y preferiblemente de β -D-oxi-LNA (**b**¹), β -D-tio-LNA (**b**²), α -L-oxi-LNA (**b**⁴), β -D-(NH)-LNA (**b**⁶), y β -D-(NCH₃)-LNA (**b**⁷); y

los enlaces internucleotídicos se seleccionan de -O-P(O)(O')-O-, -O-P(O)(S')-O-, -O-P(S)(S')-O-, -S-P(O)(O')-O-, -S-P(O)(S')-O-, -O-P(O)(O')-S-, -O-P(O)(S')-S-, -S-P(O)(O')-S-, -O-P(O)(CH₃)-O-, -O-P(O)(OCH₃)-O-, -O-P(O)(NH(CH₃))-O-, -O-P(O)[N(CH₃)₂]-O-, -O-P(O)(BH₃)-O-, -O-P(O)(OCH₂CH₂OCH₃)-O-, -O-P(O)(OCH₂CH₂SCH₃)-O-

O-, -O-P(O)(O⁻)-N(CH₃)-, -N(CH₃)-P(O)(O⁻)-O-;
y preferiblemente de -O-P(O)(O⁻)-O-, -O-P(O)(S⁻)-O-, -O-P(S)(S⁻)-O-, -S-P(O)(O⁻)-O-, -S-P(O)(S⁻)-O-, -O-P(O)(O⁻)-S-,
-O-P(O)(S⁻)-S-, -S-P(O)(O⁻)-S-;

5 y sales e isómeros ópticos del oligonucleótido antisentido. Tales oligonucleótidos antisentido preferidos pueden no contener ningún extremo terminal 3' y 5' modificado o pueden no contener ningún grupo terminal 3' y 5' y pueden contener nucleobase modificada como 5-metilcitosina y/o 2-aminoadenina.

10 **[0204]** Más preferiblemente, N⁷ representa: CTTGAATATCTCATG-, TTGAATATCTCATG-, TGAATATCTCATG-, GAATATCTCATG-, AATATCTCATG-, ATATCTCATG-, TATCTCATG-, ATCTCATG-, TCTCATG-, CTCATG-, TCATG-, CATG-, ATG-, TG-, o G-; y
N⁸ representa: -AGTATTCTAGAACT, -AGTATTCTAGAAAC, -AGTATTCTAGAAA, -AGTATTCTAGAA, -AGTATTCTAGA, -AGTATTCTAG, -AGTATTCTA, -AGTATTCT, -AGTATTC, -AGTATT, -AGTAT, -AGTA, -AGT, -AG, o -A.

15 **[0205]** Todavía más preferido, la presente invención se dirige a un oligonucleótido antisentido en forma de un dispositivo de separación que consta de 11 a 24 nucleótidos, más preferiblemente de 12 a 20, y aún más preferiblemente de 13 a 19 o de 14 a 18 nucleótidos y de 2 a 5 de estos nucleótidos en el extremo terminal 5' y 2 a 5 nucleótidos en el extremo terminal 3' del oligonucleótido antisentido son nucleótidos LNA y entre los nucleótidos LNA en el extremo terminal 5' y el extremo terminal 3' una secuencia de al menos 7, preferiblemente al menos 8
20 nucleótidos de ADN están presentes, y el oligonucleótido antisentido es capaz de hibridar con una región del gen que codifica el TGF-R_{II} o con una región del ARNm que codifica el TGF-R_{II}, en donde el oligonucleótido antisentido está representado por la siguiente secuencia 5'-N⁷-**AATGGACC**-N⁸-3' (Seq. ID No. 100), en donde

25 N⁷ representa: GAATATCTCATG-, AATATCTCATG-, ATATCTCATG-, TATCTCATG-, ATCTCATG-, TCTCATG-, CTCATG-, TCATG-, CATG-, ATG-, TG-, o G-; preferiblemente N⁷ representa: ATATCTCATG-, TATCTCATG-, ATCTCATG-, TCTCATG-, CTCATG-, TCATG-, CATG-, ATG-, TG-, o G-; y

30 N⁸ representa: -AGTATTCTAGAA, -AGTATTCTAGA, -AGTATTCTAG, -AGTATTCTA, -AGTATTCT, -AGTATTC, -AG-TATT, -AGTAT, -AGTA, -AGT, -AG, o -A; preferiblemente N⁸ representa: -AGTATTCTAG, -AGTATTCTA, -AGTATTCT, -AGTATTC, -AGTATT, -AGTAT, -AGTA, -AGT, -AG, o -A; y los nucleótidos de LNA se seleccionan de β-D-oxi-LNA (b¹), β-D-tio-LNA (b²), α-L-oxi-LNA (b⁴), β-D-(NH)-LNA (b⁶) y β-D-(NCH₃)-LNA (b⁷); y

35 los enlaces internucleotídicos se seleccionan de -O-P(O)(O⁻)-O-, -O-P(O)(S⁻)-O-, -O-P(S)(S⁻)-O-, -S-P(O)(O⁻)-O-, -S-P(O)(S⁻)-O-, -O-P(O)(O⁻)-S-, -O-P(O)(S⁻)-S-, -S-P(O)(O⁻)-S-; y preferiblemente seleccionados de fosfato, fosforotioato y fosforoditioato;

y sales e isómeros ópticos del oligonucleótido antisentido. Tales oligonucleótidos antisentido preferidos pueden no contener ningún extremo terminal 3' y 5' modificado o pueden no contener ningún grupo terminal 3' y 5' y pueden contener nucleobase modificada como 5-metilcitosina y/o 2-aminoadenina.

40 **[0206]** Se prefieren especialmente los oligonucleótidos antisentido gápmo de Seq. ID No. 439 a Seq. ID No. 473 que contiene un segmento de 2 a 5, preferiblemente de 2 a 4 y más preferiblemente de 3 a 4 unidades de LNA en el extremo 3' y un segmento de 2 a 5, preferiblemente de 2 a 4 y más preferiblemente de 3 a 4 unidades de LNA en el extremo 5' y un segmento de al menos 6, preferiblemente 7 y más preferiblemente 8 unidades de ADN entre los dos segmentos de unidades de LNA, en donde las unidades de LNA se seleccionan de β-D-oxi-LNA (b¹), β-D-tio-LNA (b²), α-L-oxi-LNA (b⁴), β-D-(NH)-LNA (b⁶) y β-D-(NCH₃)-LNA (b⁷) y los enlaces internucleotídicos se seleccionan a partir de fosfato, fosforotioato y fosforoditioato. Dichos oligonucleótidos antisentido preferidos no pueden contener ningún extremo terminal 3' y 5' modificado o pueden no contener ningún grupo terminal 3' y 5' y pueden contener
45 nucleobase como la 5-metilcitosina en las unidades de LNA, preferiblemente todas las unidades de LNA y/o 2-aminoadenina en algunas o todas las unidades de ADN y/o 5-metilcitosina en algunas o todas las unidades de ADN.

[0207] También se prefieren especialmente los oligonucleótidos antisentido de la Tabla 8 (Seq. ID No. 219a a 231b).

Tabla 4-9

SP	L	Seq ID No.	Secuencia, 5'·3'
4220	10	219a	Gb ¹ sAb ¹ sdAsdTsdGsdGsdAsdCsC ^b 'sAb ¹
4220	10	219b	Gb ¹ Ab ¹ dAdTdGdGdAdCC ^b 'Ab ¹
4219	12	220a	Tb ¹ sGb ¹ sAb ¹ sdAsdTsdGsdGsdAsdCsC ^b 'b ¹ sAb ¹ sGb ¹
4219	12	220b	Tb ¹ Gb ¹ Ab ¹ dAdTdGdGdAdCC ^b 'Ab ¹ Gb ¹
4219	12	220c	Tb ¹ sGb ¹ sAb ¹ sdAsdTsdGsdGsdAsdCsC ^b 'sAb ¹ sGb ¹
4219	12	220d	Tb ¹ sdGsdA [*] sdAsdTsdGsdGsdAsdC [*] sdCsAb ¹ sGb ¹
4219	12	220e	Tb ¹ sGb ¹ sdA [*] sdA [*] sdTsdGsdGsdA [*] sdC [*] sdC [*] sdAsGb ¹
4218	13	221a	Tb ¹ sGb ¹ sAb ¹ sAb ¹ sdTsdGsdGsdAsdCsAb ¹ sGb ¹ sTb ¹
4218	13	221b	Tb ¹ Gb ¹ Ab ¹ Ab ¹ dUdGdGdAdCdCAB ¹ Gb ¹ Tb ¹
4218	13	221c	Tb ¹ sGb ¹ sAb ¹ sAb ¹ sdTsdGsdGsdAsdCsC [*] sAb ¹ sGb ¹ sTb ¹
4218	13	221d	Tb ¹ sGb ¹ sAb ¹ sdAsdTsdGsdGsdA [*] sdCsC [*] sdAsGb ¹ sTb ¹
4218	13	221e	Tb ¹ sGb ¹ sdA [*] sdAsdTsdGsdGsdAsdC [*] sdCsAsdGsTb ¹
4218	13	221f	Tb ¹ sdGsdAsdA [*] sdTsdGsdGsdAsdCsC ^b 'sAb ¹ sGb ¹ sTb ¹
4218	14	222a	Ab ¹ sTb ¹ sGb ¹ sAb ¹ sdAsdTsdGsdGsdAsdCsC ^b 'sAb ¹ sGb ¹ sTb ¹
4218	14	222b	Ab ¹ Tb ¹ Gb ¹ Ab ¹ dAdTdGdGsdGsdAsdCsC [*] sAb ¹ Gb ¹ Tb ¹
4218	14	222c	Ab ¹ Tb ¹ dGdA [*] dAdTdGdGdA [*] dCC ^b 'Ab ¹ Gb ¹ Tb ¹
4218	14	222d	Ab ⁴ sTb ⁴ sGb ⁴ sdA [*] sdAsdTsdGsdGsdAsdCsC [*] sAbsGb ⁴ sTb ⁴
4218	14	222e	Ab ¹ sdTsdGsdA [*] sdA [*] sdTsdGsdGsdA [*] sdC [*] sdA [*] sdGsTb ¹
4218	14	222f	Ab ² sTb ² sGb ² sdA [*] sdAsdUsdGsdGsdAsdCsAb ² sGb ² sTb ²
4218	14	222g	Ab ⁴ ssTb ⁴ ssdGssdAssdTssdGssdGssdAssdCsAb ⁴ ssGb ⁴ ssTb ⁴
4217	15	223a	Ab ¹ sTb ¹ sGb ¹ sAb ¹ sdAdTdGdGdAdCdC [*] sAb ¹ sGb ¹ sTb ¹ sAb ¹
4217	15	223b	Ab ¹ ssTb ¹ ssdGssdAssdTssdGssdGssdAssdCsAsdCsAsdGssdTssdAb ¹
4217	15	223c	Ab ¹ dTdGdAdAdTdGdGdAdCdCdAdGdTAB ¹
4217	15	223d	Ab ¹ sTb ¹ sdGsdAsdAsdUsdGsdGsdA [*] sdCsCsdAsGb ¹ sTb ¹ sAb ¹
4217	15	223e	Ab ⁶ Tb ⁶ Gb ⁶ dA [*] dAdTdGdGdAdCdC [*] dAGb ⁶ Tb ⁶ Ab ⁶

(continúa)

4217	15	223f	Ab¹Tb¹dGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdC[*]sdC[*]sAb¹Gb¹Tb¹Ab¹
4217	15	223g	Ab⁴sTb⁴sGb⁴sdAsdAsdTsdCsdGsdAsdCsdCsdAsdGsTb⁴sAb⁴
4217	15	223h	Ab¹sTb¹sGb¹sAb¹sdAsdTsdGsdGsdAsdC[*]sdC[*]sdAsdGsdTsAb¹
4217	15	223i	Ab¹ssTb¹ssdGssdAssdAssdUssdGssdGssdA[*]ssdCssdCssdAssdGssTb¹ssAb¹
4217	16	218y	C[*]b²sAb²sTb²sdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsAb²sGb²sTb²sAb²
4217	16	218z	C[*]b¹sAb¹sTb¹sdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdC[*]sdC[*]sAb¹sGb¹sTb¹sAb¹
4217	16	218aa	C[*]b¹ssAb¹ssTb¹ssdGssdAssdAssdTssdGssdGssdAssdCssdCssdAssdAb¹ssGb¹ssTb¹ssAb¹
4217	16	218ab	C[*]b¹Ab¹Tb¹dGsdAsdAsdUsdGsdGsdAsdC[*]sdC[*]sAb¹Gb¹Tb¹Ab¹
4217	16	218ac	C[*]b¹Ab¹Tb¹dGsdA[*]sdA[*]sdTsdGsdGsdA[*]sdCsdCsAb¹Gb¹Tb¹Ab¹
4217	16	218ad	C[*]b⁶sAb⁶sTb⁶sdGsdAdAdTdGsdGsdAdCdCAb⁶sGb⁶sTb⁶sAb⁶
4217	16	218ae	C[*]b⁷sAb⁷sTb⁷sGb⁷sdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsdAsGb⁷sTb⁷sAb⁷
4217	16	218af	C[*]bs¹Ab¹sdUsdGsdAsdAsdUsdGsdGsdUsdCsdCsAb¹sGb¹sTb¹sAb¹
4217	16	218b	C[*]b¹sAb¹sTb¹sdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsAb¹sGb¹sTb¹sAb¹
4217	16	218m	C[*]b¹sAb¹sTb¹sdCsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdC[*]sdC[*]sAb¹sGb¹sTb¹sAb¹
4217	16	218n	C[*]b¹Ab¹Tb¹dGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdC[*]sdC[*]sAb¹Gb¹Tb¹Ab¹
4217	16	218o	C[*]b¹sAb¹sTb¹sdGsdA[*]sdA[*]sdTsdGsdGsdA[*]sdCsdCsAb¹sGb¹sTb¹sAb¹
4217	16	218p	C[*]b¹sAb¹sTb¹sdGsdA[*]sdA[*]sdTsdGsdGsdA[*]sdC[*]sdC[*]sAb¹sGb¹sTb¹sAb¹
4217	16	218q	C[*]b¹sAb¹sTb¹sdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdC[*]sdCsdCsAb¹sGb¹sTb¹sAb¹
4217	16	218c	C[*]b¹sAb¹sTb¹sdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdC[*]sAb¹sGb¹sTb¹sAb¹
4217	16	218r	C[*]b¹Ab¹Tb¹dGsdAdAdTdGsdAdCdCAb¹Gb¹Tb¹Ab¹
4217	16	218s	C[*]b¹sAb¹sTb¹sdGsdAdAdTdGsdAdC[*]sdC[*]sAb¹sGb¹sTb¹sAb¹
4217	16	218t	/5SpC3s/C[*]b¹sAb¹sTb¹sdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsAb¹sGb¹sTb¹sAb¹

(continúa)

4217	16	218u	C*b¹sAb¹sTb¹sdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsAb¹sGb¹sTb¹sAb¹/3SpC3s/
4217	16	218v	/5SpC3s/C*b¹sAb¹sTb¹sdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsAb¹sGb¹sTb¹sAb¹sAb¹/3SpC3s/
4217	16	218ag	C*b¹sAb¹sTb¹sdGsdA*sdA*sdUsdGsdGsdA*sdCsdCsAb¹sGb¹sTb¹sAb¹
4217	16	218ah	C*b⁴ssAb⁴ssTb⁴ssdGssdA*ssdA*ssdTssdGssdGssdA*ssdCssdAssdGssTb⁴ssAb⁴
4217	16	218ai	C*b²ssAb²ssTb²ssGb²ssdAssdAssdTssdGssdGssdAssdCssdCssdAssdGssdTssAb²
4217	16	218aj	C*b¹Ab¹Tb¹Gb¹dAdAdUdGdAdCdCAb¹Gb¹Tb¹Ab¹
4217	16	218ak	C*b¹sAb¹sTb¹sGb¹sAb¹sdA*sdUsdGsdCsdAsdCsdA*sGb¹sTb¹sAb¹
4217	16	218am	C*b¹sAb¹sdUsdGsdAsdUsdGsdGsdAsdCsC*b¹sAb¹sGb¹sTb¹sAb¹
4217	16	218an	C*b⁶sAb⁶sTb⁶sGb⁶sAb⁶sdA*sdGsdGsdAsdCsdAsGb⁶sTb⁶sAb⁶
4217	16	218ao	C*b⁷sAb⁷sTb⁷sdGsdA*sdA*sdUsdGsdAsdCsdA*sGb⁷sTb⁷sAb⁷
4217	16	218ap	C*b⁴sAb⁴sTb⁴sGb⁴sdA*sdAsdTsdGsdGsdAsdCsdC*sdAsdGsTb⁴sAb⁴
4217	16	218aq	C*b⁴Ab⁴Tb⁴Gb⁴dAdAdTdgDgAdCdCdAdGTb⁴Ab⁴
4217	16	218ar	C*b¹sAb¹sTb¹sdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsAb¹sTb¹sAb¹
4216	17	224a	C*b¹sAb¹sTb¹sGb¹sAb¹sdAsdTsdGsdGsdAsdCsAb¹sTb¹sAb¹sTb¹
4216	17	224b	C*b²sAb²sTb²sdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsAb²sGb²sTb²sAb²sTb²
4216	17	224c	C*b¹sAb¹sTb¹sGb¹sdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsAb¹sTb¹
4216	17	224d	C*b¹sdAsdUsdGsdAsdUsdGsdGsdAsdC*sdC*sAb¹sGb¹sTb¹sAb¹sTb¹
4216	17	224e	C*b¹sAb¹sTb¹sdGsdA*sdA*sdTsdGsdGsdA*sdC*sdC*sAb¹sGb¹sTb¹sAb¹sTb¹
4216	17	224f	C*b¹Ab¹dTdGdAdAdTdGdAdCdCdAGb¹Tb¹Ab¹Tb¹

(continua)

4216	17	224g	C*b ¹ sdAsdTsdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsdAsdGsb ¹ sAb ¹ sTb ¹
4216	17	224h	C*b ¹ Ab ¹ Tb ¹ Gb ¹ Ab ¹ dA ¹ dAdGdGdA ¹ dC ¹ dAdGdTAb ¹ Tb ¹
4216	17	224i	C*b ¹ ssAb ¹ ssTb ¹ ssGb ¹ ssAb ¹ ssdTsdGsdGsdAsdCsdCsdAsdGsb ¹ sAb ¹ sTb ¹
4216	17	224j	C*b ⁴ Ab ⁴ Tb ⁴ dGdA ⁴ dA ⁴ dTdGdGdA ⁴ dCdCdAGb ⁴ Tb ⁴ Ab ⁴ Tb ⁴
4216	17	224k	C*b ⁶ sAb ⁶ sTb ⁶ sdGsdA ⁶ sdA ⁶ sdUsdGsdGsdA ⁶ sdC ⁶ sdC ⁶ sdAsdGsTb ⁶ sAb ⁶ sTb ⁶
4216	17	224m	C*b ⁷ sAb ⁷ sTb ⁷ sGb ⁷ sdAdAdTdGdGdAdC ⁷ dAsGb ⁷ sTb ⁷ sAb ⁷ sTb ⁷
4216	18	225a	Tb ¹ sC*b ¹ sAb ¹ sTb ¹ sGb ¹ sdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsAb ¹ sGb ¹ sTb ¹ sAb ¹ sTb ¹
4216	18	225b	Tb ⁷ sC*b ⁷ sAb ⁷ sTb ⁷ sGb ⁷ sdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsdAsdTsdAsTb ⁷
4216	18	225c	Tb ¹ sC*b ¹ sAb ¹ sTb ¹ sdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdC ¹ sdC ¹ sdAsGb ¹ sTb ¹ sAb ¹ sTb ¹
			sTb ¹
4216	18	225d	Tb ¹ sC*b ¹ sAb ¹ sdTsdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsdAsGb ¹ sTb ¹ sAb ¹ sTb ¹
4216	18	225e	Tb ¹ sC*b ¹ sAb ¹ sTb ¹ sdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsdAsdGsTb ¹ sAb ¹ sTb ¹
4216	18	225f	Tb ¹ C*b ¹ dA ¹ dTdGdAdAdUdGdAdCdC ¹ Ab ¹ Gb ¹ Tb ¹ Ab ¹ Tb ¹
4216	18	225g	Tb ⁴ C*b ⁴ Ab ⁴ Tb ⁴ sdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsAb ⁴ Gb ⁴ Tb ⁴ Ab ⁴ Tb ⁴
4216	18	225h	Tb ¹ ssC*b ¹ ssAb ¹ ssdTsdGsdGsdA ¹ ssdTsdGsdGsdAsdCsdCsdAsdGsb ¹ sAb ¹ sTb ¹
4216	18	225i	Tb ² C*b ² Ab ² dTdGdAdAdTdGdAdC ² dC ² Ab ² Gb ² Tb ² Ab ² Tb ²
4215	19	226a	Tb ¹ sC*b ¹ sAb ¹ sTb ¹ sGb ¹ sdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsAb ¹ sGb ¹ sTb ¹ sAb ¹ sTb ¹
4215	19	226b	Tb ⁶ C*b ⁶ Ab ⁶ Tb ⁶ Gb ⁶ dAdAdTdGdAdCdCdAGb ⁶ Tb ⁶ Ab ⁶ Tb ⁶ Tb ⁶
4215	19	226c	Tb ¹ sC*b ¹ sAb ¹ sTb ¹ sdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsdAsdGsb ¹ sAb ¹ sTb ¹ sTb ¹

(continúa)

4215	19	226d	$Tb^1sdCsdAsdTsdGsdAsdA^*sdUsdGsdGsdAsdCsdCsdAsGb^1sTb^1sAb^1sTb^1sTb^1$
4215	19	226e	$Tb^4sC^*b^4sdAsdUsdGsdAsdAsdUsdGsdGsdAsdCsdC^*sdAsdGsTb^4sAb^4sTb^4sTb^4$
4215	19	226f	$Tb^c ssC^*b^c ssAb^c sTb^c ssGb^c ssdAssdAssdTssdGssdGssdAssdCssdCssdAssdGssdTssdAssTb^2 ssTb^2$
4215	20	227a	$C^*b^1sTb^1sC^*b^1sAb^1sTb^1sdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsdAsGb^1sTb^1sAb^1sTb^1sTb^1$
4215	20	227b	$C^*b^2sTb^2sC^*b^2sdAsdTsdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsdAsGb^2sTb^2sAb^2sTb^2sTb^2$
4215	20	227c	$C^*b^1Tb^1C^*b^1dAdTdGdAdAdTdGdAdAdC^*dAdGTb^1Ab^1Tb^1Tb^1$
4215	20	227d	$C^*b^1sdUsdCsdAsdTsdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsdAsGb^1sTb^1sAb^1sTb^1sTb^1$
4215	20	227e	$C^*b^4sTb^4sC^*b^4sAb^4sdTsdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsdAsdGsTb^4sAb^4sTb^4sTb^4$
4214	22	228a	$Tb^1sC^*b^1sTb^1sC^*b^1sAb^1sdTsdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsdAsdGsTb^1sAb^1sTb^1sTb^1sC^*b^1$
4214	22	228b	$Tb^1C^*b^1Tb^1C^*b^1Ab^1dTdGdAdAdTdGdGdAdC^*dAdGTb^1Ab^1Tb^1Tb^1C^*b^1$
4214	22	228c	$Tb^b sC^*b^b sTb^b sdCsdAsdTsdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsdAsdGsTb^b sAb^b sTb^b sTb^b sC^*b^b$
4213	24	229a	$Ab^1sTb^1sC^*b^1sTb^1sC^*b^1sdAsdTsdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdC^*sdCsdAsdGsdTsAb^1sTb^1sTb^1sC^*b^1sTb^1$
4213	24	229b	$Ab^1Tb^1C^*b^1Tb^1C^*b^1AdTdGdAdAdTdGdGdAdCdCdAdGdTAb^1Tb^1Tb^1C^*b^1Tb^1$

(continúa)

5						
10						
15						
20						
25						
30						
35						
40	4212	26	230a			Tb ¹ sAb ¹ sTb ¹ sC*b ¹ sTb ¹ sdCsdAsdTsdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsdAs dGsdTsdAsTb ¹ sTb ¹ sC*b ¹ sTb ¹ sAb ¹
45	4212	26	230a			Tb ¹ sAb ¹ sTb ¹ sC*b ¹ sTb ¹ sdCsdAsdTsdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsdAs dGsdTsdAsTb ¹ sTb ¹ sC*b ¹ sTb ¹ sAb ¹
50	4212	26	230b			Tb ¹ Ab ¹ Tb ¹ C*b ¹ Tb ¹ dCdAdTdGdAdAdTdGdGdAdCdCdAdGdTdTb ¹ Tb ¹ C*b ¹ Tb ¹ Ab ¹
	4211	28	231a			Ab ¹ sTb ¹ sAb ¹ sTb ¹ sC*b ¹ sdTsdCsdAsdTsdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCs dAsdGsdTsdAsTb ¹ sTb ¹ sC*b ¹ sTb ¹ sAb ¹ sGb ¹
	4211	28	231b			Ab ¹ Tb ¹ Ab ¹ Tb ¹ C*b ¹ dTdCdAdTdGdAdAdTdGdGdAdCdCdAdGdTdTb ¹ Tb ¹ C*b ¹ Tb ¹ Ab ¹ Gb ¹

Composiciones farmacéuticas

55 **[0208]** Los oligonucleótidos antisentido de la presente invención se administran preferiblemente en forma de sus
 sales farmacéuticamente activas, opcionalmente usando portadores, excipientes, adyuvantes, disolventes o
 diluyentes farmacéuticamente aceptables sustancialmente no tóxicos. Los medicamentos de la presente invención
 se preparan en un vehículo o diluyente sólido o líquido convencional y un adyuvante convencional de fabricación
 60 farmacéutica a un nivel de dosificación adecuado de una manera conocida. Las preparaciones y formulaciones
 preferidas son en forma administrable que es adecuada para infusión o inyección (intratecal, intracerebroventricular,
 intracraneal, intravenosa, intraparenquimática, intratumoral, intra o extraocular, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea), administración local en el cerebro, inhalación, administración local en un
 tumor sólido o aplicación oral. Sin embargo, también son posibles otras formas de aplicación tales como la absorción
 a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (mucosa oral, revestimientos epiteliales rectales y vaginales,
 65 mucosa nasofaríngea, mucosa intestinal), rectal, transdérmica, tópica, intradérmica, intragástrica, intracutánea,
 intravaginal, intravascularmente, intrabucalmente, de forma espontánea, sublingual, o cualquier otro medio disponible

dentro de las técnicas farmacéuticas.

Las formulaciones administrables, por ejemplo, incluyen formulaciones líquidas inyectables, formulaciones retardantes, polvos especialmente para inhalación, píldoras, tabletas, comprimidos de película, tabletas recubiertas, gránulos dispersables, grageas, geles, jarabes, suspensiones, emulsiones, cápsulas y depósitos. Otras formulaciones galénicas administrables también son posibles como una inyección continua a través de una bomba implantable o un catéter en el cerebro.

[0209] Como se usa en el presente documento, el término "farmacéuticamente aceptable" se refiere a cualquier vehículo que no interfiera con la eficacia de la actividad biológica de los oligonucleótidos antisentido como ingrediente activo en la formulación y que no sea tóxico para el huésped al que se administra. Ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados son bien conocidos en la técnica e incluyen soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones de aceite/agua, diversos tipos de agentes humectantes, soluciones estériles, etc. Tales vehículos pueden formularse por métodos convencionales y el compuesto activo se puede administrar al sujeto en una dosis efectiva.

Una "dosis efectiva" se refiere a una cantidad del oligonucleótido antisentido como ingrediente activo que es suficiente para afectar el curso y la gravedad de la enfermedad, lo que lleva a la reducción o remisión de dicha patología. Una "dosis efectiva" útil para tratar y/o prevenir estas enfermedades o trastornos puede determinarse usando métodos conocidos por los expertos en la técnica. Además, los oligonucleótidos antisentido de la presente invención pueden mezclarse y administrarse junto con liposomas, agentes formadores de complejos, moléculas dirigidas a receptores, disolventes, conservantes y/o diluyentes.

[0210] Se prefieren preparaciones farmacéuticas en forma de soluciones de infusión o matrices sólidas para la liberación continua del ingrediente activo, especialmente para infusión continua para administración intratecal, administración intracerebroventricular o administración intracraneal de al menos un oligonucleótido antisentido de la presente invención. También se prefieren las preparaciones farmacéuticas en forma de soluciones o matrices sólidas adecuadas para la administración local en el cerebro. Para las enfermedades fibróticas del pulmón, las formulaciones para inhalación son especialmente preferidas.

[0211] Una solución estéril lista para usar comprende, por ejemplo, al menos un oligonucleótido antisentido a una concentración que varía de 1 a 10 mg/ml, preferiblemente de 5 a 10 mg/ml y un agente isotónico seleccionado, por ejemplo, entre azúcares como sacarosa, lactosa, manitol o sorbitol. También se puede incluir un agente tampón adecuado, para controlar el pH de la solución de 6 a 8 (preferiblemente 7 - 8). Otro ingrediente opcional de la formulación puede ser un surfactante no iónico, como Tween 20 o Tween 80.

[0212] Un polvo liofilizado estéril para reconstitución para uso comprende al menos un oligonucleótido antisentido, y opcionalmente un agente de carga (por ejemplo, manitol, trehalosa, sorbitol, glicina) y/o un crioprotector (por ejemplo, trehalosa, manitol). El disolvente para la reconstitución puede ser agua para compuestos inyectables, con o sin una sal amortiguadora para controlar el pH de 6 a 8,

[0213] Las preparaciones de aerosol adecuadas para **inhalación** pueden incluir soluciones y sólidos en forma de polvo, que pueden estar en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable tal como gas comprimido inerte, por ejemplo, nitrógeno.

[0214] Una composición farmacéutica particularmente preferida es una preparación liofilizada adecuada para administración por inhalación o para administración intravenosa. Para preparar la preparación liofilizada preferida, al menos un oligonucleótido antisentido de la invención se solubiliza en una solución de manitol del 4 al 5% (p/v) y la solución se liofiliza. La solución de manitol también se puede preparar en una solución tampón adecuada como se describe anteriormente.

[0215] Otros ejemplos de crioprotectores adecuados (también denominados agentes de carga o estabilizantes) incluyen albúmina libre de tiol, inmunoglobulinas, polialquilenóxidos (por ejemplo, PEG, polipropilenglicoles), trehalosa, glucosa, sacarosa, sorbitol, dextrano, maltosa, rafinosa, estaquiosa y otros sacáridos (véase, por ejemplo, el documento WO 97/29782), mientras que el manitol se utiliza preferiblemente. Estos se pueden usar en cantidades convencionales en técnicas de liofilización convencionales. Los métodos de liofilización son bien conocidos en la técnica de preparación de formulaciones farmacéuticas.

[0216] Para la administración por inhalación, el diámetro de partícula de la preparación liofilizada está preferiblemente entre 2 y 5 μm , más preferiblemente entre 3 y 4 μm . La preparación liofilizada es particularmente adecuada para la administración usando un inhalador, por ejemplo el inhalador OPTINEB® o VENTA-NEB® (NEBU-TEC, Elsenfeld, Alemania). El producto liofilizado puede rehidratarse en agua destilada estéril o en cualquier otro líquido adecuado para administración por inhalación. Alternativamente, para administración intravenosa, el producto liofilizado puede rehidratarse en agua destilada estéril o en cualquier otro líquido adecuado para administración intravenosa.

[0217] Después de la rehidratación para administración en agua destilada estéril u otro líquido adecuado, la preparación liofilizada debe tener la osmolalidad fisiológica aproximada del tejido diana para la preparación del

péptido rehidratado, es decir, sangre para administración intravenosa o tejido pulmonar para administración por inhalación. Por lo tanto, se prefiere que la formulación rehidratada sea sustancialmente isotónica.

5 **[0218]** La concentración de dosificación preferida para administración intravenosa, oral o inhalación está entre 10 y 2000 $\mu\text{mol/ml}$, y más preferiblemente está entre 200 y 800 $\mu\text{mol/ml}$.

10 **[0219]** Para la administración **oral** en forma de tabletas o cápsulas, al menos un oligonucleótido antisentido se puede combinar con cualquier vehículo inerte farmacéuticamente aceptable no tóxico oral, como lactosa, almidón, sacarosa, celulosa, estearato de magnesio, fosfato dicálcico, sulfato cálcico, talco, manitol, alcohol etílico (formas líquidas) y similares. Además, cuando se desee o sea necesario, también se pueden incorporar en la mezcla aglomerantes, lubricantes, agentes desintegrantes y agentes colorantes adecuados. Los polvos y comprimidos pueden comprender de aproximadamente 5 a aproximadamente 95 por ciento de composición inventiva.

15 **[0220]** Los aglutinantes adecuados incluyen almidón, gelatina, azúcares naturales, edulcorantes de maíz, gomas naturales y sintéticas tales como goma arábiga, alginato de sodio, carboximetilcelulosa, polietilenglicol y ceras. Entre los lubricantes que se pueden mencionar para uso en estas formas de dosificación, ácido bórico, benzoato de sodio, acetato de sodio, cloruro de sodio y similares. Los desintegrantes incluyen almidón, metilcelulosa, goma guar y similares.

20 **[0221]** Adicionalmente, las composiciones de la presente invención pueden formularse en forma de liberación sostenida para proporcionar la liberación controlada a velocidad de al menos un oligonucleótido antisentido para optimizar los efectos terapéuticos. Las formas de dosificación adecuadas para liberación sostenida incluyen matrices biodegradables implantables para liberación sostenida que contienen al menos un oligonucleótido antisentido, comprimidos en capas que contienen capas de velocidades de desintegración variables o matrices poliméricas de liberación controlada impregnadas con al menos un oligonucleótido antisentido.

25 **[0222]** Las preparaciones en forma líquida incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones. Como ejemplo, se pueden mencionar soluciones de agua o agua-propilenglicol para inyecciones parenterales o adición de edulcorantes y opacificantes para soluciones orales, suspensiones y emulsiones.

30 **[0223]** Los diluyentes adecuados son sustancias que usualmente constituyen la mayor parte de la composición o forma de dosificación. Los diluyentes adecuados incluyen azúcares tales como lactosa, sacarosa, manitol y sorbitol, almidones derivados de trigo, arroz de maíz y patata, y celulosas tales como celulosa microcristalina. La cantidad de diluyentes en la composición puede variar desde aproximadamente el 5% hasta aproximadamente el 95% en peso de la composición total, preferiblemente desde aproximadamente el 25% hasta aproximadamente el 75% en peso.

35 **[0224]** El término desintegrantes se refiere a los materiales agregados a la composición para ayudar a que se rompa (se desintegre) y libere los medicamentos. Los desintegrantes adecuados incluyen almidones, almidones modificados "solubles en agua fría" tales como carboximetil almidón de sodio, gomas naturales y sintéticas tales como haba de langosta, karaya, guar, tragacanto y agar, derivados de celulosa tales como metilcelulosa y carboximetilcelulosa de sodio, celulosa microcristalina y reticulados. Celulosas microcristalinas tales como croscarmelosa sódica, alginatos tales como ácido alginico y alginato sódico, arcillas tales como bentonitas y mezclas efervescentes. La cantidad de desintegrante en la composición puede variar de aproximadamente 1 a aproximadamente 40% en peso de la composición, preferiblemente de 2 a aproximadamente 30% en peso de la composición, más preferiblemente de aproximadamente 3 a 20% en peso de la composición, y la mayoría preferiblemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 10% en peso.

40 **[0225]** Los aglutinantes caracterizan sustancias que unen o "pegan" polvos entre sí y los hacen cohesivos formando gránulos, sirviendo así como el "adhesivo" en la formulación. Los aglutinantes agregan resistencia cohesiva ya disponible en los diluyentes o agentes de carga. Los aglutinantes adecuados incluyen azúcares tales como sacarosa, almidones derivados de trigo, arroz de maíz y patata; gomas naturales como la acacia, la gelatina y el tragacanto; derivados de algas marinas tales como ácido alginico, alginato de sodio y alginato de calcio amónico; materiales celulósicos tales como metilcelulosa y carboximetilcelulosa sódica e hidroxipropilmetilcelulosa; polivinilpirrolidona; e inorgánicos como el silicato de magnesio y aluminio. La cantidad de aglutinante en la composición puede variar desde aproximadamente 1 a 30% en peso de la composición, preferiblemente desde aproximadamente 2 a aproximadamente 20% en peso de la composición, más preferiblemente desde aproximadamente 3 a aproximadamente 10% en peso, incluso más preferiblemente de aproximadamente 3 a aproximadamente 6% en peso.

50 **[0226]** Lubricante se refiere a una sustancia agregada a la forma de dosificación para permitir que la tableta, los gránulos, etc., una vez comprimidos, se liberen del molde o la matriz al reducir la fricción o el desgaste. Los lubricantes adecuados incluyen estearatos metálicos, tales como estearato de magnesio, estearato de calcio o estearato de potasio, ácido esteárico; ceras de alto punto de fusión; y lubricantes solubles en agua, tales como cloruro de sodio, benzoato de sodio, acetato de sodio, oleato de sodio, polietilenglicoles y D,L-leucina.

60 **[0227]** Los lubricantes se agregan generalmente en el último paso antes de la compresión, ya que deben estar

presentes en las superficies de los gránulos y entre ellos y las partes de la prensa de tabletas. La cantidad de lubricante en la composición puede variar de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 15% en peso de la composición, preferiblemente de 0,2 a aproximadamente 5% en peso de la composición, más preferiblemente de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 3%, y lo más preferiblemente de aproximadamente 0,3 hasta aproximadamente el 1,5% en peso de la composición.

[0228] Los glidentes son materiales que evitan el apelmazamiento y mejoran las características de flujo de las granulaciones, de modo que el flujo es suave y uniforme. Los glidentes adecuados incluyen dióxido de silicio y talco. La cantidad de deslizamiento en la composición puede variar de aproximadamente 0,01 a 10% en peso de la composición, preferiblemente de 0,1% a aproximadamente 7% en peso de la composición total, más preferiblemente de aproximadamente 0,2 a 5% en peso, y lo más preferiblemente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 2% en peso.

[0229] En las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento, los oligonucleótidos antisentido se incorporan preferiblemente en forma de sus sales y, opcionalmente, junto con otros componentes que aumentan la estabilidad de los oligonucleótidos antisentido, aumentan el reclutamiento de la ARNasa H, aumentan las propiedades de búsqueda de dianas, mejorar la captación celular y similares. Para alcanzar estos objetivos, los oligonucleótidos antisentido pueden modificarse químicamente en lugar de o además del uso de los componentes adicionales útiles para lograr estos propósitos. De este modo, los oligonucleótidos antisentido de la invención pueden unirse químicamente a restos o componentes que mejoran la actividad, distribución celular o captación celular, etc. de los oligonucleótidos antisentido. Tales restos incluyen restos lipídicos tales como un resto de colesterol, ácido cólico, un tioéter, hexil-S-tritilitol, un tiocolesterol, una cadena alifática, por ejemplo, residuos de dodecandiol o undecil, un fosfolípido tal como dihexadecil-rac-glicerol o trietilmononio-1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3H-fosfonato, una cadena de poliamina o polietilenglicol, o ácido acético adamantino, un resto palmitil, o un resto de octadecilamina o hexilamino-carbonil-oxicolesterol. La presente invención también incluye oligonucleótidos antisentido que son compuestos químicos. Los oligonucleótidos antisentido "quiméricos" en el contexto de esta invención son oligonucleótidos antisentido, que contienen dos o más regiones químicamente distintas, una es la secuencia de oligonucleótidos como se describe en el presente documento que está conectada a un resto o componente para aumentar la captación celular, aumentando la resistencia a la degradación de nucleasa, aumentando la afinidad de unión para el ácido nucleico diana, aumentando el reclutamiento de la ARNasa H y así sucesivamente. Por ejemplo, la región o resto o componente adicional del oligonucleótido antisentido puede servir como un sustrato para enzimas capaces de romper ARN: híbridos de ADN o moléculas de ARN:ARN. A modo de ejemplo, la RNasa H es una endoribonucleasa celular que escinde la cadena de ARN de un dúplex de ARN:ADN. La activación de la ARNasa H, por lo tanto, da como resultado la escisión de la diana de ARN que es el ARNm que codifica el TGF-R_{II}, lo que aumenta considerablemente la eficacia de la inhibición de oligonucleótidos antisentido de la expresión génica. En consecuencia, a menudo se pueden obtener resultados comparables con oligonucleótidos más cortos cuando se usan oligonucleótidos quiméricos.

Indicaciones

[0230] La presente divulgación se refiere al uso de oligonucleótidos antisentido descritos en el presente documento para la profilaxis y el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, neurotrauma, enfermedades neurovasculares y neuroinflamatorias, incluyendo trastornos postinfecciosos e inflamatorios del sistema nervioso central (CNS).

Los oligonucleótidos antisentido de la presente invención son especialmente útiles para promover la regeneración y la reconexión funcional de las vías nerviosas dañadas y/o para el tratamiento y la compensación de la disminución inducida por la edad en la renovación de células madre neuronales.

[0231] Por lo tanto, otro aspecto de la presente divulgación se refiere al uso de un oligonucleótido antisentido como se describe en el presente documento para promover la regeneración de tejido neuronal mediante la reactivación de la neurogénesis, permitiendo la diferenciación y migración neuronal, e induciendo la integración de nuevas neuronas en circuitos neuronales funcionales y anatómicos.

[0232] Un aspecto adicional de la presente divulgación se refiere al uso de un oligonucleótido antisentido como se describe en el presente documento para promover la regeneración y la reparación clínica (estructural) en pacientes con daño al sistema nervioso o daño a otros sistemas de órganos inducidos por fibrosis o pérdida del recambio de células madre.

Además, los oligonucleótidos antisentido son útiles para la compensación y el tratamiento de las disminuciones en la renovación de células madre neuronales inducidas por la edad, la inflamación o un defecto genético.

Los oligonucleótidos antisentido de la presente invención inhiben la expresión de TGF-R_{II} y, en consecuencia, se usan para el tratamiento de enfermedades asociadas con niveles de TGF-R_{II} y/o TGF-R_{II} regulados o aumentados.

[0233] Por lo tanto, otro aspecto de la presente divulgación se refiere al uso de oligonucleótidos antisentido en la profilaxis y el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, trastornos neuroinflamatorios, trastornos traumáticos o postraumáticos, trastornos vasculares o más precisamente neurovasculares, trastornos hipóxicos, trastornos del sistema nervioso central postinfeccioso, enfermedades fibróticas, enfermedades hiperproliferativas,

cáncer, tumores, presbiacus y presbicia.

[0234] El término "enfermedad neurodegenerativa" o "enfermedad neurológica" o "trastorno neuroinflamatorio" se refiere a cualquier enfermedad, trastorno o condición que afecte el sistema nervioso central o periférico, incluido el TDAH, las complicaciones neurológicas del SIDA, la ausencia de Septum Pellucidum, afasia epileptiforme adquirida, encefalomiелitis diseminada aguda, adrenoleucodistrofia, agenesia del cuerpo calloso, agnosia, síndrome de Aicardi, enfermedad de Alexander, enfermedad de Alpers, hemiplejía alternante, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica (ALS), anencefalia, aneurisma, síndrome de Angelman, angiomatosis, anoxia, afasia, apraxia, quistes aracnoideos, aracnoiditis, malformación de Arnold-Chiari, malformación arteriovenosa, aspartamo, síndrome de Asperger, ataxia telangiectasia, ataxia, trastorno de hiperactividad, autismo, trastorno de la personalidad, y Enfermedad de Batten, enfermedad de Behcet, parálisis de Bell, blefarospasmo esencial benigno, amiotrofia focal benigna, hipertensión intracraneal benigna, síndrome de Bernhardt-Roth, enfermedad de Binswanger, blefaroespasmo, síndrome de Bloch-Sulzberger, lesiones en el parto del plexo braquial, lesiones del plexo braquial, síndrome de Bradbury-Eggleston, aneurisma cerebral, lesión cerebral, tumores cerebrales y espinales, síndrome de Brown-Sequard, atrofia muscular bulbospinal, enfermedad de Canavan, síndrome del túnel carpiano, causalgia, cavernomas, angioma cavernoso, malformación cavernosa, síndrome de la médula cervical central, síndrome del cordón central, síndrome de dolor central, trastornos cefálicos, degeneración cerebelosa, hipoplasia cerebelosa, aneurisma cerebral, arteriosclerosis cerebral, atrofia cerebral, beriberi cerebral, gigantismo cerebral, hipoxia cerebral, parálisis cerebral, síndrome cerebro-oculo-facio-esquelético, trastorno de Charcot-Marie-Tooth, malformación de Chiari, corea, coreocantocitosis, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP), intolerancia ortostática crónica, dolor crónico, síndrome de Cockayne tipo II, síndrome de Coffin Lowry, coma, incluso estado vegetativo persistente, síndrome de dolor regional complejo, diplegia facial congénita, miastenia congénita, miopatía congénita, malformaciones cavernosas vasculares congénitas, degeneración corticobasal, arteritis craneal, craneosinostosis, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, trastornos de trauma acumulativo, síndrome de Cushing, enfermedad de cuerpo de inclusión citocéntrica, infección por citomegalovirus, síndrome de "ojos y pies danzantes", Síndrome de Dandy-Walker, Enfermedad de Dawson, Síndrome de De Morsier, Parálisis de Dejerine-Klumpke, Demencia multiinfarto, Demencia subcortical, Demencia con cuerpos de Lewy, dermatomiositis, dispraxia del desarrollo, Síndrome de Devic, neuropatía diabética, esclerosis difusa, síndrome de Dravet, disautonomía, disgrafía, dislexia, disfagia, dispraxia, distonías, encefalopatía epiléptica infantil temprana, Síndrome de Silla Vacía, encephalitis lethargica, encefalitis y meningitis, encefalocelos, encefalopatía, angiomatosis encefalotrigémina, epilepsia, parálisis de Erb, Erb-Duchenne y parálisis de Dejerine-Klumpke, Enfermedad de Fabry, Síndrome de Fahr, desmayo, disautonomía familiar, hemangioma familiar, parásitos idiopáticos familiares e independientes, parálisis espástica familiar, convulsiones febriles (ataques cefaleales febriles). Síndrome del lactante flácido, Ataxia de Friedreich, Enfermedad de Gaucher, Síndrome de Gerstmann, Enfermedad de Gerstmann-Straussler-Scheinker, arteritis de células gigantes, enfermedad de inclusión de células gigantes, leucodistrofia de células globoides, neuralgia glossofaríngea, síndrome de Guillain-Barré, mielopatía asociada a HTLV-1, enfermedad de Hallervorden-Spatz, lesión de cabeza, hemicrania continua, cefalea, espasmo hemifacial, hemiplegia alterans, neurocirugía hereditaria paraplejía espástica, polineuritisiformis heredopathia atactica, herpes zoster óticus, herpes zóster, síndrome de Hirayama, holoprosencefalia, enfermedad de Huntington, hidranencefalia, presión de hidrocefalia normal, hidrocefalia (en particular hidrocefalia inducida por TGFβ), hidromielia, hipercortisolismo, hipersomnia, hipertonia, hipotonía, encefalomiелitis inmunomediada, miositis por cuerpos de inclusión, incontinencia pigmentaria, hipotonía infantil, enfermedad por almacenamiento de ácido fitánico infantil, enfermedad de refsum infantil, espasmos infantiles, miopatía inflamatoria, lipodistrofia intestinal, lipodistrofia intestinal, quistes intracraneales, hipertensión intracraneal, Síndrome de Isaac, Síndrome de Joubert, Síndrome de Kearns-Sayre, Enfermedad de Kennedy, síndrome de Kinsbourne, Síndrome de Kleine-Levin, Síndrome de Klippel Feil, Síndrome de Klippel-Trenaunay (KTS), Síndrome de Klüver-Bucy, Síndrome amnésico de Korsakoff, Enfermedad de Krabbe, Enfermedad de Kugelberg-Welander, Kuru, Síndrome Miasténico de Lambert-Eaton, Enfermedad de Kugelberg y Berlín, atrapamiento lateral del nervio cutáneo femoral lateral, síndrome medular lateral, problemas de aprendizaje, enfermedad de Leigh, síndrome de Lennox-Gastaut, síndrome de Lesch-Nyhan, leucodistrofia, síndrome de Levine-Critchley, demencia con cuerpos de Lewy, lisencefalia, síndrome de Lou Gehrig, enfermedad de Lou Gehrig, secuelas neurológicas de lupus, Enfermedad de Lyme-Complicaciones neurológicas, Enfermedad de Machado-Joseph, Macorrefalia, Mega-lencefalia, Síndrome de Melkersson-Rosenthal, Meningitis, Enfermedad de Menkes, meralgia parestésica, leucodistrofia metacrómica, microcefalia, migraña, Síndrome de Miller Fisher, mini apoplejías, miopatías mitocondriales, síndrome de Mobius, amiotrofia monomérica, enfermedades de las neuronas motoras, enfermedad de Moyamoya, mucopolisacáridosis, demencia multi-infarto, neuropatía motora multifocal, esclerosis múltiple (MS), atrofia multisistémica (MSA-C y MSA-P), atrofia multisistémica con hipotensión ortostática, distrofia muscular, miastenia congénita, miastenia gravis, esclerosis difusa mielinoelástica, encefalopatía mioelástica de infantes, mioelástica, miopatía congénita, miopatía tirotoxic, miopatía, miotonía congénita, miotonía, narcolepsia, neuroacantocitosis, neurodegeneración con acumulación de hierro en el cerebro, neuroterapia, neurofibromatosis, síndrome maligno neuroléptico, complicaciones neurológicas del SIDA, manifestaciones neurológicas de enfermedad de Pompe, neuromielitis óptica, neuromiotonía, lipofuscinosis neuronal ceroida, trastornos de la migración neuronal, neuropatía hereditaria, neurosarcoidosis, neurotoxicidad, nevus cavernosus, síndrome de Niemann-Pick, síndrome de O'Sullivan-McLeod, neuralgia occipital, secuencia de disrafismo espinal oculto, Síndrome de Ohtahara, atrofia olivopontocerebelosa, opsoclonos mioelástico, hipotensión ortostática, síndrome de uso excesivo, dolor crónico, síndromes paraneoplásicos, parestesia, enfermedad de Parkinson, paroticoelástica congénita, coreoatetosis paroxística, hemiclínica paroxística, Parry-Romberg, Enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher, Síndrome de Pena Shokeir II, quistes perineurales, parálisis periódica,

neuropatía periférica, leucomalacia periventricular, estado vegetativo persistente, trastornos de desarrollo
 5 pervasivos, enfermedad por almacenamiento de ácido fitánico, enfermedad de Pick, síndrome de Piriformis, tumores
 hipofisarios, polimiositis, enfermedad de Pompe, porencefalia, síndrome de la polio, neuralgia postherpética,
 10 encefalomielitis postinfectiva, encefalitis celíaca postinfecciosa, parásitos de la piel, neoplasia pospéptica, síndrome
 de taquicardia postural, esclerosis lateral primaria, enfermedades priónicas, atrofia hemifacial progresiva, ataxia
 locomotora progresiva, leucoencefalopatía multifocal progresiva, poliodistrofia esclerosante progresiva, parálisis
 15 supranuclear progresiva, pseudotumor cerebri, reacción dependiente de piridoxina y sensible a piridoxina, Síndrome
 de Ramsay Hunt tipo I, síndrome de Ramsay Hunt tipo II, encefalitis de Rasmussen y otras epilepsias autoinmunes,
 síndrome de distrofia simpática refleja, enfermedad de Refsum infantil, enfermedad de Refsum, trastornos por
 20 movimientos repetitivos, lesiones por estrés repetitivo, síndrome de piernas inquietas, mielopatía asociada a
 retrovirus, Síndrome de Rett, Síndrome de Reye, Síndrome de Riley-Day, Cefalea solar, quistes de la raíz nerviosa
 sacra, Baile de San Vito, Enfermedad de la glándula salival, Enfermedad de Sandhoff, Enfermedad de Schilder,
 esquizencefalía, trastornos convulsivos, displasia septoóptica, epilepsia mioclónica grave (SMEI), síndrome del bebé
 25 sacudido, culebrilla, síndrome de Shy-Drager, síndrome de Sjogren, apnea del sueño, enfermedad del sueño,
 síndrome de Soto, espasticidad, espina bífida, infarto de la médula espinal, lesión de la médula espinal, tumores
 de la médula espinal, atrofia muscular espinal, atrofia espinocerebelosa, síndrome de Steele-Richardson-Olszewski,
 síndrome de Stiff-Person, degeneración estriatonigral, accidente cerebrovascular, síndrome de Sturge-Weber,
 panencefalitis esclerosante subaguda, encefalopatía arteriosclerótica subcortical, trastornos de deglución, corea de
 30 Sydenham, síncope, esclerosis espinal sifilítica, siringohidromielia, siringomielia, lupus eritematoso sistémico, tabes
 dorsalis, tardive dyskinesia, quistes de tarlov, enfermedad de Tay-Sachs, arteritis temporal, síndrome de la médula
 espinal anclada, enfermedad de Thomsen, síndrome de salida torácica, miopatía tirotóxica, tic douloureux, parálisis
 de Todd, síndrome de Tourette, ataque isquémico transitorio, encefalopatía espongiiforme transmisible, mielitis
 35 sistémica, lesión cerebral traumática, trémulo, neuralgia hemostática, paraparesia espástica tropical, esclerosis
 tuberosa, tumor eréctil vascular, vasculitis incluyendo arteritis temporal, Enfermedad de Von Economo, Enfermedad
 de Von Hippel-Lindau (VHL), Enfermedad de Von Recklinghausen, Síndrome de Wallenberg, Enfermedad de
 40 Werdnig-Hoffman, Síndrome de Wernicke-Korsakoff, Síndrome de West, Síndrome de Whipple, Síndrome de
 Williams, Enfermedad de Wilson, Atrofia muscular espinal y bulbar vinculada, y síndrome de Zellweger.

[0235] Los ejemplos preferidos de enfermedades neurodegenerativas y trastornos neuroinflamatorios se seleccionan
 30 del grupo que comprende o que consiste en:

Enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Creutzfeldt Jakob (ECJ), nueva variante de la
 enfermedad de Creutzfeldt Jakobs (enfermedad nvcJD), enfermedad de Hallervorden Spatz, enfermedad de
 Huntington, atrofia multisistémica, demencia, demencia frontotemporal, trastornos de la neurona motora de múltiples
 35 antecedentes espontáneos o genéticos, esclerosis lateral amiotrófica (ALS), atrofia muscular espinal, atrofia
 espinocerebelosa (SCA), esquizofrenia, trastornos afectivos, depresión mayor, meningoencefalitis,
 meningoencefalitis bacteriana, meningoencefalitis viral, trastornos autoinmunes del SNC, esclerosis múltiple (EM),
 isquemia aguda/hipóxica, Traumatismo del SNC y la médula espinal, traumatismo craneal y espinal, lesiones
 40 cerebrales, arteriosclerosis, aterosclerosis, demencia microangiopática, enfermedad de Binswanger (leucoaraiosis),
 degeneración retiniana, degeneración coclear, degeneración macular, sordera coclear, demencia relacionada con el
 SIDA, demencia relacionada con el SIDA, demencia relacionada con el SIDA, Síndrome de temblor/ataxia asociada
 con X frágil (FXTAS), Parálisis supranuclear progresiva (PSP), degeneración estriatonigral (SND), degeneración
 45 olivopontocerebelosa (OPCD), síndrome de Shy Drager (SDS), déficits de memoria dependientes de la edad,
 trastornos neurodegenerativos asociados con demencia, síndrome de Down, sinucleinopatías, trastornos
 de repetición de trinucleótidos como Enfermedad de Huntington, traumatismo, enfermedades vasculares, inflamaciones
 vasculares, envejecimiento del SNC. También se puede abordar la disminución dependiente de la edad de la
 renovación de células madre.

[0236] Los ejemplos particularmente referidos de enfermedades neurodegenerativas y trastornos neuroinflamatorios
 50 se seleccionan del grupo que comprende o que consiste en:

Enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica
 (ALS), hidrocefalia (en particular hidrocefalia inducida por TGFβ), SNC y traumatismo de la médula espinal, como
 55 traumatismo de la médula espinal, traumatismo craneal y vertebral, traumatismo cerebral, degeneración retiniana,
 degeneración macular, sordera coclear, demencia relacionada con el SIDA, trastornos por repetición de
 trinucleótidos como la enfermedad de Huntington y envejecimiento del SNC.

[0237] Los oligonucleótidos antisentido también son útiles para la profilaxis y el tratamiento de **enfermedades
 fibróticas**. La fibrosis o enfermedad fibrótica es la formación de tejido fibroso conectivo en exceso en un órgano o
 60 tejido en un proceso reparativo o reactivo. Esto puede ser un estado reactivo, benigno o patológico. En respuesta a
 una lesión, esto se denomina cicatrización y si la fibrosis surge de una sola línea celular, se denomina fibroma.
 Fisiológicamente, esto actúa depositando matriz extracelular, que puede destruir la arquitectura y la función del
 órgano o tejido subyacente. La fibrosis se puede usar para describir el estado patológico de la deposición excesiva
 del tejido fibroso, así como el proceso de deposición del tejido conectivo en la curación. La fibrosis es un proceso
 65 que involucra a las células estimuladas para formar tejido conectivo, incluido el colágeno y los glicosaminoglicanos.
 Posteriormente, los macrófagos y el tejido dañado entre la liberación de intersticio TGF-β. TGF-β estimula la
 proliferación y activación de los fibroblastos que depositan tejido conectivo. Reducir los niveles de TGF-β previene y
 disminuye la formación de tejido conectivo.

[0238] Ejemplos para enfermedades fibróticas son

- 5 Pulmones: • fibrosis pulmonar
• fibrosis pulmonar idiopática (se desconoce la causa idiopática)
• fibrosis quística
- Hígado: • cirrosis hepática de origen múltiple
- Corazón: • fibrosis endomiocárdica
• infarto de miocardio antiguo
• fibrosis auricular
- 10 Otro: • fibrosis mediastínica (tejido blando del mediastino)
• glaucoma (ojo, ocular)
• mielofibrosis (médula ósea)
• fibrosis retroperitoneal (tejido blando del retroperitoneo)
- 15 • fibrosis masiva progresiva (pulmones); Una complicación de la neumoconiosis de los carboneros
• fibrosis sistémica nefrogénica (piel)
• enfermedad de Crohn (intestino)
• queuloide (piel)
• esclerodermia/esclerosis sistémica (piel, pulmones)
- 20 • artrofibrosis (rodilla, hombro, otras articulaciones)
• enfermedad de Peyronie (pene)
• contractura de Dupuytren (manos, dedos)
• algunas formas de capsulitis adhesiva (hombro)
• residuos después de eritemátodos por Lupus.

25 [0239] Por lo tanto, otro aspecto de la presente descripción se refiere al uso de un oligonucleótido para profilaxis y/o el tratamiento o el uso de un oligonucleótido antisentido para la preparación de una composición farmacéutica para la profilaxis y/o el tratamiento de la fibrosis pulmonar, la fibrosis quística, la cirrosis hepática, la fibrosis endomiocárdica, el infarto de miocardio antiguo, la fibrosis auricular, la fibrosis mediastínica, mielofibrosis, fibrosis retroperitoneal, fibrosis masiva progresiva, fibrosis sistémica nefrogénica, glaucoma, como el glaucoma primario de ángulo abierto, la enfermedad de Crohn, la queuloide, la esclerosis sistémica, la artrofibrosis, la enfermedad de Peyronie, la contractura de Dupuytren y los restos después de lupus eritematoso.

30

[0240] Así otro aspecto de la presente descripción se refiere al uso de un oligonucleótido antisentido para la profilaxis y/o el tratamiento de enfermedades hiperproliferativas, cáncer, tumores y sus metástasis o al uso de un oligonucleótido antisentido para la preparación de una composición farmacéutica para la profilaxis y/o tratamiento de enfermedades hiperproliferativas, cáncer, tumores y sus metástasis.

35

Los ejemplos de enfermedades hiperproliferativas, cáncer, tumores se seleccionan del grupo que comprende o consiste en: adenocarcinoma, melanoma, leucemia aguda, neurinoma acústico, carcinoma ampular, carcinoma anal, astrocitoma, carcinoma de células basales, cáncer pancreático, tumor desmoide, cáncer de vejiga, carcinoma bronquial, cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), cáncer de mama, linfoma de Burkitt, cáncer de cuerpo, síndrome de CUP (carcinoma de origen primario desconocido), cáncer colorrectal, cáncer de intestino delgado, tumores del intestino delgado, cáncer de ovario, carcinoma endometrial, ependimoma, tipos de cáncer epitelial, tumores de Ewing, tumores gastrointestinales, cáncer gástrico, cáncer de vesícula biliar, carcinomas de vesícula biliar, cáncer de útero, cáncer cervical, cérvix, glioblastomas, tumores ginecológicos, tumores de oídos, nariz y garganta, neoplasias hematológicas, leucemia de células pilosas, leucemia uretral, cáncer uretral, cáncer de piel, cáncer de testículo de la piel, tumores cerebrales (gliomas, por ejemplo, astrocitomas, oligodendrogliomas, meduloblastomas, PNET, gliomas mixtos), metástasis cerebrales, cáncer de testículo, tumor de hipófisis, carcinoides, sarcoma de Kaposi, cáncer de laringe, tumor de células germinales, cáncer de hueso, carcinoma colorrectal, tumores de cabeza y cuello (tumores de oído, nariz y garganta), carcinoma de colon, craneofaringiomas, cáncer de boca (cáncer en el área de la boca y en los labios), cáncer del sistema nervioso central, cáncer de hígado, metástasis en el hígado, leucemia, tumor de párpado, cáncer de pulmón, cáncer de ganglios linfáticos (de Hodgkin/No Hodgkin), linfomas, cáncer de estómago, melanoma maligno, neoplasia maligna, tumores malignos tracto gastrointestinal, carcinoma de mama, cáncer rectal, meduloblastomas, melanoma, meningiomas, enfermedad de Hodgkin, micosis fungoides, cáncer nasal, neurinoma, neuroblastoma, cáncer de riñón, carcinomas de células renales, linfomas no hodgkinianos, oligodendroglioma, carcinoma esofágico, carcinomas osteolíticos y carcinomas osteoplásticos, osteosarcomas, carcinoma ovarial, carcinoma pancreático, cáncer de pene, plasmocitoma, carcinoma de células escamosas de la cabeza y cuello (SCCHN), cáncer de próstata, cáncer de faringe, carcinoma de recto, retinoblastoma, cáncer de vagina, carcinoma de tiroides, enfermedad de Schneeberger, cáncer de esófago, espinalismos, linfoma de células T (micosis fungoides), timoma, carcinoma de tubo, tumores del ojo/oculares, cáncer de uretra, tumores urológicos, carcinoma urotelial, cáncer de vulva, aparición de verrugas, tumores de tejidos blandos, sarcoma de tejidos blandos, tumor de Wilm, carcinoma cervical y cáncer de lengua.

40

45

50

55

60

[0241] El término "cáncer" se refiere preferiblemente a un cáncer seleccionado del grupo que consiste en o que comprende cáncer de pulmón, tal como carcinoma de pulmón, cáncer de hígado tal como carcinoma hepatocelular, melanoma o melanoma maligno, cáncer de páncreas, tal como carcinoma epitelioide pancreático o adenocarcinoma pancreático, cáncer de colon, como el adenocarcinoma colorrectal, cáncer gástrico o carcinoma gástrico, carcinoma

65

de mama, astrocitoma maligno, cáncer de próstata, carcinoma gástrico, leucemia, como leucemia mielógena aguda, leucemia mielógena crónica, leucemia monocítica, leucemia promielocítica, leucemia linfocítica, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica y leucemia linfoblástica aguda y linfoma, como el linfoma histiocítico.

5 **[0242]** Para el tratamiento de enfermedades hiperproliferativas, cáncer, tumores y sus metástasis, los oligonucleótidos antisentido se pueden administrar a intervalos regulares (intervalos de dosis, DI) de entre 3 días y dos semanas, como 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13 días, como aproximadamente 1 semana, como 6, 7 u 8 días. Adecuadamente se proporcionan al menos dos dosis con un período DI entre las dos dosis, como 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 dosis, cada una con un intervalo de dosis (DI) entre cada dosis del oligonucleótido antisentido. El período de DI entre cada dosis puede ser el mismo, como entre 3 días y semanas, tal como 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 días, aproximadamente 1 semana, tal como 6, 7 o 8 días. Preferiblemente, cada dosis del oligonucleótido antisentido puede estar entre aproximadamente 0,25 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg, como aproximadamente 0,5 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 2 mg/kg, aproximadamente 3 mg/kg, aproximadamente 4 mg/kg kg, aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 6 mg/kg, aproximadamente 7 mg/kg, aproximadamente 8 mg/kg, aproximadamente 9 mg/kg. En algunas realizaciones, cada dosis de oligonucleótido antisentido puede estar entre aproximadamente 2 mg/kg, aproximadamente 8 mg/kg, o aproximadamente 4 a aproximadamente 6 mg/kg o aproximadamente 4 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg. En algunas realizaciones, cada uno de los oligonucleótidos antisentido es al menos 2 mg/kg, tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 mg/kg, tal como 6 mg/kg. En algunas realizaciones, el régimen de dosificación para el oligonucleótido antisentido se puede repetir después de un régimen de dosificación inicial, por ejemplo, después de un período de descanso en el que no se administra oligonucleótido antisentido. Por ejemplo, el período de descanso puede durar más de 2 semanas, como aproximadamente 3 semanas o aproximadamente 4 semanas, o aproximadamente 5 semanas o aproximadamente 6 semanas. En algunas realizaciones, el régimen de dosificación para el oligonucleótido antisentido es una dosis semanal, repetida tres, cuatro o cinco veces. Este régimen de dosificación se puede repetir luego de un período de descanso, por ejemplo, de aproximadamente 3 a 5 semanas, como aproximadamente 4 semanas. En algunas realizaciones, el oligonucleótido antisentido se administra durante un primer régimen de dosificación a intervalos de dosificación regulares (DI) de entre 4 y 13 días para entre 2 a 10 administraciones. La administración del oligonucleótido antisentido se realiza típicamente por administración parenteral, tal como administración subcutánea, intramuscular, intravenosa o intraperitoneal.

Descripción de figuras

[0243]

35 **Fig. 1** muestra el efecto inhibitorio de los oligonucleótidos antisentido (ASO). El ADN se transcribe al Pre-ARNm al cual, en el núcleo de la célula, los oligonucleótidos antisentido (ASO) se pueden unir o hibridar con la secuencia complementaria dentro de un exón (como lo representa el primer ASO del lado derecho y el primero). ASO desde el lado izquierdo) o dentro de un intrón (como se representa por el segundo ASO desde el lado derecho) o en una asignación que consiste en un área de un exón y un área de un intrón adyacente (como está representado por el segundo ASO en el lado izquierdo). Mediante la modificación postranscripcional, es decir, el empalme, se forma el ARNm al que la ASO puede unirse o hibridar en el citoplasma de la célula para inhibir la traducción del ARNm en la secuencia de la proteína. Por lo tanto, la ASO derriba el gen objetivo y la expresión de la proteína de forma selectiva.

40 **Fig. 2** muestra una unidad de nucleósido (sin enlace internucleotídico) o unidad de nucleótido (con enlace internucleotídico) que son unidades no de LNA y que pueden estar contenidas en los oligonucleótidos antisentido de la presente invención, especialmente en la región B en el caso del oligonucleótido de la presente invención es un gápmero.

45 **Fig. 3** muestra el TGF-beta y sus efectos sobre las células madre neurales, las células madre del cáncer y los tumores. TGFbeta inhibe la proliferación de células madre neurales. Puede afectar la transición a una célula madre cancerosa, que podría escapar del control del crecimiento de TGF-beta. Más tarde, en la progresión tumoral, el TGF-beta actúa como un oncogén; además promueve el crecimiento del tumor al promover la angiogénesis y la supresión del sistema inmunológico. Además, promueve la migración celular, lo que lleva a las células a metástasis.

50 **Fig. 4** muestra el oligonucleótido antisentido de **Seq ID No 218b** en forma de un hueco que consta de 16 nucleótidos con 3 unidades de LNA (**C*b¹ y Ab¹ y Tb¹**) en el extremo terminal 5' y 4 unidades de LNA (**Ab¹ y Gb¹ y Tb¹ y Ab¹**) en el extremo terminal 3' y 9 nucleótidos de ADN (dG, dA, dA, dT, dG, dG, dA, dC, y dC) entre los segmentos de LNA, con enlaces(s) internucleotídico(s) de fosforotioato y la nucleobase 5-metilcitosina (C*) en la primera unidad de LNA desde el extremo terminal 5' .

SP	L	Seq ID No	Secuencia, 5'-3'
4217	16	218b	C*b ¹ sAb ¹ sTb ¹ sdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsAb ¹ sGb ¹ sTb ¹ sAb ¹

60 **Fig. 5: El tratamiento con ASO (Seq. ID No. 218b) conduce a la reducción de la proteína pSmad2 intracelular.** Etiquetado con un anticuerpo contra pSmad2 (columna izquierda, roja) en células A549 (Fig. 5A) y ReNcell CX@ (Fig. 5B) después de transferencia gimnótica con ASO Seq. ID No. 218b por 72 h o 96 h respectivamente. El ADN nuclear se tiñó con DAPI (columna central, azul). El examen de las células se realizó mediante microscopía de

fluorescencia (Zeiss Axio® Observer.Z1). Las imágenes se analizaron con el software Image J y el software CorelDRAW® X7, A = control sin tratar, B = Ref.1, C = Seq. ID No. 218b.

Fig. 6: El tratamiento con ASO (Seq. ID No. 218c) conduce a la reducción de la proteína pSmad2 intracelular. Etiquetado con un anticuerpo contra pSmad2 (columna izquierda, roja) en células A549 (Fig. 6A) y ReNcell CX® (Fig. 6B) después de la transferencia gimnótica con ASO Seq. ID No. 218c por 72 h o 96 h respectivamente. El ADN nuclear se tiñó con DAPI (columna central, azul). El examen de las células se realizó mediante microscopía de fluorescencia (Zeiss Axio® Observer.Z1). Las imágenes se analizaron con Image J Software y Corel DRAW®X7 Software. A = control no tratado, B = Ref.1, D = Seq. ID No. 218c.

Fig. 7: En presencia de TGF-β1, el tratamiento con ASO (Seq. ID No. 218b) conduce a la regulación a la baja del ARNm de TGF-R_{II}. Potente regulación a la baja del ARNm de TGF-R_{II} después de la transferencia gimnótica de ASO específica de TGF-R_{II} en TGF-β1 preincubado (48 h) A549 (Fig. 7A) y ReNcell CX® (Fig. 7B). Los ASO se incubaron durante 72 horas o 96 horas en presencia de TGF-β1, respectivamente. Los niveles de expresión de ARNm se cuantificaron en relación con el gen de mantenimiento GNB2L1 utilizando RT-PCR cuantitativa en tiempo real y se normalizaron para controles no tratados. A = control sin tratar, B = Ref.1, C = Seq. ID No. 218b, E = TGF-β1, 6 = SEM, *p <0.05, **p <0,01 en referencia a A, **p <0,01 en referencia a E+B. Las estadísticas se calcularon utilizando el ANOVA ordinario de una vía seguido de las comparaciones post hoc de "Tukey".

Fig. 8: En presencia de TGF-β1, el tratamiento con ASO (Seq. ID No. 218c) conduce a la regulación a la baja del ARNm de TGF-R_{II}. Potente regulación a la baja del ARNm de TGF-R_{II} después de la transferencia gimnótica de ASO específica de TGF-R_{II} en TGF-β1 pre-incubadas (48 h) A549 (Fig. 8A) y ReNcell CX® (Fig. 8B). Los ASO se incubaron durante 72 horas o 96 horas en presencia de TGF-β1, respectivamente. Los niveles de expresión de ARNm se cuantificaron en relación con el gen de mantenimiento GNB2L1 utilizando RT-PCR cuantitativa en tiempo real y se normalizaron para controles no tratados. A = control no tratado, B = Ref.1, D = Seq. ID No. 218c, E = TGF-β1, 6 = SEM, *p <0.05, **p <0,01 en referencia a A, **p <0,01 en referencia a E+B. Las estadísticas se calcularon utilizando el ANOVA ordinario de una vía seguido de las comparaciones post hoc de "Tukey".

Fig. 9 muestra el oligonucleótido antisentido de **Seq ID No 209y** en forma de un gápmero que consiste en 16 nucleótidos con 2 unidades de LNA (**Gb¹** y **Tb¹**) en el extremo terminal 5' y 3 unidades de LNA (**Ab¹** y **Gb¹** y **C^b**) en el extremo terminal 3' y 11 nucleótidos de ADN (dA, dG, dT, dG, dT, dT, dT, dA, dG, dG, y dG) entre los segmentos de LNA, con enlaces(s) internucleotídico(s) de fosforotioato y la nucleobase 5-metilcitosina (C*) en la última unidad de LNA del extremo terminal 5'.

SP	L	Seq ID No	Secuencia, 5'-3'
2064	16	209y	Gb¹sTb¹sdAsdGsdTsdGsdTsdTsdTsdAsdGsdGsdGsAb¹sGb¹sC^b

Fig. 10 muestra el oligonucleótido antisentido de **Seq ID No 210q** en forma de un hueco que consta de 16 nucleótidos con 4 unidades de LNA (**Gb¹** y **C^b** y **Tb¹** y **Ab¹**) en el extremo terminal 5' y 3 unidades de LNA (**Gb¹** y **Tb¹** y **Tb¹**) en el extremo terminal 3' y 9 nucleótidos de ADN (dT, dT, dT, dG, dG, dT, dA, dG, y dTs) entre los segmentos de LNA, con enlaces(s) internucleotídico(s) de fosforotioato y la nucleobase 5-metilcitosina (C*) en la segunda unidad de LNA desde el extremo terminal 5'.

SP	L	Seq ID No	Secuencia, 5'-3'
2072	16	210q	Gb¹sC^bsTb¹sAb¹sdTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdGsdTsGb¹sTb¹sTb¹

La Fig. 11: En presencia de TGF-β1, el tratamiento con ASO (Seq. ID No. 218b) conduce a la regulación a la baja del ARNm de CTGF. Potente regulación a la baja del ARNm de CTGF después de la transferencia gimnótica de ASO específica de TGF-R_{II} en células TGF-β1 preincubadas (48 h) A549 (Fig. 11A) y ReNcell CX® (Fig. 11B). Los ASO se incubaron durante 72 horas o 96 horas en presencia de TGF-β1, respectivamente. Los niveles de expresión de ARNm se cuantificaron en relación con el gen de mantenimiento GNB2L1 utilizando RT-PCR cuantitativa en tiempo real y se normalizaron para controles no tratados. A = control sin tratar, B = Ref.1, C = Seq. ID No. 218b, E = TGF-β1, 6 = SEM, *p <0.05, **p <0,01 en referencia a A, **p <0,01 en referencia a E+B. Las estadísticas se calcularon utilizando el ANOVA ordinario de una vía seguido de las comparaciones post hoc de "Tukey".

Fig. 12: En presencia de TGF-β1, el tratamiento con ASO (Seq. ID No. 218b) conduce a la reducción de la proteína celular CTGF. La expresión de la proteína CTGF se redujo después de la transferencia gimnótica de ASO específico a TGF-R_{II} en TGF-β1 preincubado (48 h) A549 (Fig. 12A) y ReNcell CX® (Fig. 12B). Los ASO se incubaron durante 72 horas o 96 horas en presencia de TGF-β1, respectivamente. Las células se marcaron con un anticuerpo contra CTGF (columna izquierda, roja). El ADN nuclear se tiñó con DAPI (columna central, azul). El examen de las células se realizó mediante microscopía de fluorescencia (Zeiss Axio® Observer.Z1). Las imágenes se analizaron con el software Image J y el software CorelDRAW® X7, A = control sin tratar, B = Ref.1, C = Seq. ID. 218b, E = TGF-β1.

Fig. 13: En presencia de TGF-β1, el tratamiento con ASO (Seq. ID No. 218b) conduce a una reducción intracelular de la proteína pSmad2. La expresión de la proteína pSmad2 se redujo después de la transferencia gimnótica de TGF-R_{II} ASO específica en TGF-β1 preincubado (48 h) A549 (Fig. 13A) y ReNcell CX® (Fig. 13B). Los ASO se incubaron durante 72 horas o 96 horas en presencia de TGF-β1, respectivamente. Las células se marcaron con un anticuerpo contra pSmad2 (columna izquierda, roja). El ADN nuclear se tiñó con DAPI (columna central,

azul). El examen de las células se realizó mediante microscopía de fluorescencia (Zeiss Axio® Observer.Z1). Las imágenes se analizaron con el software Image J y el software CorelDRAW® X7, A = control sin tratar, B = Ref.1, C = Seq. ID. 218b, E = TGF-β1.

Fig. 14: En presencia de TGF-β1, el tratamiento con ASO (Seq. ID No. 218c) conduce a la regulación a la baja del ARNm de CTGF. Potente regulación a la baja del ARNm de CTGF después de la transferencia gimnótica de ASO específica de TGF-R_{II} en células TGF-β1 preincubadas (48 h) A549 (Fig. 14A) y ReNcell CX® (Fig. 14B). Los ASO se incubaron durante 72 horas o 96 horas en presencia de TGF-β1, respectivamente. Los niveles de expresión de ARNm se cuantificaron en relación con el gen de mantenimiento GNB2L1 utilizando RT-PCR cuantitativa en tiempo real y se normalizaron para controles no tratados. A = control no tratado, B = Ref.1, D = Seq. ID No. 218c, E = TGF-β1, 6 = SEM, *p <0,05, **p <0,01 en referencia a A, las estadísticas se calcularon utilizando el ANOVA Ordinario de una vía seguido de comparaciones post hoc de "Dunnett". Note las diferentes escalas.

Fig. 15: En presencia de TGF-β1, el tratamiento con ASO (Seq. ID No. 218c) conduce a la reducción de la proteína celular CTGF. La expresión de la proteína CTGF se redujo después de la transferencia gimnótica de la ASO específica de TGF-R_{II} en las células A549 pre-incubadas con TGF-β1 (48 h). Los ASO se incubaron durante 72 h en presencia de TGF-β1. Las células se marcaron con un anticuerpo contra CTGF (columna izquierda, roja). El ADN nuclear se tiñó con DAPI (columna central, azul). El examen de las células se realizó mediante microscopía de fluorescencia (Zeiss Axio® Observer.Z1). Las imágenes se analizaron con el software Image J y el software CorelDRAW® X7, A = control no tratado, B = Ref.1, D = Seq. ID. 218c, E = TGF-β1.

Fig. 16: En presencia de TGF-β1, el tratamiento con ASO (Seq. ID No. 218c) conduce a la reducción de la proteína pSmad2 intracelular. La expresión de la proteína pSmad2 se redujo después de la transferencia gimnótica de TGF-R_{II} ASO específica en TGF-β1 preincubado (48 h) A549 (Fig. 16A) y ReNcell CX® (Fig. 16B). Los ASO se incubaron durante 72 horas o 96 horas en presencia de TGF-β1, respectivamente. Las células se marcaron con un anticuerpo contra pSmad2 (columna izquierda, roja). El ADN nuclear se tiñó con DAPI (columna central, azul). El examen de las células se realizó mediante microscopía de fluorescencia (Zeiss Axio® Observer.Z1). Las imágenes se analizaron con el software Image J y el software CorelDRAW® X7, A = control no tratado, B = Ref.1, D = Seq. ID. 218c, E = TGF-β1.

Fig. 17: el pretratamiento con ASO (Seq. ID No. 218b) y la posterior exposición simultánea a TGF-β1 conducen a la reducción de la proteína de membrana TGF-R_{II}. La proteína TGF-R_{II} se redujo después de la transferencia gimnótica de la ASO específica de TGF-R_{II} seguida de la coexposición de las células TGF-β1 (48 h) A549 (Fig. 17A) y ReNcell CX® (Fig. 17B). Los ASO se incubaron durante 72 h o 96 h, respectivamente, antes de la coexposición con TGF-β1 a 48 h. Las células se marcaron con un anticuerpo contra TGF-R_{II} (columna izquierda, roja). El ADN nuclear se tiñó con DAPI (columna central, azul). El examen de las células se realizó mediante microscopía de fluorescencia (Zeiss Axio® Observer.Z1). Las imágenes se analizaron con el software Image J y el software CorelDRAW® X7, A = control sin tratar, B = Ref.1, C = Seq. ID. 218b, E = TGF-β1.

Fig. 18: el pretratamiento de ASO (Seq. ID No. 218b) y la posterior exposición simultánea a TGF-β1 conducen a una reducción intracelular de la proteína pSmad3. La expresión de la proteína pSmad3 se redujo después de la transferencia gimnótica de la ASO específica de TGF-R_{II} seguida de la coexposición de las células TGF-β1 (48 h) A549 (Fig. 18A) y ReNcell CX® (Fig. 18B). Los ASO se incubaron durante 72 h o 96 h, respectivamente, antes de la coexposición con TGF-β1 a 48 h. Las células se marcaron con un anticuerpo contra pSmad3 (columna izquierda, roja). El ADN nuclear se tiñó con DAPI (columna central, azul). El examen de las células se realizó mediante microscopía de fluorescencia (Zeiss Axio® Observer.Z1). Las imágenes se analizaron con el software Image J y el software CorelDRAW® X7, A = control sin tratar, B = Ref.1, C = Seq. ID. 218b, E = TGF β1.

Fig. 19: ASO (Seq. ID No. 218b) mejora y TGF-β1 reduce la neurogénesis en células precursoras neurales humanas ReNcell CX®. El ARNm de DCX del marcador de neurogénesis se regula al alza en las células ReNcell CX® después de la transferencia gimnótica repetida (2 x 96 h) de los ASO inventivos. Se reconoció una fuerte reducción de la expresión del ARNm de DCX después de una exposición a TGF-β1 de 8 días. Los niveles de ARNm se cuantificaron en relación con el gen de mantenimiento GNB2L1 utilizando RT-PCR cuantitativa en tiempo real y los controles normalizados a no tratados. Las estadísticas se calcularon utilizando el ANOVA ordinario de una vía seguido de la comparación múltiple post-hoc de "Tukey". A = control sin tratar, B = Ref.1, C = Seq. ID No. 218b, E = TGF-β1, ± = SEM, + p <0,05 en referencia a C 2,5 μM, p <0,05 en referencia a C 10 μM.

Fig. 20: ASO (Seq. ID No. 218b) mejora y TGF-β1 reduce la proliferación en células precursoras neurales humanas ReNcell CX®. La expresión de la proteína Ki67 del marcador de proliferación aumenta en las células ReNcell CX® después de la transferencia gimnótica repetida (2 x 96 h) de los ASO inventivos. La expresión reducida de la proteína Ki67 se reconoció después de una exposición a TGF-β1 de 8 días. Las células se marcaron con un anticuerpo contra Ki67 (columna izquierda, verde). El ADN nuclear se tiñó con DAPI (columna central, azul). El examen de las células se realizó mediante microscopía de fluorescencia (Zeiss Axio® Observer.Z1). Las imágenes se analizaron con el software Image J y el software CorelDRAW® X7, A = control sin tratar, B = Ref.1, C = Seq. ID No. 218b, E = TGF-β1.

Fig. 21: A pesar de las condiciones proliferativas, la ASO (Seq. ID No. 218b) mejora la diferenciación en las células humanas previas al cursor ReNcell CX®. Se observaron marcadores neurales NeuN (Fig. 23 A, columna izquierda, roja) y βIII-tubulina (Fig. 23 B, columna izquierda, roja) en ReNcell CX®. El tratamiento con ASO se aplicó durante 4 días iniciales en condiciones de proliferación seguidas de 4 días adicionales en condiciones de proliferación (+ EGF/FGF) o de diferenciación (- EGF/FGF). El ADN nuclear se tiñó con DAPI (columna central, azul). El examen de las células se realizó mediante microscopía de fluorescencia (Zeiss Axio® Observer.Z1). Las imágenes se analizaron con el software Image J y el software CorelDRAW® X7, A = control sin tratar, B = Ref.1, C = Seq. ID No. 218b, E = TGF-β1, + EGF/FGF = proliferación, - EGF/FGF = diferenciación.

Fig. 22: Rescate mediado por ASO (Seq. ID No. 218b) de la detención de la proliferación de células madre neurales inducida por TGF-β. Se observó proliferación de células ReNcell CX® de precursor neural humano con o sin exposición a TGF-β1 durante 7 días, seguido de un tratamiento con ASO durante 8 días. La regulación al alza del ARNm de GFAP (Fig. 24A), Ki67 (Fig. 24B) y DCX (Fig. 24C) 7 días después de la incubación previa con TGF-β1 indica la recuperación de la proliferación de células madre. Los niveles de expresión de ARNm se cuantificaron en relación con el gen de mantenimiento GNB2L1 utilizando RT-PCR cuantitativa en tiempo real y se normalizaron para el control sin tratar. A = control sin tratar, B = Ref.1, C = Seq. ID No. 218b, E = TGF-β1, ± = SEM, *p <0,05 en referencia a A, Las estadísticas se calcularon utilizando el ANOVA Ordinario de una vía seguido de las comparaciones múltiples post hoc de "Tukey".

Fig. 23: ASO reduce la proliferación de células humanas de cáncer de pulmón (A549). La expresión de la proteína Ki67 en el marcador de proliferación disminuye en las células A549 después de la transferencia gimnótica (72 h) de los ASO inventivos. Se reconoció la expresión reducida de la proteína Ki67 (columna izquierda, verde). El ADN nuclear se tiñó con DAPI (columna central, azul). El examen de las células se realizó mediante microscopía de fluorescencia (Zeiss Axio® Observer.Z1). Las imágenes se analizaron con el software Image J y el software CorelDRAW® X7, A = control sin tratar, B = Ref.1, C = Seq. ID No. 218b, E = TGF-β1.

Fig. 24: ASO reduce la proliferación de varias líneas celulares de tumores humanos. Las células HPAFII, K562, MCF-7, Panc-1 y HTZ-19 se expusieron 4x 72 h a los ASO inventivos y se analizó la proliferación mediante microscopía óptica (Nikon, TS-100® F LED). A = control sin tratar, B = Ref.1, C = Seq. ID No. 218b.

Fig. 25: El tratamiento con ASO media los efectos antifibróticos neurales y mejora el estrés celular. Se observaron células ReNcell CX® después de la preincubación con TGF-β1 (48 h) seguido de transferencia gimnótica de ASO inventiva y coexposición con tratamiento con TGF-β1 durante 96 h. Las células se marcaron con un anticuerpo contra CTGF (Fig. 29A, columna izquierda, roja), FN (Fig. 29B, columna izquierda, verde) y faloidina (actin-cytoskeleton, Fig. 29C, columna izquierda, roja). El ADN nuclear se tiñó con DAPI (columna central, azul). El examen de las células se realizó mediante microscopía de fluorescencia (Zeiss Axio® Observer.Z1). Las imágenes se analizaron con el software Image J y el software CorelDRAW® X7, A = control sin tratar, B = Ref.1, C = Seq. ID No. 218b, E = TGF-β1.

Fig. 26: El tratamiento con ASO media los efectos antifibróticos del tumor y mejora el estrés celular. Se observaron células A549 después del tratamiento con TGF-β1 o transferencia gimnótica de ASO inventiva (72 h). Las células se marcaron con un anticuerpo contra FN (Fig. 30A, columna izquierda, verde), faloidina (citoesqueleto de actina, Fig. 30B, columna izquierda, roja). El ADN nuclear se tiñó con DAPI (columna central, azul). El examen de las células se realizó mediante microscopía de fluorescencia (Zeiss Axio® Observer.Z1). Las imágenes se analizaron con el software Image J y el software CorelDRAW® X7, A = control sin tratar, B = Ref.1, C = Seq. ID No. 218b, E = TGF-β1.

Fig. 27: El tratamiento con ASO media los efectos antifibróticos del tumor. Se observaron células de cáncer de pulmón humano A549 después de la preincubación con TGF-β1 (48 h) seguido de transferencia gimnótica de ASO inventiva y co-exposición con tratamiento con TGF-β1 durante 72 h. Las células se marcaron con un anticuerpo contra CTGF (Fig. 31A, columna izquierda, roja) y FN (Fig. 31B, columna izquierda, verde). El ADN nuclear se tiñó con DAPI (columna central, azul). El examen de las células se realizó mediante microscopía de fluorescencia (Zeiss Axio® Observer.Z1). Las imágenes se analizaron con el software Image J y el software CorelDRAW® X7, A = control sin tratar, B = Ref.1, C = Seq. ID No. 218b, E = TGF-β1.

Fig. 28: El tratamiento con ASO media los efectos antifibróticos del tumor. Se observaron células de cáncer de pulmón humano A549 después de la preincubación con TGF-β1 (48 h) seguido de transferencia gimnótica de ASO inventiva y co-exposición con tratamiento con TGF-β1 durante 72 h. Las células se marcaron con un anticuerpo contra CTGF (Fig. 32A, columna izquierda, roja) y FN (Fig. 32B, columna izquierda, verde). El ADN nuclear se tiñó con DAPI (columna central, azul). El examen de las células se realizó mediante microscopía de fluorescencia (Zeiss Axio® Observer.Z1). Las imágenes se analizaron con el software Image J y el software CorelDRAW® X7, A = control no tratado, B = Ref.1, D = Seq. ID No. 218c, E = TGF-β1.

La Fig. 29 muestra el oligonucleótido antisentido de Seq ID No 209x en forma de un hueco que consta de 16 nucleótidos con 2 unidades de LNA (Gb¹ y Tb¹) en el extremo terminal 5' y 3 unidades de LNA (Ab¹ y Gb¹ y C*b¹) en el extremo terminal 3' y 11 nucleótidos de ADN (dA, dG, dT, dG, dT, dT, dA, dG, dG y dG) entre los segmentos de LNA, con enlaces(s) internucleotídico(s) de fosforotioato, la nucleobase 5-metilcitosina (C*) en la última unidad LNA del extremo terminal 5', y con -O-P(O)(S)OC₃H₆OH como grupos terminales en el extremo terminal 5' y en el extremo terminal 3'.

SP	L	Seq ID No	Secuencia, 5'-3'
2064	16	209x	/5SpC3s/Gb ¹ sTb ¹ sdAsdGsdTsdGsdTsdTsdTsdAsdGsdGsdGs Ab ¹ sGb ¹ sC*b ¹ /3SpC3s/

La Fig. 30 muestra el oligonucleótido antisentido de Seq ID No 152h en forma de un gápmero que consta de 15 nucleótidos con 4 unidades de LNA (C*b¹ y Gb¹ y Ab¹ y Tb¹) en el extremo terminal 5' y 3 unidades de LNA (Ab¹ y C*b¹ y Ab¹) en el extremo terminal 3' y 8 nucleótidos de ADN (dA, dC, dG, dC, dG, dT, dC y dC) entre los segmentos de LNA, con enlaces(s) internucleotídico(s) de fosforotioato y la nucleobase 5-metilcitosina (C*) en la primera y segunda última unidad de LNA del extremo terminal 5'.

SP	L	Seq ID No	Secuencia, 5'-3'
429	15	152h	C*b ¹ sGb ¹ sAb ¹ sTb ¹ sdAsdCsdGsdCsdGsdTsdCsdCsAb ¹ sC*b ¹ sAb ¹

5
 La Fig. 31 muestra el oligonucleótido antisentido de **Seq ID No 143h** en forma de un gámpero que consta de 14 nucleótidos con 2 unidades de LNA (**C*b¹ y Tb¹s**) en el extremo terminal 5' y 3 unidades de LNA (**C*b¹ y C*b¹ y Gb¹**) en el extremo terminal 3' y 9 nucleótidos de ADN (dC, dG, dT, dC, dA, dT, dA, dG, y dA) entre los segmentos de LNA, con enlaces(s) internucleotídico(s) de fosforotioato y la nucleobase 5-metilcitosina (C*) en la primera, tercera
 10 de la última y segunda unidad de LNA desde el extremo terminal 5'.

SP	L	Seq ID No	Secuencia, 5'-3'
355	14	143h	C*b ¹ sTb ¹ sdCsdGsdTsdCsdAsdTsdAsdTsdAsGsdAsC*b ¹ sC*b ¹ sGb ¹

15
 La Fig. 32 muestra el oligonucleótido antisentido de **Seq ID No 213k** en forma de un hueco que consta de 17 nucleótidos con 3 unidades de LNA (**C*b¹ y Ab¹ y Gb¹**) en el extremo terminal 5' y 3 unidades de LNA (**Gb¹ y Tb¹ y Gb¹**) en el extremo terminal 3' y 11 nucleótidos de ADN (dG, dC, dA, dT, dT, dA, dA, dT, dA, dA, y dA) entre los segmentos de LNA, con enlaces(s) internucleotídico(s) de fosforotioato y la nucleobase 5-metilcitosina (C*) en la
 20 primera unidad de LNA del extremo 5' terminal.

SP	L	Seq ID No	Secuencia, 5'-3'
2355	17	213h	C*b ¹ sAb ¹ sGb ¹ sdGsdCsdAsdTsdTsdAsdTsdAsdTsdAsdTsdAsGsb ¹ sTb ¹ sGb ¹

25
Ejemplos

Material y métodos

30
[0244] La mayoría de los oligonucleótidos antisentido, así como los oligonucleótidos de control o de referencia utilizados aquí, fueron sintetizados por EXIQON como oligonucleótidos personalizados de acuerdo con las necesidades de los inventores/solicitantes. Los oligonucleótidos que tienen las siguientes secuencias se utilizaron como referencias:

- 35 Ref. 0 = dCsdAsdGsdCsdCsdCsdCsdCsdGsdAsdCsdCsdCsdAsdTsdG (Seq. ID No. 147c);
 Ref. 1 = Ab1sAb1sC*b¹sdAsdCsdGsdTsdCsdTsdAsdTsdAsC*b¹sGb1sC*b¹ (Seq. ID No. 76);
 Ref. 2 = C*b¹sAb1sGb1sdCsdCsdCsdCsdGsdAsdCsdCsdCsAb1sTb1sGb1 (Seq. ID No. 147m);
 Ref. 3 = TTGAATATCTCATGAATGGA; con alas 2'-MOE (5 unidades 5' y 3') y enlaces de fosforotioato (Seq. ID No. 80);
 40 Ref. 4 =; CAGAAGAGCTATTTGGTAGT, con alas 2'-MOE (5 unidades 5' y 3') y enlaces de fosforotioato (Seq. ID No. 82);
 Ref. 5 = TGGTAGTGTTTAGGGAGCCG (Seq. ID No. 85),
 Ref. 6 = GTGCAGGGGAAAGATGAAAA (Seq. ID No. 344),
 Ref. 7 = GAGCTCTTGAGGTCCCTGTG (Seq. ID No. 345),
 45 Ref. 8 = AGCCTCTTCCTCATGCAAA (Seq. ID No. 346),
 Ref. 9 = CCTTCTCTGCTTGTTCTGG (Seq. ID No. 347), y
 Ref. 10 = GCCATGGAGTAGACATCGGT (Seq. ID No. 348).

50 Protocolos de procedimientos estandarizados

Cultivo de células:

55 **[0245]**

60

65

Tabla 10: Se usaron las siguientes líneas celulares humanas para experimentos de oligonucleótidos antisentido:

Descripción	Línea celular	CO ₂ -Contenido	Medio
Melanoma	HTZ-19	5%	DMEM F12 (Gibco 31331-018) + 1% de mezcla dM (Transferrina (30 mg/ml en agua 835 µl, AS no esencial (100x) 10 ml, Selenito sódico (0,2 mg/ml) en agua) 70 µl, 10 ml PBS), 1% P/S
Carcinoma de pulmón	A549	5%	F12 K de Kaighn + 10% FCS + 1% P/S
carcinoma hepatocelular	HepG2	5%	DMEM (Sigma D6429) + 10% FCS + 1% P/S
carcinoma hepatocelular	Hep3B	5%	DMEM (Sigma D6429) + 10% FCS + 1% P/S
Carcinoma epitelioide pancreático	Panc-1	5%	DMEM (Sigma D6429) + 10% FCS + 1% P/S
adenocarcinoma pancreático	HPAFII	5%	DMEM (Sigma D5796) + 15% FCS, 1% P/S, 1% Antibiótico/Antimicótico, 1% Solución de Vitamina MEM, 1% de AS no esencial (100x)
adenocarcinoma pancreático	BxPC-3	5%	RPMI al 5% (Gibco A10491-01) + 10% FCS + 1% P/S + 1% Antibiótico/antimicótico, 1% de solución de vitaminas MEM
cáncer de páncreas metástasis en el hígado	L3.6pl	5%	DMEM (Sigma D5796) + 15 % FCS, 1% P/S, 1% Antibiótico/Antimicótico, 1% Vitamina, 1% no esencial AS (100x)
adenocarcinoma colorrectal	HT-29	5%	DMEM (Sigma D5796) + 15 % FCS, 1% P/S, 1% Antibiótico/Antimicótico, 1% Solución de Vitamina MEM, 1% no esencial AS (100x)
adenocarcinoma epitelial colorrectal	CaCo2	5%	DMEM (Sigma D5796) + 20 % FCS + 1% P/S
carcinoma gástrico	TMK-1	5%	DMEM (Sigma D5796) + 10% FCS + 1% P/S, 1% Antibiótico/Antimicótico, 1% Solución de Vitamina MEM
astrocitoma maligno	HTZ-243	5%	DMEM (Sigma D6046) + 10% FCS + 1% P/S + 1% no esencial AS + 1% Solución de Vitamina MEM
carcinoma de mama	MCF-7	5%	DMEM (Sigma D6046) + 10 % FCS + 1% P/S
adenocarcinoma prostática	PC-3M	5%	RPMI (Gibco #61870-010), 10 % FCS, 1% piruvato sódico, 1% bicarbonato sódico, 1 % P/S
leucemia mielógena aguda	KG-1	5%	RPMI (Gibco #61870-010) + 10 %FCS + 1% P/S
leucemia mielógena crónica	K562	5%	RPMI (Gibco #61870-010) + 10 % FCS + 1% P/S
leucemia monocítica	THP-1	5%	RPMI (Gibco #61870-010) + 10 % FCS + 0,5 % P/S

(continúa)

	Descripción	Línea celular	CO ₂ -Contenido	Medio
5	leucemia promielocítica	HL60	5%	RPMI (Gibco #61870-010) + 10 % FCS + 0,5 % P/S
	leucemia linfocítica	CEM-C7H2	5%	RPMI (Gibco #61870-010) + 10 % FCS + 0,5 % P/S
10	leucemia linfoblástica aguda	Pre-B697	5%	RPMI (Gibco #61870-010) + 10 % FCS + 0,5 % P/S
	linfoma histiocítico	U937	5%	RPMI (Gibco #61870-010) + 10 % FCS + 0,5 % P/S
15	Células precursoras neuronales de la región cerebral cortical	ReNcell CX	5%	Medio de mantenimiento de células madre neuronales ReNcell (Millipore #SCM005) + humano FGF Basic humano + EGF humano + Suplemento N2

[0246]

20 FCS (ATCC #30-2020)
 Piruvato de sodio (Sigma #S8636)
 Bicarbonato de sodio (Sigma #S8761-100ML)
 Transferrina (Sigma #T8158-100MG)
 25 Selenita Natrium (Sigma #S5261-10G)
 Penicilina/estreptomina (P/S)(Sigma-Aldrich #P4458)
 Aminoácidos no esenciales (AS) 100x (Sigma #M7145)
 Antibiótico/Antimicótico (Sigma #A5955)
 Solución de vitamina MEM (Sigma #M6895)
 30 PBS (Sigma #D8537)
 FGF básico humano (Millipore #GF003)
 EGF humano (Millipore #GF144)
 Suplemento N-2 (Life Technologies #17502048)
 Medio de mantenimiento de células madre neuronales ReNcell (Millipore #SCM005)

35

Cultivando y diseminando células:

40 **[0247]** Después de eliminar el medio, las células se lavaron con PBS y se incubaron con acutasa (Sigma-Aldrich P4458) (5 min, TA). Después de la incubación, las células se lavaron y se agregó medio completo (3 ml, compañía: ver Tab.10 para las respectivas líneas celulares). Posteriormente, las células se transfirieron a una taza Eppendorf de 5 ml y se centrifugaron (5 min, 1000 rpm, TA). Gránulo de 1 botella T75 (Sarstedt #833,910,302) se resuspendió en 2,5 ml de medio fresco. El número de células de la suspensión celular se determinó con el contador de células automatizado Luna-FLTM (Biozym 872040) mediante tinción con el kit de viabilidad del ensayo de naranja de acridina/yoduro de propidio (Biozym 872045). El recubrimiento con laminina (Millipore CC095) de las placas fue necesario para la adhesión de las células ReNcell CX® antes de sembrar las células para experimentos en una concentración de 2 µg/cm². La solución de laminin-PBS se administró en la cantidad correspondiente directamente a los pocillos y matraces y se incubó durante 1,5 horas a 37°C. Para los experimentos, las células se sembraron y se recolectaron como se menciona en la parte del método del capítulo experimental respectivo. Después de la incubación durante la noche de las células a 37°C y 5% de CO₂, las células se trataron como se explica en la descripción experimental respectiva. Se administraron 500 µl de la suspensión celular restante en una nueva botella de T75 llena con 10 ml de medio completo fresco para el cultivo de células.

50

Análisis de ARN

55 **[0248]** El ARN total para la síntesis de ADNc se aisló usando el mini kit de ARN innuPREP® (Analytik Jena 845-KS-2040250) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para sintetizar el ADNc, el contenido total de ARN se determinó utilizando un fotómetro (Eppendorf, BioPhotometer D30 #6133000907), diluido con agua libre de nucleasas. Posteriormente, el ADNc de la primera cadena se preparó con el kit de síntesis de ADNc iScript™ (BioRad 170-8891) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Para el análisis de ARNm, la RT-PCR en tiempo real se realizó utilizando un sistema de detección de PCR en tiempo real CFX96 Touch™ (BioRad 185-5196).

60

Todos los pares de cebadores se estandarizaron para usar y se mezclaron con la solución Mastermix lista para usar (SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (BioRad 172-5271) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Guía rápida de BioRad Prime PCR). Pares para experimentos in vivo fueron adaptados de acuerdo a las especies individuales.

65

Tabla 11: Pares de cebadores utilizados para el análisis de ARNm

Par de cebador	Empresa	Ensayo ID único
CDKN1A Humano	BioRad	qHsaCID0014498
CDNK1B Humano	BioRad	qHsaCID0012509
CFLAR Humano	BioRad	qHsaCID0038905
Col4A1 Humano	BioRad	qHsaCID0010223
CTGF Humano	BioRad	qHsaCED0002044
DCX Humano	BioRad	qHsaCID0010869
FN1 Humano	BioRad	qHsaCID0012349
GFAP Humano	BioRad	qHsaCID0022307
GNB2L1 Humano	BioRad	qHsaCEP0057912
ID-2 Humano	BioRad	qHsaCED0043637
MKi67 Humano	BioRad	qHsaCID0011882
Nestin Humano	BioRad	qHsaCED0044457
SERPINE1 Humano	BioRad	qHsaCED0043144
SOX2 Humano	BioRad	qHsaCED0036871
TGF β -RII Humano	BioRad	qHsaCID0016240
TP53 Humano	BioRad	qHsaCID0013658

[0249] Como plantilla, se utilizó 1 μ l de ADNc respectivo. El ARN que no se transcribió de manera inversa sirvió como control negativo para la RT-PCR en tiempo real. Para la cuantificación relativa de mantenimiento, se usó la subunidad de la proteína beta-2 1 (GNB2L1) de la proteína de unión a nucleótidos de guanina. La RT-PCR en tiempo real se realizó con el siguiente protocolo:

Tabla 12: Protocolo para RT-PCR en tiempo real.

Período de inicio	2 min	95 °C	1x
Desnaturalización	5s	95 °C	40x
Recocido, Extensión	30 s	60 °C	40x
Curva de fusión		65 °C - 95 °C (0,5 °C gradiente)	1x

[0250] Posteriormente, se usó BioRad CFX Manager 3,1 para la cuantificación del nivel de ARNm respectivo en relación con el ARNm de GNB2L1 y luego se normalizó a un control sin tratar.

Transferencia Western:

[0251] Para el análisis de proteínas, se lisaron células/tejidos utilizando reactivo de extracción de proteína de mamífero M-PER®/reactivo de extracción de proteína de tejido T-PER® (Thermo Scientific, #78501/#78510) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, respectivamente. Los geles de SDS-acrilamida (10%) se produjeron utilizando el TGX Stain Free™ Fast Cast™ Acrylamide Kit (BioRad #161-0183) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras de proteínas (20 μ l) se diluyeron 1:5 con Lämmli-buffer (6,5 μ l, Roti®-Load1, Roth K929,1), se incubaron a 60°C durante 30 minutos y se cargaron en el gel con todo el volumen de solución proteica. La separación de las proteínas se realizó mediante electroforesis utilizando PowerPac™ Basic Power Supply (Biorad #164-5050SP) y una cámara de electroforesis de células Tetra Mini-PROTEAN® (BioRad #165-8001-SP) (200 V, 45 min). Después de la electroforesis, las proteínas se transfirieron utilizando el sistema de transferencia turbo Trans-Blot® (BioRad 170-4155SP). Todos los materiales para la transferencia Western se incluyeron en el kit Trans-Blot® Turbo RTA PVDF-Midi (BioRad #170-4273).

La membrana de PVDF para el procedimiento de transferencia se activó en metanol (Merck #1.06009.2511) y se equilibró en tampón de transferencia 1x. Después de la transferencia (25 V, 1 A, 30 min), las membranas se lavaron (3x, 10 min, RT) con 1x TBS (Roth 10,60.1) que contenía 0,5 ml de Tween-20 (Roth 9127,1). Luego, las membranas se bloquearon con BSA al 5% (Albúmina-IgG libre, Roth 3737,3) diluida con TBS-T durante 1 hora a temperatura ambiente, los anticuerpos primarios (diluidos en BSA al 0,5% en TBS-T, Tabla 13) se agregaron y se incubaron a 4°C durante 2 días. Los anticuerpos para experimentos in vivo fueron elegidos por la especificidad de la especie en consecuencia.

Tabla 13: Anticuerpos utilizados para el análisis de transferencia Western.

Anticuerpo primario	Dilución	Empresa	Nº de orden
Alfa-Tubulina HRP-enlazado (conejo)	1:2000	Señalización celular	cs12351s
ColIV (conejo)	1:1000	Abcam	ab6586
CTGF (conejo)	1:1000	Genetex	GTX-26992
FN (conejo)	1:250	Proteintech	15613-1-AP
GAPDH XP HRP-enlazado (conejo)	1:1000	Señalización celular	cs8884s
Ki67 (conejo)	1:500	Abcam	ab15580
pAkt (conejo)	1:1000	Señalización celular	cs4060s
pErk1/2 (conejo)	1:1000	Señalización celular	cs4370s
pSmad2 (conejo)	1:500	Señalización celular	cs3104
TGF- β RII (conejo)	1:400	Aviva	ARP44743-T100
Anticuerpo secundario	Dilución	Empresa	Nº de orden
Anti-conejo IgG, HRP-enlazado	1:10000	Señalización celular	cs#12351S

[0252] En el siguiente paso, las membranas se lavaron en TBS-T (3x 10 min, RT) y se incubaron con el anticuerpo secundario (1h, RT, Tabla 13). Después de la incubación, las transferencias se lavaron con TBS-T, emergieron utilizando el sustrato LuminataTMForte Western HRP (Millipore WBLUF0500) y las bandas se detectaron con un analizador de imagen luminiscente (ImageQuantTM LAS 4000, GE Healthcare). Posteriormente, las transferencias se lavaron en TBS-T (3x 10min, RT) y se bloquearon con BSA al 5% diluido en TBS-T (1h, TA). Para comparación con el personal de mantenimiento, las membranas se incubaron con anti alfa tubulina conjugada con HRP (1:2000 en BSA al 0,5%, 4°C, durante la noche). Al día siguiente, las transferencias se obtuvieron utilizando LuminataTMForte Western HRP Substrate (Millipore WBLUF0500) y se detectaron bandas con el analizador de imagen luminiscente. Finalmente, las transferencias se lavaron con TBS-T (3x, 5 min) y se tiñeron usando 1x solución Roti[®]-Blue (Roth A152.2) y se secaron a temperatura ambiente.

Inmunocitoquímica

[0253] Las células se trataron y se recogieron como se describió anteriormente. Después de la fijación de las células con Roti[®]-Histofix 4% (Roth P087,4) en 8 pocillos, se lavaron placas de portaobjetos de cultivo celular (6 min, TA) tres veces con PBS. Después de bloquear las células durante 1 hora a temperatura ambiente con solución de bloqueo (Zytomed ZUC007-100), las células se incubaron con los anticuerpos primarios respectivos enumerados en la Tabla 14 y se incubaron a 4°C durante la noche.

Posteriormente, los portaobjetos de cultivo celular se lavaron tres veces con PBS después de la incubación con anticuerpo secundario (1 h, TA). Todas las diluciones de anticuerpos se prepararon con Anticuerpo-Diluyente (Zytomed ZUC025-100).

Tabla 14: Anticuerpos utilizados para la inmunocitoquímica.

Anticuerpo primario	Dilución	Empresa	Nº de orden
ColIV (conejo)	1:50	Abcam	ab6586
CTGF (conejo)	1:50	Genetex	GTX26992
β -Tubulina (conejo)	1:100	Señalización celular	cs5568
FN (conejo)	1:50	Proteintech	15613-1-AP
Ki67 (conejo)	1:100	Abcam	ab15580
NeuN (conejo)	1:250	Abcam	Ab104225
Faloidina Alexa Fluor 555	1:20	Señalización celular	cs8953
pSmad2 (conejo)	1:50	Señalización celular	cs3104s
pSmad3 (conejo)	1:50	Señalización celular	cs9520s
TGF-R _{II} (conejo)	1:50	Millipore	06-227
Anticuerpo secundario	Dilución	Empresa	Nº de orden
Alexa Fluor 488	1:750	Life Technologies	A21441
Cy3 cabra-anti-conejo	1:1000	Life Technologies	A10520

[0254] Después de la incubación con anticuerpo secundario, las células se lavaron tres veces con PBS, los cubreobjetos se separaron de la placa de cultivo celular y se montaron con VECTASHIELD[®] HardSetTM con DAPI (Biozol #VEC-H-1500). Los portaobjetos se secaron durante la noche a 4°C antes de la microscopía de fluorescencia

(Zeiss, Axio® Observer.Z1). Las imágenes se analizaron con el software Image J y el software CorelDRAW® X7,

Experimentos in vivo

5 Ensayo de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)

[0255] Las PBMC se aislaron a partir de capas buffy correspondientes a 500 ml de unidades de transfusión de sangre completa. Cada unidad se obtuvo de voluntarios sanos y se utilizó glucosa-citrato como anti-aglutinante. El banco de sangre Suhl del Instituto de Medicina Transfusional de Alemania preparó y entregó la sangre de la capa leucocitaria. Cada donación de sangre se monitorizó para detectar anticuerpos contra el VIH, anticuerpos contra el VHC, antígeno HBs, TPHA, ARN del VIH y SPGT (ALAT). Solo las muestras de sangre con resultado negativo para agentes infecciosos y con un valor SPGT normal se utilizaron para la separación de leucocitos y eritrocitos mediante centrifugación a baja velocidad. El aislamiento de PBMC se realizó aproximadamente 40 h después de la donación de sangre por centrifugación en gradiente usando Ficoll-Histopaque® 1077 (Heraeus™ Multifuge™ 3 SR). Para el ensayo de IFN α , las PBMC se sembraron a 100.000 células/96 pocillos en 100 μ l de medio completo más aditivos (RPMI1640, + L-Glu, + 10% FCS, + PHA-P (5 μ g/ml), + IL-3 (10 μ g/ml) y los compuestos de ensayo (5 μ l) se agregaron para incubación directa (24 h, 37°C, 5% CO₂). Para el ensayo de TNF α , las PBMC se sembraron a 100.000 células/96 pocillos en 100 μ l de medio completo sin aditivos (RPMI1640, + L-Glu, + 10% FCS) y se agregaron compuestos de prueba (5 μ l) para incubación directa (24 h, 37°C, 5% CO₂). ELISA (medida duplicada de los sobrenadantes agrupados, 20 μ l) para huIFN α (eBioscience, #BMS216INSTCE) se realizó de acuerdo con el protocolo del fabricante. El ELISA (medición duplicada de sobrenadantes combinados, 20 μ l) para huTNF α (eBioscience, BMS223INSTCE) se realizó de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Ensayo de ADNb

[0256] Los niveles de ARNm de TGF-R_{II} se determinaron en el lisado de hígado, riñón y pulmón mediante un ensayo de ADNb de acuerdo con las instrucciones del fabricante (kit QuantiGene®, Panomics/Affimetrix).

Inmunofluorescencia

[0257] La médula espinal y el tejido cerebral embebidos en parafina se cortaron en secciones de 5 μ m (3-4 portaobjetos por placa de objeto). Las secciones de parafina se desparafinaron y se sometieron a un proceso de calentamiento en tampón de citrato (10 mM, 40 min) en un horno de microondas. Posteriormente, las secciones desparafinadas se incubaron con H₂O₂ al 0,3% (30 min, TA), se lavaron con PBS (10 min, TA) y se bloquearon con solución de bloqueo (Zytomed ZUC007-100) durante 30 min. Después del bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente con solución de bloqueo (Zytomed), los portaobjetos se incubaron con 150 μ l de los anticuerpos primarios respectivos y se incubaron a 4°C durante la noche. Después de lavarse con PBS (tres veces, 5 min TA), las rodajas se incubaron con el anticuerpo secundario durante 1 hora a temperatura ambiente. Todas las diluciones de anticuerpos se prepararon con diluyente de anticuerpos (Zytomed ZUC025-100). Luego, las rodajas se lavaron nuevamente con PBS (tres veces, 5 min, TA) y se montaron usando medio de montaje VECTASHIELD® con DAPI (Vector). Los anticuerpos para la inmunofluorescencia fueron comparables a los experimentos de cultivo celular y se adaptaron para cada especie.

Electroquimioluminiscencia

[0258] Para las alteraciones inmunológicas y hematológicas, se utilizó la técnica de electroquimioluminiscencia (MesoScale Discovery®, Maryland, Estados Unidos). Para cada ensayo, se utilizaron 25 μ l de las muestras de proteína, sangre y licor y el procedimiento se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

50 Ensayo de BrdU

[0259] El etiquetado de las células en división se realizó mediante inyección intraperitoneal del análogo de timidina BrdU (Sigma, Steinheim, Alemania) a 50 mg/kg de peso corporal utilizando una solución estéril de 10 mg/ml de BrdU disuelto en una solución de NaCl al 0,9% (p/v). Las inyecciones de BrdU se realizaron diariamente durante la última semana experimental.

Cirugía

[0260] Para la infusión central crónica, los animales se sometieron a cirugía para una cánula icv unida a una minibomba osmótica Alzet® (ratones, ratas, velocidad de infusión: 0,25 μ l/h, Alzet®, Model 2004, Cupertino, EE. UU.) o una bomba de presión de gas. (Monos Cynomolgus, velocidad de infusión 0,25 ml/24 h, Tricumed®, Model IP 2000V, Alemania). La cánula y la bomba se implantaron estereotópicamente bajo anestesia con ketamina/xilacina (Baxter, GmbH, Alemania) y en condiciones semi-estériles. Cada bomba de presión de minibomba osmótica/gas se implantó por vía subcutánea en la región abdominal a través de una incisión en la piel del cuello de los animales y se conectó con la cánula icv mediante un tubo de silicona. Los animales se colocaron en un marco estereotáxico y la cánula icv se bajó hacia el ventrículo lateral derecho. La cánula se fijó con dos tornillos de acero inoxidable utilizando

5 cemento dental (Kallocryl, Speiko®-Dr. Speier GmbH, Münster, Alemania). La piel del cuello se cerró con suturas. Durante la cirugía, la temperatura corporal se mantuvo mediante una almohadilla térmica. Para evitar infecciones postquirúrgicas, los animales fueron tratados localmente con betaisodona® (Mundipharma GmbH, Limburg, Alemania) y recibieron antibióticos (sc, Baytril® 2,5% Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Alemania). El tubo se llenó con la solución respectiva. Sangre, licor y tejidos fueron recolectados para su análisis. La verificación histológica de los sitios de implantación de icv se realizó en cortes cerebrales teñidos con violeta de cresilo de 40 µm.

Parámetros de resultados y análisis funcional.

10 **[0261]** El inicio de la enfermedad sintomática, el inicio de la primera paresia y la supervivencia se usaron como puntos finales in vivo. El inicio de la enfermedad sintomática se definió como la falta de estiramiento de la pierna como reacción a la suspensión de la cola. El punto temporal en el que se detectaron por primera vez las deficiencias de la marcha (por ejemplo, cojear) se clasificó como el inicio de la primera paresia. Estos parámetros se determinaron diariamente a partir de los 40 días.

15 **[0262]** Para monitorizar la progresión de la enfermedad, se realizó una prueba de rueda de rodadura (LMTB, Berlín, Alemania). Los animales se enjaularon por separado con acceso a una rueda móvil a partir de los 33 días de edad. La actividad motora se correlacionó directamente con las rotaciones por minuto, generadas por cada animal en el volante. Cada giro completo de la rueda disparó dos señales electromagnéticas, directamente alimentadas a una computadora conectada a un máximo de 120 ruedas. Los datos de la rueda de rodadura se registraron y analizaron con el software "Maus Vital" (Laser-und Medizin-Technologie, Berlín, Alemania). El tiempo de evaluación duró 12 horas de 18:00 h a 6:00 h.

Prueba de aprendizaje espacial (Morris-Water-Maze)

25 **[0263]** Las pruebas de comportamiento se realizaron entre las 8:00 h y las 13:00 h.

30 **[0264]** Las ratas se entrenaron en un estanque circular negro (1,4 m de diámetro, 50 cm de altura, lleno de agua tibia a 20°C hasta una altura de 30 cm) para encontrar una diana blanca visible (10 cm de diámetro, elevada por encima de la superficie del agua de aproximadamente 1 cm) que se ubicó a lo largo del estudio en el centro del mismo cuadrante imaginario (proximamente señalado). Cada animal fue entrenado para navegar a la plataforma en 3 sesiones consecutivas con 12 ensayos/sesiones, una sesión por día y un intervalo entre ensayos de 10-20 s.

Análisis microbiológico

35 **[0265]** Las muestras de oligonucleótido antisentido se analizaron microbiológicamente de acuerdo con Ph. Eur. 2.6.12, USP 30 <61> con respecto al recuento microbiano aeróbico total (TAMC) y el recuento total de hongos y levaduras (TYMC).

Cromatografía líquida de alto rendimiento de intercambio aniónico (AEX-HPLC)

40 **[0266]** La integridad y estabilidad de las muestras de oligonucleótido antisentido (ASO) se determinó mediante AEX-HPLC utilizando el sistema ÄK-TAexplorer™ (GE healthcare, Freiburg, Alemania). Las muestras de ASO purificadas se desalinizaron mediante precipitación con etanol. La identidad de la ASO se confirmó mediante espectrometría de masas de ionización electrónica (ESI-MS) y la pureza se determinó mediante AEX-HPLC con una columna Dionex DNAPac™ 200 (4 x 250 mm).

Ejemplo 1: Determinación de la actividad inhibitoria de oligonucleótidos antisentido de la invención a nivel de ARNm

1.1 Transfección de oligonucleótidos antisentido

50 **[0267]** La actividad inhibitoria de varios oligonucleótidos antisentido dirigidos a TGF-R_{II} se ensayó en células de cáncer de pulmón epitelial humano (A549). El ARNm de TGF-R_{II} se cuantificó mediante un ensayo de ADN ramificado en el ARNm total aislado de células incubadas con oligonucleótidos específicos de TGF-R_{II}.

Descripción del método:

60 **[0268]** Las células se obtuvieron y se cultivaron como se describe anteriormente. La transfección de oligonucleótidos antisentido se realizó directamente después de sembrar 10.000 células A549/pocillo en una placa de 96 pocillos, y se llevó a cabo con Lipofectamine® 2000 (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Alemania, n° de catálogo 11668-019) como se describe por el fabricante. En dos experimentos independientes de dosis única realizados por cuadruplicado, los oligonucleótidos se transfectaron a una concentración de 20 nM. Después de la transfección, las células se incubaron durante 24 horas a 37°C y 5% de CO₂ en una incubadora humidificada (Heraeus GmbH, Hanau, Alemania). Para la medición del ARNm de TGF-R_{II}, las células se recolectaron y se lisaron a 53°C siguiendo los procedimientos recomendados por el fabricante del kit de exploración QuantiGene® (Panomics, Fremont, California,

EE. UU., N° de Cat. QG0004) para el aislamiento de ADN ramificado (ADNb). Para la cuantificación del ARNm del gen de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) de mantenimiento se utilizó el kit de exploración QuantiGene®, mientras que la cuantificación del ARNm de TGF-R_{II} se realizó con QuantiGene® 2,0 (fabricación personalizada para Axolabs GmbH, Kulmbach, Alemania). Después de la incubación y la lisis, se incubaron 10 ml de los lisados con conjuntos de sondas específicos para TGF-R_{II} humano y GAPDH humana. Ambos tipos de reacción se procesaron de acuerdo con el protocolo del fabricante para el kit QuantiGene® respectivo. La quimioluminiscencia se midió en un contador Victor2™ multilabel (Perkin Elmer, Wiesbaden, Alemania) como RLU (unidades de luz relativa) y los valores obtenidos con los conjuntos de sondas TGF-R_{II} se normalizaron a los valores GAPDH respectivos para cada pocillo y luego se normalizaron a la correspondiente lectura de ARNm de células tratadas de forma simulada.

Resultados

[0269] Los resultados muestran la eficaz regulación por disminución de TGF-R_{II} por varios ASO después de la transfección de células A549. Baja regulación después de la transfección de oligonucleótidos de referencia. 6 - Ref. 10 no fue tan eficiente y dio lugar a una regulación a la baja de >60%.

Tabla 15: Regulación a la baja del ARNm de TGF-R_{II}. Transfección con oligonucleótidos antisentido TGF-R_{II} específicos (ASO) en células de carcinoma epitelial de pulmón humano (A549). La cuantificación de los niveles de expresión de ARNm se realizó en relación con el gen de mantenimiento GAPDH utilizando el kit QuantiGene®. Luego, las sondas se normalizaron a la correspondiente lectura ARNm de células tratadas de forma simulada.

	A549 (c= 20 nM)			
	GAPDH		TGF-R _{II}	
	Media	DE	Media	DE
ASO				
Seq. ID No. 141j	1,41	0,05	0,02	0,01
Seq. ID No. 143aj	0,76	0,03	0,02	0,01
Seq. ID No. 139c	0,9	0,03	0,02	0,01
Seq. ID No. 145c	0,91	0,05	0,03	0,01
Seq. ID No. 209ax	1,52	0,58	0,03	0,01
Seq. ID No. 152ak	0,88	0,03	0,04	0
Seq. ID No. 218ar	1,08	0,03	0,04	0
Seq. ID No. 144c	0,5	0,07	0,05	0,03
Seq. ID No. 210ap	0,92	0,05	0,05	0,01
Seq. ID No. 142c	1,33	0,05	0,06	0,03
Seq. ID No. 213ak	1,2	0,03	0,07	0,01
Seq. ID No. 153f	1,09	0,07	0,08	0,03

Conclusión

[0270] El ARNm de TGF-R_{II} fue dirigido eficazmente por los ASO inventivos. Los ASO nombrados lograron una regulación a la baja efectiva del ARNm diana después de la transfección de células A549.

1,2 Captación gimnótica de oligonucleótidos antisentido

1.2.1a Comparación de reducción diana entre ASO inventivos y secuencias de la técnica anterior mediante transferencia gimnótica en células A549 y Panc-1

[0271] La actividad reguladora a la baja de varios oligonucleótidos antisentido dirigidos a TGF-R_{II} se ensayó en células tumorales epiteliales humanas de pulmón (A549) por captación directa sin reactivos de transfección ("captación gimnótica"). El ARNm de TGF-R_{II} se cuantificó mediante un ensayo de ADN ramificado en el ARNm total aislado de células incubadas con oligonucleótidos específicos de TGF-R_{II}.

Descripción del método:

[0272] Las células se obtuvieron y se cultivaron como se describe en los métodos generales. La transferencia gimnótica de oligonucleótidos antisentido se realizó preparando una placa de 96 pocillos con los oligonucleótidos antisentido respectivos y posteriormente sembrando 10.000 células (Panc-1) u 8.000 células (A549)/pocillo. Los experimentos se realizaron por cuadruplicado, los oligonucleótidos se utilizaron en concentraciones finales de 5 µM (Panc-1) y 7,5 µM (A549). Las células se incubaron durante 72 horas a 37°C y 5% de CO₂ en una incubadora

humidificada (Heraeus GmbH, Hanau, Alemania). Para la medición del ARNm de TGF-R_{II}, las células se recogieron y se lisaron a 53°C siguiendo los procedimientos recomendados por el fabricante del kit de exploración QuantiGene® (Panomics, Fremont, California, EE.UU., N° de Cat. QG0004) para ADN ramificado (ADNb). Para la cuantificación del ARNm de GAPDH del gen de mantenimiento doméstico, se utilizó el Kit de Exploración QuantiGene®, mientras que la cuantificación del ARNm de TGF-R_{II} se realizó con QuantiGene® 2.0 (fabricación personalizada de Axolabs GmbH, Kulmbach, Alemania). Después de la incubación y lisis, se incubaron 10 µl de los lisados con conjuntos de sondas específicas para TGF-R_{II} humano y GAPDH humana. Ambos tipos de reacción se procesaron de acuerdo con el protocolo del fabricante para el kit QuantiGene® respectivo. La quimioluminiscencia se midió en un contador Victor2™ multilabel (Perkin Elmer, Wiesbaden, Alemania) como RLUs (unidades de luz relativa) y los valores obtenidos con los conjuntos de sondas TGF-R_{II} se normalizaron a los valores de GAPDH respectivos para cada pocillo y luego se normalizaron a la lectura de ARNm correspondiente de las células tratadas con PBS.

[0273] Los resultados seleccionados se muestran en la Tabla 16a. Otras modificaciones de la Seq. ID No. 209ay, Seq. ID No. 209ax y Seq. ID No. 209y, es decir, los ASO enumerados en la Tabla 6 de la descripción, mostraron valores comparables a estos tres oligonucleótidos antisentido. Además, modificaciones de la Seq. ID No. 152h, es decir, los ASO enumerados en la Tabla 5 de la descripción, mostraron valores comparables a este oligonucleótido antisentido. Modificaciones de la Seq. ID No. 218b, es decir, los ASO enumerados en la Tabla 8 de la descripción, mostraron valores comparables a la secuencia de oligonucleótidos antisentido. ID No. 218b. Modificaciones de la Seq. ID No. 213k, es decir, los ASO enumerados en la Tabla 9 de la descripción, mostraron valores comparables a la secuencia de oligonucleótidos antisentido. ID No. 213k. También modificaciones de la Seq. ID No. 210q, es decir, los ASO enumerados en la Tabla 7 de la descripción, mostraron valores comparables a oligonucleótidos antisentido Seq. ID No. 210q. Finalmente, modificaciones de la Seq. ID No. 143h, es decir, los ASO enumerados en la Tabla 4 de la descripción, mostraron valores comparables a los oligonucleótidos antisentido Seq. ID No. 143h. La transferencia de oligonucleótidos antisentido enumerados en las Tablas 4-9 dio como resultado una regulación a la baja más potente del ARNm TGF-R_{II} diana en comparación con la transferencia de secuencias de referencia ensayadas (A549: regulación a la baja <0,5; células Panc1: regulación a la baja <0,4).

Tabla 16a Eficacia de la regulación a la baja del ARNm diana mediante transferencia gimnótica. El ARNm de TGF-R_{II} remanente después de la captación gimnótica de ASO específicos de TGF-R_{II} en células A549 y Panc-1, Los niveles de expresión de ARNm se determinaron en relación con el gen de mantenimiento gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y se compararon con células tratadas con PBS como control de referencia (= 1) utilizando el kit QuantiGene®.

ASO	ARNm restante de ASO de TGF-R _{II} (células tratadas con PBS = 1)			
	Células A549		Células Panc1	
	media	DE	media	DE
Seq. ID No. 209ay	0,11	0,01	0,07	0,02
Seq. ID No. 209ax	0,14	0,02	0,08	0,01
Seq. ID No. 209bb	0,19	0,01	0,11	0,01
Seq. ID No. 209az	0,19	0,03	0,13	0,02
Seq. ID No. 209ba	0,23	0,02	0,18	0,03
Seq. ID No. 209y	0,27	0,04	0,17	0,01
Seq. ID No. 152h	0,29	0,04	0,12	0,02
Seq. ID No. 218b	0,30	0,02	0,07	0,01
Seq. ID No. 213k	0,34	0,04	0,17	0,04
Seq. ID No. 210q	0,37	0,05	0,18	0,02
Seq. ID No. 210aq	0,39	0,03	0,18	0,02
Seq. ID No. 143h	0,43	0,04	0,35	0,05
Ref. 2	0,59	0,05	0,40	0,04
Ref. 0	0,89	0,06	1,10	0,07
Ref. 3	0,68	0,03	0,62	0,03
Ref. 4	0,74	0,04	0,71	0,01

Conclusión

[0274] La transferencia gimnótica de los ASO inventivos da como resultado una regulación a la baja continuamente más fuerte del ARNm de TGF-R_{II} diana que la transferencia de secuencias de referencia ensayadas. Los oligonucleótidos antisentido reivindicados superaron todas las secuencias ensayadas conocidas de la técnica anterior, independientemente de la línea celular humana elegida. Sin embargo, en general, los oligonucleótidos antisentido que tienen una longitud de 12-20 nucleótidos dan como resultado una regulación a la baja más efectiva

del ARNm del TGF-R_{II} diana que los oligonucleótidos antisentido más cortos o más largos. Este efecto fue aún más notable para oligonucleótidos antisentido que tienen una longitud de 14 - 18 nucleótidos, que en general muestran los efectos más potentes.

5 **1.2.1b Análisis de transferencia gimnótica en células A549 por ensayo de ADN ramificado**

[0275] Los oligonucleótidos antisentido más efectivos contra TGF-R_{II} de las pantallas de transfección se caracterizaron adicionalmente por la captación de gimnótica en células A549. El ARNm de TGF-R_{II} se cuantificó por ADN ramificado en el ARNm total aislado de células incubadas con oligonucleótidos antisentido específicos de TGF-R_{II}.

10 Descripción del método:

15 [0276] Las células A549 se cultivaron como se describe anteriormente en condiciones estándar. Para los experimentos de dosis única y dosis-respuesta, se sembraron 80.000 células A549/pocillo en una placa de cultivo de 6 pocillos y se incubaron directamente con oligonucleótidos a una concentración de 7,5 µM. Para la medición del ARNm de TGF-R_{II}, las células se recolectaron, se lisaron a 53°C y se analizaron mediante un ensayo de ADN ramificado siguiendo los procedimientos recomendados por el fabricante del kit de exploración QuantiGene® (Panomics, Fremont, California, EE.UU., N° de Cat. QG0004) como se describe arriba (ver 1,1).

20 Resultados

25 [0277] Los ASO listados en la Tabla 16b mostraron un nivel de ARNm diana reducido de TGF-R_{II} en relación con el gen de mantenimiento GAPDH en células A549. Los diez ASO más eficientes también se ensayaron para determinar la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀). Todos juntos Seq. ID No. 209t, Seq. ID No. 218b, Seq. ID No. 218c y Seq. ID No. 209y conducen a la mayoría de los derribos adecuados de TGF-R_{II} a niveles de concentración bajos.

30 **Tabla 16b: regulación a la baja del ARNm de TGF-R_{II} después de la captación gimnótica de ASOs específicos de TGF-R_{II} en células A549.**

Los niveles de ARNm se determinaron en relación con el gen de mantenimiento GAPDH utilizando el kit QuantiGene®. CI₅₀ = concentración inhibitoria para el 50% de la regulación a la baja, pos. Ctrl: aha-1 = activador del choque térmico 90kDa El homólogo 1 de la ATPasa (Aha1) dirigió el LNA como control positivo, Ref,1 = Control aleatorizado.

ASO	TGF-R _{II} n=4 DE		GAPDH n=4 DE		CI ₅₀ n=4
Seq. ID No. 209t	0,19	0,05	1,13	0,11	1,63
Seq. ID No. 218c	0,25	0,04	0,94	0,18	1,17
Seq. ID No. 218b	0,26	0,08	1,08	0,28	2,54
Seq. ID No. 218q	0,27	0,07	1,11	0,08	2,39
Seq. ID No. 209y	0,34	0,06	0,96	0,06	1,57
Seq. ID No. 218t	0,36	0,12	0,76	0,04	2,57
Seq. ID No. 218m	0,41	0,06	1,16	0,29	1,66
Seq. ID No. 209w	0,44	0,07	1,00	0,11	5,76
Seq. ID No. 218p	0,46	0,12	0,88	0,07	
Seq. ID No. 209v	0,48	0,25	0,96	0,07	3,10
Seq. ID No. 209x	0,52	0,02	0,87	0,06	5,60
Seq. ID No. 218u	0,53	0,20	0,79	0,05	
Seq. ID No.218v	0,54	0,13	0,77	0,04	
Seq. ID No. 210q	0,60	0,23	1,11	0,11	
Seq. ID No. 218o	0,61	0,15	0,96	0,06	
Seq. ID No. 210p	0,65	0,24	1,01	0,23	
Seq. ID No.218n	0,89	0,36	1,07	0,22	
Seq. ID No. 210o	0,95	0,08	0,97	0,14	
Seq. ID No. 209s	0,96	0,31	1,14	0,24	
pos. Ctrl aha-1	0,22	0,04	0,77	0,02	
Ref.1	1,43	0,40	1,27	0,18	

Conclusión

[0278] La regulación por disminución diana por los ASO inventivos más eficientes fue nuevamente excelente sin reactivos de transfección. Por lo tanto, la transferencia gimnótica es factible y el método preferido para un mayor desarrollo de fármacos.

1.2.2 Análisis de la captación gimnótica en células A549 y ReNcell CX®

[0279] La actividad inhibidora en el ARNm diana por oligonucleótidos antisentido (ASO) se determinó en células progenitoras neuronales humanas de la región del cerebro cortical (células ReNcell CX®, Millipore SCM007). Las preguntas sobre la neurogenia del adulto como diana terapéutica se evaluaron mediante estudios de transferencia gimnótica con ASO más eficaces. Se utilizaron células A549 como línea celular de referencia.

Descripción del método:

[0280] Las células A549 y ReNcell CX® se cultivaron como se describe anteriormente. Para los estudios de tratamiento, las células se sembraron en una placa de cultivo de 24 pocillos (Sarstedt nº 83.1836.300) (50.000 células/pocillo) y se incubaron durante la noche a 37°C y 5% de CO₂. Para el tratamiento de células A549 y ReNcell CX®, se eliminó el medio y se reemplazó por medio completo nuevo (0,5 ml para 24 pocillos). Ref.1, ASO con Seq. ID No. 218b, y ASO con Seq. ID No. 218c luego se agregaron en el medio a concentraciones de 2,5 y 10 µM para el análisis de la regulación a la baja diana diana en diferentes puntos de tiempo (células A549: 18 h, 72 h, 6 d, células ReNcell CX®: 18 h, 96 h, 8 d) a 37°C y 5% de CO₂. Para la recolección, las células se lavaron dos veces con PBS y se congelaron a -20°C. Para el análisis de ARNm por RT-PCR en tiempo real, las células se procesaron como se describe anteriormente. Se utilizaron pares de cebadores listos para usar y estandarizados para RT-PCR en tiempo real (consulte la Tabla 11) y se mezclaron con la solución Mastermix lista para usar (SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (BioRad 172-5271) de acuerdo con siguiendo las instrucciones del fabricante (Guía rápida de BioRad Prime PCR). Las sondas se analizaron por triplicado y los datos se cuantificaron en relación con el ARNm de GNB2L1 utilizando BioRad CFX Manager™ 3,1 y luego se normalizaron para el control no tratado. Las estadísticas se calcularon utilizando el ANOVA Ordinario de una vía seguido de las comparaciones post hoc de "Dunnett".

Resultados:

[0281] Los resultados mostraron que la transferencia gimnótica con Seq. ID No. 218b y 218c dan como resultado una correcta regulación a la baja del ARNm de TGF-R_{II} en células A549 y ReNcell CX® en función de la dosis y el tiempo (Tabla 17). El ARNm diana en células A549 se redujo significativamente después de 18 h, y se redujo aún más eficazmente después de 72 h y 6 d. Después de las 18 h en ReNcell CX®, solo se pudo observar una depresión del ARNm de TGF-R_{II} después de la captación de 10 mM por parte de gimnótica, pero la regulación de la disminución del blanco fue significativa después de las 72 h para ambas concentraciones ensayadas y se mantuvo estable hasta el día 8.

Tabla 17: Regulación a la baja dependiente de dosis y tiempo de TGF-R_{II} ARNm después de la transferencia gimnótica con ASO específico a TGF-R_{II} en células A549 y ReNcell CX®. Los niveles de expresión de ARNm se determinaron relativos al gen housekeeping GNB2L1 utilizando RT-PCR en tiempo real cuantitativos y luego se normalizaron al control no tratado. A = control no tratado, B = Ref.1, C = Seq. ID No. 218b, D = Seq. ID No. 218c, ± = SEM, *p < 0,05, **p < 0,01 en referencia a A, +p < 0,05, ++p < 0,01 en referencia a B. Las estadísticas se calcularon utilizando ANOVA ordinario de una dirección seguido por comparaciones *post hoc* de "Dunnett".

Línea de células	A549		
Diana	TGF-R _{II}	TGF-R _{II}	TGF-R _{II}
Punto de tiempo	18 h, n=3	72 h, n=3	6 d, n=3
A	1,00 ± 0,03	1,00 ± 0,20	1,00 ± 0,38
B 2,5 µM	1,17 ± 0,06	0,87 ± 0,21	0,88 ± 0,14
B 10 µM	0,98 ± 0,10	0,77 ± 0,06	1,03 ± 0,10
C 2,5 µM	0,60*++ ± 0,09	0,41* ± 0,07	0,13 ± 0,03
C 10 µM	0,49** ± 0,02	0,15** ± 0,02	0,02 ± 0,00
D 2,5 µM		0,46** ± 0,09	
D 10 µM		0,21* ± 0,04	

Línea de células	ReNcell CX		
Diana	TGF-R _{II}	TGF-R _{II}	TGF-R _{II}
Punto de tiempo	18 h, n=3	96 h, n=3	8 d, n=3
A	1,00 ± 0,41	1,00 ± 0,04	1,00 ± 0,18
B 2,5 µM	1,38 ± 0,58	0,89 ± 0,09	0,80 ± 0,33
B 10 µM	1,70 ± 0,68	0,81 ± 0,10	1,16 ± 0,43

C 2,5 μ M	1,04 \pm 0,36	0,32** \pm 0,06	0,42 \pm 0,16
C 10 μ M	0,64 \pm 0,24	0,16** \pm 0,02	0,21 \pm 0,09
D 2,5 μ M		0,53 \pm 0,07	
D 10 μ M		0,23** \pm 0,03	

Conclusión:

10 **[0282]** La regulación a la baja eficiente y estable del ARNm diana por la captación gimnótica de los ASO se logra incluso en aplicaciones a largo plazo. Por lo tanto, las células ReNcell CX® podrían usarse, por ejemplo, para experimentos que abordan la recuperación de la neurogénesis en adultos como una opción terapéutica en pacientes. Lo mismo se aplica a otras indicaciones como se muestra en los experimentos A549.

15 **[0283]** Considerados en conjunto, la regulación eficaz de TGF-R_{II} es adecuada independientemente del método de transferencia y el tipo de célula. El método de transferencia preferido es la captación gimnótica de ASO, ya que en las aplicaciones clínicas, la ausencia de agentes de transfección adicionales sugiere una alta seguridad para los pacientes.

20 **Ejemplo 2: Determinación de la actividad inhibitoria de los oligonucleótidos antisentido dirigidos a TGF-R_{II} a nivel de proteína**

25 **[0284]** Se realizó un análisis de transferencia Western e inmunocitoquímica para determinar si el nivel de ARNm de TGF-R_{II} reducido, mediado por oligonucleótidos antisentido (ASO) de la invención en células de cáncer de pulmón humano (A549) y células precursoras neuronales humanas (ReNcell CX®) da como resultado reducción de la proteína diana.

Descripción del método:

30 **[0285]** Las células se cultivaron como se describe anteriormente. Para el tratamiento, las células se sembraron en una placa de cultivo de 6 pocillos (Sarstedt n° 83.3920.300, 80.000 células/pocillo) y placas de portaobjetos de cultivo celular de 8 pocillos (Sarstedt n° 94.6140.802, 10.000 células/pocillo) y se incubaron durante la noche en 37°C y 5% CO₂. Para la transferencia gimnótica de A549 y ReNcell CX®, se eliminó el medio celular y se reemplazó por medio completo nuevo (1 ml para 6 pocillos y 0,5 ml para 8 pocillos). Ref. 1 (control aleatorizado), la respectiva ASO inventiva se añadió luego en medio a concentraciones de 2,5 y 10 μ M para el análisis de proteínas de la regulación a la baja diana después de 72 h en células A549 y 96 h en células ReNcell CX®. Las células se lisaron y se examinaron por transferencia Western como se describe en la parte del método general. El anticuerpo primario anti-TGF-R_{II} se diluyó en BSA al 0,5% en TBS-T y se incubó a 4°C durante 2 días. Posteriormente, las membranas se incubaron con el segundo anticuerpo anti-IgG de conejo unido a HRP, diluido en BSA al 0,5% en TBS-T (1h, TA).
 35 Después de la incubación, las transferencias se lavaron con TBS-T, emergieron usando el sustrato Western HRP de Luminata™Forte (Millipore WBLUF0500) y se detectaron bandas con un analizador de imagen luminiscente (ImageQuant™ LAS 4000, GE Healthcare). Para comparación con el personal de mantenimiento, las membranas se incubaron con anti-GAPDH conjugado con HRP (1:1000 en Blotto al 0,5%, 4°C, durante la noche). La cuantificación densitométrica se calculó en relación con GAPDH y luego se normalizó a control sin tratar con el software Image Studio™ Lite.
 40
 45

50 **[0286]** El procedimiento para inmunocitoquímica se realizó como se describe en el protocolo estándar. Para la verificación de la regulación por disminución del objetivo, se diluyó el anti-TGF-R_{II} y se incubó durante la noche a 4°C. Cy3 cabra-anti-conejo se utilizó como anticuerpo secundario. Todas las diluciones de anticuerpos se prepararon con diluyente de anticuerpo (Zytomed® ZUC025-100). El examen de las células se realizó mediante microscopía de fluorescencia (Zeiss Axio® Observer.Z1). Las imágenes se analizaron con el software Image J y el software CorelDRAW® X7,

Resultados después de la transferencia de gimnótica:

55 **[0287]** El análisis de transferencia Western y la inmunocitoquímica se usaron para verificar la reducción del nivel de proteína TGF-R_{II}. 72 h después de la transferencia gimnótica, la proteína TGF-R_{II} se redujo significativamente utilizando una alta concentración de diferentes ASO de acuerdo con la invención en comparación con el control no tratado en células A549 (Tabla 18). También se observaron niveles reducidos de TGF-R_{II} en las células ReNcell CX® (Tabla 18). Para ambas líneas celulares, la reducción del nivel de proteína TGF-R_{II} se demostró mediante Analysis de Transferencia Western. La inmunocitoquímica reveló una fuerte reducción dependiente de la dosis de la proteína TGF-R_{II} en ambas líneas celulares en comparación con las células no tratadas y las células tratadas de control codificadas.
 60
 65

Tabla 18: Análisis densitométrico después de transferencia Western de TGF-R_{II}. La reducción de la proteína TGF-R_{II} después de la transferencia gimnótica con ASO específicos de TGF-R_{II} en células A549 y ReNcell CX® se pudo observar después de 72 horas o 96 horas, respectivamente. Los niveles de proteína se determinaron en relación con el gen de mantenimiento GAPDH utilizando el software Image Studio™ Lite y se normalizaron para el control no tratado. A = control sin tratar, B = Ref.1, C = Seq. ID No. 218b, D = Seq. ID No. 218c, F = Seq. ID No. 210q, G = Seq. ID No. 213k, H = Seq. ID No. 143h, I = Seq. ID No. 152h, J = Seq. ID No. 209az, K = Seq. ID No. 209y, ± = SEM, *p <0,05 en referencia a A. Las estadísticas se calcularon utilizando el ANOVA Ordinario de una vía seguido de las comparaciones post hoc de "Dunnnett".

Línea de células	A549	ReNcell CX
Diana	TGF-R _{II}	TGF- R _{II}
Punto de tiempo	72 h, n=3	96 h, n=2
A	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00
B 2,5 mM	0,85 ± 0,13	0,91 ± 0,12
B 10 mM	1,06 ± 0,47	1,23 ± 0,16
C 2,5 mM	0,34 ± 0,11	0,59 ± 0,05
C 10 mM	0,39* ± 0,11	0,63 ± 0,17
D 2,5 mM	0,68 ± 0,14	1,21 ± 0,28
D 10 μM	0,39* ± 0,07	0,77 ± 0,10
F 2,5 μM	0,51 ± 0,08	0,71 ± 0,16
F 10 μM	0,45 ± 0,09	0,57 ± 0,12
G 2,5 μM	0,41 ± 0,13	0,61 ± 0,10
G 10 μM	0,40* ± 0,06	0,58 ± 0,08
H 2,5 μM	0,75 ± 0,12	0,83 ± 0,13
H 10 μM	0,51 ± 0,07	0,77 ± 0,06
I 2,5 μM	0,58 ± 0,14	0,91 ± 0,21
I 10 μM	0,38* ± 0,14	0,67 ± 0,09
J 2,5 μM	0,42 ± 0,15	0,75 ± 0,23
J 10 μM	0,34* ± 0,05	0,59 ± 0,08
K 2,5 μM	0,45 ± 0,17	0,69 ± 0,16
K 10 μM	0,36* ± 0,09	0,49 ± 0,09

Conclusión:

[0288] Además de la regulación a la baja del ARNm diana, la transferencia gimnótica de la Seq. ID No. 218b, Seq. ID No. 218c, Seq. ID No. 210q, Seq. ID No. 213k, Seq. ID No. 143h, Seq. ID No. 152h, Seq. ID No. 209az, y Seq. ID No. 209y resultó en una excelente reducción del nivel de proteína en células A549 y ReNcell CX®. La tinción de TGF-R_{II} reveló una reducción dependiente de la dosis de la proteína TGF-R_{II} después del tratamiento con estos ASO en ambas líneas celulares.

Resultados después de la transferencia gimnótica con otros ASOs:

[0289] El análisis de proteínas mostró una cantidad reducida de TGF-R_{II} en células A549 y transferencia gimnótica de células ReNcell CX® de ASO ensayados (10 μM, Tabla 19). Esto también fue verificado por inmunocitoquímica. Para ambas líneas celulares, la reducción del nivel de proteína TGF-R_{II} por transferencia gimnótica de los ASO ensayados podría detectarse en comparación con las células no tratadas y las células tratadas de control codificadas.

Tabla 19: Análisis densitométrico después de transferencia Western de TGF-R_{II}. La reducción de la proteína TGF-R_{II} después de la transferencia gimnótica con otros oligonucleótidos antisentido (ASO) específicos de TGF-R_{II} en células A549 y ReNcell CX® se pudo observar después de 72 horas o 96 horas, respectivamente. Los niveles de proteína se determinaron en relación con el gen de mantenimiento GAPDH utilizando el software Studio™ Lite y luego se normalizaron para el control no tratado. Las estadísticas se calcularon utilizando el ANOVA ordinario de una vía seguido de las comparaciones post hoc de "Dunnnett". La reducción del nivel de proteína para ASO 1 - 25 está indicada con la siguiente clave: A = menos del 10% inferior a la SEQ ID NO: 143h; B = más del 10% pero menos del 20% inferior a la SEQ ID NO: 143h; C = más del 20% pero menos del 30% inferior a la SEQ ID NO: 143h. La reducción del nivel de proteína para ASO 26 - 48 se indica con la siguiente clave: A = menos del 10% inferior a la SEQ ID NO 152h; B = más del 10% pero menos del 20% inferior a la SEQ ID NO 152h; C = más del 20% pero

ES 2 705 066 T3

menos del 30% inferior a la SEQ ID NO 152h. La reducción del nivel de proteína para ASO 49 - 74 se indica con la siguiente clave: A = menos del 10% inferior al valor medio derivado de la Seq. ID No. 209az y Seq. ID No. 209y; B = más del 10% pero menos del 20% inferior al valor medio derivado de la Seq. ID No. 209az y Seq. ID No. 209y; C = más del 20% pero menos del 30% inferior al valor medio derivado de la Seq. ID No. 209az y Seq. ID No. 209y. La reducción del nivel de proteína para ASO 75 - 100 se indica con la siguiente clave: A = menos del 10% inferior a la SEQ ID NO 210q; B = más del 10% pero menos del 20% inferior a la SEQ ID NO 210q; C = más del 20% pero menos del 30% inferior a la SEQ ID NO 210q. Reducción del nivel de proteína para ASO 101 - 124 se indica con la siguiente clave: A = menos del 10% inferior al valor medio derivado de la Seq. ID No. 218b y Seq. ID No. 218c; B = más del 10% pero menos del 20% inferior al valor medio derivado de la Seq. ID No. 218b y Seq. ID No. 218c; C = más del 20% pero menos del 30% inferior al valor medio derivado de la Seq. ID No. 218b y Seq. ID No. 218c. La reducción del nivel de proteína para ASO 125 - 152 se indica con la siguiente clave: A = menos del 10% inferior a la SEQ ID NO 213k; B = más del 10% pero menos del 20% inferior a la SEQ ID NO 213k; C = más del 20% pero menos del 30% inferior a la SEQ ID NO 213k.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Nº ASO en prueba	Seq ID No.	Resultado
1	233d	B
2	234d	A
3	143j	C
4	143p	A
5	143q	A
6	143r	A
7	143w	A
8	143af	C
9	143ag	C
10	143ah	C
11	235b	B
12	235d	A
13	141d	A
14	141g	A
15	141i	A
16	237b	A
17	237c	A
18	237i	C
19	237m	A
20	238c	A
21	238f	A
22	239e	B
23	240c	B
24	241b	C
25	242a	C
26	246e	C
27	247d	A
28	248b	A
29	248e	B
30	248g	A
31	152k	B
32	152s	B
33	152t	B
34	152u	B
35	152ab	C
36	152ag	B
37	152ah	C
38	152ai	C
39	249c	A
40	249e	A
41	250b	A
42	250g	B

ES 2 705 066 T3

(continúa)

Nº ASO en prueba	Seq ID No.	Resultado
43	251c	A
44	251f	A
45	252e	B
46	253c	A
47	254b	C
48	255a	C
49	259e	C
50	260d	B
51	261b	A
52	261e	B
53	261g	A
54	262d	B
55	262e	A
56	209s	A
57	209v	B
58	209w	B
59	209x	C
60	209ai	B
61	209an	C
62	209at	A
63	209au	B
64	209av	B
65	263b	B
66	263c	A
67	263i	B
68	263m	A
69	264e	A
70	264h	A
71	265e	B
72	266c	A
73	267b	B
74	268a	B
75	272e	B
76	273d	A
77	274a	A
78	274d	B
79	274f	A
80	275g	A
81	275i	B
82	210o	A
83	210v	B
84	210w	B
85	210x	C
86	210ab	B
87	210ac	A
88	210ad	B
89	210af	A
90	210am	B
91	276b	B
92	276c	A
93	276j	B
94	276k	B

ES 2 705 066 T3

(continúa)

Nº ASO en prueba	Seq ID No.	Resultado
95	277d	A
96	277e	A
97	278f	B
98	279c	B
99	280b	C
100	281a	C
101	220d	C
102	221d	B
103	222b	A
104	222c	A
105	222f	B
106	223c	B
107	223f	A
108	218ad	B
109	218n	A
110	218t	B
111	218u	B
112	218v	C
113	218ah	C
114	218an	A
115	218ao	B
116	218ap	B
117	224i	B
118	224m	B
119	225c	A
120	225f	A
121	226e	B
122	227c	A
123	228b	C
124	229a	C
125	285d	C
126	286d	A
127	287d	B
128	287e	A
129	287f	A
130	288e	A
131	288i	A
132	289d	B
134	289h	A
135	289o	B
136	289p	B
137	289q	B
138	213o	B
139	213p	B
140	213q	B
141	213s	B
142	213y	B
143	213z	B
144	213aa	B
145	213af	B
146	290c	A
147	290f	B
148	290i	A

(continúa)

N° ASO en prueba	Seq ID No.	Resultado
149	291c	B
150	292c	C
151	293b	C
152	294a	C

Conclusión:

[0290] En conjunto, la regulación a la baja dependiente de la dosis del ARNm de TGF-R_{II} por transferencia gimnótica en células A549 y ReNcell CX® dio como resultado una reducción dependiente de la dosis de los niveles de proteína. Los ASO inventivos son potentes en la regulación por disminución de la proteína como se demuestra en las células A549 y ReNcell CX®.

Ejemplo 3: Análisis de los efectos de los oligonucleótidos antisentido a la vía de señalización descendente de TGF-R_{II}.

[0291] Los análisis funcionales se realizaron en células de cáncer de pulmón humano (A549) y células precursoras neuronales humanas (ReNcell CX®). Se analizó la vía de señalización en sentido descendente de TGF-β, después de una regulación eficaz hacia abajo del ARNm de TGF-R_{II} y la reducción de los niveles de proteína por transferencia gimnótica de los ASO inventivos. Por lo tanto, se evaluaron los niveles de ARNm y proteína del Factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF), conocido como mediador descendente de TGF-β. Además, se examinó la fosforilación de Smad2 (madres contra el homólogo 2 decapentafléxico). La fosforilación de Smad2 es un marcador para una vía activa de TGF-β seguida por la regulación positiva del gen diana CTGF en sentido descendente.

Descripción del método:

[0292] Las células se cultivaron como se describe anteriormente. Para el tratamiento, las células se sembraron en una placa de cultivo de 6 pocillos (Sarstedt n° 83.3920.300) (80.000 células/pocillo) y placas de portaobjetos de cultivo celular de 8 pocillos (Sarstedt n° 94.6140.802) (10.000 células/pocillo) y se incubaron durante la noche a 37°C y 5% de CO₂. Para la transferencia gimnótica, se eliminó el medio celular A549 y ReNcell CX® y se reemplazó por medio completo nuevo (1 ml para 6 pocillos y 0,5 ml para 8 pocillos). Ref. 1 (control aleatorizado), ASO con número de identificación de secuencia 218b (Seq. ID No. 218b), No. 218c (Seq.ID No. 218c) luego se agregó en medio a concentraciones de 2,5 y 10 μM y se realizó el análisis respectivo después 72 h en células A549 y 96 h en células ReNcell CX®. Para evaluar los efectos en el nivel de ARNm de CTGF, se realizó RT-PCR en tiempo real como se describió anteriormente. El par de cebadores para el análisis de CTGF estaba listo para usar y estandarizado. Para verificar los niveles de proteína CTGF y pSmad2, se usaron transferencia Western e inmunocitoquímica como se describió anteriormente. El tipo y las diluciones usadas de anticuerpos para el método respectivo se enumeran en la Tabla 13 y 14.

3.1. Resultados para Seq.ID No.218b**3.1,1 Efectos sobre el nivel de ARNm y proteína de CTGF**

[0293] El ARNm de CTGF se redujo de manera significativa y dependiente de la dosis después de la transferencia gimnótica con ASO Seq. ID No. 218b en células A549 (72 h) y ReNcell CX® (96 h). El mediador descendente de TGF-β se redujo a 52% 6 0,02 en células ReNcell CX® y a 39% 6 0,03 en células A549 después de la transferencia gimnótica con 10 mM Seq.ID No.218b (Tabla 20). De acuerdo con estos niveles de ARNm de CTGF regulados a la baja, se observó una fuerte reducción de la expresión de la proteína CTGF en las células A549 (Tabla 21).

Tabla 20: Regulación a la baja significativa e dependiente de la dosis del ARNm de CTGF después de la transferencia gimnótica con Seq. ID No. 218b en células A549 y ReNcell CX®. Los niveles de expresión de ARNm se cuantificaron en relación con el gen de mantenimiento GNB2L1 utilizando RT-PCR cuantitativa en tiempo real y se normalizaron para el control sin tratar. A = control sin tratar, B = Ref.1, C = Seq. ID No. 218b. \pm = SEM, *p <0,05, **p <0,01 en referencia a A. Las estadísticas se calcularon utilizando el ANOVA Ordinario de una vía seguido de las comparaciones post hoc de "Dunnett".

Línea de células	A549	ReNcell CX
Diana	CTGF	CTGF
Punto de tiempo	72 h, n=3	96 h, n=3
A	1,00 \pm 0,08	1,00 \pm 0,04
B 2,5 mM	0,87 \pm 0,06	0,97 \pm 0,06
B 10 mM	0,80 \pm 0,03	0,86 \pm 0,17
C 2,5 mM	0,60** \pm 0,04	0,66** \pm 0,02
C 10 mM	0,39** \pm 0,03	0,52** \pm 0,02

Tabla 21: Análisis densitométrico de transferencia Western CTGF. Regulación a la baja de la proteína CTGF 72 h después de la transferencia gimnótica con ASO Seq. ID No. 218b en A549 fue reconocida. Los niveles de proteína se determinaron en relación con el gen de mantenimiento de la alfa-tubulina utilizando el software Studio™ Lite y se normalizaron para el control sin tratar. A = control no tratado, B = Ref.1, C = Seq. ID No. 218b.

Línea de células	A549
Diana	CTGF
Punto de tiempo	72 h, n=1
A	1,00
B 2,5 μ M	0,91
B 10 μ M	1,31
C 2,5 μ M	0,05
C 10 μ M	0,086

Conclusión:

[0294] La inhibición funcional de la señalización de TGF- β se logró con la transferencia gimnótica de Seq. ID No. 218b como se muestra mediante la regulación a la baja del ARNm de CTGF diana y los niveles reducidos de proteína CTGF en células A549 y ReNcell CX®.

3.1.2 Efectos sobre el nivel de proteína pSmad2

[0295] Se analizaron los niveles de proteína pSmad2 para ensayar la regulación a la baja de CTGF como un resultado específico de la inhibición de la señalización TGF- β mediada por ASO. Tinción contra pSmad2 después de la transferencia gimnótica de ASO Seq. ID No. 218b después de 72 h en A549 y 96 h en células ReNcell CX® mostró una inhibición dependiente de la dosis de la fosforilación de Smad2 (Figura 5). Además, la reducción de los niveles de expresión pSmad2 por ASO Seq. ID No. 218b se verificó mediante análisis de transferencia Western en células A549 (Tabla 22).

Tabla 22: Análisis densitométrico de pSmad2 transferencia Western. Regulación a la baja de la proteína pSmad2 72 h después de la transferencia gimnótica con ASO Seq. ID No. 218b en A549 fue reconocida. Los niveles de proteína se determinaron en relación con el gen de mantenimiento GAPDH utilizando el software Studio™ Lite y se normalizaron para el control no tratado. A = control sin tratar, B = Ref.1, C = Seq. ID No. 218b.

Línea de células	A549
Diana	pSmad2
Punto de tiempo	72 h, n=1
A	1,00
B 2,5 μ M	1,81
B 10 μ M	1,79
C 2,5 μ M	0,66
C 10 μ M	0,72

Conclusión:

[0296] La transferencia gimnótica de la Seq. ID No. 218b en células A549 y ReNcell CX® dio como resultado una inhibición dependiente de la dosis de mediadores posteriores de la señalización de TGF-β. El CTGF y la fosforilación de Smad2 se redujeron mediante ASO Seq. ID No. 218b, ambos indican una ruta TGF-β inhibida.

3.2 Resultados para Seq.ID No. 218c**3.2.1 Efectos sobre el nivel de ARNm de CTGF y pSmad2**

[0297] La transferencia gimnótica de ASO Seq. ID No. 218c regula a la baja el ARNm de CTGF en células A549 y ReNcell CX® (Tabla 23). La inmunocitoquímica contra pSmad2 confirmó una inhibición de la señalización de TGF-β (Figura 6). Por lo tanto, la regulación por disminución del ARNm de CTGF es un efecto directo de la reducción de la señalización de TGF-β.

Tabla 23: Se observó una importante regulación a la baja del ARNm de CTGF en células A549 y ReNcell CX®. Los niveles de expresión de ARNm se cuantificaron en relación con el gen de mantenimiento GNB2L1 utilizando RT-PCR cuantitativa en tiempo real y se normalizaron para controles no tratados. A = control no tratado, B = Ref.1, D = Seq. ID No. 218c. \pm = SEM, **p <0,01 en referencia a A. Las estadísticas se calcularon utilizando el ANOVA ordinario de una vía seguido de las comparaciones post hoc de "Dunnett".

Línea de células	A549	ReNcell CX
Diana	CTGF	CTGF
Punto de tiempo	72 h, n=4	96 h, n=3
A	1,00 \pm 0,08	1,00 \pm 0,10
B 2,5 μ M	0,97 \pm 0,07	0,88 \pm 0,08
B 10 μ M	0,85 \pm 0,06	0,89 \pm 0,07
D 2,5 μ M	0,49** \pm 0,05	1,10 \pm 0,08
D 10 μ M	0,31** \pm 0,03	0,82 \pm 0,02

Conclusión:

[0298] ASO Seq. ID No. 218c fue eficaz en la inhibición de la señalización de TGF-β después de la regulación a la baja del ARNm de TGF-R_{II} diana. Esto se examinó mediante la determinación de ARNm de CTGF regulado a la baja y niveles reducidos de proteína pSmad2 como un marcador para la señalización de TGF-β.

[0299] En conjunto, los ASO de la invención son eficientes en la mediación de una inhibición funcional de la señalización de TGF-β por regulación a la baja de TGF-R_{II}. Por lo tanto, los ASO de la invención serán beneficiosos para las indicaciones médicas en las que están involucrados niveles elevados de TGF-β, por ejemplo, trastornos neurológicos, fibrosis y progresión tumoral.

Ejemplo 4: Actividad inhibitoria de los ASO de la invención en niveles de ARNm diana en células tratadas con TGF-β1.

4.1 Captación gimnótica de ASO en células A549 y ReNcell CX® después del pretratamiento con TGF-β1

[0300] Para analizar la actividad inhibitoria de oligonucleótidos antisentido (ASO) en células progenitoras neuronales humanas de la región del cerebro cortical (ReNcell CX®) en condiciones patológicas, las células se trataron previamente con factor de crecimiento transformante β 1 (TGF-β1). Por estudios anteriores, se sabe que el TGF-β1 se encuentra en altas concentraciones en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de todos los trastornos neuronales, por ejemplo, ALS. Por lo tanto, se examinó la eficacia inhibitoria de los ASO en la señalización de TGFβ después del pretratamiento y en presencia de TGF-β1. Se utilizaron células A549 como línea celular de referencia.

Descripción del método:

[0301] Se cultivaron A549 y ReNcell CX® como se describe anteriormente. Para los estudios de tratamiento, las células se sembraron en una placa de cultivo de 24 pocillos (Sarstedt n° 83.1836.300) (50.000 células/pocillo) y se incubaron durante la noche a 37°C y 5% de CO₂. Para el tratamiento de células A549 y ReNcell CX®, se eliminó el medio y se reemplazó por medio completo nuevo (0,5 ml para 24 pocillos). Después de la exposición a TGF-β1 (10 ng/ml, PromoCell C-63499) durante 48 h, se cambió el medio, se realizó un nuevo tratamiento con TGF-β1 en combinación con Ref.1 (control Revuelto, 10 μ M), ASO Seq. ID No. 218b (10 μ M), o ASO Seq. ID No. 218c (10 μ M) en medio. Las células A549 se incubaron durante 72 h más, mientras que las células ReNcell CX® se recolectaron después de 96 h. Por lo tanto, las células se lavaron dos veces con PBS y posteriormente se usaron para el

aislamiento de ARN (placas de 24 pocillos) como se describió anteriormente. Los pares de cebadores usados para la RT-PCR en tiempo real se enumeran en la Tabla 11,

4.1.1 Resultados para Seq. ID No. 218b

[0302] La eficacia en la regulación por disminución de ARNm de TGF-R_{II} por ASO Seq. ID No. 218b no fue influenciada por la preincubación de TGF-β1 en células A549 y ReNcell CX® (Tabla 24, Fig. 7). El ARNm diana en células A549 se reguló significativamente a la baja después del tratamiento único (ARNm restante: 15% ± 0,05) con ASO, pero también después del tratamiento en presencia de TGF-β1, después del tratamiento previo (ARNm restante: 7% ± 0,01). En las células ReNcell CX® ASO Seq. ID No. 218b mostró una potencia similar en la inhibición del ARNm de TGF-R_{II} en ausencia de TGF-β1 (25% ± 0,01) o en presencia de TGF-β1, después del tratamiento previo de TGF-β1 (17% ± 0,02).

Tabla 24: En presencia de TGF-β1, ASO Seq. ID No. 218b conduce a una potente regulación a la baja del ARNm de TGF-R_{II} después de la transferencia gimnástica en células A549 y ReNcell CX®. Los niveles de expresión de ARNm se cuantificaron en relación con el gen de mantenimiento GNB2L1 utilizando RT-PCR cuantitativa en tiempo real y se normalizaron para controles no tratados. A = control sin tratar, B = Ref.1, C = Seq. ID No. 218b, E = TGF-β1, ± = SEM, *p <0,05, **p <0,01 en referencia a A. Las estadísticas se calcularon utilizando el ANOVA Ordinario de una vía seguido de las comparaciones post hoc de Dunnett.

Punto de tiempo diana	TGF-R _{II}	
	48 h TGF-β1 -> 72 h / 96 h TGF-β1 + ASOs / tratamiento único	
Línea de células	A549 n= 4	ReNcell CX n= 3
A	1,00 ± 0,07	1,00 ± 0,11
B 10 μM	0,90 ± 0,17	0,89 ± 0,26
C 10 μM	0,15** ± 0,05	0,25 ± 0,01
E 10 ng/ml	0,71 ± 0,05	0,79 ± 0,34
E 10 ng/ml + B 10 μM	0,74 ± 0,05	0,89 ± 0,25
E 10 ng/ml + C 10 μM	0,07** ± 0,01	0,27 ± 0,02

Conclusión:

[0303] El ARNm diana se reguló por disminución de manera eficaz hasta aprox. 20% por la captación gimnástica de ASO inventivos en presencia de TGF-β1, después de la pre-incubación en ambas líneas celulares ensayadas.

4.1.2 Resultados para Seq. ID No. 218c

[0304] Regulación a la baja del ARNm de TGF-R_{II} por ASO Seq. ID No. 218c fue eficaz en presencia de TGF-β1 en células A549 y ReNcell CX® (Tabla 25, Fig. 8). El ARNm diana en ambas líneas celulares ensayadas se reguló significativamente a la baja, independientemente de un solo tratamiento con ASO Seq. ID No. 218c o en presencia con TGF-β1.

Tabla 25: En presencia de TGF-β1, ASO Seq. ID No. 218c conduce a una potente regulación a la baja del ARNm de TGF-R_{II} después de la transferencia gimnástica en células A549 y ReNcell CX®. Los niveles de expresión de ARNm se cuantificaron en relación con el gen de mantenimiento GNB2L1 utilizando RT-PCR cuantitativa en tiempo real y se normalizaron para el control sin tratar. A = control no tratado, B = Ref.1, D = Seq. ID No. 218c, E = TGF-β1, ± = SEM, *p <0,05, **p <0,01 en referencia a A. Las estadísticas se calcularon utilizando el ANOVA Ordinario de una vía seguido de las comparaciones post hoc de Dunnett.

Punto de tiempo diana	TGF-R _{II}	
	48 h TGF-β1 -> 72 h / 96 h TGF-β1 + ASOs / tratamiento único	
Línea de células	A549 n= 2	ReNcell CX n= 2
A	1,00 ± 0,12	1,00 ± 0,18
B 10 μM	0,92 ± 0,06	0,51 ± 0,14
D 10 μM	0,31** ± 0,04	0,05** ± 0,01
E 10 ng/ml	0,68 ± 0,05	0,88 ± 0,73
E 10 ng/ml + B 10 μM	0,86 ± 0,04	0,45 ± 0,09
E 10 ng/ml + D 10 μM	0,16** ± 0,05	0,03** ± 0,01

Conclusión:

[0305] Considerados en conjunto, los ASO de la invención fueron efectivos para regular a la baja el ARNm de TGF-R_{II} en presencia de TGF-β1, lo que indica que los ASO son funcionales en condiciones patológicas.

Ejemplo 5: Actividad inhibitoria de los ASO de la invención en niveles de proteína diana en células tratadas con TGF-β1.

[0306] Para analizar la actividad inhibitoria de los oligonucleótidos antisentido (ASO) en células progenitoras neuronales humanas de la región del cerebro cortical (ReNcell CX®) en condiciones patológicas, las células se trataron previamente con factor de crecimiento transformante β1 (TGF-β1). Por estudios anteriores, se sabe que el TGF-β1 se encuentra en altas concentraciones en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de todos los trastornos neuronales, por ejemplo, ALS. Por lo tanto, se examinó la eficacia inhibitoria de los ASO en la señalización de TGFβ después del pretratamiento y en presencia de TGF-β1. Se utilizaron células A549 como línea celular de referencia.

Descripción del método:

[0307] Las células se cultivaron como se describió anteriormente en el protocolo estándar. Para el tratamiento, las células se sembraron en una placa de cultivo de 6 pocillos (Sarstedt n° 83.3920.300) (80.000 células/pocillo) y placas de portaobjetos de cultivo celular de 8 pocillos (Sarstedt n° 94.6140.802) (10.000 células/pocillo) y se incubaron durante la noche a 37°C y 5% de CO₂. Para la investigación de los efectos de transferencia gimnástica (A549 y ReNcell CX), después de la incubación previa con TGF-β1 (Promocell n.°C-63499), se eliminó el medio y se reemplazó por medio completo nuevo (1 ml para platos de 6 pocillos y bandejas de cultivo de células de 8 pocillos). Tras la exposición de TGF-β1 (10 ng/ml, 48 h), se cambió el medio, se añadió TGF-β1 (10 ng/ml), Ref.1 (control aleatorizado, 10 μM) y ASOs inventivos (10 μM). En combinación y en tratamiento único, a las células. Las células A549 se incubaron durante 72 h más, mientras que las células ReNcell CX® se recolectaron después de 96 h. Por lo tanto, las células se lavaron dos veces con PBS y posteriormente se usaron para el aislamiento de proteínas (placas de 6 pocillos) después del análisis de transferencia Western o el examen inmunocitoquímico de células (en placas de portaobjetos de cultivo celular de 8 pocillos). Los procedimientos para las técnicas utilizadas se realizaron como se describe anteriormente. Los anticuerpos y diluciones usados para los métodos respectivos se enumeran en la Tabla 13 y 14.

Resultados después de la transferencia gimnástica

[0308] El análisis de transferencia Western e inmunocitoquímico para células A549 mostró que los ASO que tienen Seq. ID No. 218b, Seq. ID No. 218c, Seq. ID No. 210q, Seq. ID No. 213k, Seq. ID No. 143h, Seq. ID No. 152h, Seq. ID No. 209az, Seq. ID No. 209y genera una potente regulación hacia abajo del objetivo en presencia de TGF-β1 (Tabla 26). La tinción de TGF-R_{II} en células ReNcell CX® fijadas confirmó los resultados observados en células A549. Los ASO ensayados revelaron una fuerte regulación hacia abajo del objetivo después del tratamiento individual, pero también en presencia de TGF-β1.

Tabla 26: Análisis densitométrico de transferencia Western TGF-R_{II}. Se observó una reducción de la proteína TGF-R_{II} después de la incubación previa con TGF-β1 seguida de una transferencia gimnástica con diferentes ASO en A549. Los niveles de proteína se determinaron en relación con el gen de mantenimiento GAPDH utilizando el software Studio™ Lite y luego se normalizaron para el control no tratado. A = control sin tratar, B = Ref.1, C = Seq. ID No. 218b, D = Seq. ID No. 218c, F = Seq. ID No. 210q, G = Seq. ID No. 213k, H = Seq. ID No. 143h, I = Seq. ID No. 152h, J = Seq. ID No. 209az, K = Seq. ID No. 209y, E = TGF-β1

Diana	TGF-R _{II}
Punto de tiempo	48 h TGF-β1 -> 72 h TGF-β1 + ASOs / tratamiento único
Línea de células	A549 n= 1
A	1,00
B 10 μM	1,20
C 10 μM	0,31
D 10 μM	0,42
F 10 μM	0,45
G 10 μM	0,35
H 10 μM	0,47
I 10 μM	0,33
J 10 μM	0,27
K 10 μM	0,30

(continúa)

Diana	TGF-R _{II}
Punto de tiempo	48 h TGF-β1 → 72 h TGF-β1 + ASOs / tratamiento único
Línea de células	A549 n= 1
E 10 ng/ml	2,03
E 10 ng/ml + B 10 μM	1,50
E 10 ng/ml + C 10 μM	0,78
E 10 ng/ml + D 10 μM	1,16
E 10 ng/ml + F 10 μM	1,21
E 10 ng/ml + G 10 μM	0,83
E 10 ng/ml + H 10 μM	1,02
E 10 ng/ml + I 10 μM	0,76
E 10 ng/ml + J 10 μM	0,69
E 10 ng/ml + K 10 μM	0,77

Conclusión:

[0309] Preincubación de TGF-β1 seguida de transferencia gimnótica de Seq. ID No. 218b, Seq. ID No. 218c, Seq. ID No. 210q, Seq. ID No. 213k, Seq. ID No. 143h, Seq. ID No. 152h, Seq. ID No. 209az, y Seq. ID No. 209y dio como resultado, además de la regulación a la baja del ARNm diana, una reducción del nivel de proteína en las células A549 y ReNcell CX®.

Resultados después de la transferencia gimnótica con otros ASOs:

[0310] El análisis de transferencia Western mostró una cantidad reducida de proteína TGF-R_{II} en células A549 (Tabla 27) después de la transferencia gimnótica durante 72 h en comparación con células no tratadas y células tratadas con control aleatorizado. La preincubación de TGF-β1 seguida de una transferencia gimnótica de las ASO ensayadas provocó una reducción en comparación con las células que fueron tratadas previamente con TGF-β1 seguida de una transferencia gimnótica con un control aleatorizado. Examen inmunocitoquímico de A549 y ReNcell CX® después de la tinción contra TGF-R_{II} mostró que los ASO ensayados mediaron en una fuerte reducción de la proteína diana después de la transferencia gimnótica con o sin tratamiento previo de TGF-β1.

Tabla 27 Análisis densitométrico de transferencia Western TGF-R_{II}. Se pudo detectar la reducción de la proteína TGF-R_{II} después de la incubación previa con TGF-β1 seguida de una transferencia gimnótica con otros oligonucleótidos antisentido (ASO) específicos de TGF-R_{II} en A549. Los niveles de proteína se determinaron en relación con el gen de mantenimiento GAPDH utilizando el software Studio™ Lite y luego se normalizaron para el control no tratado. La reducción del nivel de proteína para ASO 1 - 25 se indica con la siguiente clave: A = menos del 10% inferior a la SEQ ID NO 143h; B = más del 10% pero menos del 20% inferior a la SEQ ID NO: 143h; C = más del 20% pero menos del 30% inferior a la SEQ ID NO: 143h. La reducción del nivel de proteína para ASO 26 - 48 se indica con la siguiente clave: A = menos del 10% inferior a la SEQ ID NO 152h; B = más del 10% pero menos inferior al 20% de la SEQ ID NO 152h; C = más del 20% pero menos del 30% inferior a la SEQ ID NO 152h. La reducción del nivel de proteína para ASO 49 - 74 se indica con la siguiente clave: A = menos del 10% inferior al valor medio derivado de la Seq. ID No. 209az y Seq. ID No. 209y; B = más del 10% pero menos del 20% inferior al valor medio derivado de la Seq. ID No. 209az y Seq. ID No. 209y; C = más del 20% pero menos del 30% inferior al valor medio derivado de la Seq. ID No. 209az y Seq. ID No. 209y. La reducción del nivel de proteína para ASO 75 - 100 se indica con la siguiente clave: A = menos del 10% inferior a la SEQ ID NO 210q; B = más del 10% pero menos que 20% inferior a la SEQ ID NO 210q; C = más del 20% pero menos del 30% inferior a la SEQ ID NO 210q. La reducción del nivel de proteína para ASO 101 - 124 se indica con la siguiente clave: A = menos del 10% inferior al valor medio derivado de la Seq. ID No. 218b y Seq. ID No. 218c; B = más del 10% pero menos del 20% inferior al valor medio derivado de la Seq. ID No. 218b y Seq. ID No. 218c; C = más del 20% pero menos del 30% inferior al valor medio derivado de la Seq. ID No. 218b y Seq. ID No. 218c. La reducción del nivel de proteína para ASO 125 - 152 se indica con la siguiente clave: A = menos del 10% inferior a la SEQ ID NO 213k; B = más del 10% pero menos del 20% inferior a la SEQ ID NO 213k; C = más del 20% pero menos del 30% inferior a la SEQ ID NO 213k.

ES 2 705 066 T3

Nº ASO en prueba	Seq ID No.	Resultado
1	233d	B
2	234d	A
3	143j	C
4	143p	A
5	143q	A
6	143r	A
7	143w	A
8	143af	B
9	143ag	C
10	143ah	C
11	235b	B
12	235d	A
13	141d	A
14	141g	A
15	141i	B
16	237b	A
17	237c	A
18	237i	C
19	237m	A
20	238c	A
21	238f	A
22	239e	B
23	240c	B
24	241b	C
25	242a	C
26	246e	C
27	247d	A
28	248b	A
29	248e	B
30	248g	A
31	152k	B
32	152s	B
33	152t	B
34	152u	B
35	152ab	C
36	152ag	B
37	152ah	A
38	152ai	A
39	249c	A
40	249e	A
41	250b	A
42	250g	B
43	251c	A
44	251f	A
45	252e	B
46	253c	A
47	254b	C
48	255a	C
49	259e	C
50	260d	B
51	261b	A

ES 2 705 066 T3

(continúa)

Nº ASO en prueba	Seq ID No.	Resultado
52	261e	B
53	261g	A
54	262d	B
55	262e	A
56	209s	A
57	209v	B
58	209w	A
59	209x	C
60	209ai	B
61	209an	C
62	209at	B
63	209au	B
64	209av	B
65	263b	B
66	263c	A
67	263i	B
68	263m	A
69	264e	A
70	264h	A
71	265e	B
72	266c	A
73	267b	B
74	268a	B
75	272e	B
76	273d	B
77	274a	A
78	274d	B
79	274f	A
80	275g	A
81	275i	B
82	210o	A
83	210v	B
84	210w	B
85	210x	C
86	210ab	B
87	210ac	A
88	210ad	B
89	210af	A
90	210am	B
91	276b	B
92	276c	A
93	276j	B
94	276k	B
95	277d	A
96	277e	A
97	278f	B
98	279c	B
99	280b	C
100	281a	C
101	220d	C
102	221d	B
103	222b	A
104	222c	A

ES 2 705 066 T3

(continúa)

	Nº ASO en prueba	Seq ID No.	Resultado
5	105	222f	B
	106	223c	B
	107	223f	A
	108	218ad	B
	109	218n	A
10	110	218t	B
	111	218u	B
	112	218v	C
	113	218ah	C
15	114	218an	A
	115	218ao	B
	116	218ap	B
	117	224i	B
20	118	224m	B
	119	225c	A
	120	225f	A
	121	226e	B
25	122	227c	B
	123	228b	C
	124	229a	C
	125	285d	C
30	126	286d	A
	127	287d	B
	128	287e	A
	129	287f	A
35	130	288e	A
	131	288i	A
	132	289d	B
	134	289h	A
40	135	289o	B
	136	289p	A
	137	289q	B
	138	213o	B
	139	213p	B
45	140	213q	B
	141	213s	B
	142	213y	B
	143	213z	B
50	144	213aa	B
	145	213af	C
	146	290c	A
	147	290f	B
55	148	290i	A
	149	291c	B
	150	292c	C
	151	293b	C
60	152	294a	C
	125	285d	C

Conclusión:

65 **[0311]** Incluso después de la preincubación de TGF- β 1, la transferencia gimnótica de ASO inventivos da como

resultado la reducción de la proteína TGF-R_{II} en células A549 y ReNcell CX®.

Ejemplo 6: Análisis de los efectos de los ASO de la invención a la vía de señalización descendente de TGF-R_{II} después de la preincubación con TGF-β1

[0312] Los análisis funcionales se realizaron en células de cáncer de pulmón humano (A549) y células precursoras neuronales humanas (ReNcell CX®). Se analizó la vía de señalización en sentido descendente de TGF-β1, luego de una eficaz regulación a la baja del ARNm de TGF-R_{II} y la reducción de los niveles de proteína por transferencia gimnótica de los ASO inventivos en presencia de TGF-β1.

[0313] Por lo tanto, se evaluaron los niveles de ARNm y proteína del factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF), conocidos como mediadores en sentido descendente de TGF-β. Además, se examinó la fosforilación de Smad2 (madres contra el homólogo 2 decapentafléptico). La fosforilación de Smad2 es un marcador para una ruta activa de TGF-β seguida por la regulación positiva del gen diana CTGF en sentido descendente.

Descripción del método:

[0314] Las células se cultivaron como se describió anteriormente en el protocolo estándar. Para el tratamiento, las células se sembraron en placas de cultivo de 24 pocillos (Sarstedt n° 83.1836.300) (50.000 células/pocillo), placas de cultivo de 6 pocillos (Sarstedt n° 83.3920.300) (80.000 células/pocillo) y cultivo celular de 8 pocillos platos de portaobjetos (Sarstedt n° 94.6140.802)(10.000 células/pocillo) y se incubaron durante la noche a 37°C y 5% de CO₂. Para la investigación de los efectos de transferencia gimnótica (células A549 y ReNcell CX®), después de la incubación previa con TGF-β1, se eliminó el medio y se reemplazó por medio completo fresco (1 ml para placas de 6 pocillos y placas de portaobjetos de cultivo celular de 8 pocillos). Tras la exposición de TGF-β1 (10 ng/ml, 48 h), se cambió el medio, TGF-β1 (10 ng/ml), Ref.1 (control aleatorizado, 10 μM), ASO con Seq. ID No. 218b (10 μM), y ASO con Seq. ID No. 218c (10 μM) se añadió en combinación y en un solo tratamiento a las células. Las células A549 se incubaron durante 72 h más, mientras que las células ReNcell CX® se recolectaron después de 96 h. Por lo tanto, las células se lavaron dos veces con PBS y posteriormente se utilizaron para el ARN (placas de 24 pocillos) y el aislamiento de proteínas (placas de 6 pocillos) o el examen inmunocitoquímico de las células (en placas de portaobjetos de cultivo celular de 8 pocillos). Para evaluar los efectos en el nivel de ARNm de CTGF, se realizó RT-PCR en tiempo real como se describió anteriormente. El par de cebadores para el análisis de CTGF estaba listo para usar y estandarizado. Para verificar los niveles de proteína CTGF y pSmad2, se usaron transferencia Western e inmunocitoquímica como se describió anteriormente. El tipo y las diluciones usadas de anticuerpos para el método respectivo se enumeran en la Tabla 13 y 14.

6.1. Resultados para Seq. ID No. 218b

6.1.1 Efectos sobre los niveles de ARNm y proteínas de CTGF

[0315] El ARNm de CTGF se reguló por disminución después de la transferencia gimnótica con ASO Seq. ID No. 218b en células A549 (72 h, 0,52 ± 0,05) y ReNcell CX® (96 h, 0,70 ± 0,25), mientras que la incubación de TGF-β1 durante 5 días (A549: 48 h + 72 h, 6,92 ± 2.32) o 6 días (ReNcell CX: 48 h + 96 h, 1,60 ± 0,15) respectivamente, causaron una regulación positiva significativa del ARNm de CTGF. ASO Seq. ID No. 218b fue lo suficientemente potente como para provocar una regulación a la baja del ARNm de CTGF al bloquear los efectos de TGF-β1 en presencia de TGF-β1 (Tabla 28, Fig. 11). De acuerdo con las observaciones de los niveles de ARNm, la tinción inmunocitoquímica contra CTGF también confirmó estas observaciones para los niveles de proteína (Figura 12).

Tabla 28: Regulación a la baja del ARNm de CTGF en presencia de TGF-β1 seguido de transferencia gimnótica con Seq. ID No. 218b en células A549 y ReNcell CX®. Los niveles de expresión de ARNm se cuantificaron en relación con el mantenimiento de GNB2L1 utilizando RT-PCR cuantitativa en tiempo real normalizada para el control no tratado. A = control sin tratar, B = Ref.1, C = Seq. ID No. 218b, E = TGF-β1, ± = SEM, *p <0,05, **p <0,01 en referencia a A, ***p <0,01 en referencia a E+B. Las estadísticas se calcularon utilizando el ANOVA ordinario de una vía seguido de las comparaciones post hoc de "Tukey".

Diana Punto de tiempo	CTGF	
	48 h TGF-β1 -> 72 h / 96 h TGF-β1 + ASOs / tratamiento único	
Línea de células	A549 n= 5	ReNcell CX n= 3
A	1,00 ± 0,22	1,00 ± 0,04
B 10 μM	0,89 ± 0,19	0,85 ± 0,01
C 10 μM	0,52 ± 0,05	0,70* ± 0,25
E 10 ng/ml	6,92* ± 2,32	1,60** ± 0,15
E 10 ng/ml + B 10 μM	8,79** ± 2,72	1,71** ± 0,03
E 10 ng/ml + C 10 μM	2,53*** ± 0,59	1,19*** ± 0,04

Conclusión:

[0316] En presencia de TGF-β1 y después del tratamiento de ASO Seq. ID No. 218b resultó en primer lugar en la regulación a la baja del ARNm de TGF-R_{II} y secundario en los niveles de proteína y ARNm de CTGF reducidos en células A549 y ReNcell CX®. Eso indica que ASO Seq. ID No. 218b es lo suficientemente potente como para estar activo en condiciones patológicas de alto TGF-β1 y es capaz de rescatar de los efectos mediados por TGF-β1.

6.1.2 Efectos sobre el nivel de proteína pSmad2

[0317] Para verificar si la regulación a la baja de CTGF es una consecuencia de la inhibición específica de la señalización de TGF-β, mediada por ASO Seq. ID No. 218b en presencia de TGF-β1, se analizaron los niveles de proteína pSmad2.

[0318] Tinción de pSmad2 después de la incubación previa con TGF-β1 seguida de transferencia gimnótica de ASO Seq. ID No. 218b con exposición paralela a TGF-β1 conduce a una inhibición de la fosforilación de Smad2 en ambas líneas celulares analizadas (Figura 13). Además, los niveles reducidos de proteína pSmad2 se verificaron mediante análisis de transferencia Western en células A549 y ReNcell CX® (Tabla 29).

Tabla 29: Análisis densitométrico de transferencia Western pSmad2. Regulación a la baja de la proteína pSmad2 después de la transferencia gimnótica con ASO Seq. ID No. 218b fue reconocida. También se encontró una reversión de los efectos mediados por TGF-β1 por ASO inventivos, cuando se compararon los tratamientos de combinación. Los niveles de proteína se determinaron en relación con el gen de mantenimiento GAPDH utilizando el software Studio™ Lite y luego se normalizaron para el control no tratado. A = control sin tratar, B = Ref.1, C = Seq. ID No. 218b, E = TGF-β1. Las estadísticas se calcularon utilizando el ANOVA ordinario de una vía seguido por las comparaciones post hoc de "Dunnett".

Diana Punto de tiempo Línea de células	pSmad2 48 h TGF-β1 -> 72 h / 96 h TGF-β1 + ASOs / único tratamiento	
	A549 n= 2	ReNcell CX n= 2
A	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00
B 10 μM	1,23 ± 0,47	0,89 ± 0,22
C 10 μM	0,58 ± 0,08	0,66 ± 0,14
E 10 ng/ml	1,40 ± 0,31	1,19 ± 0,61
E 10 ng/ml + B 10 μM	1,27 ± 0,46	2,19 ± 0,76
E 10 ng/ml + C 10 μM	0,81 ± 0,31	1,55 ± 0,42

Conclusión:

[0319] ASO Seq. ID No. 218b da como resultado una inhibición funcional de la señalización de TGF-β en células A549 y ReNcell CX® en presencia de TGF-β1, confirmada por una fosforilación reducida de Smad2.

6.2 Resultados para Seq. ID No. 218c

6.2.1 Efectos sobre el nivel de ARNm y proteína de CTGF

[0320] Los datos muestran que la regulación del ARNm de CTGF después del tratamiento de combinación con ASO Seq. ID No. 218c y TGF-β1 (A549: 0,86, ReNcell CX®: 0,23) en comparación con el tratamiento combinado con control aleatorizado y TGF-β1 (A549: 5,89, ReNcell CX®: 1,25) (Tabla 30 y Fig. 14). Además de estas observaciones, la tinción inmunocitoquímica de CTGF confirmó la prevención de los efectos mediados por TGF-β1 en el nivel de proteína por ASO Seq. ID No. 218c (Figura 15).

Tabla 30: Niveles de ARNm de CTGF después de la incubación previa con TGF-β1 seguida de transferencia gimnótica de Seq. ID No. 218c y tratamiento paralelo de TGF-β1 en células A549 y ReNcell CX®. Los datos confirmaron la prevención efectiva de los efectos de TGF-β1 en los niveles de ARNm de CTGF por ASO Seq. ID No. 218c. Se cuantificaron los niveles de expresión de ARNm en relación con el gen de mantenimiento GNB2L1 utilizando RT-PCR cuantitativa en tiempo real normalizada para los controles no tratados. A = control no tratado, B = Ref.1, D = Seq. ID No. 218c, E = TGF-β1, ± = SEM, **p <0,01 en referencia a A, **p <0,01 en referencia a E+B. Las estadísticas se calcularon utilizando el ANOVA ordinario de una vía seguido de las comparaciones *post hoc* de "Tukey".

Diana	CTGF	
Punto de tiempo	48 h TGF- β 1 -> 72 h / 96 h TGF- β 1 + ASOs / único tratamiento	
Línea de células	A549 n= 3	ReNcell CX n= 2
A	1,00 \pm 0,05	1,00 \pm 0,03
B 10 μ M	0,86 \pm 0,11	0,85 \pm 0,01
D 10 μ M	0,53 \pm 0,10	0,17* \pm 0,02
E 10 ng/ml	4,71 \pm 1,76	1,39 \pm 0,08
E 10 ng/ml + B 10 μ M	5,89* \pm 2,16	1,25 \pm 0,44
E 10 ng/ml + D 10 μ M	0,86** \pm 0,06	0,23*** \pm 0,02

Conclusión:

Los datos confirmaron una prevención eficaz de los efectos inducidos por TGF- β 1 en los niveles de proteína y ARNm de CTGF por ASO Seq. ID No. 218c.

6.2.2 Efectos sobre el nivel de proteína pSmad2

[0322] Para verificar si la regulación a la baja de CTGF (6.2.1) es una consecuencia de la inhibición de señalización de TGF- β 1 mediada por ASO Seq. ID No. 218c, incluso en presencia de preincubación con TGF- β 1, se analizaron los niveles de proteína pSmad2.

[0323] La inducción de la fosforilación de Smad2 por TGF- β 1 (1,52 \pm 0,19), mientras que la transferencia de ASO gimnótica mediada por una reducción de pSmad2 en células A549 (0,89 \pm 0,05). La preincubación de TGF- β 1 con el siguiente tratamiento de combinación da como resultado la supresión de los efectos de TGF- β 1 en la fosforilación de Smad2 (Análisis de Transferencia Western, Tabla 31). La inmunocitoquímica respaldó los datos observados por análisis de transferencia Western (Figura 16).

Tabla 31: Análisis densitométrico de transferencia Western pSmad2. Regulación a la baja de la proteína pSmad2 después de medirse la transferencia gimnótica con ASO Seq. ID No. 218c. Cuando se compararon los tratamientos combinados, se demostró la supresión de los efectos mediados por TGF- β 1 por los ASO inventivos. Los niveles de proteína se determinaron en relación con el gen housekeeping GAPDH utilizando el software Studio™ Lite y los controles normalizados a no tratados. A = control no tratado, B = Ref.1, D = Seq. ID No. 218c, E = TGF- β 1. Las estadísticas se calcularon utilizando el ANOVA ordinario de una vía seguido de las comparaciones *post hoc* de "Dunnett".

Diana	pSmad2
Punto de tiempo	48 h TGF- β 1 -> 72 h TGF- β 1 + ASOs / único tratamiento
Línea de células	A549 n= 2
A	1,00 \pm 0,00
B 10 μ M	1,23 \pm 0,27
D 10 μ M	0,89 \pm 0,05
E 10 ng/ml	1,52 \pm 0,19
E 10 ng/ml + B 10 μ M	1,27 \pm 0,29
E 10 ng/ml + D 10 μ M	0,93 \pm 0,35

Conclusión:

[0324] ASO Seq. ID No. 218c está inhibiendo eficientemente la señalización de TGF- β después de la incubación previa con TGF- β 1 seguida de transferencia gimnótica de ASO. Esto se demostró mediante el examen de los niveles de proteína pSmad2 aguas abajo.

[0325] En conjunto, los ASO inventivos son extraordinariamente capaces de mediar una inhibición funcional de la señalización de TGF- β en presencia de niveles patológicos de TGF- β 1 altos mediante una regulación por disminución eficiente del ARNm de TGF- β . Por lo tanto, los ASO de la invención serán beneficiosos en las indicaciones médicas en las que están involucrados niveles elevados de TGF- β , por ejemplo, trastornos neurológicos, fibrosis, progresión tumoral y otros.

Ejemplo 7: Determinación de la actividad profiláctica de los oligonucleótidos antisentido a nivel de ARNm (TGF-β1 posterior al tratamiento)

5 **[0326]** Para analizar la actividad profiláctica de oligonucleótidos antisentido (ASO) en células progenitoras neuronales humanas de la región del cerebro cortical (ReNcell CX®), los ASO se transfirieron a las células mediante captación gimnótica después del tratamiento del Factor-β1 de crecimiento transformador (TGF-β1).

Descripción del método:

10 **[0327]** Las células A549 y ReNcell CX® se cultivaron como se describe anteriormente. Para los estudios de tratamiento profiláctico, las células se sembraron en una placa de cultivo de 24 pocillos (Sarstedt nº 83.1836.300)(50.000 células/pocillo) y se incubaron durante la noche a 37°C y 5% de CO₂. Posteriormente, Ref.1 (control aleatorizado, 10 mM) o ASO con Seq. ID No. 218b (10 mM) se agregaron a los medios durante 72 h (A549) o 96 h (ReNcell CX®). Tras el tiempo de incubación después de la transferencia gimnótica, se añadió TGF-β1 (10 ng/ml, Promocell C-63499), sin reemplazo de medio, a las células durante 48 h más. Para la recolección, las células se lavaron dos veces con PBS y posteriormente se usaron para el aislamiento de ARN (placas de 24 pocillos) después del análisis de ARNm mediante RT-PCR en tiempo real. Se utilizaron pares de cebadores listos para uso y estandarizados para RT-PCR en tiempo real y se mezclaron con la solución Mastermix lista para usar (SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (BioRad 172-5271) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (BioRad Prime PCR Quick Guide). Los métodos se realizaron como se describe anteriormente.

7.1 Resultados para Seq. ID No. 218b

25 **[0328]** Eficacia en la regulación por disminución de ARNm de TGF-R_{II} por ASO Seq. ID No. 218b no fue influenciada por TGF-β1 después de la incubación en células A549 y ReNcell CX® (Tabla 32). Se mostró una disminución significativa del ARNm diana en las células ReNcell CX® después del tratamiento único (0,33* ± 0,11) con ASO Seq. ID No. 218b. La transferencia gimnótica de ASO con el postratamiento de TGF-β1, redujo fuertemente el ARNm de TGF-R_{II} diana. En células A549, Seq. ID No. 218b mostró una potencia similar en la inhibición del ARNm de TGF-R_{II} en un tratamiento único (0,25 ± 0,07) o combinado con post-incubación de TGF-β1 (0,24 ± 0,06).

30 **Tabla 32: Regulación a la baja del ARNm de TGF-R_{II} después de la transferencia gimnótica después del tratamiento con TGF-β1 de ASO inventiva en células A549 y ReNcell CX®.** Se cuantificaron los niveles de expresión de ARNm en relación con el gen de mantenimiento GNB2L1 utilizando RT-PCR cuantitativa en tiempo real normalizada para el control no tratado. A = control no tratado, B = Ref.1, C = Seq. ID No. 218b, E = TGF-β1. ± = SEM, *p <0,05 en referencia a A, **p <0,01 en referencia a E+B. Las estadísticas se calcularon utilizando el ANOVA ordinario de una vía seguido de las comparaciones *post hoc* de "Tukey".

Diana Punto de tiempo	TGF-R _{II}	
	72 h / 96 h ASOs	-> 48 h TGF-β1
Línea de células	A549 n= 3	ReNcell CX n= 3
A	1,00 ± 0,44	1,00 ± 0,19
B 10 μM	0,95 ± 0,22	1,42 ± 0,14
C 10 μM	0,25 ± 0,07	0,33* ± 0,11
E 10 ng/ml	1,96 ± 0,16	1,42 ± 0,08
E 10 ng/ml + B 10 μM	1,14 ± 0,39	1,25 ± 0,14
E 10 ng/ml + C 10 μM	0,24** ± 0,06	0,56** ± 0,10

Conclusión:

55 **[0329]** Captación gimnótica de ASO Seq. ID No. 218b seguido de TGF-β1 después de la incubación fue eficaz en la regulación a la baja del ARNm de TGF-R_{II} diana, lo que indica que ASO Seq. ID No. 218b es factible para el tratamiento profiláctico en indicaciones médicas.

60 **Ejemplo 8: Determinación de la actividad inhibitoria de las ASO inventivas a nivel de proteína después del tratamiento con TGF-β1**

65 **[0330]** Para analizar la actividad profiláctica de las ASO inventivas en células progenitoras neuronales humanas de la región del cerebro cortical (ReNcell CX®), las ASO se transfirieron a las células mediante captación gimnótica después del tratamiento con TGF-β1.

Descripción del método:

[0331] Las células se cultivaron como se describe anteriormente en el protocolo estándar. Para el tratamiento, las células se sembraron en placas de portaobjetos de cultivo celular de 8 pocillos (Sarstedt nº 94.6140.802) (10.000 células/pocillo) y se incubaron durante la noche a 37°C y 5% de CO₂. Posteriormente, se agregaron a los medios Ref.1 (control aleatorizado, 10 µM) o número de identificación de secuencia ASO 218b (Seq. ID No. 218b, 10 µM) durante 72 h (A549) o 96 h (ReNcell CX®). Después de la transferencia gimnótica, se añadió TGF-β1 (10 ng/ml, Promocell C-63499), sin reemplazo de medio, a las células durante 48 h más. Para la recolección, las células se lavaron dos veces con PBS y posteriormente se utilizaron para el análisis inmunocitoquímico. El procedimiento se realizó como se describe anteriormente. Los anticuerpos y diluciones usados para los métodos respectivos se enumeran en la Tabla 13 y 14.

8.1 Resultados de la reducción de la proteína TGF-R_{II} después de la transferencia gimnótica con Seq. ID No. 218b luego del tratamiento con TGF-β1

[0332] El análisis inmunocitoquímico contra TGF-R_{II} para células A549 y ReNcell CX® mostró que ASO Seq. ID No. 218b genera una potente regulación hacia abajo de la diana de ARNm de TGF-R_{II} después de seguir el tratamiento con TGF-β1 (Figura 17).

Conclusión:

[0333] Transferencia gimnótica de ASO Seq. ID No. 218b después del tratamiento con TGF-β1 dio como resultado una regulación a la baja del ARNm, así como una fuerte reducción del nivel de proteína TGF-R_{II} en células A549 y ReNcell CX®.

[0334] En conjunto, la eficacia de la regulación a la baja de la proteína TGF-R_{II} mediada por ASO Seq. ID No. 218b en combinación con el postratamiento de TGF-β1 todavía se dio, concluyendo que las ASO de la invención son efectivas para aplicaciones profilácticas.

Ejemplo 9: Efectos del tratamiento con ASO en la vía de señalización descendente de TGF-R_{II} después del tratamiento con TGF-β1.

[0335] La eficacia de las ASO inventivas en la mediación de una inhibición de la señalización de TGF-β se evaluó para el tratamiento con TGF-β1 seguido de transferencia gimnótica en células de cáncer de pulmón humano (A549) y células precursoras neuronales humanas (ReNcell CX®). Por lo tanto, se analizaron las moléculas derivadas de la señalización de TGF-β, Smad3 (madres contra el homólogo 3 decapentafléjico) y el factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF).

Descripción del método:

[0336] Las células se cultivaron como se describe anteriormente en el protocolo estándar. Para el tratamiento, las células se sembraron en placas de cultivo de 24 pocillos (Sarstedt nº 83.1836.300) (50.000 células/pocillo) y placas de portaobjetos de cultivo celular de 8 pocillos (Sarstedt nº 94.6140.802) (10.000 células/pocillo) y se incubaron durante la noche a 37°C y 5% CO₂. Después, Ref.1 (control aleatorizado, 10 µM) o ASO Seq. ID No. 218b (10 µM) se agregaron a los medios durante 72 h (A549) o 96 h (ReNcell CX®). Después de la transferencia gimnótica, se añadió TGF-β1 (10 ng/ml, Promocell C-63499) sin reemplazo de medio durante 48 h más. Para la recolección, las células se lavaron dos veces con PBS y posteriormente se usaron para el aislamiento de ARN (placas de 24 pocillos) o el examen inmunocitoquímico de células (en placas de portaobjetos de cultivo celular de 8 pocillos). Para evaluar los efectos en el nivel de ARNm de CTGF, se realizó RT-PCR en tiempo real como se describió anteriormente. El par de cebadores para el análisis de CTGF estaba listo para uso y estandarizado. Para determinar los niveles de proteína pSmad3, se utilizó la inmunocitoquímica como se describió anteriormente. El tipo y las diluciones usadas de anticuerpos para el método respectivo se enumeran en la Tabla 13 y 14.

9.1. Resultados para Seq. ID No. 218b

9.1.1 Efectos en el nivel de ARNm de CTGF y pSmad3

[0337] El ARNm de CTGF se redujo después de la transferencia gimnótica con ASO Seq. ID No. 218b en A549 (5 días: 0,67 ± 0,02) y células ReNcell CX® (6 días: 0,70 ± 0,02). Al agregar TGF-β1 después de 72 horas o 96 horas respectivamente, las células reaccionan con un aumento del ARNm de CTGF, pero en comparación con la transferencia gimnótica del control mezclado después del tratamiento con TGF-β1, la inducción del ARNm de CTGF se redujo fuertemente (Tabla 33). Para verificar si la regulación a la baja del ARNm de CTGF fue una consecuencia de la inhibición de la señalización del TGF-β, mediada por la ASO Seq. ID No. 218b, también después de seguir el tratamiento con TGF-β1, se examinaron los niveles de proteína pSmad3. La Fig. 18 demuestra que la señalización de TGF-β estaba de hecho bloqueada por la transferencia gimnótica de ASO Seq. ID No. 218b en células A549 (Figura 18 A) y ReNcell CX® (Figura 18 B). Este efecto también estuvo presente después de la transferencia gimnótica de ASO ensayada después del tratamiento con TGF-β1.

Tabla 33: Regulación a la baja del ARNm de CTGF después de la transferencia gimnótica de ASO Seq. ID No. 218b seguido por tratamiento con TGF- β 1 en células A549 y ReNcell CX®. La cuantificación de los niveles de expresión de ARNm se realizó en relación con el gen de mantenimiento GNB2L1 utilizando RT-PCR cuantitativa en tiempo real y luego se normalizó a un control sin tratar. A = control sin tratar, B = Ref.1, C = Seq. ID No. 218b, E = TGF- β 1. \pm = SEM, *p <0,05, **p <0,01 en referencia a A, + p <0,05, **p <0,01 en referencia a E+B. Las estadísticas se calcularon utilizando el ANOVA ordinario de una vía seguido de las comparaciones *post hoc* de "Tukey".

Diana Punto de tiempo	CTGF	
	72 h /96 h ASOs -> +/- 48 h TGF- β 1	
Línea de células	A549 n= 3	ReNcell CX n= 3
A	1,00 \pm 0,13	1,00 \pm 0,09
B 10 μ M	0,80 \pm 0,03	1,07 \pm 0,07
C 10 μ M	0,67 \pm 0,02	0,70 \pm 0,02
E 10 ng/ml	4,54** \pm 0,68	1,56* \pm 0,08
E 10 ng/ml + B 10 μ M	4,07** \pm 0,38	1,62* \pm 0,09
E 10 ng/ml + C 10 μ M	1,90* \pm 0,03	0,97** \pm 0,10

Conclusión:

[0338] Transferencia gimnótica de ASO Seq. ID No. 218b dio como resultado una regulación a la baja del ARNm y la proteína de TGF- R_{II} , así como también niveles reducidos de ARNm y pSmad3 de CTGF en células A549 y ReNcell CX®, independientemente del tratamiento con TGF- β 1.

[0339] Eso indica que ASO Seq. ID No. 218b es lo suficientemente potente como para ser también activo en condiciones profilácticas para reanudar o reducir los efectos mediados por TGF- β 1 en curso.

Ejemplo 10: Análisis de los posibles efectos proinflamatorios y toxicológicos de los oligonucleótidos antisentido

10.1 Ensayo de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)

[0340] Para analizar las propiedades inmunoestimuladoras (oligonucleótido antisentido) (ASO), se incubaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) con ASO de control y compuestos de prueba seguidos de ELISA para IFN α y TGF α .

Descripción del método:

[0341] Se aislaron PBMC de capas buffy correspondientes a 500 ml de unidades de transfusión de sangre completa. Cada unidad se obtuvo de voluntarios sanos y se utilizó glucosa-citrato como anti-aglutinante. La capa leucocitaria fue preparada y entregada por el Banco de Sangre Suhl en el Instituto de Medicina Transfusional de Alemania. Cada donación de sangre se monitorizó para detectar anticuerpos contra el VIH, anticuerpos contra el VHC, antígeno HBs, TPHA, ARN del VIH y SPGT (ALAT). Solo las muestras de sangre con resultado negativo para agentes infecciosos y con un valor SPGT normal se utilizaron para la separación de leucocitos y eritrocitos mediante centrifugación a baja velocidad. El aislamiento de PBMC se realizó aproximadamente 40 h después de la donación de sangre por centrifugación en gradiente usando Ficoll-Histopaque® 1077 (Heraeus™ Multifuge™ 3 SR). Para el ensayo de IFN α , las PBMC se sembraron a 100.000 células/96 pocillos en 100 μ l de medio completo más aditivos (RPMI1640, + L-Glu, + 10% FCS, + PHA-P (5 μ g/ml), + IL-3 (10 μ g/ml) y los compuestos de ensayo (5 μ l) se agregaron para incubación directa (24 h, 37°C, 5% CO $_2$). Para el ensayo de TNF α , las PBMC se sembraron a 100.000 células/96 pocillos en 100 μ l de medio completo sin aditivos (RPMI1640, + L-Glu, + 10% FCS) y se agregaron compuestos de prueba (5 μ l) para incubación directa (24 h, 37°C, 5% CO $_2$). El ELISA (medición duplicada de los sobrenadantes combinados, 20 μ l) para huIFN α (eBioscience, #BMS216INSTCE) se realizó de acuerdo con el protocolo del fabricante. El ELISA (medición duplicada de sobrenadantes combinados, 20 μ l) para huTNF α (eBioscience, #BMS223INSTCE) se realizó de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Resultados:

[0342] No hubo efecto inmunoestimulador del tratamiento con ASO en las PBMC indicadas por la secreción de IFN α no detectable (Tabla 34) y TNF α (Tabla 35) tras la incubación de ASO. La funcionalidad del ensayo está ensayada por el efecto inmunoestimulador de ARNs inmunoestimulador, conjugado con colesterol (XD-01024; IFN α) y poliinosínico: poli (ácido citidílico) (poli I:C; TNF α ; InvivoGen # tlrl-pic) que es un análogo sintético del ARN de doble cadena, se une a TLR3 y estimula el sistema inmune.

Tabla 34 Respuesta de IFN α a la exposición inventiva de ASO: muestra la respuesta de IFN α de las PBMC tras la incubación de ASO. La cuantificación de los niveles de expresión se determinó en controles positivos (ODN2216 [oligonucleótido CpG de clase A; reconocido por TLR9 y que conduce a fuertes efectos inmunoestimulantes; InvivoGen tlr-2216], poli I: C, XD-01024) usando el ensayo ELISA.

Candidato de prueba	Medio de duplicados [pg/ml]	
	Donante 1	Donante 2
muestra	- 0,084	0,720
Seq. ID No. 209y	- 0,061	- 0,039
Seq. ID No. 209t	- 0,308	- 0,520
Seq. ID No. 209v	- 0,191	- 1,252
Seq. ID No. 218b	- 0,001	- 0,093
Seq. ID No. 218m	- 0,140	- 0,163
Seq. ID No. 218q	- 0,755	0,005
Seq. ID No. 218c	- 0,852	- 0,805
Seq. ID No. 218t	- 0,469	0,450
ODN2216	0,300	1,311
poli I:C	- 1,378	2,053
XD-01024	13,961	26,821

Todos los valores salvo control positivo (XD-01024) por debajo del límite de cuantificación

Tabla 35 Respuesta de TNF α a la exposición a ASO de la invención: la cuantificación de los niveles de expresión se determinó para controlar a los candidatos (ODN2216, poli I: C, XD-01024) utilizando el ensayo ELISA.

Candidato de prueba	Medio de duplicados [pg/ ml]	
	Donante 1	Donante 2
muestra	0,647	-0,137
Seq. ID No. 209y	2,397	-0,117
Seq. ID No. 209t	0,734	0,193
Seq. ID No. 209v	0,360	0,063
Seq. ID No. 218b	0,670	0,183
Seq. ID No. 218m	0,594	0,519
Seq. ID No. 218q	0,049	0,194
Seq. ID No. 218c	-0,212	0,029
Seq. ID No. 218t	0,593	0,758
ODN2216	0,085	0,894
poli I:C	115,026	102,042
XD-01024	1,188	1,418

Todos los valores salvo el control positivo (poli I:C) por debajo del límite de cuantificación

10.2 Toxicología *in vivo* de los oligonucleótidos antisentido de la invención.

[0343] Para analizar las propiedades toxicológicas de los oligonucleótidos antisentido (ASO), los ratones C57/BI6N recibieron tres inyecciones de ASO, y luego del sacrificio, se examinaron los niveles de transaminasas en suero, hígado y riñón.

Descripción del método:

[0344] Los ratones hembras C57/BI6N a la edad de 6 semanas se trataron con compuestos de ensayo (Seq. ID No. 218b, Seq. ID No. 218c) durante siete días. Las ASO (200 μ l, 15 mg/kg/BW) se inyectaron por vía intravenosa en el día uno, dos y tres del período de tratamiento. El desarrollo del peso corporal (Seq. ID No. 218c) se monitorizó cada día consecutivo y en el día cuatro se recogió el suero de la vena fascicularis. El día ocho, los animales se sacrificaron (CO₂) y el suero de la vena cava, el hígado (trozos de ~ 50 mg), los riñones y el pulmón se recolectaron para la cuantificación de ARNm y transaminasa. Los niveles de ARNm de TGF-R_{II} se determinaron en el lisado de hígado, riñón y pulmón mediante un ensayo de ADNc (kit QuantiGene®, Panomics/Affimetrix). La transaminasa de aspartato (ASP) y la transaminasa de alanina (ALT) se midieron en Cobas Integra® 400 de suero diluido 1:10.

Tabla 36: Niveles de expresión en suero de transaminasa de alanina y transaminasa de aspartato de ratones C57/BI6N después de la inyección repetida de ASO iv. La cuantificación de los niveles de expresión se logró comparando con los niveles de expresión de los animales tratados con solución salina. \pm = SEM.

Compuesto de prueba	Transaminasas de suero [U/L]			
	3 días post inyección		7 días post inyección	
	ALT	AST	ALT	AST
Seq. ID No. 209ax	13,87 \pm 1,44	47,33 \pm 15,88	64,91 \pm 21,01	108,99 \pm 13,56
Seq. ID No. 143h	13,68 \pm 3,33	53,50 \pm 6,99	12,47 \pm 1,64	33,35 \pm 8,17
Seq. ID No. 152h	16,66 \pm 6,29	67,23 \pm 29,91	17,49 \pm 2,81	45,75 \pm 17,14
Seq. ID No. 209ay	18,29 \pm 6,37	69,96 \pm 35,44	287,29 \pm 65,39	273,45 \pm 101,33
Seq. ID No. 210q	11,70 \pm 3,80	36,44 \pm 5,36	11,11 \pm 6,31	40,81 \pm 13,32
Seq. ID No. 218b	19,60 \pm 8,62	67,61 \pm 42,75	18,38 \pm 4,60	48,91 \pm 17,86
Seq. ID No. 213k	13,59 \pm 3,28	54,47 \pm 36,15	96,00 \pm 46,74	89,12 \pm 21,82
Salina	9,52 \pm 9,21	67,18 \pm 28,60	9,99 \pm 2,29	28,29 \pm 2,23

Tabla 37: Niveles de expresión de TGF-R_{II} en tejidos de hígado, riñón y pulmón de ratones C57/BI6N después de una inyección repetida de ASO iv. La cuantificación de los niveles de expresión se logró comparando con los niveles de expresión de los animales tratados con solución salina. \pm = SEM.

Compuesto de prueba	Expresión de TGF-R _{II} ARNm/GAPDH ARNm		
	Hígado	Riñón	Pulmon
Seq. ID No. 209ax	0,64 \pm 0,03	1,31 \pm 0,11	13,25 \pm 0,67
Seq. ID No. 143h	0,26 \pm 0,02	0,65 \pm 0,22	11,10 \pm 0,11
Seq. ID No. 152h	0,58 \pm 0,10	0,87 \pm 0,17	13,42 \pm 0,69
Seq. ID No. 209ay	0,62 \pm 0,06	1,30 \pm 0,10	13,93 \pm 0,57
Seq. ID No. 210q	0,39 \pm 0,06	0,83 \pm 0,15	13,53 \pm 1,23
Seq. ID No. 218b	0,72 \pm 0,08	0,97 \pm 0,06	15,63 \pm 1,45
Seq. ID No. 213k	0,42 \pm 0,01	1,20 \pm 0,04	14,44 \pm 1,03
Salina	0,66 \pm 0,04	1,10 \pm 0,08	15,14 \pm 0,65

Tabla 38: Niveles de expresión en suero de transaminasa de alanina y transaminasa de aspartato de ratones C57/BI6N después de la inyección repetida de ASO iv. La cuantificación de los niveles de expresión se logró comparando con los niveles de expresión de los animales tratados con solución salina. \pm = SEM.

Compuesto de prueba	Transaminasas de suero [U/L]			
	3 días post inyección		7 días post inyección	
	ALT	AST	ALT	AST
Seq. ID No. 218c	24,63 \pm 2,10	51,87 \pm 5,99	18,10 \pm 4,01	39,99 \pm 2,09
Saline	28,68 \pm 3,23	79,95 \pm 30,24	14,52 \pm 4,89	36,08 \pm 3,32

Tabla 39: Niveles de expresión de TGF-R_{II} en el tejido hepático y renal de ratones C57/BI6N después de una inyección repetida de ASO iv. La cuantificación de los niveles de expresión se logró comparando con los niveles de expresión de los animales tratados con solución salina. \pm = SEM.

Compuesto de prueba	TGF-R _{II} mRNA/GAPDH mRNA expression	
	Liver	Kidney
Seq. ID No. 218c	0,21 \pm 0,03	0,16 \pm 0,02
Saline	0,35 \pm 0,05	0,24 \pm 0,03

Tabla 40: Desarrollo del peso corporal durante el paradigma de tratamiento ASO de 7 días. El aumento de peso corporal se cuantificó en comparación con el peso corporal en el día 0, que se estableció en 100%.

Compuesto de prueba	Desarrollo de peso corporal [%]					
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 7
Seq. ID No. 218c	100%	99%	99%	99%	102%	104%
Salina	100%	99%	100%	100%	101%	103%

[0345] Conclusión: No hubo efectos proinflamatorios o tóxicos de las ASO relevantes de la invención en los PBMC o ratones C57/Bl6N. Por lo tanto, el tratamiento con ASO dirigido a TGF-R_{II} refleja un método seguro para tratar una variedad de trastornos asociados con TGF- β .

Ejemplo 11: Determinación de la infusión intracerebroventricular de ASO inventivas sobre la inhibición del tallo neural inducida por TGF- β y la proliferación de células progenitoras neurales *in vivo*

[0346] El objetivo del presente estudio fue el de evaluar el potencial de las ASO inventivas frente a TGF-R_{II} i) para prevenir y ii) tratar los efectos inducidos por TGF- β 1 sobre la proliferación de células progenitoras y de los tallos neurales *in vivo*.

Descripción del método:

11.1 Prevención de la regulación a la baja de la neurogénesis asociada a TGF- β 1

[0347] Las ratas hembra Fischer-344 de dos meses de edad (n = 32) recibieron infusiones intracerebroventriculares a través de miniculturas osmóticas (Model 2002, Alzet) conectadas a cánulas de acero inoxidable. La implantación quirúrgica de las minibombas se realizó bajo anestesia profunda mediante inyecciones intramusculares. Los animales se infundieron con ASO inventivas de acuerdo con la invención (concentración de 1,64 mM presente en la bomba), ASO mezclado (concentración de 1,64 mM presente en la bomba) o aCSF (líquido cefalorraquídeo artificial) durante 7 días. En el día 8, se cambiaron las bombas y los animales se infundieron con i) aCSF, ii) TGF- β 1 (500 ng/ml presente en la bomba), iii) TGF- β 1 (500 ng/ml presente en la bomba) más ASO revuelto (concentración 1,64 mM presente en la bomba) o iv) TGF- β 1 (500 ng/ml presente en la bomba) más ASO inventivo (concentración 1,64 mM presente en la bomba) durante 14 días. Al final del período de infusión, todos los animales se perfundieron transcárdialmente con un 4% de paraformaldehído. Los cerebros se analizaron para la localización del tracto de la cánula y los animales con la colocación incorrecta de la cánula se excluyeron del análisis. Durante las últimas 24 horas del período de bombeo, los animales recibieron una inyección intraperitoneal de 200 mg/kg de bromodesoxiuridina (BrdU).

[0348] El tejido se procesó para inmunodetección cromogénica de células positivas para BrdU en secciones sagitales de 40 μ m. Las células positivas para BrdU se contaron dentro de tres marcos de conteo de 50 μ m x 50 μ m por sección ubicados en la parte más baja, media y superior de la zona subventricular. Los perfiles positivos que intersectaron el plano focal superior (plano de exclusión) o los límites de exclusión lateral del marco de conteo no se contaron. Para el análisis del hipocampo, se determinó el volumen del hipocampo y se contaron todas las células positivas dentro y adyacentes a los límites. Los recuentos totales de los perfiles positivos se multiplicaron por la relación entre el volumen de referencia y el volumen de muestreo para obtener el número estimado de células positivas para BrdU para cada estructura. Todas las extrapolaciones se calcularon para un hemisferio cerebral y deben duplicarse para representar los valores cerebrales totales. Los datos se presentan como valores medios de \pm desviaciones estándar (DE). El análisis estadístico se realizó utilizando la comparación de la prueba t no pareada, prueba t de Student entre los grupos tratados con TGF- β 1 y de control (software GraphPad Prism 4, EE.UU.). El nivel de significación se asumió en p < 0,05.

11.2 Tratamiento de la regulación a la baja de TGF- β 1 asociada a la neurogénesis

[0349] Los animales recibieron aCSF o TGF- β 1 humano recombinante (500 ng/ml presente en la bomba) a un caudal de 0,5 μ l por hora durante 14 días. Después de 14 días, se cambiaron las bombas y los animales se infundieron con i) aCSF, ii) TGF- β 1 humano recombinante (500 ng/ml presente en la bomba) o co-infundido con iii) ASO inventivo (1,64 mM concentración presente en la bomba) más TGF- β 1 humano recombinante (500 ng/ml presente en la bomba) o iv) ASO revuelto (concentración de 1,64 mM presente en la bomba) más TGF- β 1 humano recombinante (500 ng/ml presente en la bomba). Al final del período de infusión, todos los animales se perfundieron transcárdialmente con un 4% de paraformaldehído. Los cerebros se analizaron para la localización del tracto de la cánula y los animales con la colocación incorrecta de la cánula se excluyeron del análisis. Durante las últimas 24 horas del período de bombeo, los animales recibieron una inyección intraperitoneal de 200 mg/kg de bromodesoxiuridina (BrdU). El análisis histológico se realizó como se describe anteriormente (11.1).

Resultados:

[0350] El tratamiento con ASO de Seq. ID No. 143aj, Seq. ID No. 143h y Seq. ID No. 210q específicamente y parcialmente redujo el efecto del TGF-β1 sobre la proliferación celular en el hipocampo y en la pared del ventrículo. El tratamiento con una ASO inventiva rescata específicamente y parcialmente el efecto inhibitorio de TGF-β1 en la neurogénesis.

[0351] Conclusión: Las ASO de la presente invención que demuestran reactividad cruzada con roedores inducen neurogénesis en este experimento *in vivo*. Las ASO de la presente invención que no muestran reactividad cruzada, ejercen efectos aún más potenciales en experimentos *in vitro*. Como resultado, se asume que estas ASO inventivas también son más efectivas en configuraciones *in vivo* para primates y humanos no humanos y, por lo tanto, actúan como una medicación altamente potente para prevenir o tratar la inhibición inducida por TGF-β1 de la proliferación del tallo neural y progenitores.

Ejemplo 12: Análisis del efecto de los oligonucleótidos antisentido de la invención sobre la proliferación y marcadores específicos de células progenitoras neuronales humanas

[0352] La esclerosis lateral amiotrófica (ALS) es un trastorno neurodegenerativo letal que no tiene un tratamiento efectivo hasta el momento. La actual campaña de genética molecular está dilucidando cada vez más la patogénesis molecular de esta enfermedad mortal, de estudios anteriores se sabe que el TGF-β se encuentra en altas concentraciones en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con ALS. Se sabe que estos altos niveles de TGF-β circulante promueven la quiescencia de las células madre y, por lo tanto, causan la inhibición de la neurogénesis adulta dentro de la zona subventricular (SVZ) del cerebro. Por lo tanto, la regeneración de las neuronas degenerativas parece prevenirse mediante una señalización TGF-β mejorada.

[0353] Para determinar si la inhibición selectiva de la señalización de TGF-β mediada por los oligonucleótidos antisentido inventivos podría permitir la reactivación de la neurogénesis adulta, se debe ensayar la evidencia de la detención del ciclo celular mediada por TGF-β.

Descripción de los métodos:

[0354] Estudios de detención del ciclo celular: las células se cultivaron como se describe anteriormente en el protocolo estándar. Para los experimentos, las células se sembraron en placas de cultivo de 24 pocillos (Sarstedt #83.1836.300) (30.000 células/pocillo) y se incubaron durante la noche a 37°C y 5% de CO₂. Para la determinación de los efectos mediados por TGF-β1 en el ciclo celular en condiciones proliferativas (+EGF/FGF) (Millipore: EGF GF144, bFGF #GF003) o diferenciador (-EGF/FGF), las células se trataron durante 4 días con TGF-β1. (PromoCell #C-63499, 10 o 50 ng/ml) después de retirar y reemplazar el medio respectivo. En el día 4, el medio se refrescó y el tratamiento con TGF-β1 se repitió hasta el día 7. En el día 7, las células se recogieron lavando dos veces con PBS y posteriormente se usaron para el aislamiento de ARN (placas de 24 pocillos) como se describe anteriormente. Para evaluar los efectos mediados por TGF-β1 en el ciclo celular mediante RT-PCR en tiempo real, se analizaron el ARNm del marcador de proliferación Ki67, el gen p53 supresor de tumores, el inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina 1 (p21) y el marcador de neurogénesis Doublecortin (DCX). Los pares de cebadores respectivos se enumeran en la Tabla 11.

[0355] Análisis de ARNm para los efectos de ASO Seq. ID No. 218b en células progenitoras neurales humanas: Las células se cultivaron como se describió anteriormente en el protocolo estándar. Para los experimentos, las células se sembraron en placas de cultivo de 24 pocillos (Sarstedt n° 83.1836.300) (30.000 células/pocillo) y se incubaron durante la noche a 37°C y 5% de CO₂. Para los experimentos presentes, se cambió el medio celular y Ref.1 (control aleatorizado, 2,5 y 10 μM), ASO con Seq. ID No. 218b (2,5 y 10 μM) o TGF-β1 (10 ng/ml, Promocell C-63499) se agregaron a las células durante 96 h. Después del tiempo de incubación, el medio se cambió una vez más y se realizó un tratamiento adicional durante 96 h más. Después de 8 días de tratamiento se recogieron las células. Las células se lavaron dos veces con PBS y posteriormente se usaron para el aislamiento de ARN (placas de 24 pocillos). Para evaluar los efectos en las células progenitoras, se determinaron los niveles de ARNm de Nestin (marcador neuronal temprano), Sox2 (marcador neuronal temprano), DCX (indicador de neurogénesis) y Ki67 (marcador de proliferación) mediante RT-PCR en tiempo real como se describió anteriormente. Los pares de cebadores respectivos se enumeran en la Tabla 11,

[0356] Efectos proliferativos y diferenciadores de las ASO específicas de TGFRII por transferencia gimnótica en células ReNcell CX®: El siguiente objetivo fue el de investigar si la ASO específica de TGF-RII influye en la proliferación de células ReNcell CX®. Por lo tanto, las células se cultivaron como se describió anteriormente y se sembraron en placas de cultivo de 24 pocillos (Sarstedt n° 83.1836.300) (30.000 células/pocillo) o placas de portaobjetos de cultivo celular de 8 pocillos (Sarstedt n° 94.6140.802) (10.000 células/pocillo) y se incubaron durante la noche a 37°C y 5% de CO₂. Para obtener una curva de proliferación, las células se trataron después del cambio de medio durante 72 h con Ref.1 (control aleatorizado, 2,5 y 10 μM) y con ASO Seq. ID No. 218b (2,5 y 10 μM). Después del tiempo de incubación, el cambio de medio y el tratamiento se repitieron dos veces. Después de recoger el sobrenadante, las células restantes se recogieron de placas de 24 pocillos para la determinación del número de células. Para este propósito, las células restantes se lavaron con PBS (2x), se trataron con acutasa (500 μl/pocillo) y se incubaron durante 5 min a 37°C. Posteriormente, se agregaron 500 μl de medio y el número de células se

determinó utilizando la fluorescencia del contador celular automatizado Luna FL™ y el campo brillante (Biozym, nº 872040) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, se agregaron 18 µl de la suspensión celular a 2 ml de un kit de viabilidad de ensayo de naranja de acridina/yoduro de propidio (Biozym 872045). Después de 1 minuto de sedimentación, se agregaron 10 µl al porteobjetos de conteo de células (Biozym 872011), las células se contaron y se calcularon en células/ml totales y el porcentaje de células vivas en comparación con las células muertas. Después de la transferencia gimnótica de Ref.1 (10 µM), Seq. ID No. 218b (10 µM) y el tratamiento correspondiente de TGF-β1 (10 ng/ml) durante 8 días, las células de placas de portaobjetos de cultivo celular de 8 pocillos se fijaron y se tiñeron con un anticuerpo contra Ki67. Para investigar la capacidad de diferenciación de las células ReNcell CX® después de la transferencia gimnótica, otras placas de portaobjetos de cultivo celular de 8 pocillos se trataron con Ref.1 (10 µM), Seq. ID No. 218b (10 µM) y tratamiento correspondiente de TGF-β1 (10 ng/ml) durante 96 h en condiciones proliferativas (+ EGF/FGF). Posteriormente, una parte de las células se trató durante 96 h más en condiciones de proliferación, mientras que la otra parte de las células se trató y se mantuvo en condiciones de diferenciación (- EGF/FGF). Tras la tinción de las células, se determinaron los niveles de expresión de Neurofilament N (NeuN) y βIII-tubulina mediante microscopía de fluorescencia. El protocolo para recolectar, fijar y teñir las células se describió anteriormente y las diluciones de anticuerpos respectivas se enumeran en la Tabla 14.

[0357] Análisis de ARNm de marcadores para la proliferación y neurogénesis después de la transferencia gimnótica después de la preincubación con TGF-β1: Las células se cultivaron como se describe anteriormente en el protocolo estándar. Para los experimentos, las células se sembraron en placas de cultivo de 24 pocillos (Sarstedt nº 83.1836.300) (30.000 células/pocillo) y se incubaron durante la noche a 37°C y 5% de CO₂. Para inducir la detención del ciclo celular, las células ReNcell CX® se trataron con TGF-β1 durante 4 días. Luego se cambió el medio y se añadió recientemente TGF-β1 (10 ng/ml). Se cambió el medio de un día 8 por más tiempo y se realizó una transferencia gimnótica durante 96 h agregando Ref.1 (10 µM), Seq. ID No. 218b (10 µM) en combinación con TGF-β1 (10 ng/ml). Las células se recogieron después de la incubación lavando dos veces con PBS. Tras el aislamiento de ARN y el análisis de ARNm mediante RT-PCR en tiempo real se realizaron como se describe.

12.1.1 Mediación de la detención del ciclo celular por TGF-β1 en células progenitoras neurales humanas

[0358] La detección de marcadores de quiescencia de células madre mostró que el TGF-β1 media la detención del ciclo celular 7 días después de la exposición de las células. La expresión de ARNm del marcador de proliferación Ki67 se redujo de forma dependiente de la dosis. Además, la expresión del ARNm del gen p53 supresor de tumores fue regulada a la baja en correlación con la concentración de TGF-β1. En contraste, el inhibidor de la quinasa 1 dependiente de ciclina (p21) estaba significativamente regulado por el TGF-β1. En resumen, estos resultados indican la quiescencia de células madre inducida por TGF-β1. Curiosamente, el DCF, un marcador para la neurogénesis, se redujo fuertemente con el TGF-β1 (Tabla 41).

Tabla 41: expresión de ARNm de Ki67, p27, p21 y DCX 7 días después del tratamiento con TGF-β1 en células ReNcell CX®. Los niveles de expresión de ARNm se determinaron en relación con el gen de mantenimiento GNB2L1 utilizando RT-PCR cuantitativa en tiempo real y luego se normalizaron para el control sin tratar. A = control no tratado, E = TGF-β1. ± = SEM, *p <0,05 en referencia a A. Las estadísticas se calcularon utilizando el ANOVA Ordinario de una vía seguido de la comparación múltiple *post hoc* de "Tukey".

Línea de células	ReNcell CX			
	Niveles de ARNm 7 días tras exposición a TGF-β1			
Diana	Ki67 n=3	p53 n=3	p21 n=3	DCX n=3
A + EGF/FGF	1,00 ± 0,38	1,00 ± 0,38	1,00 ± 0,25	1,00 ± 0,49
E 10 ng/ml + EGF/FGF	0,67 ± 0,20	0,66 ± 0,18	1,90* ± 0,22	0,37 ± 0,06
E 50 ng/ml + EGF/FGF	0,43 ± 0,09	0,42 ± 0,06	1,45 ± 0,16	0,16 ± 0,01
A - EGF/FGF	1,00 ± 0,15	1,00 ± 0,13	1,00 ± 0,14	1,00 ± 0,31
E 10 ng/ml - EGF/FGF	0,87 ± 0,08	0,97 ± 0,10	1,00 ± 0,04	0,72 ± 0,14
E 50 ng/ml - EGF/FGF	0,93 ± 0,11	0,93 ± 0,09	0,90 ± 0,09	0,71 ± 0,24

Conclusión

[0359] La proliferación de células ReNcell CX® fue bloqueada por TGF-β1.

12.1.2 Resultados de los efectos de oligonucleótidos antisentido en marcadores de células madre neuronales humanas

[0360] Para averiguar el efecto de ASO Seq. ID No. 218b en marcadores de células madre, 8 días después de la transferencia gimnótica repetida (2 x 96 h) en células ReNcell CX®, se analizaron diferentes marcadores de células progenitoras neurales tempranas (Tabla 42). Los niveles de expresión génica de Nestina y Sox2 no fueron influenciados por ASO Seq. ID No. 218b. El ARNm de GFAP estaba ligeramente regulado al alza después de la transferencia gimnótica con 10 µM de ASO Seq. ID No. 218b y, por el contrario, el DCX se indujo claramente

después de la absorción gimnótica de ASO Seq. ID No. 218b. La expresión de todos los marcadores ensayados se redujo considerablemente después del tratamiento con TGF-β1 (8d) (Tabla 42, Fig. 19).

Tabla 42: expresión de ARNm de Nestina, Sox2, GFAP y DCX 8 días después de la transferencia gimnótica de Seq. ID No. 218b en células ReNcell CX®. Los niveles de expresión de ARNm se determinaron en relación con el gen de mantenimiento GNB2L1 utilizando RT-PCR cuantitativa en tiempo real y luego se normalizaron para el control sin tratar. A = control sin tratar, B = Ref.1, C = Seq. ID No. 218b, E = TGF-β1, ± = SEM, + p <0,05 en referencia a C 2,5 mM, p <0,05 en referencia a C 10 mM. Las estadísticas se calcularon utilizando el ANOVA ordinario de una vía seguido de la comparación múltiple *post hoc* de "Tukey".

Línea de células	ReNcell CX			
	Niveles de ARNm 8 días tras la transferencia gimnótica o exposición a TGF-β1			
Diana	Nestin n=4	Sox2 n=4	GFAP n=4	DCX n=4
A	1,00 ± 0,18	1,00 ± 0,25	1,00 ± 0,22	1,00 ± 0,32
B 2,5 μM	0,97 ± 0,32	0,88 ± 0,33	0,78 ± 0,13	1,31 ± 0,42
B 10 μM	0,89 ± 0,16	0,79 ± 0,13	1,02 ± 0,20	1,44 ± 0,48
C 2,5 μM	1,09 ± 0,21	0,93 ± 0,09	0,99 ± 0,14	1,67 ± 0,46
C 10 μM	0,90 ± 0,09	0,89 ± 0,11	1,21 ± 0,11	1,95 ± 0,37
E 10 ng/ml	0,48 ± 0,12	0,32 ± 0,06	0,41# ± 0,13	0,05+# ± 0,01

Conclusión:

[0361] Los resultados para el análisis de ARNm indican que ASO Seq. ID No. 218b guía las células ReNcell CX® en la dirección de un estado similar a una célula madre (regulación hacia arriba GFAP). Además, la inducción de DCX indica una neurogénesis elevada. El tratamiento con TGF-β1 resulta en una dirección opuesta.

12.1.3 Resultados de los efectos de oligonucleótidos antisentido en la proliferación de células madre neuronales humanas

[0362] Se realizó un análisis adicional para investigar si la transferencia gimnótica de ASO Seq. ID No. 218b tiene efectos reales en la tasa de proliferación al contar las células 9 días después de la transferencia gimnótica repetida (3 x 72 h) y la determinación de los niveles de proteína Ki67 8 días después de la absorción gimnótica (2 x 96 h).

Resultados

[0363] El número de células aumentó después de la absorción gimnótica de ASO Seq. ID No. 218b de acuerdo con un aumento en la expresión de proteínas del marcador de proliferación Ki67 observado en la tinción inmunocitoquímica de las células (Tabla 43, Fig. 20). El análisis de fluorescencia de la tinción inmunocitoquímica también reveló una parada de proliferación mediada por TGF-β1.

Tabla 43: Número de células aumentado 9 días después de la transferencia gimnótica repetida (3 x 72 h) de células ReNcell CX®. El número de células se determinó utilizando la fluorescencia del contador celular automatizado Luna FL™ y el campo brillante (Biozym, n° 872040) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A = control sin tratar, B = Ref.1, C = Seq. ID No. 218b, ± = SEM.

Línea de células	ReNcell CX	
	Células vivas x 10 ⁵ , n = 2	Células muertas x 10 ⁵ , n = 2
A	3,34 ± 0,09	0,51 ± 0,05
B 2,5 μM	4,34 ± 0,56	0,60 ± 0,09
B 10 μM	4,36 ± 0,96	0,58 ± 0,09
C 2,5 μM	4,63 ± 1,28	0,47 ± 0,02
C 10 μM	5,24 ± 0,42	0,37 ± 0,02

Conclusión

[0364] Transferencia gimnótica de ASO Seq. ID No. 218b en células ReNcell CX® da como resultado un aumento en el número de células, en paralelo con una expresión aumentada de la proteína Ki67, lo que indica en conjunto una mayor proliferación de precursores neuronales.

12.1.3 Resultados de los efectos de oligonucleótidos antisentido en la capacidad de diferenciación de las células madre neuronales humanas

[0365] Para excluir una influencia de ASO Seq. ID No. 218b en la capacidad celular para diferenciar, ASO Seq. ID No. 218b se transfirió a las células por absorción gimnótica durante 96 h en condiciones de proliferación (+ EGF/FGF). Después del tiempo de incubación, se cambió el medio y se añadió una parte del medio proliferativo de las células, mientras que a la otra parte se agregó el medio de diferenciación de las células (- EGF/FGF). Posteriormente, se realizó otra transferencia gimnótica durante 96 h. Las células se analizaron mediante niveles de expresión de marcadores neuronales, neurofilamento N (NeuN) y β III-tubulina.

Resultados

[0366] La tinción inmunquímica contra NeuN (Figura 23A) y β III-tubulina (Figura 23B) no demuestra efectos sobre la capacidad de diferenciación después de la transferencia de ASO gimnótica en condiciones proliferativas, seguida de transferencia gimnótica bajo condiciones diferenciadoras. La señal de β III-tubulina, una proteína específica de la neurona humana, no fue influenciada por ASO Seq. ID No. 218b en condiciones de diferenciación y fue comparable al control sin tratar. Además, la expresión de NeuN no se vio afectada después de la transferencia gimnótica en condiciones de diferenciación. Por lo tanto, las células todavía son capaces de diferenciarse en células neurales. Sorprendentemente, las células ReNcell CX® expresaron el marcador neuronal NeuN y β III-tubulina después de la transferencia gimnótica de ASO en condiciones proliferativas (2 x 96 h) para ambos períodos, lo que indica que la transferencia gimnótica de ASO podría promover un cambio específico en la diferenciación de las neuronas incluso bajo condiciones proliferativas. Además, se observaron tasas de proliferación elevadas de células precursoras neurales (Tabla 43, Fig. 20). Además, la tinción contra NeuN reveló que las células tratadas con ASO Seq. ID 218b parece más viable en comparación con todos los otros tratamientos (Figura 21A). Obviamente, las células que fueron tratadas con TGF- β 1 fueron significativamente menos proliferativas.

Conclusión

[0367] La capacidad de diferenciación no fue influenciada por ASO Seq. ID No. 218b. Curiosamente, las células ReNcell CX® mostraron diferenciación a neuronas después de la transferencia gimnótica en condiciones proliferativas y diferenciadoras. Esto indica en contexto a la observación de una mayor tasa de proliferación, que la ASO Seq. ID No. 218b promueve la neurogénesis con una tendencia hacia la diferenciación neuronal elevada.

12.1.4 Resultados de los oligonucleótidos antisentido de la invención sobre la proliferación de células madre neuronales humanas después de la incubación previa con TGF- β 1

[0368] Para analizar si la transferencia gimnótica de ASO Seq. ID No. 218b es eficaz para revertir los efectos mediados por TGF- β 1 en células ReNcell CX®; se realizaron estudios adicionales con preincubación de TGF- β 1 durante 7 días, seguido de transferencia gimnótica durante 8 días (2 x 96 h).

Resultados

[0369] La expresión génica de GFAP (Tabla 44, Fig. 22A) como un marcador neuronal temprano, Ki67 (Tabla 44, Fig. 22B), como marcador de proliferación, y DCX (Tabla 44, Fig. 22C) como marcador de neurogénesis fueron elevados después de un solo tratamiento con ASO, mientras que el TGF- β 1 dio lugar a lo contrario. Además, 7 días después de la incubación previa con TGF- β 1, el tratamiento con ASO de la invención revirtió los efectos inducidos por TGF- β 1. Así, el análisis demuestra que ASO Seq. ID No. 218b es potente en la recuperación de los efectos mediados por TGF- β 1 sobre células madre y marcadores de proliferación

Tabla 44: Expresión de ARNm de GFAP, Ki67 y DCX 7 días después de la incubación previa con TGF- β 1 seguida de 2 x 96 h de transferencia gimnótica de Seq. ID No. 218b en células ReNcell CX®. Los niveles de expresión de ARNm se determinaron en relación con el gen de mantenimiento GNB2L1 utilizando RT-PCR cuantitativa en tiempo real y luego se normalizaron para el control sin tratar. A = control sin tratar, B = Ref.1, C = Seq. ID No. 218b, E = TGF- β 1, \pm = SEM, Las estadísticas se calcularon utilizando el ANOVA ordinario de una vía seguido de las comparaciones múltiples *post hoc* de "Tukey".

Línea de células	ReNcell CX		
	Niveles de ARNm 7 días tras pre-incubación de TGF-β1 seguida por 2 x 96 h de transferencia gimnótica		
Diana	GFAP n=2	Ki67 n=1	DCX n=2
A	1,00 ± 0,20	1,00	1,00 ± 0,16
B 10 μM	1,62 ± 0,15	0,91	1,52 ± 0,24
C 10 μM	2,23 ± 0,52	1,52	4,82 ± 1,15
E 10 ng/ml	0,76 ± 0,01	0,48	0,68 ± 0,03
E 10 ng/ml + B 10 μM	0,58 ± 0,07	0,61	0,83 ± 0,10
E 10 ng/ml + C 10 μM	2,04 ± 1,04	7,40	1,55 ± 0,24

Conclusión

[0370] Los resultados indican que la neurogénesis adulta podría reactivarse mediante el bloqueo mediado por ASO específico de TGF-R_{II} de la invención de la señalización de TGF-β.

[0371] Considerados en conjunto, las células rescatadas de ASO Seq. ID No. 218b específicas a TGF-R_{II} de la quiescencia de células madre mediadas por TGF-β y promueve la neurogénesis en adultos sin tener un impacto en la diferenciación. Esto lo convierte en un fármaco de tratamiento ideal para la reparación del cerebro.

Ejemplo 13: Determinación de la actividad terapéutica de la progresión de la enfermedad de oligonucleótidos antisentido de la invención de ALS en ratones SOD1

[0372] Para analizar el potencial terapéutico de las ASO como medicación para la esclerosis lateral amiotrófica (ALS), los ratones SOD1 G93A transgénicos machos y hembras se trataron con diferentes dosis de ASO inventivas mediante la administración de icv en el ventrículo lateral a través de minibombas osmóticas ALZET®. Además, se utilizó riluzol como referencia. El riluzol es un medicamento utilizado para tratar la esclerosis lateral amiotrófica y se comercializa por Sanofi Pharmaceuticals. Retrasa la aparición de la dependencia de ventilador o traqueostomía en pacientes seleccionados y puede aumentar la supervivencia en aproximadamente dos o tres meses

Descripción del método:

[0373] Para una infusión central de larga duración, una cánula icv unida a una minibomba osmótica Alzet® (velocidad de infusión: 0,25 μl/h, Alzet®, Model 2004, Cupertino, EE.UU.), se implantó estereotáxicamente bajo anestesia con isoflurano (Baxter, GmbH, Alemania) y condiciones semi-estériles. Cada minibomba osmótica se implantó por vía subcutánea en la región abdominal a través de una incisión en la piel de 1 cm en el cuello del ratón y se conectó con la cánula icv mediante un tubo de silicona. Los animales se colocaron en un marco estereotáxico, y la cánula icv (23G, 3 mm de longitud) se redujo en el ventrículo lateral derecho (posterior 0,3 mm, lateral 1 mm, profundidad 3 mm en relación con bregma). La cánula se fijó con dos tornillos de acero inoxidable utilizando cemento dental (Kallocryl, Speiko® Dr. Speier GmbH, Münster, Alemania). La piel del cuello se cerró con suturas. Durante la cirugía, la temperatura corporal se mantuvo mediante una almohadilla térmica. Para evitar infecciones postquirúrgicas, los ratones fueron tratados localmente con betaisodona® (Mundipharma GmbH, Limburg, Alemania) y recibieron 0,1 ml de antibióticos (sc, Baytril® 2,5% Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Alemania). El tubo se llenó con la solución respectiva. Para determinar los efectos de las ASO en el desarrollo y la progresión de la ALS, el inicio de los síntomas, la paresia y la supervivencia se utilizaron como criterios de valoración *in vivo*. A la edad de nueve semanas, se sacrificaron los ratones y se extrajeron los cerebros para el análisis neuropatológico. La verificación histológica de los sitios de implantación de icv se realizó en cortes cerebrales teñidos con violeta de cresilo de 40 μm.

[0374] Las ASO de la invención ejercen efectos potenciales en experimentos *in vitro*. Muy en línea, las ASO inventan reactividad cruzada de roedores con la Seq. ID No. 143aj, Seq. ID No. 143h y Seq. ID No. 210q también fue eficaz en los experimentos anteriores que demuestran un efecto en el tratamiento de animales modelo de ALS. Las ASO de la presente invención que demuestran que no hay reactividad cruzada ejercen más efectos potenciales en experimentos *in vitro*. Como resultado, se asume que estas ASO inventivas también son más efectivas en configuraciones *in vivo* para primates y humanos no humanos y, por lo tanto, actúan como una medicación altamente potente para prevenir o tratar la inhibición inducida por TGF-β1 de la proliferación del tallo neural y progenitores, y por lo tanto tratar la ALS y otros trastornos neurodegenerativos.

Ejemplos 14: Determinación de la actividad terapéutica de las ASO inventadas antisentido dirigidas a TGF-R_{II} en el desarrollo de la enfermedad y la progresión de la enfermedad de Huntington en ratones R6/2

[0375] Para analizar el potencial terapéutico de las ASO como medicación para la enfermedad de Huntington (HD),

se trataron ratones R6/2 transgénicos machos y hembras con diferentes dosis de ASO específico de TGF-R_{II} inventivo mediante la administración de icv en el ventrículo lateral mediante minibombas osmóticas.

[0376] Descripción del método: para la infusión central crónica, los ratones se sometieron a una cirugía para una cánula icv unida a una minibomba osmótica Alzet® (velocidad de infusión: 0,25 µl/h, Alzet®, Model 2004, Cupertino, EE.UU.) A la edad de cinco años semanas. La cánula y la bomba se implantaron estereotáxicamente bajo anestesia con ketamina/xilacina (Baxter, GmbH, Alemania) y en condiciones semi-estériles. Cada minibomba osmótica se implantó por vía subcutánea en la región abdominal a través de una incisión de piel de 1 cm en el cuello del ratón y se conectó con la cánula icv mediante un tubo de silicona. Los animales se colocaron en un marco estereotáxico, y la cánula icv (23G, 3 mm de longitud) se redujo en el ventrículo lateral derecho (posterior 0,3 mm, lateral 1 mm, profundidad 3 mm en relación con bregma). La cánula se fijó con dos tornillos de acero inoxidable utilizando cemento dental (Kallocryl, Speiko®-Dr. Speier GmbH, Münster, Alemania). La piel del cuello se cerró con suturas. Durante la cirugía, la temperatura corporal se mantuvo mediante una almohadilla térmica. Para evitar infecciones postquirúrgicas, los ratones fueron tratados localmente con betaisodona® (Mundipharma GmbH, Limburg, Alemania) y recibieron 0,1 ml de antibióticos (sc, Baytril® 2,5% Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Alemania). El tubo se llenó con la solución respectiva. Para determinar los efectos de las ASO en el desarrollo y la progresión de la EH, el inicio de los síntomas, la fuerza de agarre, la motricidad general y la supervivencia se utilizaron como criterios de valoración *in vivo*. A la edad de nueve semanas, se sacrificaron los ratones y se extrajeron los cerebros para el análisis histológico. La verificación histológica de los sitios de implantación de icv se realizó en cortes cerebrales teñidos con violeta de cresilo de 40 µm.

[0377] Las ASO inventivas ejercen efectos potenciales en experimentos *in vitro*. Muy en línea, las ASO inventan reactividad cruzada de roedores con la Seq. ID No. 143aj, Seq. ID No. 143h y Seq. ID No. 210q también fue eficaz en los experimentos anteriores que demuestran un efecto en el tratamiento de animales modelo Huntington. Las ASO de la presente invención que no demuestran reactividad cruzada ejercen más efectos potenciales en experimentos *in vitro*. Como resultado, se asume que estas ASO inventivas también son más efectivas en configuraciones *in vivo* para primates no humanos y humanos y, por lo tanto, actúan como una medicación altamente potente para prevenir o tratar la inhibición inducida por TGF-β1 de la proliferación del tallo neural y progenitores, y por lo tanto tratar la HD y otros trastornos neurodegenerativos.

Ejemplo 15: Determinación de la actividad terapéutica de las ASO de la invención en la progresión de la enfermedad de hidrocefalia inducida por TGFβ y déficits cognitivos asociados en ratas Fischer-344

[0378] El objetivo del presente estudio es tratar a los animales que sufren los efectos inducidos por el TGFβ sobre i) la proliferación de células madre neurales y la neurogénesis, ii) la formación de hidrocefalia y iii) los déficits de aprendizaje espacial por infusión intraventricular de ASO inventiva de una manera dependiente de la dosis.

[0379] Descripción del método: Se implantaron minibombas osmóticas para infusión intracerebroventricular en ratas Fischer-344 hembras de 180 a 200 g de peso corporal ($n_{total} = 70$, $n_{group} = 10$). Se infundieron a) líquido cefalorraquídeo artificial (aCSF: NaCl 148,0 mM, KCl 3,0 mM, CaCl₂ 1,4 mM, MgCl₂ 0,8 mM, Na₂HPO₄ 1,5 mM, NaH₂PO₄ 0,2 mM, 100 µg/ml de suero de rata albúmina, 50 µg/ml Gentamicin, pH 7,4) como control, o b) TGF-β1 1 µg/ml en aCSF utilizando una bomba osmótica Alzet® 2004 con un caudal de 0,25 µl/h durante 14 días. Después de 14 días, se cambiaron las bombas y se utilizaron las bombas osmóticas Alzet® 2004 (caudal de 0,25 µl/h) para las siguientes infusiones: aCSF o TGF-β1 (1 µg/ml) en combinación con concentraciones variables de TGF-R_{II} ASO (Se inyectaron 1,1 mmol/l, 3,28 mmol/l, 9,84 mmol/l) o ASO revueltos (3,28 mmol/l) (2 x 4 semanas). Durante los últimos cuatro días del período de infusión, los animales recibieron una inyección intraperitoneal diaria de BrdU (50 mg/kg de peso corporal) para marcar las células en proliferación. Se extraen las bombas y, dos semanas después, los animales se analizan funcionalmente en una prueba de aprendizaje espacial (Morris-Water-Maze) durante 14 días. Un día después, los animales se perfunden con NaCl al 0,9%, se extraen los cerebros, el hemisferio ipsilateral se fija en paraformaldehído al 4% para el análisis histológico cuantitativo de PCNA, BrdU, DCX, BrdU/NeuN y BrdU/GFAP, y para el análisis estereológico del volumen de los ventrículos laterales como medida para la hidrocefalia. El hemisferio contralateral se disecciona aún más y se procesan diferentes áreas (pared del ventrículo, hipocampo, corteza) para RT-PCR cuantitativa para analizar los niveles de expresión de TGF-R_{II}. Se tomaron imágenes de RM de 4 animales del grupo 1, grupo 3 y grupo 6 el día cuatro antes de la implantación de la bomba, una semana después de la implantación de la bomba, el día del primer cambio de la bomba y desde entonces cada 2 semanas hasta el final del período de infusión. La verificación histológica de los sitios de implantación de icv se realizó en cortes cerebrales teñidos con violeta de cresilo de 40 mm.

Tabla 46: Esquema de tratamiento y la clasificación grupal del experimento de hidrocefalia.

Grupo	1. aCSF	2. aCSF + ASO	3. TGF- [®] 1	4. TGF- [®] 1 + aleat.-ASO	5.-7. TGF- [®] 1 + ASO
tratamiento	infusión aCSF	aCSF más infusión ASO	infusión TGF- [®] 1	TGF- [®] 1 más infusión ASO	TGF- [®] 1 más infusión ASO
esquema de tratamiento	semana 1 a 10	semana 1 y 2: aCSF semana 3 a 10: ASO: 3,28 mmol/l	semana 1 y 2: 1 µg/ml semana 3 a 10: 1 µg/ml	semana 1 y 2: TGF- [®] 1: 1 µg/ml semana 3 a 10: TGF- [®] 1: 1 µg/ml aleat.,-ASO: 3,28 mmol/l	semana 1 y 2: TGF- [®] 1: 1 µg/ml semana 3 a 10: TGF- [®] 1: 1 µg/ml ASO: 1,1 mmol/l 3,28 mmol/l 9,84 mmol/l
n	10	10	10	10	10 por dosis
n-total	10	10	10	10	30

[0380] Las ASO inventivas ejercen efectos potenciales en experimentos *in vitro*. Muy en línea, las ASO inventan reactividad cruzada de roedores con la Seq. ID No. 143aj, Seq. ID No. 143h y Seq. ID No. 210q también fueron efectivos en los experimentos anteriores que demuestran un efecto en el tratamiento de animales modelo de hidrocefalia. Las ASO de la presente invención que demuestran que no hay reactividad cruzada ejercen más efectos potenciales en experimentos *in vitro*. Como resultado, se asume que estas ASO inventivas también son más efectivas en configuraciones *in vivo* para primates no humanos y humanos y, por lo tanto, actúan como una medicación altamente potente para prevenir o tratar la inhibición inducida por TGF-β1 de la proliferación del tallo neural y progenitores, y por lo tanto tratar la hidrocefalia y otros trastornos neurodegenerativos.

Ejemplo 16: Determinación de la actividad terapéutica de los oligonucleótidos antisentido dirigidos a TGF-R_{II} en la rehabilitación de la lesión de la médula espinal en

Ratas Fischer 344

[0381] Para analizar el potencial terapéutico de las ASO como medicamento para la lesión de la médula espinal (SCI), las ratas Fischer-344 macho y hembra fueron tratadas con diferentes dosis de ASO inventivas por administración icv en el ventrículo lateral a través de minibombas osmóticas.

[0382] Descripción del método: SCI se simuló mediante la transección de la columna dorsal con cuchilla de alambre de tungsteno cervical a nivel C3. En el siguiente paso, para ratas de infusión central crónica, (180 - 200 g de peso corporal) se sometió a una cirugía para una cánula icv unida a una minibomba osmótica Alzet[®] (tasa de infusión: 0,25 µl/h, Alzet[®], Model 2004, Cupertino, EE.UU.). La cánula y la bomba se implantaron estereotáxicamente bajo anestesia con ketamina/xilacina (Baxter, GmbH, Alemania) y en condiciones semi-estériles. Cada minibomba osmótica se implantó por vía subcutánea en la región abdominal a través de una incisión de piel de 1 cm en el cuello de la rata y se conectó con la cánula icv mediante un tubo de silicona. Los animales se colocaron en un marco estereotáxico y la cánula icv (23G, 3 mm de longitud) se redujo en el ventrículo lateral derecho (posterior 1,0 mm, lateral 1,0 mm, profundidad 1,8 mm en relación con bregma). La cánula se fijó con dos tornillos de acero inoxidable utilizando cemento dental (Kallocryl, Speiko[®]-Dr. Speier GmbH, Münster, Alemania). La piel del cuello se cerró con suturas. Durante la cirugía, la temperatura corporal se mantuvo mediante una almohadilla térmica. Para evitar infecciones postquirúrgicas, las ratas fueron tratadas localmente con betaisodona[®] (Mundipharma GmbH, Limburg, Alemania) y recibieron 0,5 ml de antibióticos (sc, Baytril[®] 2,5% Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Alemania). El tubo se llenó con la solución respectiva. Para determinar los efectos de las ASO en el proceso de rehabilitación después de la LME, 4 semanas después de la cirugía se realizó un análisis estructural de IRM *in vivo* (3T MRI, Allegra Siemens, phased array - small animal coil). 6 semanas después de la cirugía, se sacrificaron los animales y se extrajo la médula espinal para el análisis histológico e inmunohistoquímico. La verificación histológica de los sitios de implantación de icv se realizó en cortes cerebrales teñidos con cresil violeta coronal de 40 µm.

[0383] Las ASO de la invención ejercen efectos potenciales en experimentos *in vitro*. Muy en línea, las ASO inventan reactividad cruzada de roedores con la Seq. ID No. 143aj, Seq. ID No. 143h y Seq. ID No. 210q también fueron efectivos en los experimentos anteriores que demuestran un efecto en el tratamiento de un modelo de paraplejía de la médula espinal de rata Fischer-344. En las imágenes de resonancia magnética y el análisis neuropatológico, las ASO de la invención mostraron una alta eficacia de tratamiento. Las ASO de la presente invención que demuestran que no hay reactividad cruzada ejercen más efectos potenciales en experimentos *in vitro*. Como resultado, se asume que estas ASO inventivas también son más efectivas en configuraciones *in vivo* para primates no humanos y humanos y, por lo tanto, actúan como una medicación altamente potente para prevenir o tratar la inhibición inducida por TGF-β1 de la proliferación del tallo neural y progenitores, y por lo tanto tratar la lesión de la médula espinal y otros trastornos neurodegenerativos.

Ejemplo 17: Efectos mediados por ASO sobre la proliferación de la línea celular A549 de cáncer de pulmón humano.

[0384] El ARNm de Ki67, p53, caspasa 8 (Casp8) y del inhibidor de la proteína de unión al ADN 2 (ID2) se analizaron como marcadores representativos de la proliferación en varias células tumorales. Se sabe a partir de estudios previos, que la expresión del gen supresor de tumores p53 y ID2 a menudo está dramáticamente elevada en los tejidos tumorales. Ki67 es un marcador de proliferación y Casp8 es un indicador de apoptosis. Además, los números de células se determinaron después de la transferencia gimnótica.

Descripción del método:

[0385] Se cultivaron A549 como se describe anteriormente. Para el tratamiento de las células, el medio se eliminó y se reemplazó por medio fresco completo en placas de cultivo de 24 pocillos (Sarstedt n° 83.1836.300) (30.000 células/pocillo), placas de cultivo de 6 pocillos (Sarstedt n° 83.3920.300) (50.000 células/pocillo) o placas de portaobjetos de cultivo celular de 8 pocillos (Sarstedt n° 94.6140.802) (20.000 células/pocillo) (0,5 ml para placas de portaobjetos de cultivo celular de 24 pocillos y 8 pocillos y 1 ml para placas de 6 pocillos) y fueron incubados durante la noche a 37°C y 5% de CO₂. Para analizar la expresión del ARNm y su influencia en la proliferación, las células se trataron con Ref.1 (control aleatorizado) y ASO Seq. ID No. 218b a concentraciones de 2,5 µM y 10 µM y se incubaron durante 72 horas a 37°C y 5% de CO₂. El tratamiento que incluía el reemplazo de medio se repitió 3 veces cada 72 h (12 días en total). Para el análisis inmunocitoquímico de la proliferación (Ki67), la transferencia gimnótica de ASO Seq. ID No. 218b se limitó a 72 h. Posteriormente, las células se lavaron dos veces con PBS y posteriormente se usaron para el aislamiento de proteínas (placas de 6 pocillos), inmunocitoquímica (en placas de portaobjetos de cultivo celular de 8 pocillos), curva de proliferación y aislamiento de ARN (placas de 24 pocillos). Los protocolos para ARN, proteínas e inmunocitoquímica se realizaron como se describe anteriormente. Para la curva de proliferación, las células restantes se recolectaron de placas de 24 pocillos para la determinación del número de células. Para este propósito, las células restantes se lavaron con PBS (2x), se trataron con acutasa (500 µl/pocillo) y se incubaron durante 7 min a 37°C. Posteriormente, se agregaron 500 µl de medio y el número de células se determinó utilizando la fluorescencia del contador celular automatizado Luna FL™ y el campo brillante (Biozym, No. 872040) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, se agregaron 18 µl de la suspensión celular a 2 µl de un kit de viabilidad de ensayo de naranja de acridina/yoduro de propidio (Biozym 872045). Después de 1 minuto de sedimentación, se agregaron 10 µl a la diapositiva de conteo celular (Biozym 872011). Las células se contaron y se calcularon en distinción de células vivas y muertas.

17.1 Resultados para ASO Seq. ID No. 218b

[0386] El análisis de ARNm mostró niveles reducidos de expresión de Ki67, p53 e ID2 12 días después de la transferencia gimnótica de ASO Seq. ID No. 218b. En contraste, Casp8 se elevó a niveles bajos de ASO Seq. ID No. 218b (Tabla 46). Estas observaciones indican que un crecimiento reducido del tumor se asocia con un ligero aumento en las células apoptóticas. Además, el análisis de transferencia Western mostró una reducción en el nivel de proteína de Ki67 y pAkt 12 días después de la transferencia gimnótica de las ASO inventivas (Tabla 47). El examen inmunocitoquímico de células A549 después de la transferencia gimnótica de ASO Seq. ID No. 218b mostró un nivel reducido de señales Ki67 en comparación con el control aleatorizado para ambas concentraciones aplicadas (Figura 23). Finalmente, el número de células A549 se redujo en casi un 50% 12 días después de la transferencia gimnótica de ASO Seq. ID No. 218b (Tabla 48).

Tabla 46: Expresión de ARNm de Ki67, p53, Casp8 y ID2, 12 días después de la transferencia gimnótica de ASO Seq. ID No. 218b en células A549. La regulación de los genes examinados demuestra tasas de proliferación disminuidas después de la transferencia gimnótica de ASO inventivas. Los niveles reducidos de ARNm de ID2 son beneficiosos para amortiguar la expansión de las células tumorales. Los niveles de expresión de ARNm se determinaron en relación con el gen de mantenimiento GNB2L1 utilizando RT-PCR cuantitativa en tiempo real normalizada para el control no tratado. A = control sin tratar, B = Ref.1, C = Seq. ID No. 218b, ± = SEM. Las estadísticas se calcularon utilizando el ANOVA Ordinario de una vía seguido de las comparaciones múltiples *post hoc* de "Tukey".

Línea de células	A549			
	Niveles de ARNm 12 días después de la transferencia gimnótica repetida (4x 72 h)			
Diana	Ki67 n=2	p53 n=2	Casp8 n=2	ID2 n=2
A	1,00 ± 0,37	1,00 ± 0,31	1,00 ± 0,05	1,00 ± 0,03
B 2,5 µM	0,92 ± 0,05	1,06 ± 0,02	1,36 ± 0,37	0,73 ± 0,01
B 10 µM	0,96 ± 0,03	1,11 ± 0,92	1,52 ± 0,15	0,82 ± 0,15
C 2,5 µM	0,55 ± 0,33	0,27 ± 0,04	1,59 ± 0,48	0,59 ± 0,01
C 10 µM	0,57 ± 0,20	0,53 ± 0,07	0,98 ± 0,17	0,35 ± 0,02

Tabla 47: Análisis densitométrico de Ki67 y transferencia Western pAkt. La regulación a la baja de la proteína Ki67 y pAkt 12 días después de la transferencia gimnótica con TGF-R_{II} específica ASO Seq. ID No. 218b se observó en células A549. Los niveles de proteína se determinaron en relación con el gen de mantenimiento GAPDH utilizando el software Image Studio™ Lite y luego se normalizaron al control no tratado. A = control sin tratar, B = Ref.1, C = Seq. ID No. 218b, \pm = SEM.

Línea de células	A549	
	Niveles de proteína 12 días tras transferencia gimnótica repetida (4x 72 h)	
Diana	Ki67 n=1	pAKT n=1
A	1,00	1,00
B 10 μ M	1,18	0,80
C 10 μ M	0,57	0,39

Tabla 48: Números de células 12 días después de la transferencia gimnótica repetida. Los números de células se determinaron 12 días después de transferencias gimnóticas repetidas (4 x 72 h) de células A549 utilizando fluorescencia de contador celular automatizada Luna FL™ y Campo brillante (Biozym, #872040) según las instrucciones del fabricante. A = control sin tratar, C = Seq. ID No. 218b, \pm = SEM.

II línea	A549	
	Nº de células 12 días tras transferencia gimnótica repetida (4x 72 h)	
Nº de células	células vivas x 10 ⁵ n=3	células muertas x 10 ⁵ n=3
A	4,25 \pm 0,50	0,47 \pm 0,09
B 10 μ M	3,88 \pm 0,95	0,31 \pm 0,11
C 10 μ M	2,35 \pm 0,07	0,35 \pm 0,16

Conclusión

[0387] Estas observaciones indican que el crecimiento tumoral reducido se asocia con un aumento en las células apoptóticas. Cabe destacar que la ID2, que es un posible gen diana terapéutico en tumores, se reduce después de la transferencia gimnótica de la ASO Seq. ID No. 218b específica a TGF-R_{II}.

[0388] Considerados juntos, ASO Seq. ID No. 218b es eficiente para minimizar las tasas de proliferación y reduce la expresión de genes promotores de tumores.

Ejemplo 18: Efecto de la transferencia gimnótica de ASO sobre la proliferación de varias líneas de células tumorales

[0389] La señalización de TGF- β es una vía crítica en el desarrollo del cáncer. Por un lado, el TGF- β promueve factores, que actúan como supresores de tumores, pero por otro lado, este factor de crecimiento conduce a la estimulación de la migración celular, invasión celular, proliferación celular, regulación inmune y promueve una reorganización ambiental en beneficio de la progresión y metastasis de células tumorales. Por lo tanto, el TGF- β es un objetivo clave en el tratamiento del cáncer. Los niveles de ARNm y proteínas del marcador de proliferación (Ki67) y los números de células se determinaron después de la captación gimnótica de las ASO inventivas como marcadores de la tasa de proliferación en células tumorales. Además, se examinaron los niveles de ARNm del gen p53 supresor de tumores y del inhibidor 2 de la proteína de unión al ADN (ID2).

Descripción de los métodos.

[0390] Se cultivaron varias líneas de células tumorales como se describe anteriormente (Tabla 10). Para el tratamiento de las células, el medio se eliminó y se reemplazó por medio fresco completo en placas de cultivo de 24 pocillos (Sarstedt nº 83.1836.300) (30.000 células/pocillo), placas de cultivo de 6 pocillos (Sarstedt nº 83.3920.300) (50.000 células/pocillo) (0,5 ml para 24 pocillos y 1 ml para placas de 6 pocillos) y se incubaron durante la noche a 37°C y 5% de CO₂. Para analizar la expresión del ARNm y su influencia en la proliferación, las células se trataron con Ref.1 (control aleatorizado) y ASO Seq. ID No. 218b a concentraciones de 2,5 μ M y 10 μ M y se incubaron durante 72 horas a 37°C y 5% de CO₂. El tratamiento que incluía el reemplazo del medio se repitió 3 veces cada 72 h (12 días en total). Para la recolección, las células se lavaron dos veces con PBS y posteriormente se usaron para el aislamiento de ARN (placas de 24 pocillos), aislamiento de proteínas (placas de 6 pocillos) o curva de proliferación. Los protocolos para el aislamiento de ARN y proteínas se realizaron como se describe anteriormente. Antes de contar las células para la curva de proliferación, las células se analizaron mediante microscopía óptica (Nikon, TS-100 F LED #MFA33500). Las células restantes se recogieron luego de placas de 24 pocillos para la determinación del número de células. Para este propósito, las células restantes se lavaron con PBS (2x), se trataron

con acutasa (500 µl/pocillo) y se incubaron durante 5 - 7 min a 37°C. Posteriormente, se agregaron 500 µl de medio y el número de células se determinó utilizando la fluorescencia del contador celular automatizado Luna FL™ y el campo brillante (Biozym, #872040) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, se agregaron 18 µl de la suspensión celular a 2 µl de un kit de viabilidad de ensayo de naranja de acridina/yoduro de propidio (Biozym #872045). Después de 1 minuto de sedimentación, se agregaron 10 µl a la diapositiva de conteo celular (Biozym #872011). Las células se contaron y se calcularon en distinción de células vivas y muertas.

18.1 Resultados para Seq. ID No. 218b

[0391] Los niveles de ARNm de Ki67 disminuyeron eficazmente independientemente (A549, L3.6pl, Panc-1) o dependientemente (HT-29, Panc-1, CaCo2) de las concentraciones de ASO usadas, 12 días después de la transferencia gimnótica (Tabla 40). El nivel de expresión génica de p53 también se vio afectado en A549, HT-29, K562, KG-1, CaCO2 y TMK-1 por ASO ensayado (Tabla 50). La verificación de la expresión reducida de la proteína Ki67 se mostró para A549, L3.6pl, TMK-1, HT-29 y K562 (Tabla 51). Notablemente, la expresión del ARNm de ID2 mostró una regulación constante consistente y dependiente de la dosis en células A549, HT-29, K562 y TMK-1 mediadas por ASO Seq. ID No. 218b (Tabla 51). Además, ASO Seq. ID No. 218b dio como resultado una tasa de proliferación reducida de varias líneas de células tumorales (Tabla 53). Se reconoció una disminución dependiente de la dosis del número de células para las células HPAFII, MCF-7, KG1, K562, U937 y HTZ-19. Las células de cáncer de pulmón (A549) mostraron reducción aprox. del 50% de los números de células provocados por ASO Seq. ID No. 218b. Los números de células reducidos se confirmaron adicionalmente mediante microscopía óptica para HPAFII, K562, MCF-7, Panc-1 y HTZ-1, 12 días después de la transferencia gimnótica de ASO Seq. ID No. 218b (Figura 24).

[0392] Se pueden obtener resultados comparables para los oligonucleótidos antisentido de la Seq. ID No.s 141d, 141g, 141i, 143r, 143w, 143af, 143ag, 143ah, 143j, 143p, 143q, 233d, 234d, 235b, 235d, 237b, 237c, 237i, 237m, 238c, 238f, 239e, 240c, 241b, 242a, 246e, 247d, 248b, 248e, 248g, 152k, 152s, 152t, 152u, 152ab, 152ag, 152ah, 152ai, 249c, 249e, 250b, 250g, 251c, 251f, 252e, 253c, 254b, 255a, 259e, 260d, 261b, 261e, 261g, 262d, 262e, 209s, 209v, 209w, 209x, 209ai, 209an, 209at, 209au, 209av, 210o, 210v, 210w, 210x, 210ab, 210ac, 210ad, 210af, 210am, 263b, 263c, 263i, 263m, 264e, 264h, 265e, 266c, 267b, 268a, 272e, 273d, 274a, 274d, 274f, 275g, 275i, 276b, 276c, 276j, 276k, 277d, 277e, 278f, 279c, 280b, 281a, 218ad, 218n, 218t, 218u, 218v, 218ah, 218an, 218ao, 218ap, 220d, 221d, 222b, 222c, 222f, 223c, 223f, 224i, 224m, 225c, 225f, 226e, 227c, 213o, 213p, 213q, 213s, 213y, 213z, 213aa, 213af, 228b, 229a, 285d, 286d, 287d, 287e, 287f, 288e, 288i, 289d, 289h, 289o, 289p, 289q, 290c, 290f, 290i, 291c, 292c, 293b, and 294a. La mayor parte de los oligonucleótidos antisentido mencionados anteriormente no pudieron vencer a la Seq. ID Nos. 218b y 218c, pero aún son mucho más ventajosos que los oligonucleótidos antisentido del estado de la técnica. Por lo tanto, los oligonucleótidos antisentido de la presente invención son muy útiles para el tratamiento de enfermedades hiperproliferativas tales como cáncer y tumores.

Tabla 49: expresión de ARNm del marcador de proliferación Ki67. 12 días después de la transferencia gimnótica de ASO Seq. ID No. 218b en células A549, HT-29, L3.6pl, KG1, Panc-1 y CaCO2, el ARNm de Ki67 disminuyó en todas las líneas celulares, respectivamente. Los niveles de ARNm se determinaron en relación con el gen de mantenimiento GNB2L1 utilizando RT-PCR cuantitativa en tiempo real normalizada para el control no tratado. A = control sin tratar, B = Ref.1, C = Seq. ID No. 218b, ± = SEM. Las estadísticas se calcularon utilizando el ANOVA Ordinario de una vía seguido de las comparaciones múltiples *post hoc* de "Tukey".

Diana	Ki67					
	Niveles de ARNm 12 días tras la transferencia gimnótica repetida (4x 72 h)					
Línea de células	A549 n=2	HT-29 n=2	L3.6pl n=2	KG1 n=1	Panc-1 n=1	CaCo2 n=1
A	1,00 ± 0,37	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,25	1,00	1,00	1,00
B 2,5 µM	0,92 ± 0,05	0,89 ± 0,46	0,93 ± 0,03	0,72	0,76	1,21
B 10 µM	0,96 ± 0,03	0,60 ± 0,11	0,96 ± 0,16	0,76	0,79	1,07
C 2,5 µM	0,55 ± 0,33	0,34 ± 0,11	0,42 ± 0,03	0,16	0,68	0,99
C 10 µM	0,57 ± 0,20	0,17 ± 0,02	0,64 ± 0,05	0,33	0,37	0,37

Tabla 50: Expresión de ARNm del supresor de tumores p53. 12 días después de la transferencia gimnótica de ASO Seq. ID No. 218b en células A549, HT-29, K562, KG1, CaCO2 y TMK-1, el ARNm de p53 disminuyó en todas las líneas celulares, respectivamente. Los niveles de expresión de ARNm se determinaron en relación con el gen de mantenimiento GNB2L1 utilizando RT-PCR cuantitativa en tiempo real y luego se normalizaron para el control sin tratar. A = control sin tratar, B = Ref.1, C = Seq. ID No. 218b, ± = SEM, *p <0,05 en referencia a A, las estadísticas se calcularon utilizando el ANOVA Ordinario de una vía seguido de las comparaciones múltiples *post hoc* de "Tukey".

Diana	p53					
	Niveles de ARNm 12 días tras la transferencia gimnótica repetida (4x 72 h)					
Línea de células	A549 n=2	HT-29 n=1	K562 n=1	KG1 n=1	TMK-1 n=1	CaCo2 n=1
A	1,00 ± 0,31	1,00	1,00	1,00	1,00 ± 0,04	1,00
B 2,5 µM	1,06 ± 0,02	0,72	0,90	1,37	0,74 ± 0,11	0,82
B 10 µM	1,11 ± 0,92	0,68	1,35	0,87	0,71 ± 0,15	1,25
C 2,5 µM	0,27 ± 0,04	0,51	0,27	0,65	0,14* ± 0,14	0,99
C 10 µM	0,53 ± 0,07	0,32	0,46	0,67	0,21* ± 0,05	0,30

Tabla 51: Expresión de ARNm de ID2. 12 días después de la transferencia gimnótica de ASO Seq. ID No. 218b en células A549, HT-29, K562 y TMK-1, el ARNm de ID2 se regulaba de manera dependiente de la dosis en todas las líneas celulares, respectivamente. Los niveles de expresión de ARNm se determinaron en relación con el gen de mantenimiento GNB2L1 utilizando RT-PCR cuantitativa en tiempo real y luego se normalizaron para el control sin tratar. A = control sin tratar, B = Ref.1, C = Seq. ID No. 218b, ± = SEM, *p <0,05 en referencia a A, las estadísticas se calcularon utilizando el ANOVA ordinario de una vía seguido de las comparaciones múltiples *post hoc* de "Tukey".

Diana	ID2			
	Niveles de ARNm 12 días tras transferencia gimnótica repetida (4x 72 h)			
Línea de células	A549 n=2	HT-29 n=1	K562 n=1	TMK-1 n=1
A	1,00 ± 0,03	1,00	1,00 ± 0,23	1,00 ± 0,23
B 2,5 µM	0,73 ± 0,01	0,93	0,97 ± 0,15	0,88 ± 0,15
B 10 µM	0,82 ± 0,15	1,00	0,82 ± 0,05	0,82 ± 0,05
C 2,5 µM	0,59 ± 0,01	0,31	0,70 ± 0,10	0,70 ± 0,10
C 10 µM	0,35 ± 0,02	0,25	0,29* ± 0,09	0,30* ± 0,09

Tabla 52: Análisis densitométrico de transferencia Western Ki67. Regulación a la baja de la proteína Ki67 después de la transferencia gimnótica con ASO Seq. ID No. 218b fue reconocida. El nivel de proteína se cuantificó en relación con el gen de mantenimiento de la alfa-tubulina utilizando el software Image Studio™ Lite y se normalizó a los controles sin tratar. A = control sin tratar, B = Ref.1, C = Seq. ID No. 218b. Las estadísticas se calcularon utilizando el ANOVA ordinario de una vía seguido de las comparaciones *post hoc* de "Tukey".

Diana	Ki67				
	Niveles de ARNm 12 días tras transferencia gimnótica repetida (4x 72 h)				
Línea de células	A549 n=1	L3,6pl n=2	TMK-1 n=2	HT29 n=2	K562 n=1
A	1,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00
B 10 µM	1,18	0,59 ± 0,00	0,75 ± 0,00	1,19 ± 0,68	1,05
C 10 µM	0,57	0,19 ± 0,17	0,53 ± 0,26	0,69 ± 0,05	0,35

Tabla 53: Números de células en varias líneas celulares de cáncer 12 días después de la transferencia gimnótica repetida (4 x 72 h). ASO Seq. ID No. 218b se transfirió a varias líneas celulares de cáncer. Los números de células se determinaron utilizando fluorescencia de contador celular automatizada Luna FL™ y campo brillante (Biozym, nº 872040) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A = control sin tratar, B = Ref.1, C = Seq. ID No. 218b, a = células vivas, d = células muertas. ± = SEM. Las estadísticas se calcularon utilizando el ANOVA ordinario de una vía seguido de la prueba de comparaciones *post hoc* de "Tukey".

Líneas de células	Tratamiento											
	A		B 2,5 μM		B 10 μM		C 2,5 μM		C 10 μM			
	Nº de células x 10 ⁵											
	a	d	a	d	a	d	a	d	a	d	n	p=
A5 49	4,25 ± 0,50	0,47 ± 0,09			3,88 ± 0,95	0,31 ± 0,11			2,35 ± 0,07	0,35 ± 0,16	3	
HPAF II	2,80 ± 0,33	0,35 ± 0,11	2,88 ± 2,04	0,36 ± 0,06	2,56 ± 0,45	0,39 ± 0,06	0,66 ± 0,47	0,25 ± 0,07	0,20 ± 0,09	0,06 ± 0,02	2	
KG 1	17,40 ± 3,00	0,43 ± 0,16	16,5 ± 0,85	0,58 ± 0,24	13,80 ± 0,80	0,26 ± 0,17	10,90 ± 0,20	0,59 ± 0,18	7,63 ± 3,08	0,48*+ ± 0,14	3	A vs, C 10 μM *p < 0,01 B2,5 μM vs, C 10 μM +p < 0,01 C10 μM vs, D 10 μM #p < 0,01
K5 62	10,93 ± 1,58	1,37 ± 0,40	7,44 ± 1,05	2,40 ± 0,62	6,40 ± 0,38	2,36 ± 0,30	5,60 ± 0,08	2,66 ± 0,41	3,33 ± 0,54	0,62* ± 0,07	3	A vs, C 10 μM *p < 0,01
MCF-7	6,73	2,37	6,51	1,57	6,51	3,35	5,21	1,64	2,47	0,73	1	
U9 37	26,43 ± 2,05	7,04 ± 0,28	14,5 ± 2,73	2,88 ± 0,37	17,67 ± 0,50	2,36 ± 0,30	11,34* ± 2,85	3,07 ± 0,97	7,56* ± 1,49	2,25 ± 0,44	3	A vs, C 2,5 μM *p < 0,01 A vs, C 10 μM *p < 0,01
Pa nc -1	2,16 ± 0,08	0,11 ± 0,02	1,82 ± 0,36	0,15 ± 0,04	2,98 ± 0,27	0,16 ± 0,02	1,15* ± 0,51	0,07 ± 0,02	1,20*+ ± 0,23	0,36 ± 0,02	3	A vs, C 2,5 μM *p < 0,05 A vs, C 10 μM *p < 0,05 B 10 μM vs, C 10 μM +p < 0,01
HT Z-19	2,06 ± 0,02	3,05 ± 0,36	2,57 ± 0,16	1,78 ± 0,15	2,55 ± 0,22	1,22 ± 0,15	1,78 ± 0,25	0,88 ± 0,09	1,17+ ± 0,14	0,49 + 0,05	3	B 10μM vs, C 10 μM +p < 0,05

Conclusión

[0393] Modulación de ARNm de Ki67, p53 e ID2 por ASO Seq. ID No. 218b indica un efecto beneficioso para amortiguar la expansión del tumor en varios órganos y con diferentes orígenes. Se sabe que Ki67, ID2 y p53 están regulados positivamente y promueven la proliferación celular en diferentes tipos de cáncer. El marcador de proliferación Ki67, p53 y ID2 se regularon de manera eficiente. El recuento de células y la microscopía óptica de varias células tumorales 12 días después de la transferencia gimnótica reveló ASO Seq. ID No. 218b como un potente agente para reducir la proliferación celular.

[0394] Considerados en conjunto, la ASO Seq. ID No. 218b específica a TGF-R_{II} reducía eficientemente las tasas de proliferación paralelas a las modulaciones de ARNm reconocidas de Ki67, p53 e ID2. Estos datos sugieren que las ASO de la invención son candidatos a fármacos prometedores para amortiguar la progresión de las células tumorales y la metástasis de las células tumorales.

Ejemplo 19: Análisis del efecto de los oligonucleótidos antisentido para la angiogénesis en varias líneas celulares tumorales

[0395] La modulación de la angiogénesis es esencial para el crecimiento y reparación de órganos. Un desequilibrio en el crecimiento de los vasos sanguíneos contribuye a diferentes enfermedades como, por ejemplo, el crecimiento de tumores, isquemia, trastornos inflamatorios e inmunes. Se sabe que el TGF-β es un factor proangiogénico. Esto puede ser más relevante en los procesos inflamatorios y neoplásicos, cuando la angiogénesis es responsable de la progresión de la enfermedad. Estos efectos pueden ir de la mano con la fibrosis inducida por TGF-β1. Por lo tanto, la inhibición de la señalización de TGF-β por la ASO específica a TGF-R_{II} puede representar un enfoque terapéutico adecuado.

[0396] Para ensayar esta suposición, estas ASO se transfirieron a varias líneas de células tumorales por captación

gimnástica. 12 días después de transferencias gimnásticas repetidas, se analizó el sobrenadante celular para determinar los niveles de proteína de los factores proangiogénicos mediante análisis multiplex. Esta tecnología permitió la investigación de múltiples proteínas pro-angiogénicas (VEGF, Tie-2, Flt-1, PIGF y bFGF) por electro-quimioluminiscencia. El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es una citoquina potente secretada por un tumor que promueve la angiogénesis y contribuye a la proliferación de tumores, por ejemplo. Tie-2 es una proteína que se expresa en los vasos sanguíneos en crecimiento activo. La quinasa de tirosina 1 de tipo Fms (Flt-1), también conocida como receptor 1 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR1), es una quinasa receptora de tirosina transmembrana que se expresa en gran medida en las células endoteliales vasculares y el factor de crecimiento placentario (PIGF) actúa junto con VEGF y está regulada positivamente en condiciones patológicas, por ejemplo, en la formación de tumores. Además, el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) es un factor de crecimiento que también induce la angiogénesis. PAI-1 es un gen diana de TGF- β y media la formación de cicatrices y los efectos angiogénicos de TGF- β . Por lo tanto, PAI-1 demuestra también un factor clave para la invasión de tumores y la metástasis. Los pacientes que muestran un alto nivel de concentración de PAI-1 se consideran un factor de mal pronóstico, por ejemplo, en cáncer de mama, pulmón, colorrectal y cáncer gástrico. Las altas concentraciones de PAI-1 también son un factor de riesgo para enfermedades en las que la trombosis juega un papel (por ejemplo, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular). Por lo tanto, también se ensayó la regulación del ARNm de PAI-1 por oligonucleótidos antisentido específicos de TGF- β .

Descripción de los métodos:

[0397] Las líneas celulares tumorales se cultivaron como se describe anteriormente (Tabla 10). Para el tratamiento de las células, el medio se eliminó y se reemplazó por medio fresco completo en placas de cultivo de 24 pocillos (Sarstedt n° 83.1836.300) (30.000 células/pocillo) incubado durante la noche a 37°C y 5% de CO₂. Al día siguiente, Ref.1 (control aleatorizado) y ASO Seq. ID No. 218b (se agregaron al medio renovado a concentraciones de 2,5 y 10 μ M y se incubaron durante 72 horas a 37°C y 5% de CO₂. El tratamiento que incluía el reemplazo del medio se repitió 3 veces cada 72 horas (12 días en total). Posteriormente, se recogió y analizó el sobrenadante celular mediante un ensayo MesoScale Discovery® (MSD Discovery). Esta tecnología permitió la investigación de múltiples proteínas pro-angiogénicas (VEGF, Tie-2, Flt-1, PIGF y bFGF) mediante electro-quimioluminiscencia e información sobre los factores de crecimiento individuales fueron extraídos por las instrucciones del fabricante (MSD MesoScale Discovery®, K15198G). Los resultados fueron evaluados por el software GraphPad Prism® 6.0.

[0398] Posteriormente, las células se lavaron dos veces con PBS y posteriormente se usaron para el aislamiento de ARN (placas de 24 pocillos) para analizar si la transferencia gimnástica de ASO puede regular los niveles de ARNm del inhibidor-activador de plasminógeno (PAI-1) por RT-PCR en tiempo real. Los protocolos y los cebadores se utilizaron y enumeraron como se describió anteriormente.

19.1 Resultados para Seq. ID 218b

[0399] La tabla 54 demuestra que el ARNm de PAI-1 estaba regulado a la baja de manera dependiente de la dosis en varias células cancerosas analizadas (A549: cáncer de pulmón, HPAFII: adenocarcinoma pancreático, HT-29: adenocarcinoma colorrectal, HTZ-19: melanoma, TMK- 1: carcinoma gástrico, THP-1: leucemia monocítica) después de la transferencia gimnástica repetida de ASO Seq. ID No. 218b. Además, los niveles de proteína VEGF en los sobrenadantes celulares estimulados también mostraron una disminución dependiente de la dosis en A549, HTZ-19, HPAFII y PC3M (adenocarcinoma prostático). Para HPAFII y PC3M, la regulación a la baja fue significativa (Tabla 55). Influencia de ASO Seq. ID No. 218b a bFGF confirmó las observaciones para VEGF, lo que significa que ASO Seq. ID No. 218b es potente para suprimir la angiogénesis (Tabla 56) En A549 y PC3M los resultados mostraron también una reducción significativa de bFGF. La cantidad de proteína de PIGF en los sobrenadantes celulares fue solo ligera pero dependiente de la dosis en las células A549 y HTZ-19. En las células PC3M, el nivel de PIGF endógeno básico fue mayor que en todas las otras células analizadas y el efecto de la ASO también fue más fuerte (Tabla 57). Finalmente, podrían ser detectadas la regulación por disminución de la proteína Flt-1 en las células HT-29 (Tabla 58) y la depresión de Tie-2 en HTZ-19 (ASO Seq. ID No. 218b 2,5 μ M) y MCF-7 (carcinoma de mama, 10 μ M) (tabla 59).

[0400] Se pueden obtener resultados comparables para los oligonucleótidos antisentido de la Seq. ID No.s 141d, 141g, 141i, 143r, 143w, 143af, 143ag, 143ah, 143j, 143p, 143q, 152k, 152s, 152t, 152u, 152ab, 152ag, 152ah, 152ai, 209s, 209w, 209x, 209y, 209ai, 209an, 209at, 209au, 209av, 210o, 210v, 210w, 210x, 210ab, 210ac, 210ad, 210af, 210am, 213o, 213p, 213q, 213s, 213y, 213z, 213aa, 213af, 218ad, 218n, 218t, 218u, 218v, 218ah, 218an, 218ao, 218ap, 220d, 221d, 222b, 222c, 222f, 223c, 223f, 224i, 224m, 225c, 225f, 226e, 227c, 228b, 229a, 233d, 234d, 235b, 235d, 237b, 237c, 237i, 237m, 238c, 238f, 239e, 240c, 241b, 242a, 246e, 247d, 248b, 248e, 248g, 249c, 249e, 250b, 250g, 251c, 251f, 252e, 253c, 254b, 255a, 259e, 260d, 261b, 261e, 261g, 262d, 262e, 263b, 263c, 263i, 263m, 264e, 264h, 265e, 266c, 267b, 268a, 272e, 273d, 274a, 274d, 274f, 275g, 275i, 276b, 276c, 276j, 276k, 277d, 277e, 278f, 279c, 280b, 281a, 285d, 286d, 287d, 287e, 287f, 288e, 288i, 289d, 289h, 289o, 289p, 289q, 290c, 290f, 290i, 291c, 292c, 293b, and 294a. La mayoría de los oligonucleótidos antisentido mencionados anteriormente no pudieron vencer a la Seq. ID Nos. 218b y 218c, pero aún son mucho más ventajosos que los oligonucleótidos antisentido del estado de la técnica. Por lo tanto, los oligonucleótidos antisentido de la presente invención son muy útiles para el tratamiento de enfermedades hiperproliferativas tales como cáncer y tumores.

Tabla 54: expresión de ARNm de PAI-1 12 días después de la transferencia gimnótica de Seq. ID No. 218b en células A549, HPAFII, HT-29, HTZ-19, TMK-1 y THP-1. La regulación de la expresión del gen PAI-1 depende de la dosis de ASO Seq. ID No. 218b para mejorar el pronóstico de la enfermedad. Los niveles de ARNm se determinaron en relación con el gen de mantenimiento GNB2L1 utilizando RT-PCR cuantitativa en tiempo real y luego se normalizaron para el control sin tratar. A = control sin tratar, B = Ref.1, C = Seq. ID No. 218b, \pm = SEM. Las estadísticas se calcularon utilizando el ANOVA Ordinario de una vía seguido de las comparaciones múltiples *post hoc* de "Tukey".

Diana	PAI-1					
	Niveles de ARNm 12 días tras transferencia gimnótica repetida (4x 72 h)					
Línea de células	A549 n=3	HPAFII n=1	HT-29 n=2	HTZ-19 n=2	TMK-1 n=2	THP-1 n=2
A	1,00 \pm 0,10	1,00	1,00 \pm 0,11	1,00 \pm 0,21	1,00 \pm 0,06	1,00 \pm 0,11
B 2,5 μ M	1,28 \pm 0,03	1,48	0,88 \pm 0,27	0,99 \pm 0,34	0,89 \pm 0,04	1,14 \pm 0,79
B 10 μ M	1,03 \pm 0,27	1,05	0,81 \pm 0,08	1,30 \pm 0,00	1,16 \pm 0,00	1,21 \pm 0,37
C 2,5 μ M	0,91 \pm 0,28	0,62	0,60 \pm 0,13	1,13 \pm 0,10	0,56 \pm 0,04	0,83 \pm 0,20
C 10 μ M	0,56 \pm 0,13	0,32	0,50 \pm 0,18	0,77 \pm 0,10	0,45 \pm 0,23	0,09 \pm 0,02

Tabla 55: Niveles de proteína VEGF en el sobrenadante celular 12 días después de la transferencia gimnótica de Seq. ID No. 218b en células A549, HPAFII, HTZ-19, PC3M mediante el ensayo MesoScale Discovery® (MSD Mesoscale Discovery, #K15198G). Los niveles de proteína se determinaron midiendo la electroquimioluminiscencia. A = control sin tratar, B = Ref.1, C = Seq. ID No. 218b, \pm = SEM, *p <0,05 y **p <0,01 en referencia a A, + p <0,05 y ++p <0,01 en referencia a B 2,5 μ M. Las estadísticas se calcularon utilizando el ANOVA ordinario de una vía seguido de las comparaciones múltiples *post hoc* de "Tukey".

Diana	VEGF			
	proteína (pg / ml) 12 días tras transferencia gimnótica repetida (4x 72 h)			
Línea de células	A549 n=1	HPAFII n=2	HTZ-19 n=2	PC3M n=2
A	8186	23266 \pm 876	4411 \pm 66	2657 \pm 103
B 2,5 μ M	8387	22278 \pm 5711	3385 \pm 57	1993 \pm 5,4
B 10 μ M	8623	20776 \pm 497	4044 \pm 21	813 \pm 0,8
C 2,5 μ M	8846	15479*** \pm 512	3444 \pm 197	1266** \pm 20,5
C 10 μ M	6842	11214** \pm 898	2882 \pm 90	442** \pm 14,3

Tabla 56: Niveles de proteína bFGF en el sobrenadante celular 12 días después de la transferencia gimnótica de Seq. ID No. 218b en células A549 y PC3M por MesoScale Discovery® Assay (MSD Mesoscale Discovery, K15198G). Los niveles de proteína se determinaron midiendo la electroquimioluminiscencia. A = control sin tratar, B = Ref.1, C = Seq. ID No. 218b, \pm = SEM, *p <0,05 y **p <0,01 en referencia a A, + p <0,05 y ++p <0,01 en referencia a B 2,5 μ M, p <0,05 y p <0,01 en referencia a B 10 μ M. Las estadísticas se calcularon utilizando el ANOVA ordinario de una vía seguido de las comparaciones múltiples *post hoc* de "Tukey".

Diana	bFGF	
	proteína (pg / ml) 12 días tras transferencia gimnótica repetida (4x 72 h)	
Línea de células	A549 n=2	PC3M n=2
A	50,7 \pm 2,9	21,2 \pm 0,2
B 2,5 μ M	54,4 \pm 3,1	16,8 \pm 0,1
B 10 μ M	51,8 \pm 2,7	14,7 \pm 0,2
C 2,5 μ M	26,7*** \pm 2,1	11,3*** \pm 0,0
C 10 μ M	24,2 \pm 3,4	7,6*** \pm 0,0

Tabla 57: Niveles de proteína PIGF en el sobrenadante celular 12 días después de la transferencia gimnótica de Seq. ID No. 218b en células A549, HTZ-19 y PC3M por el ensayo MesoScale Discovery® (MSD Mesoscale Discovery®, #K15198G). Los niveles de proteína se determinaron midiendo la electroquimioluminiscencia. A = control sin tratar, B = Ref.1, C = Seq. ID No. 218b, \pm = SEM, ***p <0,01 en referencia a A, las estadísticas se calcularon usando el ANOVA Ordinario de una vía seguido de varias comparaciones *post hoc* de "Tukey"

Diana	PIGF		
	proteína (pg / ml) 12 días tras transferencia gimnótica repetida (4x 72 h)		
Línea de células	A549 n=2	HTZ-19 n=1	PC3M n=2
A	9,9 ± 0,4	11,6	61,7 ± 2,1
B 2,5 µM	9,6 ± 0,2	8,1	54,1 ± 19
B 10 µM	8,6 ± 0,1	8,4	59,5 ± 3,2
C 2,5 µM	8,2 ± 0,8	8,2	69,4 ± 2,4
C 10 µM	6,3** ± 0,9	6,5	45,0 ± 3,5

Tabla 58: Niveles de proteína Flt-1 en el sobrenadante celular 12 días después de la transferencia gimnótica de Seq. ID No. 218b en células HTZ-19 por el ensayo MesoScale Discovery® (MSD Mesoscale Discovery, #K15198G). Los niveles de proteína se determinaron midiendo la electroquimioluminiscencia. A = control sin tratar, B = Ref.1, C = Seq. ID No. 218b, ± = SEM, **p < 0,01 en referencia a A, las estadísticas se calcularon utilizando el ANOVA Ordinario de una vía seguido de las comparaciones múltiples *post hoc* de "Tukey".

Diana	Flt-1
	proteína (pg / ml) 12 días tras transferencia gimnótica repetida (4x 72 h)
Línea de células	HT-29 n=1
A	33,9
B 2,5 µM	27,7
B 10 µM	27,7
C 2,5 µM	18,2
C 10 µM	18,7

Tabla 59: muestra los niveles de proteína Tie-2 en el sobrenadante celular 12 días después de la transferencia gimnótica de Seq. ID No. 218b en células HTZ-19 y MCF-7 por MesoScale Discovery® Assay (MSD Mesoscale Discovery, #K15198G). Los niveles de proteína se determinaron midiendo la electroquimioluminiscencia. A = control sin tratar, B = Ref.1, C = Seq. ID No. 218b, ± = SEM, **p < 0,01 en referencia a A, las estadísticas se calcularon utilizando el ANOVA Ordinario de una vía seguido por las comparaciones múltiples *post hoc* de "Tukey".

Diana	Tie-2	
	proteína (pg / ml) 12 días tras transferencia gimnótica repetida (4x 72 h)	
Línea de células	HTZ-19 n=1	MCF-7 n=1
A	13,5	98,1
B 2,5 µM	6,2	
B 10 µM		149,2
C 2,5 µM	3,2	
C 10 µM		76,9

Conclusión

[0401] Todos los factores proangiogénicos analizados (VEGF, bFGF, PIGF, Flt-1 y Tie-2) podrían ser regulados por ASO Seq. ID No. 218b de una manera que tendría un impacto favorable en la supresión del tumor y otros mecanismos patológicos dependientes de la angiogénesis mejorada. Además, el ARNm de PAI-1 se redujo de manera dependiente de la dosis por ASO Seq. ID No. 218b. Este factor, un gen diana de TGF-β y, por ejemplo, un marcador de pronóstico aprobado en el cáncer de mama, también fue regulado en forma dependiente de la dosis. Considerados en conjunto, todas las ASO ensayadas de la invención fueron eficientes en la reducción de los procesos angiogénicos que favorecen la progresión tumoral, la metástasis, la inflamación y la trombosis. Por lo tanto, las ASO de la invención dirigidas contra TGF-R_{II} son candidatos terapéuticos potentes en diferentes tipos de enfermedades relacionadas con el cáncer y la trombosis.

Ejemplo 20: Análisis del efecto de las ASO inventivas sobre la fibrosis

[0402] El TGF-β está implicado en muchos procesos tales como la proliferación celular, la migración, la cicatrización de heridas, la angiogénesis y las interacciones célula-célula. Se sabe por varios estudios, que este factor a menudo se eleva durante la patogénesis en varias enfermedades, como el glaucoma primario de ángulo abierto, la enfermedad de Alzheimer, la fibrosis pulmonar y la nefropatía diabética. Estas enfermedades están relacionadas con modificaciones patológicas en la matriz extracelular (MEC) y el citoesqueleto actina. A menudo, estas alteraciones observadas se correlacionan con la progresión de la enfermedad de gravedad y la resistencia al tratamiento (transición mesenquimatosa epitelial - EMT - en tumores). El factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF) es un mediador descendente de TGF-β y media los efectos fibróticos de TGF-β. Por lo tanto, se muestra que CTGF media la deposición de ECM y modula la reorganización de actina-citoesqueleto. Para investigar si las ASO de la invención contribuyen a la resolución de los procesos fibróticos al inhibir la señalización de TGF-β, se evaluaron los niveles de CTGF además de la fibronectina (FN) y el colágeno IV (ColIV), que representan dos componentes principales de la MEC en varias células cancerosas diferentes. Además, se examinaron los efectos de las ASO en CTGF, FN y actina-citoesqueleto en células precursoras neurales (ReNcell CX) y cáncer de pulmón humano (A549).

20.1 Fibrosis en neurodegeneración.

Descripción de los métodos.

[0403] Las células se cultivaron como se describe anteriormente en el protocolo estándar. Para el tratamiento, las células se sembraron en placas de cultivo de 24 pocillos (Sarstedt n° 83.1836.300) (50.000 células/pocillo), placas de cultivo de 6 pocillos (Sarstedt n° 83.3920.300) (80.000 células/pocillo) y placas de portaobjetos de cultivo celular de 8 pocillos (Sarstedt n° 94.6140.802) (10.000 células/pocillo) y se incubaron durante la noche a 37°C y 5% de CO₂. Para investigar una respuesta de las células ReNcell CX® a las células TGF-β1 se trataron después de refrescar el medio con TGF-β1 (2 y 10 ng/ml, PromoCell #C63499) durante 48 h, seguido de un análisis de ARNm para CTGF. Para determinar el efecto de ASO en CTGF y FN, células ReNcell CX®, se eliminó el medio y se reemplazó por medio completo nuevo (1 ml para 6 pocillos y 0,5 ml para 8 pocillos). Ref. 1 (control codificado), ASO Seq. ID No. 218b y Seq.ID No. 218b luego se agregaron en el medio a concentraciones de 2,5 y 10 μM y el análisis respectivo (RT-PCR en tiempo real, análisis de transferencia Western e inmunocitoquímica) se realizó después de 96 h. Para examinar el impacto de ASO después de la investigación de la preincubación con TGF-β1, se eliminó el medio y se reemplazó por medio completo fresco (1 ml para placas de 6 pocillos y placas de portaobjetos de cultivo celular de 8 pocillos). Tras la exposición de TGF-β1 (10 ng/ml, 48 h), se cambió el medio, TGF-β1 (10 ng/ml), Ref.1 (10 μM), ASO con Seq. ID No. 218b (10 μM) y ASO con Seq. ID No. 218c (10 μM) se agregaron en combinación y en un solo tratamiento a las células. Las células ReNcell CX® se recogieron 96 h después de la transferencia gimnótica. Por lo tanto, las células se lavaron dos veces con PBS y posteriormente se usaron para ARN (placas de 24 pocillos) y aislamiento de proteínas (placas de 6 pocillos) o examen inmunocitoquímico de células (en placas de portaobjetos de cultivo celular de 8 pocillos). Protocolos, anticuerpos, diluciones y cebadores se utilizaron como se describió anteriormente.

20.1.1 Resultados de los efectos de TGF-β1 en células precursoras neurales (ReNcell CX)

[0404] No se sabía nada acerca de la reacción de ReNcell CX® a la exposición a TGF-β1. Así, las células ReNcell CX® fueron tratadas durante 48 h con TGF-β1 en dos concentraciones diferentes (Tabla 60). La evaluación de la RT-PCR en tiempo real reveló una inducción dependiente de la dosis de la expresión de los genes CTGF y TGF-β1.

Tabla 60: Expresión de ARNm de CTGF y TGF-β1 48 h después de la estimulación con TGF-β1. Los niveles de ARNm se determinaron en relación con el gen de mantenimiento GNB2L1 utilizando RT-PCR cuantitativa en tiempo real y luego se normalizaron para el control sin tratar. A = control no tratado, E = TGF-β1. ± = SEM. Las estadísticas se calcularon utilizando el ANOVA ordinario de una vía seguido de la comparación múltiple *post hoc* de "Tukey".

Línea de células	ReNcell CX	
	Niveles de ARNm tras tratamiento de TGF-β1 por 48 h	
Diana Punto de tiempo	CTGF 48 h n=3	TGF-β1 48 h n=3
A	1,00 ± 0,43	1,00 ± 0,10
E 2 ng/ml	1,73 ± 0,92	1,34 ± 0,45
E 10 ng/ml	2,15 ± 1,14	1,85 ± 0,65

Conclusión

[0405] Las células ReNcell CX® mostraron una respuesta a la exposición a TGF-β1 presentando autoinducción de TGF-β1 y elevación del gen diana de TGF-β1 CTGF. En conjunto, las células ReNcell CX® son ideales para examinar preguntas que abordan los efectos de TGF-β.

20.1,2 Resultados para Seq. ID No. 218b

20.1.2,1 Efectos de la transferencia gimnótica

5 **[0406]** Transferencia gimnótica de ASO Seq. ID No. 218b da como resultado una reducción significativa y dependiente de la dosis de CTGF y FN (Tabla 61). Este impacto de ASO Seq. ID No. 218b fue verificado para el nivel de proteína FN. El nivel de proteína FN se redujo en aproximadamente un 70% 96 h después de la transferencia gimnótica de ASO ensayada, mientras que el tratamiento con TGF- β 1 de células ReNcell CX $\text{\textcircled{R}}$ dio como resultado una inducción de FN de 3,4 veces (Tabla 62).

10 **Tabla 61: Regulación a la baja significativa e dependiente de la dosis del ARNm de CTGF después de la transferencia gimnótica con Seq. ID No. 218b en células ReNcell CX $\text{\textcircled{R}}$.** Los niveles de ARNm se determinaron en relación con el gen de mantenimiento GNB2L1 utilizando RT-PCR cuantitativa en tiempo real y luego se normalizaron para el control sin tratar. A = control sin tratar, B = Ref.1, C = Seq. ID No. 218b. \pm = SEM, *p <0,05, **p <0,01 en referencia a A. Las estadísticas se calcularon utilizando el ANOVA Ordinario de una vía seguido de las comparaciones *post hoc* de "Dunnett".

Línea de células	ReNcell CX	
	Niveles de ARNm tras transferencia gimnótica	
Diana	CTGF	FN
Punto de tiempo	96 h, n=3	96 h, n=3
A	1,00 \pm 0,04	1,00 \pm 0,00
B 2,5 μ M	0,97 \pm 0,06	0,81 \pm 0,14
B 10 μ M	0,86 \pm 0,17	0,67 \pm 0,07
C 2,5 μ M	0,66** \pm 0,02	0,59 \pm 0,02
C 10 μ M	0,52** \pm 0,02	0,39* \pm 0,03

30 **Tabla 62: Análisis densitométrico después de la transferencia Western para fibronectina.** Regulación a la baja de la proteína FN 96 h después de la transferencia gimnótica de ASO Seq. ID No. 218b en células ReNcell CX $\text{\textcircled{R}}$ podría ser reconocida. El nivel de proteína se determinó en relación con el gen de mantenimiento de la alfa-tubulina utilizando el software Image Studio TM Lite y luego se normalizó para que no se tratara control A = control sin tratar, B = Ref.1, C = Seq. ID No. 218b.

Línea de células	ReNcell CX
	Niveles de proteína tras transferencia gimnótica
Diana	FN
Punto de tiempo	96 h, n=1
A	1,00
B 2,5 μ M	1,06
B 10 μ M	0,60
C 2,5 μ M	0,46
C 10 μ M	0,30
E 10 ng/ml	3,43

Conclusión

55 **[0407]** ASO Seq. ID No. 218b fue potente en la regulación por disminución de los niveles de ARNm de CTGF y FN en células precursoras neuronales humanas. El tratamiento de ASO Seq. ID No. 218b redujo proteína FN, 96 h después de la transferencia gimnótica. Por lo tanto, la ASO específica de TGF-R $\text{\textsubscript{II}}$ media en el bloqueo de las células ReNcell CX $\text{\textcircled{R}}$ de los efectos fibróticos inducidos por TGF- β .

20.1.2.2 Efectos de la transferencia gimnótica después de la preincubación con TGF- β

60 **[0408]** Para analizar si ASO Seq. ID No. 218b también es potente para inhibir los efectos fibróticos mediados por TGF- β en condiciones patológicas, las células ReNcell CX $\text{\textcircled{R}}$ se preincubaron con preincubación de TGF- β seguida de transferencia gimnótica durante 96 h. Posteriormente, los niveles determinados de ARNm de CTGF y FN indican un fuerte efecto antifibrótico de ASO Seq. ID No. 218b también después de la inducción por TGF- β de CTGF y expresión del gen FN (Tabla 63). La tinción inmunocitoquímica para CTGF (Figura 25A) y FN (Figura 25B) confirmó los datos del análisis de ARNm. Además, la tinción con faloidina para el análisis del citoesqueleto de actina mostró una inducción de fibras de estrés después del tratamiento con TGF- β , mientras que la ASO Seq. ID No. 218b fue

eficaz en el bloqueo de la inducción de la fibra de estrés mediada por TGF-β (Figura 25C).

Tabla 63: Regulación a la baja del ARNm de CTGF y FN después de la incubación previa con TGF-β1 seguida de transferencia gimnótica con Seq. ID No. 218b en células ReNcell CX® (en comparación con el control codificado). Los niveles de ARNm se determinaron en relación con el gen de mantenimiento GNB2L1 utilizando RT-PCR cuantitativa en tiempo real y luego se normalizó a un control sin tratar. A = control sin tratar, B = Ref.1, C = Seq. ID No. 218b, E = TGF-β, ± = SEM, *p <0,05, **p <0,01 en referencia a A. Las estadísticas se calcularon utilizando el ANOVA Ordinario de una vía seguido de las comparaciones *post hoc* de Dunnett.

Línea de células	ReNcell CX	
	Niveles de ARNm tras 48 h TGF-β1 -> 96 h TGF-β1 + ASOs / tratamiento único	
Diana	CTGF	FN
Punto de tiempo	96 h, n=3	96 h, n=3
A	1,00 ± 0,04	1,00 ± 0,10
B 10 μM	0,85 ± 0,01	0,78 ± 0,20
C 10 μM	0,70* ± 0,25	0,44 ± 0,04
E 10 ng/ml	1,60** ± 0,15	2,25 ± 0,31
E 10 ng/ml + B 10 μM	1,71** ± 0,03	4,08*** ± 0,90
E 10 ng/ml + C 10 μM	1,19*** ± 0,04	1,74*** ± 0,61

Conclusión

[0409] ASO Seq. ID No. 218b mostró fuertes efectos antifibróticos bajo condiciones patológicas simuladas (preincubación de TGF-β1). Aparte de la regulación a la baja de FN como un componente principal de la ECM, la actina-citoesqueleto también se vio afectada por la ASO inventiva de una manera que puede ser beneficiosa para un mejor resultado en las enfermedades fibróticas.

20.1.3 Resultados para Seq. ID No. 218c

20.1.3,1 Efectos de la transferencia gimnótica

[0410] Transferencia gimnótica de ASO Seq. ID No. 218c produce una fuerte y significativa reducción de ARNm de CTGF después de la transferencia gimnótica de 10 μM ASO Seq. ID No. 218c (Tabla 64).

Tabla 64: Regulación a la baja del ARNm de CTGF después de la transferencia gimnótica de Seq. ID No. 218c en células ReNcell CX®. Los niveles de ARNm se determinaron en relación con el gen de mantenimiento GNB2L1 utilizando RT-PCR cuantitativa en tiempo real y luego se normalizaron para el control sin tratar. A = control no tratado, B = Ref.1, D = Seq. ID No. 218c. ± = SEM, *p <0,05 en referencia a A. Las estadísticas se calcularon utilizando el ANOVA ordinario de una vía seguido de las comparaciones *post hoc* de "Dunnett".

Línea de células	ReNcell CX
	Niveles de ARNm tras transferencia gimnótica
Diana	CTGF
Punto de tiempo	96 h, n=3
A	1,00 ± 0,10
B 2,5 mM	0,88 ± 0,08
B 10 mM	0,89 ± 0,07
D 2,5 mM	0,48 ± 0,08
D 10 mM	0,17* ± 0,02

Conclusión

[0411] ASO Seq. ID No. 218c fue eficiente en la reducción dependiente de la dosis de ARNm de CTGF.

20.1.3.2 Efectos de la transferencia gimnótica después de la preincubación con TGF-β

[0412] Resultados de transferencia gimnótica para ASO Seq. ID 218c seguido de la incubación previa con TGF-β1

verificó un bloqueo efectivo de los efectos inducidos por TGF-β1 en los niveles de ARNm de CTGF (Tabla 65). La ASO fue tan potente para bloquear el efecto de TGF-β1 en CTGF que el tratamiento combinado es comparable al tratamiento único de ASO Seq. ID No. 218c.

5 **Tabla 65: Nivel de ARNm de CTGF después de la incubación previa con TGF-β1 tras la transferencia**
gimnótica de Seq. ID No. 218c y tratamiento paralelo de TGF-β1 en células ReNcell CX®. Los datos
 confirmaron un bloqueo efectivo de los efectos inducidos por TGF-β1 en los niveles de ARNm de CTGF por ASO
 Seq. ID No. 218c en comparación con tratamientos combinados. Los niveles de ARNm se determinaron en relación
 10 con el gen de mantenimiento GNB2L1 utilizando RT-PCR cuantitativa en tiempo real y luego se normalizaron para el
 control sin tratar. A = control no tratado, B = Ref.1, D = Seq. ID No. 218c, E = TGF-β1. ± = SEM, *p <0,05 en
 referencia a A. Las estadísticas se calcularon utilizando el ANOVA ordinario de una vía seguido de las
 comparaciones *post hoc* de "Dunnett".

Diana	ReNcell CX
Punto de tiempo	Niveles de ARNm 48 h TGF-β1 -> 96 h TGF-β1 + ASOs / tratamiento único
Línea de células	CTGF n= 3
A	1,00 ± 0,03
B 10 μM	0,85 ± 0,01
D 10 μM	0,17* ± 0,02
E 10 ng/ml	1,39 ± 0,08
E 10 ng/ml + B 10 μM	1,25 ± 0,44
E 10 ng/ml + D 10 μM	0,23* ± 0,02

Conclusión

30 **[0413]** ASO Seq. ID No. 218c mostró una fuerte regulación a la baja de ARNm y proteína de CTGF incluso en
 condiciones patológicas artificiales (preincubación de TGF-β1).

35 **[0414]** Considerados juntos, aparte de los fuertes efectos antifibróticos, las ASO específicas a TGF-R_{II} mostraron
 una modulación de actina-citoesqueleto. La inducción de fibras de estrés puede causar una elevación de la rigidez
 celular y la rigidez que puede desempeñar un papel, por ejemplo, en la enfermedad de Alzheimer y otros trastornos
 neurodegenerativos. La deposición de ECM también puede mediar modificaciones patógenas rápidas, por ejemplo,
 en el glaucoma primario de ángulo abierto. Por lo tanto, la reducción de la deposición de ECM y la supresión de la
 formación de fibras de estrés pueden ser beneficiosas para un mejor pronóstico en trastornos neurológicos
 relacionados con la fibrosis. Por lo tanto, las ASO específicas a TGF-R_{II} son potentes agentes terapéuticos para el
 tratamiento, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer y el glaucoma primario de ángulo abierto.

20.2. Fibrosis pulmonar

Descripción de los métodos.

45 **[0415]** Para la investigación de los efectos de la ASO en la ECM y el citoesqueleto de actina en el pulmón, se
 examinaron células de cáncer de pulmón humano (A549) y se cultivaron como se describe anteriormente. Para el
 tratamiento, las células se sembraron en placas de cultivo de 24 pocillos (Sarstedt n° 83.1836.300) (50.000
 células/pocillo), placas de cultivo de 6 pocillos (Sarstedt n° 83.3920.300) (80.000 células/pocillo) y placas de
 portaobjetos de cultivo celular de 8 pocillos (Sarstedt n° 94.6140.802) (10.000 células/pocillo) y se incubaron durante
 50 después de renovar el medio con TGF-β1 (2 y 10 ng/ml, PromoCell C63499) durante 48 h después del análisis de
 ARNm para CTGF. Para investigar el efecto de ASO en las células CTGF y FN A549, el medio se eliminó y se
 reemplazó por medio completo nuevo (1 ml para 6 pocillos y 0,5 ml para 8 x pocillos). Ref. 1 (control codificado),
 ASO Seq. ID No. 218b y Seq.ID No. 218b luego se agregaron en el medio a concentraciones de 2,5 y 10 μM y el
 análisis respectivo (RT-PCR en tiempo real, análisis de transferencia Western e inmunocitoquímica) se realizó
 55 después de 72 h en células ReNcell CX®. Para mostrar el posible impacto de la ASO después de la preincubación
 con TGF-β1, se eliminó el medio y se reemplazó por medio completo nuevo (1 ml para placas de 6 pocillos y placas
 de portaobjetos de cultivo celular de 8 pocillos). Tras la exposición de TGF-β1 (10 ng/ml, 48 h), se cambió el medio,
 TGF-β1 (10 ng/ml), Ref.1 (10 μM), ASO con Seq. ID No. 218b (10 μM) y ASO con Seq. ID No. 218c (10 μM) se
 añadió en combinación y en un solo tratamiento a las células. Las células A549 se recogieron 72 h después de la
 60 transferencia gimnótica. Por lo tanto, las células se lavaron dos veces con PBS y posteriormente se usaron para
 ARN (placas de 24 pocillos) y aislamiento de proteínas (placas de 6 pocillos) o examen inmunocitoquímico de
 células (en placas de portaobjetos de cultivo celular de 8 pocillos). Protocolos, anticuerpos utilizados, diluciones y
 cebadores fueron como se describió anteriormente.

20.2.1 Resultados de los efectos de TGF- β 1 en células de cáncer de pulmón (A549)

[0416] Para investigar la capacidad de las células A549 para reaccionar a la exposición al TGF- β 1, las células se trataron durante 48 h con TGF- β 1 en dos concentraciones diferentes (Tabla 66). La evaluación de la RT-PCR en tiempo real reveló para CTGF y TGF- β 1 una inducción de la expresión génica dependiente de la dosis.

Tabla 66: Expresión de ARNm de CTGF y TGF- β 1 inducida 48 h después de la estimulación con TGF- β 1 en células A549. Los niveles de expresión de ARNm se determinaron en relación con el gen de mantenimiento GNB2L1 utilizando RT-PCR cuantitativa en tiempo real y luego se normalizaron para el control sin tratar. A = control no tratado, E = TGF- β 1. \pm = SEM, *p <0,05 y **p <0,01 en referencia a A, **p <0,05 en referencia a E 2 ng/ml. Las estadísticas se calcularon utilizando el ANOVA ordinario de una vía, seguido de la comparación múltiple *post hoc* de "Tukey".

Línea de células	A549	
	Niveles de ARNm tras transferencia gimnástica	
Diana	CTGF	FN
Punto de tiempo	72 h, n=3	72 h, n=3
A	1,00 \pm 0,08	1,00 \pm 0,07
B 2,5 μ M	0,87 \pm 0,06	1,08 \pm 0,02
B 10 μ M	0,80 \pm 0,03	0,87 \pm 0,08
C 2,5 μ M	0,60** \pm 0,04	0,77 \pm 0,17
C 10 μ M	0,39** \pm 0,03	0,74 \pm 0,16

Conclusión

[0417] Las células A549 mostraron una regulación positiva de ARNm dependiente de la dosis y de CTGF tras la exposición a TGF- β 1. Además, se observó autoinducción de TGF- β 1. Consideradas juntas, las células A549 son un buen modelo para examinar preguntas que abordan los efectos del TGF- β en el pulmón y cáncer de pulmón.

20.2.2 Resultados para Seq. ID No. 218b

20.2.2,1 Resultados por efectos de transferencia gimnástica

[0418] La transferencia gimnástica de ASO Seq. ID No. 218b causa una reducción altamente significativa, dependiente de la dosis, de la expresión del gen CTGF (Tabla 67). El nivel de ARNm de FN también se vio afectado por la prueba ASO pero no dependiente de la dosis. En contraste, la tinción contra FN reveló una reducción dependiente de la dosis de FN en comparación con el control aleatorizado (Figura 260A). Además, se examinó el impacto de ASO y TGF- β en el citoesqueleto de actina. La Fig. 26B mostró una inducción de las fibras de actina, incluida la formación de fibras de estrés después del tratamiento con TGF- β 1 en células A549 en función de la dosis, mientras que la señal después de la transferencia gimnástica de ASO Seq. ID No. 218b en células A549 fue significativamente disminuida paralelamente a la reversión reconocida de los efectos mediados por TGF- β 1. Para el análisis de proteínas, una regulación correcta de CTGF paralela a una inhibición de pErk1/2 mediante la cual CTGF media sus efectos fibróticos podría haberse demostrado (Tabla 68).

[0419] Además, 72 h después de la transferencia gimnástica de ASO Seq. ID No. 218b fue notable una disminución de los componentes principales FN y ColIV de ECM (Tabla 68).

Tabla 67: Regulación a la baja significativa y dependiente de la dosis del ARNm de CTGF después de la transferencia gimnástica con Seq. ID No. 218b en células A549. Los niveles de ARNm se determinaron en relación con el gen de mantenimiento GNB2L1 utilizando RT-PCR cuantitativa en tiempo real y luego se normalizaron para el control sin tratar. A = control sin tratar, B = Ref.1, C = Seq.ID No.218b. \pm = SEM, **p <0,01 en referencia a A. Las estadísticas se calcularon usando el ANOVA Ordinario de una vía seguido de comparaciones *post hoc* de "Dunnnett".

Línea de células	A549	
	Niveles de ARNm tras transferencia gimnótica	
Diana Punto de tiempo	CTGF 72 h, n=3	FN 72 h, n=3
A	1,00 ± 0,08	1,00 ± 0,07
B 2,5 µM	0,87 ± 0,06	1,08 ± 0,02
B 10 µM	0,80 ± 0,03	0,87 ± 0,08
C 2,5 µM	0,60** ± 0,04	0,77 ± 0,17
C 10 µM	0,39** ± 0,03	0,74 ± 0,16

Tabla 68: Análisis densitométrico después de transferencia Western de CTGF, FN, ColIV y pErk11/2: 72 h después de la transferencia gimnótica con ASO Seq. ID No 218b en A549. El nivel de proteína se determinó en relación con el gen de mantenimiento de la alfa-tubulina utilizando el software Image Studio™ Lite y luego se normalizó para el control no tratado. A = control no tratado, B = Ref. 1, C = Seq. ID No. 218b.

Línea de células	A549			
	niveles de proteína tras transferencia gimnótica			
Diana Punto de tiempo	CTGF 72 h n = 1	FN 72 h n = 1	ColIV 72 h n = 1	pErk11/2 72 h n=2
A	1,00	1,00	1,00	1,00 ± 0,00
B 2,5 µM	0,91	0,89	1,19	1,00 ± 0,14
B 10 µM	1,31	0,76	0,87	0,98 ± 0,02
C 2,5 µM	0,05	0,81	1,16	0,67 ± 0,26
C 10 µM	0,09	0,46	0,65	0,61 ± 0,13

Conclusión

[0420] Transferencia gimnótica de la Seq. ID No. 218b fue eficiente en factores moduladores que están involucrados en la deposición de ECM y en la reorganización del citoesqueleto de actina en células pulmonares humanas.

20.2.2.2 Resultados de los efectos de la transferencia gimnótica después de la incubación previa con TGF-β1

[0421] Resultados de la transferencia gimnótica de ASO Seq. ID 218b después de la incubación previa con TGF-β1 verificó un bloqueo efectivo de los efectos inducidos por TGF-β1 fuerte en los niveles de ARNm de CTGF y FN (Tabla 69). La tinción inmunocitoquímica contra CTGF (Figura 27A) y FN (Figura 27B) confirmó la detección de ARNm a nivel de proteína.

Tabla 69: Nivel de ARNm de CTGF y FN después de la incubación previa con TGF-β1 después de la transferencia gimnótica de Seq. ID No. 218b y tratamiento paralelo de TGF-β1 en células A549. Los datos confirmaron un bloqueo efectivo de los efectos inducidos por TGF-β1 en los niveles de ARNm de CTGF y FN por ASO Seq. ID No. 218b en comparación con tratamientos combinados. Los niveles de ARNm se determinaron en relación con el gen de mantenimiento GNB2L1 utilizando RT-PCR cuantitativa en tiempo real y luego se normalizaron para el control sin tratar. A = control sin tratar, B = Ref. 1, C = Seq. ID No. 218b, E = TGF-β1. ± = SEM, *p <0,05, **p <0,01 en referencia a A. Las estadísticas se calcularon usando el ANOVA Ordinario de una vía seguido por comparaciones *ad hoc* de "Dunnett"

Diana Punto de tiempo	A549	
Línea de células	CTGF n= 5	FN n= 3
A	1,00 ± 0,22	1,00 ± 0,45
B 10 µM	0,89 ± 0,19	1,02 ± 0,37
C 10 µM	0,52 ± 0,05	0,35 ± 0,06
E 10 ng/ml	6,92* ± 2,32	2,92 ± 1,02
E 10 ng/ml + B 10 µM	8,79** ± 2,72	2,90 ± 0,56
E 10 ng/ml + C 10 µM	2,53 ± 0,59	1,18 ± 0,28

Conclusión

[0422] ASO Seq. ID No. 218b fue eficiente en la mediación de efectos antifibróticos en células A549 en condiciones patológicas artificiales que simulaban concentraciones excesivas de TGF-β1.

20.2.3 Resultados para Seq. ID No. 218c

20.2.3,1 Resultados por efectos de transferencia gimnótica

[0423] Transferencia gimnótica de ASO Seq. ID No. 218c media una fuerte reducción, dependiente de la dosis, del ARNm de CTGF 72 h después de la transferencia gimnótica en células A549 (Tabla 70).

Tabla 70: Regulación a la baja del ARNm de CTGF 72 h después de la transferencia gimnótica de Seq. ID No. 218c en células A549. Los niveles de ARNm se determinaron en relación con el gen de mantenimiento GNB2L1 utilizando RT-PCR cuantitativa en tiempo real y luego se normalizaron para el control sin tratar. A = control no tratado, B = Ref.1, D = Seq. ID No. 218c. ± = SEM, **p <0,01 en referencia a A. Las estadísticas se calcularon utilizando el ANOVA Ordinario de una vía seguido de las comparaciones *post hoc* de "Dunnett".

Línea de células	A549	
	Nivel de ARNm tras la transferencia gimnótica	
Diana	CTGF 72 h n=4	
Punto de tiempo		
A	1,00 ± 0,08	
B 2,5 µM	0,97 ± 0,07	
B 10 µM	0,85 ± 0,06	
D 2,5 µM	0,49** ± 0,05	
D 10 µM	0,31** ± 0,03	

Conclusión

[0424] Transferencia gimnótica de ASO Seq. ID No. 218c fue eficiente en la reducción del ARNm de CTGF mediador aguas abajo de TGF-β.

20.2.2.2 Resultados de los efectos de la transferencia gimnótica después de la incubación previa con TGF-β

[0425] Resultados para transferencia gimnótica para ASO Seq. ID No. 218c después de la incubación previa con TGF-β1 verificó un bloqueo efectivo de los fuertes efectos inducidos por TGF-β1 en los niveles de ARNm de CTGF (Tabla 71). La tinción inmunocitoquímica contra CTGF confirmó estos hallazgos a nivel de proteína (Figura 28).

Tabla 71: Niveles de ARNm de CTGF después de la incubación previa con TGF-β1 seguida de transferencia gimnótica de Seq. ID No. 218c y tratamiento paralelo de TGF-β1 en A549. Los datos verificaron un bloqueo efectivo de los efectos inducidos por TGF-β1 en los niveles de ARNm de CTGF por ASO Seq. ID No. 218c en comparación con tratamientos combinados. Los niveles de ARNm se determinaron en relación con el gen de mantenimiento GNB2L1 utilizando RT-PCR cuantitativa en tiempo real y luego se normalizaron para el control sin tratar. A = control no tratado, B = Ref.1, D = Seq. ID No. 218c, E = TGF-β1. ± = SEM, **p <0,01 en referencia a A, **p <0,01 en referencia a E+B. Las estadísticas se calcularon utilizando el ANOVA ordinario de una vía seguido de las comparaciones *post hoc* de "Tukey".

Diana	A549
Punto de tiempo	48 h TGF-β1 -> 72 h TGF-β1 + ASOs / tratamiento único
Línea de células	CTGF n= 3
A	1,00 ± 0,05
B 10 µM	0,86 ± 0,11
D 10 µM	0,53 ± 0,10
E 10 ng/ml	4,71 ± 1,76
E 10 ng/ml + B 10 µM	5,89* ± 2,16
E 10 ng/ml + D 10 µM	0,86++ ± 0,06

Conclusión

[0426] ASO Seq. ID 218c fue potente en la mediación de efectos antifibróticos en células A549 en condiciones

patológicas artificiales imitadas por concentraciones excesivas de TGF-β1.

[0427] Considerados juntos, ASO Seq. ID 218c es un agente terapéutico eficaz, porque la patología de la fibrosis pulmonar podría disminuirse al reducir CTGF, FN y ColIV. Además, la formación de fibras de estrés puede reducirse de manera efectiva por el ASO específico de TGF-R_{II}, lo que hace que las ASO inventivas sean agentes terapéuticos ideales.

20.3 Efectos sobre varias células cancerosas.

Descripción de los métodos.

[0428] Para la investigación de los efectos de ASO dirigidos a las células ECM (CTGF, FN, ColIV) se utilizaron y cultivaron como se describe anteriormente en el protocolo estándar (Tabla 10). Para el tratamiento, las células se sembraron en placas de cultivo de 24 pocillos (Sarstedt n° 83.1836.300) (30.000 células/pocillo), placas de cultivo de 6 pocillos (Sarstedt n° 83.3920.300) (50.000 células/pocillo) y se incubaron durante la noche a 37°C y 5% CO₂. Para analizar la expresión de ARNm e influencia en CTGF, FN y ColIV, los niveles de ARNm y proteínas se trataron con Ref.1 (control aleatorizado) o ASO Seq. ID No. 218b a concentraciones de 2,5 y 10 μM y se incubaron durante 72 horas a 37°C y 5% de CO₂. El tratamiento que incluía el reemplazo del medio se repitió 3 veces cada 72 h (12 días en total). Para la recolección, las células se lavaron dos veces con PBS y posteriormente se usaron para el aislamiento de ARN (placas de 24 pocillos) o el aislamiento de proteínas (placas de 6 pocillos). Los protocolos para el aislamiento de ARN y proteínas, así como los anticuerpos y diluciones utilizados, se realizaron como se describe anteriormente.

20.3,1 Resultados para Seq. ID No. 218b

[0429] Los efectos antifibróticos se detectaron mediante análisis de CTGF, FN, ColIV ARNm y niveles de proteína. El ARNm de CTGF (Tabla 72) se redujo de manera dependiente de la dosis por Seq. ID No. 218b en células HT-29, HTZ-19, MCF-7 y THP-1. Para las células KG-1, se reconoció la regulación por disminución de TGF-β mediador en sentido descendente para ASO 2,5 μM. ID No. 218b. Para A549, células Panc-1 y CaCO₂ se demostró una disminución de FN (Tabla 73) de acuerdo con una disminución dependiente de la dosis del ARNm de ColIV (Tabla 74) en células THP-1, HTZ-19 y L3.6pl (Tabla 65). El análisis de transferencia Western reveló una fuerte reducción de la proteína CTGF en células HT-29, MCF-7, TMK-1 y L3.6pl. El resultado para MCF-7 fue significativo (Tabla 75). Además, la fosforilación de Erk1/2 en células A549 y TMK-1 fue inhibida por ASO Seq. ID No. 218b. pErk1/2 normalmente es activado por CTGF para inducir efectos fibróticos mediados por TGF-β (Tabla 76). Para FN (A549, MCF-7, HT-29, HTZ-19, HPAFII) y Col IV (A549, HTZ-19, HPAFII, PC3M) (Tabla 77 y 78), los dos componentes principales de la ECM fueron los niveles de proteína. minimizado en aproximadamente un 50%.

Tabla 72: expresión de ARNm de CTGF 12 días después de la transferencia gimnótica de Seq. ID No. 218b en células HT-29, HTZ-19, KG1, MCF-7 y THP-1. El ARNm de CTGF disminuyó después de la transferencia gimnótica de Seq. ID No. 218b para todas las líneas celulares ensayadas. Los niveles de ARNm se determinaron en relación con el gen de mantenimiento GNB2L1 utilizando RT-PCR cuantitativa en tiempo real y luego se normalizaron para el control sin tratar. A = control sin tratar, B = Ref.1, C = Seq. ID No. 218b, ± = SEM. Las estadísticas se calcularon utilizando el ANOVA ordinario de una vía seguido de las comparaciones *post hoc* múltiples de "Tukey".

Diana	CTGF				
	Niveles de ARNm 12 días tras la transferencia gimnótica repetida (4x 72 h)				
Línea de células	HT-29 n=2	HTZ-19 n=1	KG-1 n=1	MCF-7 n=1	THP-1 n=2
A	1,00 ± 0,28	1,00	1,00	1,00	1,00 ± 0,28
B 2,5 μM	0,686 ± 0,11	1,30		0,93	0,99 ± 0,68
B 10 μM	0,65 ± 0,03	1,20	0,88	0,91	1,15 ± 0,34
C 2,5 μM	0,40 ± 0,20	0,64		0,24	0,98 ± 0,11
C 10 μM	0,33 ± 0,19	0,55	0,26	0,22	0,09 ± 0,03

Tabla 73: expresión de ARNm de FN 12 días después de la transferencia gimnótica de Seq. ID No. 218b en células A549, Panc-1 y CaCO₂. El ARNm de FN disminuyó después de la transferencia gimnótica de Seq. ID No. 218b para todas las líneas celulares ensayadas. Los niveles de ARNm se determinaron en relación con el gen de mantenimiento GNB2L1 utilizando RT-PCR cuantitativa en tiempo real y luego se normalizaron para el control sin tratar. A = control sin tratar, B = Ref.1, C = Seq. ID No. 218b, ± = SEM, **p < 0,01 en referencia a A. Las estadísticas se calcularon utilizando el ANOVA Ordinario de una vía seguido de varias comparaciones *post hoc* de "Tukey".

Diana	FN		
	niveles de ARNm 12 días tras la transferencia gimnótica repetida (4x 72 h)		
Línea de células	A549 n=2	Panc-1 n=1	CaCo2 n=2
A	1,00 ± 0,39	1,00	1,00 ± 0,30
B 2,5 µM	0,83 ± 0,08	1,29	0,55 ± 0,13
B 10 µM			1,00 ± 0,76
C 2,5 µM	0,35 ± 0,20	0,15	0,73 ± 0,54
C 10 µM			0,18 ± 0,17

Tabla 74: expresión de ARNm de ColIV 12 días después de la transferencia gimnótica de Seq. ID No. 218b en células A549, HTZ-19, THP-1, L3.6pl, Panc-1 y CaCO2. El ARNm de ColIV disminuyó después de la transferencia gimnótica de Seq. ID No. 218b para todas las líneas celulares ensayadas. Los niveles de ARNm se determinaron en relación con el gen de mantenimiento GNB2L1 utilizando RT-PCR cuantitativa en tiempo real y luego se normalizaron para el control sin tratar. A = control sin tratar, B = Ref.1, C = Seq. ID No. 218b, ± = SEM, las estadísticas se calcularon utilizando el ANOVA ordinario de una vía seguido de las comparaciones múltiples *post hoc* de "Tukey".

Diana	Col IV					
	niveles de ARNm 12 días tras la transferencia gimnótica repetida (4x 72 h)					
Línea de células	A549 n=2	THP-1 n=2	HTZ-19 n=1	L3,6pl n=2	Panc-1 n=1	CaCo2 n=2
A	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,22	1,00	1,00 ± 0,20	1,00	1,00 ± 0,71
B 2,5 µM	1,18 ± 0,31	0,71 ± 0,25	0,94	0,83 ± 0,09	0,98	1,37 ± 0,19
B 10 µM	1,11 ± 0,60	0,61 ± 0,03		0,91 ± 0,29	0,57	2,61 ± 0,01
C 2,5 µM	0,84 ± 0,02	0,65 ± 0,19	0,51	1,14 ± 0,13	0,59	1,30 ± 0,03
C 10 µM	0,75 ± 0,02	0,30 ± 0,13		0,69 ± 0,05	0,30	0,57 ± 0,14

Tabla 75: Análisis densitométrico después de la transferencia Western en células HT-29, MCF-7, L3.6pl y TMK-1 12 días después de la transferencia gimnótica de Seq. ID No. 218b. Podría ser reconocida la regulación a la baja de la proteína CTGF por ASO Seq. ID No. 218b. Los niveles de proteína se determinaron en relación con el gen de mantenimiento de la alfa-tubulina utilizando el software Image Studio™ Lite y luego se normalizó para el control no tratado. A = control sin tratar, B = Ref.1, C = Seq. ID No. 218b. Las estadísticas se calcularon utilizando el ANOVA ordinario de una vía seguido de las comparaciones múltiples *post hoc* de "Tukey".

Diana	CTGF			
	protein levels 12 días tras la transferencia gimnótica repetida (4x 72 h)			
Línea de células	HT-29 n=1	MCF-7 n=2	TMK-1 n=1	L3,6pl n=1
A	1,00	1,00 ± 0,0	1,00	1,00
B 10 µM	1,19	1,12 ± 0,11	0,85	0,93
C 10 µM	0,50	0,22*** ± 0,03	0,38	0,22

Tabla 76: Análisis densitométrico después de transferencia Western en células A549 y TMK-1 12 días después de la transferencia gimnótica de Seq. ID No. 218b. Fue determinada la regulación a la baja de la proteína pErk1/2 por ASO Seq. ID No. 218b. La cuantificación del nivel de proteína se realizó en relación con el gen de mantenimiento de la alfa-tubulina utilizando el software Image Studio™ Lite y luego se normalizó a un control sin tratar. A = control sin tratar, B = Ref.1, C = Seq. ID No. 218b. Las estadísticas se calcularon utilizando el ANOVA ordinario de una vía seguido de las comparaciones múltiples *post hoc* de "Tukey".

Diana	pErk1/2	
	Niveles de proteína 12 días tras la transferencia gimnótica repetida (4x 72 h)	
Línea de células	A549 n=1	TMK-1 n =1
A	1,00	1,00
B 10 μ M	1,21	1,14
C 10 μ M	0,58	0,76

Tabla 77: Análisis densitométrico después de transferencia Western en células A549, MCF-7, HT-29, HTZ-19 y HPAFII 12 días después de la transferencia gimnótica de Seq. ID No. 218b. Fue determinada la regulación a la baja de la proteína FN por ASO Seq. ID No. 218b. La cuantificación del nivel de proteína se realizó en relación con el gen de mantenimiento de la alfa-tubulina utilizando Image Studio™ Lite Software y luego se normalizó a un control no tratado. A = control sin tratar, B = Ref.1, C = Seq. ID No. 218b. Las estadísticas se calcularon utilizando el ANOVA ordinario de una vía seguido de las comparaciones múltiples *post hoc* de "Tukey".

Diana	FN				
	Niveles de proteína 12 días tras la transferencia gimnótica repetida (4x 72 h)				
Línea de células	A549 n=1	MCF-7 n=2	HT-29 n =1	HTZ-19 n =1	HPAFII n=1
A	1,00	1,00 \pm 0,22	1,00	1,00	1,00
B 10 μ M	1,10	1,08 \pm 0,25	0,81	1,20	1,12
C 10 μ M	0,56	0,69 \pm 0,18	0,40	0,83	0,56

Tabla 78: Análisis densitométrico después de transferencia Western en células A549, MCF-7, HT-29, HTZ-19 y HPAFII 12 días después de la transferencia gimnótica de Seq. ID No. 218b. Fue determinada la regulación a la baja de la proteína FN por ASO Seq. ID No. 218b. Los niveles de proteína se analizaron en relación con el gen de mantenimiento de la alfa-tubulina utilizando el software Image Studio™ Lite y luego se normalizaron para el control no tratado. A = control sin tratar, B = Ref.1, C = Seq. ID No. 218b. Las estadísticas se calcularon utilizando el ANOVA ordinario de una vía seguido de las comparaciones múltiples *post hoc* de "Tukey".

Diana	Col IV			
	Niveles de proteína 12 días tras la transferencia gimnótica repetida (4x 72 h)			
Línea de células	A549 n=1	HTZ-19 n =1	HPAFII n =1	PC3M n=1
A	1,00	1,00	1,00	1,00
B 10 μ M	1,31	1,01	1,05	1,07
C 10 μ M	0,61	0,36	0,76	0,43

Conclusión

[0430] El aumento de la deposición de ECM mediada por TGF- β 1, a través de su CTGF mediador descendente, podría revertirse de manera eficiente por las ASO inventivas específicas a TGF-R_{II} en diferentes líneas celulares de tumores. Un nivel reducido de componentes de la MEC podría contribuir a una progresión del tumor menos agresivo. En conjunto, las ASO ensayadas pueden demostrar una nueva estrategia terapéutica en diferentes enfermedades asociadas con la fibrosis.

Ejemplo 21: Umbral para la toxicidad de las ASO inventivas por administración intracerebroventricular crónica utilizando un paradigma de aumento de la dosis en Cynomolgus.

[0431] Para evaluar el intervalo de dosis ideal para el estudio de toxicidad de GLP, se realizó un experimento previo con administración intracerebroventricular (icv) de oligonucleótido antisentido (ASO) con dosis crecientes en monos Cynomolgus. Durante la administración, los animales fueron monitoreados para detectar alteraciones inmunológicas, hematológicas y fisiológicas.

Descripción del método:

[0432] Para la infusión central crónica de ASO en monos Cynomolgus machos y hembras, se implantó por vía subcutánea una bomba de presión de gas (0,25 ml/24 h, Tricumed-IP 2000V®) conectada a un catéter de silicona dirigido al ventrículo lateral derecho. Anestesia con ketamina/xilacina y condiciones semi-estériles. Se utilizaron un

solo macho y una única hembra para cada condición de tratamiento (Seq. ID No. 218b, Seq. ID No. 218c, concentraciones dadas en la Tabla 79). Cada bomba se implantó por vía subcutánea en la región abdominal a través de una incisión en la piel de 10 cm de largo en el cuello del mono y se conectó con la cánula icv mediante un catéter de silicona. Los animales se colocaron en un marco estereotáxico y la cánula icv se bajó hacia el ventrículo lateral derecho. La cánula se fijó con dos tornillos de acero inoxidable utilizando cemento dental (Kallocryl, Speiko®-Dr. Speier GmbH, Münster, Alemania). La piel del cuello se cerró con suturas. Durante la cirugía, la temperatura corporal se mantuvo mediante una almohadilla térmica. Para evitar infecciones postquirúrgicas, los monos fueron tratados localmente con betaisodona® (Mundipharma GmbH, Limburg, Alemania) y recibieron antibióticos de 1 ml (sc, Baytril® 2,5% Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Alemania). El tubo y la bomba se llenó con la solución de tratamiento respectiva. Los periodos de infusión de ASO (1 semana para cada dosis) se interrumpieron por un periodo de lavado de una semana con una administración exclusiva de NaCl al 0,9%. Durante toda la administración del paradigma del desarrollo del peso corporal y se monitorizó el consumo de alimentos. Además, se tomaron muestras de sangre y de LCR una vez a la semana para determinar alteraciones hematológicas y también inmunológicas, pero también concentraciones sistémicas de ASO. El último día, se sacrificaron los animales y se extirparon los órganos (hígado, riñones, cerebro) y se analizaron en busca de proliferación, apoptosis, eliminación de ARNm y formación de tumores.

Tabla 79: Diseño experimental y las dosis de ASO administradas durante el paradigma de administración de 7 semanas.

Condición de tratamiento	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6	Semana 7
Seq. ID No.218b	0,048 mM	0,9% NaCl	0,24 mM	0,9% NaCl	1,2 mM	0,9% NaCl	6 mM
Seq. ID No 218c	0,048 mM	0,9% NaCl	0,24 mM	0,9% NaCl	1,2 mM	0,9% NaCl	6 mM

Conclusión:

[0433] Todas las ASO inventadas e inventivas fueron al menos no tóxicas en las semanas 1 a 6 y, por lo tanto, se utilizaron para investigaciones adicionales y exámenes toxicológicos. Sin embargo, la infusión de oligonucleótidos antisentido Seq. ID No. 214, Seq. ID No. 138b, Seq. ID No. 172b así como Ref. 0 y ref. 5, dio lugar a efectos tóxicos tempranos en el esquema anterior. Por lo tanto, estos oligonucleótidos antisentido no son adecuados como agentes terapéuticos y no se utilizaron para estudios adicionales.

Ejemplo 22: Determinación de anomalías de comportamiento y fisiológicas después de la administración central de oligonucleótidos antisentido

[0434] El objetivo de este estudio fue investigar los efectos de una única administración de oligonucleótidos antisentido intracerebroventricular (icv) en los parámetros neurológicos y de comportamiento resultantes en ratas.

Descripción del método:

[0435] Los procedimientos estereotáxicos se realizaron bajo anestesia con ketamina/xilacina y en condiciones semi-estériles. Después de la cirugía, las ratas tuvieron dos días para recuperarse.

Implantación de la cánula de guía icv.

[0436] Los animales se colocaron en un marco estereotáxico, y la cánula de guía (12 mm) se implantó 2 mm por encima del ventrículo lateral izquierdo (coordenadas relativas a bregma: 1,0 mm posterior, -1,6 mm lateral a la línea media, 1,8 mm por debajo de la superficie La cánula guía se ancló a dos tornillos de acero inoxidable utilizando cemento acrílico dental (Kallocryl, Speiko®-Dr. Speier GmbH, Münster, Alemania) y se cerró con una cánula simulada. Durante la cirugía, la temperatura corporal se mantuvo por una almohadilla de calefacción. Para evitar las infecciones post quirúrgicas, los ratones fueron tratados localmente con betaisodona® (Mundipharma GmbH, Limburg, Alemania) y recibieron 0,1 ml de antibióticos (sc, Baytril® 2,5% Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Alemania).

Infusión de ICV

[0437] Las ratas ligeramente restringidas recibieron una infusión icv de ASO (2 µM/5 µl, 10 µM/5 µl, 50 µM/5 µl, 250 µM/5 µl) o vehículo (5 µl, NaCl al 0,9%, pH 7,4, Braun) utilizando una cánula de calibre 27, que se extendió 2 mm más allá de la cánula de guía y permaneció en su lugar durante 30 s para permitir la difusión. Las ratas se monitorizaron 15, 30, 60 y 120 minutos después de la administración de icv para detectar reacciones de comportamiento, actividad motora, excitación del SNC, postura, coordinación motora, tono muscular, reflejos y temperatura corporal.

Verificación de cánula y colocación de sonda de microdiálisis.

[0438] Después de la escarificación, se extrajeron los cerebros, se congelaron rápidamente y se almacenaron a -

80°C hasta su análisis. La verificación histológica de los sitios de implantación de icv se realizó en cortes cerebrales teñidos con cresil violeta coronal de 40 µm.

[0439] Los presentes resultados demuestran una administración única de icv de ASO (para ambas secuencias, SEQ. ID NO. 218b, ID. Sec. 218c), para diferentes dosis, para ser una técnica segura en ratas debido a que no tiene efectos en parámetros neurológicos.

Ejemplo 23: Determinación del rango de dosis ideal para el estudio de toxicidad de GLP de Cynomolgus (experimento de toxicidad previa en ratas)

[0440] Para investigar cualquier efecto toxicológico general de una administración diaria intravenosa (iv) de oligonucleótido antisentido (ASO), y para localizar el rango de dosis perfecto para el estudio de prototoxicidad con GLP en ratas, fue realizado un experimento de pre-toxicidad en ratas.

Descripción del método:

[0441] Para la inyección intravenosa repetida de ASO, se dividieron 20 ratas macho y 20 hembras en cuatro grupos de tratamiento, un grupo de vehículo, un grupo ASO_{bajo}, un grupo ASO_{intermedio} y un grupo ASO_{alto}. Este paradigma fue realizado para Seq. ID No. 218b y Seq. ID No. 218c. Las ratas recibieron una inyección diaria de bolo intravenoso por 15 días consecutivos. Las ratas se controlaron para determinar la mortalidad (dos veces al día), los síntomas clínicos (una vez al día, el desarrollo del peso corporal (semanalmente), el consumo de alimentos (semanalmente). El día 15 del paradigma experimental, los animales se sacrificaron, se extrajeron los órganos (hígado, riñón, cerebro) y se recogió la sangre del tronco. Posteriormente, se analizaron los tejidos y la sangre para detectar alteraciones inmunológicas y hematológicas.

[0442] Los resultados del presente estudio demuestran que los dos ASO Seq. ID No. 218b y Seq. ID No. 218c son una medicación segura para una variedad de trastornos diferentes sin efectos tóxicos cuando se administra en dosis bajas e intermedias.

Ejemplo 24: Determinación de cualquier efecto toxicológico general por inyección intravenosa repetida de oligonucleótido antisentido

[0443] El objetivo de este estudio era el de investigar en qué dosis una administración diaria intravenosa (iv) de oligonucleótido antisentido (ASO) ejerce cualquier efecto toxicológico general en ratas.

Descripción del método:

[0444] Para la inyección intravenosa repetida de ASO, se dividieron 80 ratas macho y 80 ratas hembra en cuatro grupos de tratamiento, un grupo de vehículo, un grupo ASO_{bajo}, un grupo ASO_{intermedio} y un grupo ASO_{alto}. Las ratas recibieron una inyección diaria de bolo iv con ASO durante 29 días consecutivos. Las ratas se controlaron para determinar la mortalidad (dos veces al día), los síntomas clínicos (una vez al día, el desarrollo del peso corporal (semanalmente), el consumo de alimentos (semanalmente). En el día 29 del paradigma experimental, se sacrificaron los animales, los órganos (hígado, riñón, cerebro) se extrajeron y se extrajo sangre del tronco. Además, se recogieron frotis de médula ósea. Posteriormente, se analizaron las alteraciones inmunológicas, hematológicas e histopatológicas de los tejidos y la sangre.

[0445] Los resultados del presente estudio demuestran los dos ASO Seq. ID No. 218b y la Seq. ID No. 218c son medicamentos seguros para una variedad de trastornos diferentes sin efectos tóxicos cuando se administran en dosis bajas e intermedias.

Ejemplo 25: Determinación de las propiedades toxicológicas de una administración crónica central de oligonucleótidos antisentido en monos Cynomolgus

[0446] Para determinar la eficacia y para identificar la dosis tóxica, los monos Cynomolgus machos y hembras recibieron diferentes dosis de un oligonucleótido antisentido (ASO) de la invención mediante administración intracerebroventricular crónica. Durante el paradigma de administración, los animales fueron monitoreados para detectar alteraciones inmunológicas, hematológicas y fisiológicas.

Descripción del método:

[0447] Para la infusión central crónica de ASO en monos Cynomolgus machos y hembras, se implantó por vía subcutánea una bomba de gas (0,25 ml/24 h, Tricumed IP-2000V®) conectada a un catéter de silicona, dirigido al ventrículo lateral derecho. Bajo anestesia con ketamina/xilacina y condiciones semi-estériles. Se usaron tres monos machos y tres hembras para cada condición de tratamiento (vehículo, ASO_{bajo}, ASO_{alto}, concentraciones dadas en la Tabla 79). Además, para investigar el período de recuperación, se sacrificaron dos monos machos y dos hembras (vehículo y ASO_{alto}) cuatro semanas después de que se terminó la administración de ASO. Cada bomba se implantó

por vía subcutánea en la región abdominal a través de una incisión de piel de 10 cm en el cuello del mono y se conectó con la cánula icv mediante un catéter de silicona. Los animales se colocaron en un marco estereotáxico y la cánula icv se bajó hacia el ventrículo lateral derecho. La cánula se fijó con dos tornillos de acero inoxidable utilizando cemento dental (Kallocryl, Speiko®-Dr. Speier GmbH, Münster, Alemania). La piel del cuello se cerró con suturas. Durante la cirugía, la temperatura corporal se mantuvo mediante una almohadilla térmica. Para evitar infecciones postquirúrgicas, los monos fueron tratados localmente con betaisodona® (Mundipharma GmbH, Limburg, Alemania) y recibieron antibióticos de 1 ml (sc, Baytril® 2,5% Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Alemania). El tubo se llenó con la solución de tratamiento respectiva. Durante toda la administración se monitorizó el desarrollo del peso corporal del paradigma y el consumo de alimentos. Además, se tomaron muestras de sangre y aCSF una vez a la semana para determinar alteraciones tanto hematológicas como inmunológicas pero también concentraciones sistémicas de ASO. El último día, se sacrificaron los animales del estudio principal y se extirparon los órganos (hígado, riñones, cerebro) y se analizaron para determinar la proliferación, apoptosis, eliminación de ARNm y formación de tumores. Después de la semana 57, los animales adicionales utilizados para investigar los períodos de recuperación también se sacrificaron y se determinaron los mismos parámetros de lectura.

Tabla 80. Condiciones de tratamiento y los animales por grupo para el estudio de toxicidad GLP de 4 semanas y para el período de recuperación adicional de 4 semanas.

Tratamiento condición	Estudio principal		Período de recuperación de 4 semanas	
	Machos [n]	Hembras [n]	Machos [n]	Hembras [n]
Vehículo	3	3	2	2
ASO _{bajo}	3	3	/	/
ASO _{alto}	3	3	2	2

[0448] Los resultados del presente estudio demuestran que una administración de ASO intracerebroventricular crónica es una medicación no tóxica y segura para el tratamiento de una variedad de enfermedades diferentes.

Ejemplo 26: Determinación de la estabilidad y la actividad biológica de un oligonucleótido antisentido en diferentes soluciones de vehículo

[0449] Para investigar, si hay algún efecto de interacción de los oligonucleótidos antisentido (Seq. ID No. 218b, Seq. ID No. 218c) y la solución de infusión, se realizó un experimento previo de 29 días. Por lo tanto, los dos ASO se reconstituyeron en diferentes soluciones de vehículos libres de endotoxinas (PBS, agua para inyección [WFI], 0,9% de NaCl) y se almacenaron en diferentes condiciones, respectivamente. Las muestras se recolectaron cada semana y se analizaron para determinar el valor de pH, la estabilidad de ASO, el contenido y la integridad mediante AEX-HPLC. Cualquier cambio en las condiciones de eficacia se ensayó demostrando la potencia de la eliminación del ARNm de TGF-R_{II} en el ensayo de cultivo celular con cada muestra, respectivamente.

Descripción del método:

[0450] Las ASO liofilizadas se diluyeron con la solución de vehículo respectiva (Agua para inyección, NaCl al 0,9%, PBS) en condiciones estériles (flujo laminar, BOWIZARD Golden GL-170 Ergoscience®, condiciones S1). Las copas Eppendorf de 1,5 ml se marcaron y se llenaron con 100 µl (AEX-HPLC) o 250 µl (eliminación directa) de la solución ASO respectiva (todas las etapas bajo flujo laminar, BOWIZARD Golden GL-170 Ergoscience®, condiciones S1, ver pipeteo/esquema de etiquetado tabla 81). En el siguiente paso, todas las muestras se almacenaron en sus respectivas condiciones de almacenamiento y las muestras se recolectaron cada semana (ver tabla de esquema de muestreo 82) y se almacenaron a -80°C hasta el análisis.

Tabla 81: Esquema de etiquetado para el estudio de estabilidad de vehículo de ASO. El esquema de etiquetado se realizó para Seq. ID No. 218b y Seq. ID No. 218c (cada 10 µM y 0,24 µM) y para los tres vehículos WFI, NaCl al 0,9% y PBS (=> 12 esquemas diferentes).

Etiqueta	Vehículo (WFI, 0,9%NaCL o PBS)	Condición	Día					24	29
			0	6	12	18	18		
ASO [10 µM]	X	Línea de base	ASO [10 µM] X_ Línea de base						
ASO [10 µM]	X	-20°C		ASO [10 µM] X_ 20°C_ Día 6	ASO [10 µM] X_ 20°C_ Día 12	ASO [10 µM] X_ 20°C_ Día 18	ASO [10 µM] X_ 20°C_ Día 24	ASO [10 µM] X_ 20°C_ Día 29	
ASO [10 µM]	X	+4°C		ASO [10 µM] X_ +4°C_ Día 6	ASO [10 µM] X_ +4°C_ Día 12	ASO [10 µM] X_ +4°C_ Día 18	ASO [10 µM] X_ +4°C_ Día 24	ASO [10 µM] X_ +4°C_ Día 29	
ASO [10 µM]	X	+20°C		ASO [10 µM] X_ +20°C_6	ASO [10 µM] X_ +20°C_ Día 12	ASO [10 µM] X_ +20°C_ Día 18	ASO [10 µM] X_ +20°C_ Día 24	ASO [10 µM] X_ +20°C_ Día 29	
ASO [10 µM]	X	+37°C		ASO [10 µM] X_ +37°C_ Día 6	ASO [10 µM] X_ +37°C_ Día 12	ASO [10 µM] X_ +37°_Día 18	ASO [10 µM] X_ +37°_Día 24	ASO [10 µM] X_ +37°C_ Día 29	
ASO [10 µM]	X	+40°C		ASO [10 µM] X_ 40°C_ Día 6	ASO [10 µM] X_ 40°C_ Día 12	ASO [10 µM] X_ 40°C_ Día 18	ASO [10 µM] X_ 40°C_ Día 24	ASO [10 µM] X_ 40°C_ Día 29	
ASO [10 µM]	X	valor de pH	ASO [10 µM] X_pH valor_ Día 0					ASO [10 µM] X_pH value_ Día 29	
ASO [0,24 µM]	X	Línea de base	ASO [0,24 µM] X_ Línea de base						
ASO [0,24 µM]	X	-20°C		ASO [0,24 µM] X_ 20°C_ Día 6	ASO [0,24 µM] X_ 20°C_ Día 12	ASO [0,24 µM] X_ 20°C_ Día 18	ASO [0,24 µM] X_ 20°C_ Día 24	ASO [0,24 µM] X_ 20°C_ Día 29	
ASO [0,24 µM]	X	+4°C		ASO [0,24 µM] X_ +4°C_ Día 6	ASO [0,24 µM] X_ +4°C_ Día 12	ASO [0,24 µM] X_ +4°C_ Día 18	ASO [0,24 µM] X_ +4°C_ Día 24	ASO [0,24 µM] X_ +4°C_ Día 29	

(continúa)

Etiqueta	Vehículo (WFI, 0,9%NaCl o PBS)	Condición	Día					
			0	6	12	18	24	29
ASO [0,24 μM]	X	+20°C		ASO [0,24 μM] X_ +20°C_ Día 6	ASO [0,24 μM] X_ +20°C_ Día 12	ASO [0,24 μM] X_ +20°C_ Día 18	ASO [0,24 μM] X_ +20°C_ Día 24	ASO [0,24 μM] X_ +20°C_ Día 29
ASO [0,24 μM]	X	+37°C		ASO [0,24 μM] X_ +37°C_ Día 6	ASO [0,24 μM] X_ +37°C_ Día 12	ASO [0,24 μM] X_ +37°C_ Día 18	ASO [0,24 μM] X_ +37°C_ Día 24	ASO [0,24 μM] X_ +37°C_ Día 29
ASO [0,24 μM]	X	+40°C		ASO [0,24 μM] X_ 40°C_ Día 6	ASO [0,24 μM] X_ 40°C_ Día 12	ASO [0,24 μM] X_ 40°C_ Día 18	ASO [0,24 μM] X_ 40°C_ Día 24	ASO [0,24 μM] X_ 40°C_ Día 29
ASO [0,24 μM]	X	valor de pH	ASO [0,24 μM] X_pH valor_ Día 0					ASO [0,24 μM] X_pH value_ Día 29

Tabla 82: Esquema de recolección para el estudio de estabilidad de vehículo de ASO. El esquema de recolección se realizó para Seq. ID No. 218b y Seq. ID No. 218c (cada 10 μM y 0,24 μM) y para los tres vehículos WFI, NaCl al 0,9% y PBS (=> 12 esquemas diferentes).

Muestra	Día					
	0	6	12	18	24	29
Condición						
Línea de base	X					
-20°C		X	X	X	X	X
+4°C		X	X	X	X	X
+20°C		X	X	X	X	X
+37°C		X	X	X	X	X
+40°C		X	X	X	X	X
Valor de pH	X					X

[0451] Dado que no hubo efectos de ninguna de las soluciones del vehículo en la estabilidad, el contenido y la integridad de la Seq. ID No. 218b y Seq. ID No. 218c, se usó NaCl al 0,9% para el experimento de estabilidad de uso ASO-in.

Ejemplo 27: Determinación de la estabilidad en uso y la actividad biológica de oligonucleótidos antisentido de la invención (ASO) en solución de vehículo

[0452] Para investigar si hay algún efecto de interacción de los oligonucleótidos antisentido (ASO) (Seq. ID No. 218b, Seq. ID No. 218c) y una bomba de presión de gas o un catéter, fue realizado un experimento previo de 29 días. Por lo tanto, los dos ASO se reconstituyeron en NaCl al 0,9% y la bomba y el catéter se llenaron de acuerdo con la descripción del fabricante. Las muestras se recolectaron cada semana y se analizaron para determinar el valor de pH, microbiología y estabilidad, contenido e integridad del oligo mediante AEX-HPLC. También se ensayó cualquier cambio en las condiciones de eficacia mediante la prueba de la potencia para eliminar el ARNm de TGF-R_{II} en un ensayo de cultivo celular con cada muestra, respectivamente.

Descripción del método:

[0453] Las ASO liofilizadas se diluyeron con NaCl al 0,9% en condiciones estériles (flujo laminar, BIOWIZARD

Golden GL-170 Ergoscience®, condiciones S1). Las copas Eppendorf de 5 ml se marcaron según el esquema de etiquetado (consulte la tabla 83) en condiciones estériles (flujo laminar, BLOWIZARD Golden GL-170 Ergoscience, condiciones S1). Las dos bombas de presión de gas (Tricumed Model IP-2000 V®) y el catéter (conjunto de catéter espinal 4000) se llenaron de acuerdo con la descripción del fabricante con la solución ASO respectiva (todos los pasos bajo flujo laminar, BLOWIZARD Golden GL-170 Ergoscience®, condiciones S1, consulte la tabla de esquemas de pipeteo/etiquetado 83). En el siguiente paso, la bomba se conectó al catéter que se conectó a la tapa de una Copa Eppendorf de 5 ml y las Copas restantes se almacenaron en una caja de almacenamiento con todas las aberturas cerradas con Parafilm®, para evitar cualquier contaminación. Cada semana, las muestras se recolectaron, se almacenaron a -80°C hasta que el análisis y el catéter conectado a la tapa de una Copa Eppendorf de 5 ml se transfirieron a la Copa siguiente para continuar con el procedimiento de muestreo. Además, se tomó una muestra directamente de la bomba a través del puerto de bolo y se almacenó a -80°C. El último día, se recogió una muestra adicional para el análisis microbiológico.

Tabla 83: Esquema de etiquetado para el estudio de estabilidad en uso de ASO. El esquema de etiquetado se realizó para Seq. ID No. 218b y Seq. ID No. 218c (cada 0,24 µM). PS: (Muestra de bomba: muestra directamente desde el catéter), AS: (Muestra adicional: muestra directamente desde el reservorio dentro de la bomba a través del puerto de bolos, MB: (MicroBiología: 500 µM desde PS y AS)

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

Muestra	Día							
	Oligo	Copa	Condición	0	6	12	18	24
5 Seq, ID No, 218b [0,24 mM]	5ml	PS	Seq, ID No, 218b [10 μM] Línea de base	Seq, ID No, 218b +37°C PS_Día 6	Seq, ID No, 218b +37°C PS_Día 12	Seq, ID No, 218b +37°C PS_Día 18	Seq, ID No, 218b +37°C PS_Día 24	Seq, ID No, 218b +37°C PS_Día 29
10 Seq, ID No, 218b [0,24 μM]	5 ml	AS		Seq, ID No, 218b +37°C AS_Día 6	Seq, ID No, 218b +37°C AS_Día 12	Seq, ID No, 218b +37°C AS_Día 18	Seq, ID No, 218b +37°C AS_Día 24	Seq, ID No, 218b +37°C AS_Día 29
15 Seq, ID No, 218b [0,24 μM]	5 ml	MB						Seq, ID No, 218b +37°C MB_Día 29
20 Seq, ID No, 218b [0,24 μM]	5 ml	valor pH	Seq, ID No, 218b valor pH Día 0					Seq, ID No, 218b valor pH Día 29
25 Seq, ID No, 218c [0,24 mM]	5 ml	PS	Seq, ID No, 218c Línea de base	Seq, ID No, 218c +37°C PS_Día 6	Seq, ID No, 218c +37°C PS_Día 12	Seq, ID No, 218c +37°C PS_Día 18	Seq, ID No, 218c +37°C PS_Día 24	Seq, ID No, 218c +37°C PS_Día 29
30 Seq, ID No, 218c [0,24 μM]	5 ml	AS		Seq, ID No, 218c +37°C AS_Día 6	Seq, ID No, 218c +37°C AS_Día 12	Seq, ID No, 218c +37°C AS_Día 18	Seq, ID No, 218c +37°C AS_Día 24	Seq, ID No, 218c +37°C AS_Día 29
35 Seq, ID No, 218c [0,24 mM]	5 ml	MB						Seq, ID No, 218c +37°C MB_Día 29
40 Seq, ID No, 218c [0,24 mM]	5 ml	valor pH	Seq, ID No, 218c valor pH Día 0					Seq, ID No, 218c valor pH Día 29

50 **Tabla 84: Esquema de recolección para el estudio de estabilidad en uso de ASO.** El esquema de recolección se realizó para Seq. ID No. 218b y Seq. ID No. 218c (0,24 mM). PS: (Muestra de bomba: muestra directamente desde el catéter), AS: (Muestra adicional: muestra directamente desde el reservorio dentro de la bomba a través del puerto de bolos, MB: (MicroBiología: 500 μM desde PS y AS)

Muestra	Día							
		Copa	Condición	0	6	12	18	24
5 ml	Línea de base	X						
5 ml	PS		X	X	X	X	X	X
5 ml	AS		X	X	X	X	X	X
5 ml	MB							X
5 ml	Valor de pH	X						X

[0454] Dado que no hubo efectos de la bomba y el catéter sobre la estabilidad, el contenido y la integridad de la Seq. ID No. 218b y Seq. ID No. 218c, y tampoco hubo problemas microbiológicos notables, este paradigma de aplicación representa la técnica óptima para la administración intratecal e intracerebroventricular en monos Cynomolgus y humanos.

Síntesis química

Abreviaturas

[0455]

Pybop:	(Benzotriazol-1-il-oxi)tripirrolidinofosfonio-hexafluorofosfato
DCM:	Diclorometano
DMF:	Dimetilformamida
DMAP:	4-Dimetilaminopiridina
DMT:	4,4'-dimetoxitritilo
LCAA:	Alquil Amino de cadena larga
TRIS:	Tris(hidroximetil)-aminometano
TRIS-HCl:	Clorhidrato de tris(hidroximetil)-aminometano
DEPC:	Dicarbonato de dietilo

Síntesis y purificación antisentido-oligonucleótido de gápmero

[0456] Los oligonucleótidos antisentido en forma de gápmeros se ensamblaron en un sintetizador ABI 3900 o en un sintetizador ABI 394, o en un Expedite™ (Applied Biosystems) de acuerdo con la química de la oligomerización de fosforamidita. En el ABI3900, el soporte sólido era poliestireno cargado con UnySupport (comprado en Glen Research, Sterling, Virginia, EE.UU.) Para proporcionar una escala de síntesis de 0,2 μmol. En el ABI 394, el soporte sólido era un vidrio de poro controlado (CPG) de 500 A cargado con Unylinker™ adquirido en Chemgenes (Wilmington, MA, EE.UU.) para proporcionar una escala de síntesis de 3 μmol.

[0457] Se obtuvieron reactivos de síntesis auxiliares tales como "Deblock", "Oxidizer", "CapA" y "CapB", así como ADN-fosforimitas, de SAFC Prologo (Hamburgo, Alemania).

Específicamente, los monómeros de 5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2'-O, 3'-O-(2-cianoetil-N,N-diisopropil)fosforamidita de deoxi timidina (dT), 4-N-benzoil-2'-desoxi-citidina (dC^{Bz}), 6-N-benzoil-2'-desoxi-adenosina (dABz) y 2-N-isobutiril-2'-deoxi-guanosina (dGiBu) se utilizaron como unidades de construcción de ADN. 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-metilen-N²-dimetilformamidina-guanosina-3'-[(2-cianoetil-N,N-diisopropil)fosforamidita (LNA-G^{DMF})], 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-metilen-timidina 3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]fosforamidita (LNA-Tb), 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-metileno-N⁶-benzoiladenosina-3'-[(2-cianoetil-N,N-diisopropil)fosforamidita (LNA-A^{Bz})], 5'-O-DMT-2'-O, 4' -C-metilen-5-metil-N⁴-benzoilcididina-3'-[(2-cianoetil-N,N-diisopropil)fosforamidita (LNA-C^{Bz})] se utilizaron como unidades de construcción de LNA. Las fosforamiditas de LNA se adquirieron en Exiqon (Vebaek, Dinamarca).

[0458] Como se muestra en los ejemplos de los LNA en la tabla 85, las fosforamiditas se disolvieron en acetonitrilo seco para dar un oligonucleótido 0,07 M, excepto LNA-C^{Bz}, que se disolvió en una mezcla de THF/acetonitrilo (25/75 (v/v)).

Tabla 85:

	Peso molecular g/mol	CAS N°	Disolvente	Para obtener una solución de 0,07 M 100 mg
LNA-ABz	885,9	[206055-79-0]	Acetonitril anhidro	1,6 ml
LNA-C ^{Bz}	875,9	[206055-82-5]	THF/Acetonitril 25/75 (v/v)	1,6 ml
LNA-G ^{DMF}	852,9	[709641-79-2]	Acetonitril anhidro	1,7 ml
LNA-T	772,8	[206055-75-6]	Acetonitril anhidro	1,8 ml

[0459] Los β-D-tio-LNA 5'-O-DMT-2'-desoxi-2'-mercapto-2'-S,4'-C-metilen-N⁶-benzoiladenosina-3'-[(2-cianoetil-N,N-diisopropil)]-fosforamidita, 5'-O-DMT-2'-deoxi-2'-mercapto-2'-S, 4'-C-metileno-5-metil-N⁴-benzoilcitiidina-3'-[(2-cianoetil-N,N-diisopropil)]fosforamiditas, 5'-O-DMT-2'-deoxi-2'-mercapto-2'-S,4'-C-metileno-N²-dimetilformamidineguanosina-3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita, 5'-O-DMT-2'-deoxi-2'-mercapto-2'-S, 4'-C-metilen-timidina-3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita, y 5'-O-DMT-2'-deoxi-2'-amino-2'-N, 4'-C-metileno-N⁶-benzoiladenosina-3'-[(2-cianoetil-N,N-diisopropil)]fosforamiditas se sintetizaron como se describe en J. Org. Chem. 1998, 63, 6078 - 6079.

[0460] La síntesis de la β-D-amino-LNA 5'-O-DMT-2'-deoxi-2'-amino-2'-N, 4'-C-metilen-5-metil-N⁴-benzoílo-citidina-3'-[(2-cianoetil-N,N-diisopropil)]-fosforamiditas, 5'-O-DMT-2'-deoxi-2'-amino-2'-N, 4'-C-metileno-N²-dimetilformamidineguanosina-3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita, 5'-O-DMT-2'-deoxi-2'-amino-2'-N, 4'-C-

metilen-timidina-3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita, 5'-O-DMT-2'-deoxi-2'-metilamino-2'-N, 4'-C-metileno-N⁶-benzoiladenosina-3'-[(2-cianoetil-N,N-diisopropil)]-fosforamidita y 5'-O-DMT-2'-deoxi-2'-metilamino-2'-N, 4'-C-metileno-5-metil-N⁴-benzoilcitidina-3'-(2-cianoetil-N,N-diisopropil)fosforamiditas, 5'-O-DMT-2'-desoxi-2'-metilamino-2'-N, 4'-C-metilen-N²-dimetilformamidineguanosina-3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita 5'-O-DMT-2'-desoxi-2'-metilamino-2'-N, 4'-C-metilen-timidina-3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita se llevaron a cabo de acuerdo con al procedimiento de literatura (J. Org Chem. 1998, 63, 6078 - 6079).

[0461] Los α -L-oxi-LNAs α -L-5'-O-DMT-2'-O,4'-C-metileno-N⁶-benzoiladenosina-3'-(2-cianoetil-N,N-diisopropil)fosforamidita, α -L-5'-O-DMT-2'-O,4'-C-metileno-5-metil-N⁴-benzoilcitidina-3'-(2-cianoetil-N,N-diisopropil)fosforamidita, α -L-5'-O-DMT-2'-O,4'-C-metileno-N²-dimetilformamidineguanosina-3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita y α -L-5'-O-DMT-2'-O,4'-C-metilen-timidina-3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)] la fosforamidita se realizó de manera similar a los procedimientos descritos en la literatura (J. Am. Chem. Soc. 2002, 124, 2164-2176; Angew. Chem. Int. Ed. 200, 39, 1656 - 1659).

[0462] Los (β -benzoilmercapto)etilpirrolidinoltiofosforamiditas para la síntesis del oligonucleótido con esqueleto de fosforotioato se prepararon en analogía al protocolo informado por Caruthers (J. Org. Chem. 1996, 61, 4272-4281).

[0463] Las "fosforamiditas-C3" (3-(4,4'-Dimetoxitritiloxi)propil-1-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita y el "3'-espaciador C3 CPG" (1-Dimetoxitritiloxi-propanodiol-3-succinoil)-alquilamino-CPG de cadena larga se compraron en Glen Research.

Procedimiento general

Preparación del soporte sólido de LNA:

1) Preparación del hemiéster de succinil LNA (documento WO2007/112754)

[0464] Se disolvieron 5'-O-DMT-3'-hidroxi-nucleósido monómero, anhídrido succínico (1,2 eq.) y DMAP (1,2 eq.) En 35 ml de diclorometano (DCM). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Después de las extracciones con NaH₂PO₄ 0,1 M pH 5,5 (2x) y salmuera (1x), la capa orgánica se secó adicionalmente con NaSO₄ anhidro, se filtró y se evaporó. El derivado de hemiéster se obtuvo con un rendimiento del 95% y se usó sin ninguna purificación adicional.

2) Preparación del soporte de LNA (documento WO2007/112754)

[0465] El derivado de hemiéster preparado anteriormente (90 μ mol) se disolvió en una cantidad mínima de DMF, DIEA y pyBOP (90 μ mol) se añadieron y se mezclaron juntos durante 1 minuto. Esta mezcla preactivada se combinó con LCAA-CPG (500 Å, tamaño de malla 80-120, 300 mg) en un sintetizador manual y se agitó. Después de 1,5 horas a temperatura ambiente, el soporte se filtró y se lavó con DMF, DCM y MeOH. Después del secado, se determinó que la carga era de 57 μ mol/g (ver Tom Brown, Dorcas JS Brown. Métodos modernos de síntesis de oligodeoxirribonucleótidos asistidos por máquina. En: F.Eckstein, editor. Oligonucleotides and 35 Analogues A Practical Approach. Oxford: IRL Press, 1991:13-14).

Alargamiento del oligonucleótido (acoplamiento)

[0466] Se empleó 5-etiltio-1H-tetrazol (ETT) como activador (0,5 M en acetonitril) para el acoplamiento de las fosforamiditas. En lugar de ETT, se pueden usar otros reactivos, como el 4,5-dicianoimidazol (DCI), como se describe en el documento WO2007/112754, 5-benciltio-1H-tetrazol o sacarina-1-metilimidazol como activador. Se utilizó DCI 0,25 M en acetonitril para el acoplamiento con LNA.

Tapado

[0467] Se añadió anhídrido acético al 10% (AC₂O) en THF (grado HPLC) y N-metilimidazol al 10% (NMI) en THF/piridina (8:1) (grado HPLC) y se dejó reaccionar.

Oxidación

[0468] El fósforo (III) al fósforo (V) se realiza normalmente con, por ejemplo, yodo/THF/piridina/H₂O utilizando yodo 0,02 M en THF/piridina/H₂O comprado en Glen Research o 0,5 M 1S)-(-)-camforsulfonil)-oxaziridina (CSO) en acetonitril anhidro de Glen Research.

[0469] En el caso de que se prepare un enlace internucleósido de fosforioato, se realiza una etapa de tiolación utilizando una solución de 0,05 M de 3-((dimetilamino-metiliden)amino)-3H-1,2,4-ditiazol-3-tiona (DDTT, obtenido de Chem-genes (Wilmington, MA, EE.UU.) en acetonitril/piridina anhidra (1:1 v/v). En el caso de que se usen LNA, la tiolación se llevó a cabo con 0,2 M 3,H-1,2-benzotiol-3-ona 1,1-dióxido (reactivo de Beaucage) en acetonitril anhidro. En general, la tiolación también se puede llevar a cabo utilizando cloruro de xantano (0,01 M en acetonitril/piridina al

10%) como se describe en el documento WO2007/112754.

Alternativamente, se pueden aplicar otros reactivos para la etapa de tiolación, como el hidruro de xantano (5-imino-(1,2,4)ditiiazolidina-3-tiona), disulfuro de fenilacetil (PADS).

- 5 **[0470]** En el caso de que se sintetizara un fosforitoato, el triéster de tiofosfito resultante se oxidó al fosforotiotriéster mediante la adición de DDTT 0,05 M (3-((Dimetilamino-metilideno)amino)-3H-1,2,4-ditiazol-3-tiona) en piridina/acteonitrilo (4:1 v/v).

10 Escisión del soporte sólido y desprotección.

- 10 **[0471]** Al final de la síntesis en fase sólida, el oligonucleótido antisentido puede ser escindido "DMT-activado" o "DMT-desactivado". "DMT desactivado" significa que el grupo 5'-O-(4,4'-dimetoxitritil) final se eliminó en el sintetizador usando el reactivo "Deblock" y DMT-activado significa que el grupo está presente mientras el oligonucleótido se escinde del sólido soporte. Los grupos DMT se eliminaron con ácido tricloroacético.

15 "DMT-desactivado"

- 20 **[0472]** Una vez completada la síntesis en fase sólida, los oligonucleótidos antisentido se trataron con una solución de dietilamina al 20% en acetonitril (Biosolve BV, Valkenswaard, Países Bajos) durante 20 min. para eliminar los grupos protectores de cianoetil en el esqueleto de fosfato. Posteriormente, los oligonucleótidos antisentido se escindieron del soporte sólido y se desprotegeron usando 1 a 5 mL de amoníaco acuoso concentrado (obtenido de Sigma Aldrich) durante 16 horas a 55°C. El soporte sólido se separó de los oligonucleótidos antisentido mediante filtración o centrifugación.

- 25 **[0473]** Si los oligonucleótidos contienen triéster de fosforoditioato, los grupos tiol se desprotegeron con tiofenol: trietilamina: dioxano, 1:1:2, v/v/v durante 24 h, luego los oligonucleótidos se escindieron del soporte sólido utilizando amoníaco acuoso durante 1-2 horas a temperatura ambiente, y se desprotegeron adicionalmente durante 4 horas a 65°C.

30 "DMT-activado"

- [0474]** Los oligonucleótidos se escindieron del soporte sólido usando amoníaco acuoso durante 1-2 horas a temperatura ambiente, y se desprotegeron adicionalmente durante 4 horas a 65°C. Los oligonucleótidos se purificaron mediante HPLC de fase inversa (RP-HPLC), y luego se eliminó el grupo DMT con ácido tricloroacético.

- 35 **[0475]** Si los oligonucleótidos contienen triéster de fosforoditioato, la escisión del soporte sólido y la eliminación del grupo tiol se realizaron mediante la adición de 850 µl de amoníaco en etanol concentrado (amoníaco/etanol 3:1 v/v) a 55°C durante 15 - 16h.

40 Grupos terminales

Grupos terminales en el extremo 5' del oligonucleótido antisentido

- 45 **[0476]** El oligonucleótido con soporte sólido se trató con ácido tricloroacético al 3% en diclorometano (p/v) para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT. Además, el compuesto se convirtió con un grupo terminal apropiado con un resto de cianoetil-N,N-diisopropil)fosforamidita. Después de la oxidación del fósforo (III) al fósforo (V), la desprotección, el desprendimiento del soporte sólido y la secuencia de desprotección se realizaron como se describe anteriormente.

50 Purificación

- 55 **[0477]** A continuación, los oligonucleótidos antisentido crudos se purificaron mediante cromatografía líquida de alto rendimiento de intercambio aniónico (HPLC) en un sistema AKTA Explorer (GE Healthcare, Freiburg, Alemania) y una columna empaquetada con la Fuente Q15 (GE Healthcare). El tampón A era perclorato sódico 10 mM, Tris 20 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4 y contenía 20% de acetonitril y el tampón B era el mismo que el tampón A, con la excepción del perclorato sódico 500 µM. Se empleó un gradiente de 15% de B a 55% de B dentro de 32 volúmenes de columna (CV). Se registraron trazas UV a 280 nm. Las fracciones apropiadas se agruparon y precipitaron con NaOAc 3 M, pH = 5,2 y etanol al 70%. Finalmente, el sedimento se lavó con etanol al 70%.

- 60 **[0478]** La identidad de los oligonucleótidos antisentido se confirmó mediante espectrometría de masas de ionización por electropulverización (ESI-MS) y la pureza se realizó mediante electroforesis capilar analítica OligoPro (CE).

- 65 **[0479]** La purificación del ditioato se realizó en un instrumento Amersham Biosciences P920 FPLC equipado con una columna Mono Q 10/100 GL. Los tampones se prepararon con agua tratada con DEPC, y sus composiciones fueron las siguientes: Tampón A: Tris-HCl 25 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0; Tampón B: Tris-HCl 25 mM, EDTA 1 mM, NaCl 1 M, pH 8,0.

Ejemplo 28

Gb¹sTb¹sdAsdGsdTsdGsdTsdTsdTsdAsdGsdGsdGsAb¹sGb¹sC*b¹ (Seq. ID No. 209y)

5 **[0480]** 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-metilen-5-metil-N⁴-benzoxilcitolidina-3'-O-succinoil unido a LCAA CPG (0,2 μmol) se trató con 1400 μl 3 % de ácido tricloroacético en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT. Después de varios lavados con una cantidad total de 800 μl de acetonitril, la reacción de acoplamiento se llevó a cabo con 80 μl de 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-metilen-N²-dimetilformamidineguanosina-3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforomidita (0,07 M) y 236 μl de DCI en acetonitril (0,25 M). Se dejó que la reacción de acoplamiento tuviera lugar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 μl de acetonitril, y se insertaron 640 μl de Beaucage (0,2 M) en la columna durante 180 segundos. El sistema se lavó con 320 μl de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 μl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 μl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 μl de acetonitril. El compuesto se trató con 1.400 μl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.

20 **[0481]** El acoplamiento se llevó a cabo con 80 μl de 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-metileno-N⁶-benzoidenosina-3'-(2-cianoetil-N,N-diisopropil)fosforamiditas (0,07 M) y 236 μl de DCI en acetonitril (0,25 M). Se dejó que la reacción de acoplamiento tuviera lugar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 μl de acetonitril, y se insertaron 640 μl de Beaucage (0,2 M) en la columna durante 180 segundos. El sistema se lavó con 320 μl de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 μl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 μl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 μl de acetonitril. El compuesto se trató con 1.400 μl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.

25 **[0482]** El acoplamiento se realizó con 80 μl de 5'-O-DMT-N²-isobutiril-2'-desoxiguanosina-3'-(2-cianoetil-N,N-diisopropil)fosforamiditas (0,07 M) y 236 ml DCI en acetonitril (0,25 M). Se dejó que la reacción de acoplamiento tuviera lugar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 μl de acetonitril, y se insertaron 640 μl de Beaucage (0,2 M) en la columna durante 180 segundos. El sistema se lavó con 320 μl de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 μl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 μl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 μl de acetonitril. El compuesto se trató con 1.400 μl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.

30 **[0483]** El acoplamiento se realizó con 80 μl de 5'-O-DMT-N²-isobutiril-2'-desoxiguanosina-3'-(2-cianoetil-N,N-diisopropil)fosforamiditas (0,07 M) y 236 μl DCI en acetonitril (0,25 M). La reacción de acoplamiento se dejó realizar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 μl de acetonitril, y se insertaron 640 ml de Beaucage (0,2 M) en la columna durante 180 s. El sistema se lavó con 320 μl de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 μl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 μl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 μl de acetonitril. El compuesto se trató con 1.400 μl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.

35 **[0484]** El acoplamiento se realizó con 80 μl de 5'-O-DMT-N²-isobutiril-2'-desoxiguanosina-3'-(2-cianoetil-N,N-diisopropil)fosforamiditas (0,07 M) y 236 μl DCI en acetonitril (0,25 M). Se dejó que la reacción de acoplamiento tuviera lugar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 μl de acetonitril, y se insertaron 640 μl de Beaucage (0,2 M) en la columna durante 180 segundos. El sistema se lavó con 320 μl de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 μl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 μl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 μl de acetonitril. El compuesto se trató con 1.400 μl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.

40 **[0485]** El acoplamiento se realizó con 80 μl de 5'-O-DMT-N⁶-benzoidenosina-3'-(2-cianoetil-N,N-diisopropil)fosforamidita (0,07 M) y 236 μl DCI en acetonitril (0,25 M). Se dejó que la reacción de acoplamiento tuviera lugar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 μl de acetonitril, y se insertaron 640 μl de Beaucage (0,2 M) en la columna durante 180 segundos. El sistema se lavó con 320 μl de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 μl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 μl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 μl de acetonitril. El compuesto se trató con 1.400 μl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.

45 **[0486]** El acoplamiento se llevó a cabo con 80 μl de 5'-O-DMT-2'-desoxitimidina-3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita (0,07 M) y 236 ml de DCI en acetonitril (0,25 M). Se dejó que la reacción de acoplamiento tuviera lugar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 μl de acetonitril, y se insertaron 640 μl de Beaucage (0,2 M) en la columna durante 180 segundos. El sistema se lavó con 320 μl de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 μl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 μl de N-metilimidazol

(NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 µl de acetonitril. El compuesto se trató con 1.400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.

5 **[0487]** El acoplamiento se llevó a cabo con 80 µl de 5'-O-DMT-2'-desoxitimidina-3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita (0,07 M) y 236 ml de DCI en acetonitril (0,25 M). Se dejó que la reacción de acoplamiento tuviera lugar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 µl de acetonitril, y se insertaron 640 µl de Beaucage (0,2 M) en la columna durante 180 segundos. El sistema se lavó con 320 µl de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 µl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 µl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 µl de acetonitril. El compuesto se trató con 1.400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.

15 **[0488]** El acoplamiento se llevó a cabo con 80 µl de 5'-O-DMT-2'-desoxitimidina-3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita (0,07 M) y 236 µl de DCI en acetonitril (0,25 M). Se dejó que la reacción de acoplamiento tuviera lugar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 µl de acetonitril, y se insertaron 640 µl de Beaucage (0,2 M) en la columna durante 180 segundos. El sistema se lavó con 320 µl de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 µl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 µl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 µl de acetonitril. El compuesto se trató con 1.400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.

25 **[0489]** El acoplamiento se llevó a cabo con 80 µl de 5'-O-DMT-N²-isobutiril-2'-desoxiguanosina-3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamiditas (0,07 M) y 236 µl DCI en acetonitril (0,25 M). Se dejó que la reacción de acoplamiento tuviera lugar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 µl de acetonitril, y se insertaron 640 µl de Beaucage (0,2 M) en la columna durante 180 segundos. El sistema se lavó con 320 µl de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 µl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 µl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 µl de acetonitril. El compuesto se trató con 1.400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.

35 **[0490]** El acoplamiento se llevó a cabo con 80 µl de 5'-O-DMT-2'-desoxitimidina-3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita (0,07 M) y 236 µl de DCI en acetonitril (0,25 M). Se dejó que la reacción de acoplamiento tuviera lugar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 µl de acetonitril, y se insertaron 640 µl de Beaucage (0,2 M) en la columna durante 180 segundos. El sistema se lavó con 320 µl de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 µl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 µl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 µl de acetonitril. El compuesto se trató con 1.400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.

40 **[0491]** El acoplamiento se realizó con 80 µl de 5'-O-DMT-N²-isobutiril-2'-desoxiguanosina-3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]fosforamidita (0,07 M) y 236 µl DCI en acetonitril (0,25 M). Se dejó que la reacción de acoplamiento tuviera lugar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 µl de acetonitril, y se insertaron 640 µl de Beaucage (0,2 M) en la columna durante 180 segundos. El sistema se lavó con 320 µl de acetonitril. Para la etapa de tapado, 448 µl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 µl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) se añadieron y se dejaron reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 µl de acetonitril. El compuesto se trató con 1.400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.

50 **[0492]** El acoplamiento se llevó a cabo con 80 µl de 5'-O-DMT-N⁶-benzoi-2'-desoxiadenosina-3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]fosforamiditas (0,07 M) y 236 µl DCI en acetonitril (0,25 M). Se dejó que la reacción de acoplamiento tuviera lugar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 µl de acetonitril, y se insertaron 640 µl de Beaucage (0,2 M) en la columna durante 180 segundos. El sistema se lavó con 320 µl de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 µl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 µl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 µl de acetonitril. El compuesto se trató con 1.400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.

60 **[0493]** El acoplamiento se llevó a cabo con 80 µl de 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-metileno timidina 3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropilo)]-fosforamidita (0,07 M) y 236 µl de DCI en acetonitril (0,25 M). Se dejó que la reacción de acoplamiento tuviera lugar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 µl de acetonitril, y se insertaron 640 µl de Beaucage (0,2 M) en la columna durante 180 segundos. El sistema se lavó con 320 µl de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 µl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 µl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 µl de acetonitril. El compuesto se trató con 1.400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.

[0494] El acoplamiento se llevó a cabo con 80 µl de 5'-O-DMT-2'-O-,4'-C-metileno-N²-dimetilformamidineguanosina-3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropilo)]-fosforamidita (0,07 M) y 236 µl de DCI en acetonitril (0,25 M). Se dejó que la reacción de acoplamiento tuviera lugar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 µl de acetonitril, y se insertaron 640 µl de Beaucage (0,2 M) en la columna durante 180 segundos. El sistema se lavó con 320 µl de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 µl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 µl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 µl de acetonitril. El compuesto se trató con 1.400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.

[0495] Una vez completada la síntesis en fase sólida, los oligonucleótidos antisentido se trataron con una solución de dietilamina al 20% en acetonitril (Biosolve BV, Valkenswaard, Países Bajos) durante 20 minutos para eliminar los grupos protectores de cianoetil en el esqueleto de fosfato.

Posteriormente, los oligonucleótidos antisentido se escindieron del soporte sólido y se desprotegeron adicionalmente con 5 mL de amoniaco acuoso concentrado durante 16 horas a 55°C. El soporte sólido se separó de los oligonucleótidos antisentido mediante filtración o centrifugación.

[0496] A continuación, los oligonucleótidos antisentido crudos se purificaron mediante cromatografía líquida de alto rendimiento de intercambio aniónico (HPLC) en un sistema AKTA Explorer (GE Healthcare, Freiburg, Alemania) y una columna empaquetada con Source Q15 (GE Healthcare). El tampón A era perclorato sódico 10 mM, Tris 20 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4 y contenía 20% de acetonitril y el tampón B era el mismo que el tampón A, con la excepción del perclorato sódico 500 µM. Se empleó un gradiente de 15% de B a 55% de B dentro de 32 volúmenes de columna (CV). Se registraron trazas UV a 280 nm. Las fracciones apropiadas se agruparon y precipitaron con NaOAc 3 M, pH = 5,2 y etanol al 70%. Finalmente, el sedimento se lavó con etanol al 70%. El oligonucleótido antisentido se recibió con una pureza del 93,7%. ESI-MS: experimental: 5387,3 Da; calculado: 5387,80 da.

Ejemplo 29

Gb¹Tb¹dAdGdTdGdTdAdGdGdGAb¹Gb¹C*b¹ (Seq. ID No. 209u)

[0497] El LNA se unió a CPG de acuerdo con el procedimiento general. La reacción de acoplamiento y la etapa de cobertura también se llevaron a cabo como se describe en el ejemplo 28. Después de la etapa de cobertura, el sistema se lavó con 800 µl de acetonitril y se insertaron 400 µl de yodo 0,02 M en THF/piridina/H₂O en la columna para 45 s. El sistema se lavó después de la etapa de oxidación con 24 µl de acetonitril. Después de la purificación, el oligonucleótido antisentido se recibió con una pureza del 95,3%. ESI-MS: experimental: 5146,80 Da; calculado: 5146,4 da.

Ejemplo 30

/5SpC₃s/Gb¹sTb¹sdAsdGsdTsdGsdTsdTsdAsdGsdGsdGsAb¹sGb¹sC*b¹ (Seq. ID No. 209v)

[0498] El compuesto se sintetizó de acuerdo con el procedimiento general con las unidades de construcción de ADN y LNA apropiadas, como se ejemplifica en el Ejemplo 28. Pero con la excepción de que después del último nucleótido se ha acoplado al oligonucleótido y los pasos subsiguientes de oxidación y tapado se llevaron a cabo, se agregaron 80 µl de fosforamidita-C3 (0,07 M) y 236 µl de DCI en acetonitril (0,25 M). Se permitió que el acoplamiento tuviera lugar durante 250 segundos, y un exceso de reactivos se eliminó rápidamente con 800 µl de acetonitril. Los pasos subsiguientes se realizaron como se describe en el ejemplo 28. Después de la purificación, el oligonucleótido antisentido se recibió con una pureza del 97,4%. HRMS (ESI): experimental: 5540,70 Da; calculado: 5541,4 da.

Ejemplo 31

Gb¹sTb¹sdAsdGsdTsdGsdTsdTsdAsdGsdGsdGsAb¹sGb¹sC*b¹/3SpC₃s/(Seq. ID No. 209w)

[0499] 3'-Espaciador C3 CPG (0,2 mmol) se trató con 1.400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT. Después de varios lavados con una cantidad total de 800 µl de acetonitril, la reacción de acoplamiento se llevó a cabo con 80 µl de 5'-O-DMT-2'-O-,4'-C-metileno-5-metil-N⁴-benzoilcitidina-3'-[(2-cianoetil-N,N-diisopropil)]-fosforamidita (0,07 M) y 236 µl de DCI en acetonitril (0,25 M). Se dejó que la reacción de acoplamiento tuviera lugar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 µl de acetonitril, y se insertaron 640 µl de Beaucage (0,2 M) en la columna durante 180 segundos. El sistema se lavó con 320 µl de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 µl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 µl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 µl de acetonitril. El compuesto se trató con 1.400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT. Las reacciones posteriores se realizaron como se describe en el ejemplo 28. Después de la purificación, se recibió el oligonucleótido antisentido con una pureza del 92,7%. ESI-sMS: experimental: 5541,70 Da; calculado: 5541,4 da.

Ejemplo 32**[0500]**

5 Gb¹ssTb¹ssAb¹ssdGssdTssdTssdTssdTssdTssdTssA*ssdTssdTssdTssGssAb¹ssGb¹ssC*b¹
 1 (Seq. ID No. 209an)

10 **[0501]** 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-metilen-5-metil-N⁴-benzoxilcitosina-3'-O-succinilo unido a LCAA CPG (0,2 mmol) se trató con 1.400 µl 3 % de ácido tricloroacético en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT. Después de varios lavados con una cantidad total de 800 µl de acetonitril, la reacción de acoplamiento se llevó a cabo con 38 µl de 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-metileno-N²-dimetilformamidineguanosina-3'-[(β-benzoilmercapto)etil]pirrolidinoltiofosforamidita (0,15 M) en diclorometano al 10% (v/v) en acetonitril y 236 µl de DCI en acetonitril (0,25 M). La reacción de acoplamiento se dejó llevar a cabo durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 µl de acetonitril y se insertaron 900 ml de DDTT (0,05 M en piridina/acetonitril 4:1 v/v) en la columna para 240 s. El sistema se enjuagó con 320 µl de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 µl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 µl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 µl de acetonitril. El compuesto se trató con 1.400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.

25 **[0502]** El acoplamiento se llevó a cabo con 38 µl de 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-metileno-N⁶-benzoiladenosina-3'-[(β-benzoilm-ercapto)etil]pirrolidinoltiofosforamidita (0,15). M) en diclorometano al 10% (v/v) en acetonitril y 236 µl de DCI en acetonitril (0,25 M). La reacción de acoplamiento se dejó llevar a cabo durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 µl de acetonitril y se insertaron 900 µl de DDTT (0,05 M en piridina/acetonitril 4:1 v/v) en la columna para 240 s El sistema se enjuagó con 320 µl de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 µl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 µl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 µl de acetonitril. El compuesto se trató con 1.400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.

30 **[0503]** El alargamiento adicional del oligonucleótido se realizó de la misma manera.

35 **[0504]** Una vez completada la síntesis en fase sólida, los oligonucleótidos antisentido se trataron con 850 µl de amoníaco en etanol concentrado (amoníaco/etanol 3:1 v/v) a 55°C durante 15 - 16 h para separar el oligonucleótido antisentido del soporte sólido y desproteger el grupo tiol.

40 **[0505]** A continuación, se purificó el oligonucleótido antisentido en bruto mediante cromatografía de intercambio aniónico usando una columna Mono Q 10/100 GL. Los tampones se prepararon con agua tratada con DEPC, y sus composiciones fueron las siguientes: Tampón A: Tris-HCl 25 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0; Tampón B: Tris-HCl 25 mM, EDTA 1 mM, NaCl 1 M, pH 8,0.

Ejemplo 33

45 Gb¹sTb¹sAb¹sdGsdTsdGsdTsdTsdAsdGsdGsGbsAb¹sGb¹sC*b¹ (Seq. ID No. 209az)

50 **[0506]** El compuesto se sintetizó de acuerdo con el procedimiento general con las unidades de construcción de ADN y LNA apropiadas, como se ejemplifica en el Ejemplo 28. Después de la purificación, el oligonucleótido antisentido se recibió con una pureza del 90,5%. ESI-MS: experimental: 5442,9 Da; calculado: 5443,3 da.

Ejemplo 34

Gb¹sTb¹sAb¹sGb¹sdTsdGsdTsdTsdAsdGsdGsGb¹sAb¹sGb¹sC*b¹ (Seq. ID No. 209ba)

55 **[0507]** El compuesto se sintetizó de acuerdo con el procedimiento general con las unidades de construcción de ADN y LNA apropiadas, como se ejemplifica en el Ejemplo 28. Después de la purificación, el oligonucleótido antisentido se recibió con una pureza del 89,4%. ESI-MS: experimental: 5469,9 Da; calculado: 5471,3 da.

Ejemplo 35

60 Gb¹sTb¹sAb¹sdGsdTsdGsdTsdTsdAsdGsdGsdAsGb¹sC*b¹ (Seq. ID No. 209bb)

65 **[0508]** El compuesto se sintetizó de acuerdo con el procedimiento general con las unidades de construcción de ADN y LNA apropiadas, como se ejemplifica en el Ejemplo 28. Después de la purificación, el oligonucleótido antisentido se recibió con una pureza del 88,4%. ESI-MS: experimental: 5386,5 Da; calculado: 5387,3 da.

Ejemplo 36

Gb¹Tb¹dAsdGsdTsdGsdTsdTsdTsdAsdGsdGsdGsAb¹Gb¹C*b¹ (Seq. ID No. 209s)

- 5 **[0509]** El compuesto se sintetizó de acuerdo con el procedimiento descrito en el ejemplo 28 y el ejemplo 29 con el ADN apropiado, los derivados del ADN y las unidades de construcción de LNA. Después de la purificación, el oligonucleótido antisentido se recibió con una pureza del 96,8%. ESI-MS: experimental: 5323,30 Da; calculado: 5323,0 da.

10 **Ejemplo 37**

Gb¹sTb¹sdA* sdGsdTsdGsdTsdTsdTsdA* sdGsdGsdGsAb¹sGb¹sC*b¹ (Seq. ID No. 209t)

- 15 **[0510]** El compuesto se sintetizó de acuerdo con el procedimiento general y como se describe en el ejemplo 28 con las unidades de construcción de ADN y LNA apropiadas. Después de la purificación, el oligonucleótido antisentido se recibió con una pureza del 91,4%. ESI-MS: experimental: 5416.30 Da; calculado: 5417,3 da.

Ejemplo 38

20 /5SpC3s/Gb¹sTb¹sdAsdGsdTsdGsdTsdTsdTsdAsdGsdGsdGsAb¹sGb¹sC*b¹/3SpC3 s/ (Seq. ID No. 209x)

- 25 **[0511]** El compuesto se sintetizó de acuerdo con el procedimiento general con las unidades de construcción de ADN y LNA apropiadas, como se ejemplificó en el ejemplo 28, el ejemplo 30 y el ejemplo 31. Después de la purificación, el oligonucleótido antisentido se recibió con una pureza del 95,1%. ESI-MS: experimental: 5696,30 Da; calculado: 5695,5 da.

Ejemplos 39 - 132

- 30 **[0512]** Los otros oligonucleótidos de la Tabla 6 se sintetizaron de acuerdo con el procedimiento general y como se muestra en los ejemplos. La preparación del oligonucleótido antisentido que incluye β-D-tio-LNA, α-L-oxi-LNA, β-D-(NH)-LNA o β-D-(NCH₃)-LNA se realizó en las mismas unidades. así como los oligonucleótidos antisentido que contienen unidades β-D-oxi-LNA.

Ejemplo 133

35 Gb¹sC*b¹sTb¹sAb¹sdTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdGsdTsGb¹sTb¹sTb¹ (Seq. ID No. 210q)

- 40 **[0513]** 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-metileno timidina-3'-O-succinil LCAA CPG (0,2 mmol) se trató con 1.400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT. Después de varios lavados con una cantidad total de 800 µl de acetonitril, la reacción de acoplamiento se llevó a cabo con 80 µl de 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-metileno timidina 3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita (0,07 M) y 236 µl de DCI en acetonitril (0,25 M). Se dejó que la reacción de acoplamiento tuviera lugar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 µl de acetonitril, y se insertaron 640 µl de Beaucage (0,2 M) en la columna durante 180 segundos. El sistema se lavó con 320 µl de acetonitril. Para la etapa final, se agregaron 448 µl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 µl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piririna (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 minutos. segundo. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 µl de acetonitril. El compuesto se trató con 1.400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.

- 50 **[0514]** El acoplamiento se llevó a cabo con 80 µl de 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-metileno-N²-dimetilformamidinaguanosina-3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropilo)]-fosforamidita (0,07 M) y 236 µl de DCI en acetonitril (0,25 M). Se dejó que la reacción de acoplamiento tuviera lugar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 µl de acetonitril, y se insertaron 640 µl de Beaucage (0,2 M) en la columna durante 180 segundos. El sistema se lavó con 320 µl de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 µl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 µl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 µl de acetonitril. El compuesto se trató con 1.400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.

- 60 **[0515]** El acoplamiento se llevó a cabo con 80 µl de 5'-O-DMT-2'-desoxitimidina-3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita (0,07 M) y 236 µl de DCI en acetonitril (0,25 M). Se dejó que la reacción de acoplamiento tuviera lugar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 µl de acetonitril, y se insertaron 640 µl de Beaucage (0,2 M) en la columna durante 180 segundos. El sistema se lavó con 320 µl de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 µl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 µl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 µl de acetonitril. El compuesto se trató con 1.400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.

640 µl de Beaucage (0,2 M) en la columna durante 180 segundos. El sistema se lavó con 320 µl de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 µl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 µl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 µl de acetonitril. El compuesto se trató con 1.400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.

[0524] El acoplamiento se llevó a cabo con 80 µl de 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-metileno-N⁶-benzoidenosina-3'-(2-cianoetil-N,N-diisopropil)fosforamidita (0,07 M) y 236 µl de DCI en acetonitril (0,25 M). Se dejó que la reacción de acoplamiento tuviera lugar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 µl de acetonitril, y se insertaron 640 µl de Beaucage (0,2 M) en la columna durante 180 segundos. El sistema se lavó con 320 µl de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 µl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 µl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 µl de acetonitril. El compuesto se trató con 1.400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.

[0525] El acoplamiento se llevó a cabo con 80 µl de 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-metileno timidina 3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropilo)]-fosforamidita (0,07 M) y 236 µl de DCI en acetonitril (0,25 M). Se dejó que la reacción de acoplamiento tuviera lugar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 µl de acetonitril, y se insertaron 640 µl de Beaucage (0,2 M) en la columna durante 180 segundos. El sistema se lavó con 320 µl de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 µl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 µl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 µl de acetonitril. El compuesto se trató con 1.400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.

[0526] El acoplamiento se llevó a cabo con 80 µl de 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-metilen-5-metil-N⁴-benzocitidina-3'-(2-cianoetil-N,N-diisopropil)fosforamidita (0,07 M) y 236 µl de DCI en acetonitril (0,25 M). Se dejó que la reacción de acoplamiento tuviera lugar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 µl de acetonitril, y se insertaron 640 µl de Beaucage (0,2 M) en la columna durante 180 segundos. El sistema se lavó con 320 µl de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 µl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 µl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 µl de acetonitril. El compuesto se trató con 1.400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.

[0527] El acoplamiento se llevó a cabo con 80 µl de 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-metileno-N²-dimetilformamidineguanosina-3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropilo)]-fosforamidita (0,07 M) y 236 µl de DCI en acetonitril (0,25 M). Se dejó que la reacción de acoplamiento tuviera lugar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 µl de acetonitril, y se insertaron 640 µl de Beaucage (0,2 M) en la columna durante 180 segundos. El sistema se lavó con 320 µl de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 µl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 µl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 µl de acetonitril. El compuesto se trató con 1.400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.

[0528] Una vez completada la síntesis en fase sólida, se trataron oligonucleótidos antisentido con un 20% de solución de dietilamina en acetonitril (Biosolve BV, Valkenswaard, Países Bajos) durante 20 min. para eliminar los grupos protectores de cianoetil en el esqueleto de fosfato. Posteriormente, los oligonucleótidos antisentido se escindieron del soporte sólido y se desprotegieron adicionalmente con 5 ml de amoniaco acuoso concentrado durante 16 horas a 55°C. El soporte sólido se separó de los oligonucleótidos antisentido mediante filtración o centrifugación.

[0529] A continuación, los oligonucleótidos antisentido crudos se purificaron mediante cromatografía líquida (HPLC) de alto rendimiento de intercambio aniónico en un sistema AKTA Explorer (GE Healthcare, Freiburg, Alemania) y una columna empaquetada con la Fuente Q15 (GE Healthcare). El tampón A era perclorato sódico 10 mM, Tris 20 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4 y contenía 20% de acetonitril y el tampón B era el mismo que el tampón A, con la excepción del perclorato sódico 500 µM. Se empleó un gradiente de 15% de A a 55% de B dentro de 32 volúmenes de columna (CV). Se registraron trazas UV a 280 nm. Las fracciones apropiadas se agruparon y precipitaron con 3 M NaOAc, pH = 5,2 y etanol al 70%. Finalmente, el sedimento se lavó con etanol al 70%.

[0530] El oligonucleótido antisentido se recibió con una pureza del 87,1%. ESI-MS: experimental: 5384,30 Da; calculado: 5384.3 da.

Ejemplo 134

Gb¹C^{*}b¹Tb¹Ab¹dTdTdGdGdTdA^{*} dGdTGb¹Tb¹Tb¹ (Seq. ID No. 210r)

[0531] El LNA se unió a CPG de acuerdo con el procedimiento general. La reacción de acoplamiento y la etapa de taponado también se llevaron a cabo como se describe en el ejemplo 133. Después de la etapa de taponamiento, el

sistema se lavó con 800 µl de acetonitril y se insertaron 400 ml de yodo 0,02 M en THF/piridina/H₂O en la columna para 45 s. El sistema se lavó después de la etapa de oxidación con 24 ml de acetonitril. Después de la purificación, el oligonucleótido antisentido se recibió con una pureza del 95,3%.

5 Ejemplo 135

/5SpC₃s/**Gb¹sC^{*}b¹sTb¹sAb¹sdTsdTsdGsdGsdTsdAsdGsdTsGb¹sTb¹sTb¹** (Seq. ID No. 210v)

10 **[0532]** El compuesto se sintetizó de acuerdo con el procedimiento general con las unidades de construcción de ADN y LNA apropiadas, como se ejemplifica en el ejemplo 133. Pero con la excepción de que después de acoplarse el último nucleótido al oligonucleótido y llevarse a cabo las etapas subsiguientes de oxidación y tapado, se agregaron 80 µl de fosforamidita-C3 (0,07 M) y 236 µl de DCI en acetonitril (0,25 M). Se dejó que el acoplamiento tuviera lugar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 µl de acetonitril. Los pasos subsiguientes se realizaron como se describe en el ejemplo 133. Después de la purificación, el oligonucleótido antisentido se recibió con una pureza del 93,9%.

Ejemplo 136

20 **Gb¹sC^{*}b¹sTb¹sAb¹sdTsdTsdGsdGsdTsdAsdGsdTsGb¹sTb¹sTb¹**/3SpC₃s/(Seq. ID No. 210w)

25 **[0533]** 3'-Espaciador C3 CPG (0,2 mmol) se trató con 1.400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT. Después de varios lavados con una cantidad total de 800 µl de acetonitril, la reacción de acoplamiento se llevó a cabo con 80 µl de 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-metilen-timidina-3'-[(2-cianoetilo)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita (0,07 M) y 236 µl de DCI en acetonitril (0,25 M). Se dejó que la reacción de acoplamiento tuviera lugar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 µl de acetonitril, y se insertaron 640 µl de Beaucage (0,2 M) en la columna durante 180 segundos. El sistema se lavó con 320 µl de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 µl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 µl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 µl de acetonitril. El compuesto se trató con 1.400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT. Las reacciones posteriores se realizaron como se describe en el ejemplo 133. Después de la purificación, el oligonucleótido antisentido se recibió con una pureza del 89,7%.

Ejemplo 137

35 **Gb¹C^{*}b¹Tb¹Ab¹dTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdGsdTsGb¹Tb¹Tb¹** (Seq. ID No. 210o)

40 **[0534]** El compuesto se sintetizó de acuerdo con el procedimiento general con las unidades de construcción de ADN y LNA apropiadas, como se ejemplificó en el ejemplo 133 y el ejemplo 134. Después de la purificación, el oligonucleótido antisentido se recibió con una pureza del 83,8%. ESI-MS: experimental: 5288.10 Da; calculado: 5287,9 da.

Ejemplo 138

45 **Gb¹sC^{*}b¹sTb¹sAb¹sdTsdTsdGsdGsdTsdA^{*}sdGsdTsGb¹sTb¹sTb¹** (Seq. ID No. 210p)

50 **[0535]** El compuesto se sintetizó de acuerdo con el procedimiento general con las unidades de construcción de ADN y LNA apropiadas, como se ejemplificó en el ejemplo 133. Después de la purificación, el oligonucleótido antisentido se recibió con una pureza del 80,7%. ESI-MS: experimental: 5398.40 Da; calculado: 5399,3 da.

Ejemplo 139

[0536]

55 **Gb¹ssC^{*}b¹ssTb¹ssdAssdTssdTssdTssdTssdGssdGssdTssdA^{*}ssdTssdTssGb¹ssTb¹ssTb¹**
b¹ (Seq. ID No. 210af)

60 **[0537]** LCAA CPG ligado a 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-metilen-timidina-3'-O-succinoil (0,2 mmol) se trató con 1.400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano para 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT. Después de varios lavados con una cantidad total de 800 µl de acetonitril, la reacción de acoplamiento se llevó a cabo con 38 µl de 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-metilen-timidina-3'-[(β-benzoilmercapto)etil]pirrolidinoltiofosforamidita (0,15 M) en diclorometano al 10% (v/v) en acetonitril y 236 µl de DCI en acetonitril (0,25 M). La reacción de acoplamiento se dejó llevar a cabo durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 µl de acetonitril y se insertaron 900 µl de DDTT (0,05 M en piridina/acetonitril 4:1 v/v) en la columna para 240 s. El sistema

se enjuagó con 320 µl de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 µl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 µl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 µl de acetonitril. El compuesto se trató con 1.400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.

[0538] El acoplamiento se llevó a cabo con 38 µl de 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-metileno-N²-dimetilformamidineguanosina-3'-[(β-benzoilmercapto)etil]pirrolidinolfosforamidita (0,15 M) en diclorometano al 10% (v/v) en acetonitril y 236 µl de DCI en acetonitril (0,25 M). La reacción de acoplamiento se dejó llevar a cabo durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 µl de acetonitril y se insertaron 900 µl de DDTT (0,05 M en piridina/acetonitril 4:1 v/v) en la columna para 240 s. El sistema se enjuagó con 320 µl de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 µl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 µl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 µl de acetonitril. El compuesto se trató con 1.400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.

[0539] El alargamiento adicional del oligonucleótido se realizó de la misma manera.

[0540] Una vez completada la síntesis en fase sólida, los oligonucleótidos antisentido se trataron con 850 µl de amoníaco en etanol concentrado (amoníaco/etanol 3:1 v/v) a 55°C durante 15 - 16 h para separar el oligonucleótido antisentido del soporte sólido y desproteger el grupo tiol.

[0541] A continuación, se purificó el oligonucleótido antisentido en bruto por cromatografía de intercambio aniónico usando una columna Mono Q 10/100 GL. Los tampones se prepararon con agua tratada con DEPC, y sus composiciones fueron las siguientes: Tampón A: Tris-HCl 25 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0; Tampón B: Tris-HCl 25 mM, EDTA 1 mM, NaCl 1 M, pH 8,0.

Ejemplo 140-23

[0542] Los otros oligonucleótidos de la Tabla 7 se sintetizaron de acuerdo con el procedimiento general y como se muestra en los ejemplos. La preparación del oligonucleótido antisentido que incluye β-D-tio-LNA, α-L-oxi-LNA, β-D-(NH)-LNA o β-D-(NCH₃)-LNA se realizó en las mismas unidades, así como los oligonucleótidos antisentido que contienen unidades β-D-oxi-LNA.

Ejemplo 234

C*b¹sAb¹sTb¹sdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsAb¹sGb¹sTb¹sAb¹ (Seq. ID No. 218b)

5'-O-DMT-2'-O,4'-C-metileno-N⁶-benzoiladenosina-3'-O-succinato

[0543] 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-metilen-N⁶-benzoiladenosina (500 mg, 0,73 mmol), 95 mg de anhídrido succínico (0,95 mmol, 1,2 eq.) Y 116 mg DMAP (0,95 mmol, 1,2 eq.) se disolvieron en 35 ml de diclorometano. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La solución de reacción se lavó 2 veces con 10 ml de NaH₂PO₄ (0,1 M, pH 5,5) y una vez con 10 ml de salmuera. La fase orgánica se secó bajo NaSO₄ anhidro, se filtró y se concentró a sequedad al vacío. El derivado de hemiéster se obtuvo con un rendimiento del 95% y se usó sin purificación adicional para el siguiente paso.

LCAA ligada a 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-metilen-N⁶-benzoiladenosina-3'-O-succinoil

[0544] Se disolvieron 70 mg de derivado de hemiéster (90 mmol) en 0,3 ml de DMF, se añadieron 11,6 ml de DIEA (90 mmol) y pyBOP (90 mmol) y se mezclaron durante 1 min. Esta mezcla se combinó con LCAA-CPG (500 Å, tamaño de malla 80-120, 300 mg) en un sintetizador manual y se agitó durante 1,5 horas a temperatura ambiente. El soporte se separó por filtración y se lavó con DMF, DCM y MeOH. Después del secado, se determinó que la carga era de 57 mmol/g.

Alargamiento

[0545] LCAA CPG ligada a 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-metilen-N⁶-benzoiladenosina-3'-O-succinoil (0,2 mmol) se trató con 1.400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT. Después de varios lavados con una cantidad total de 800 µl de acetonitril, la reacción de acoplamiento se llevó a cabo con 80 µl de 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-metilen-timidina 3'-[(2-cianoetilo)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita (0,07 M) y 236 µl de DCI en acetonitril (0,25 M). Se dejó que la reacción de acoplamiento tuviera lugar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 µl de acetonitril, y se insertaron 640 µl de Beaucage (0,2 M) en la columna durante 180 segundos. El sistema se lavó con 320 µl de acetonitril. Para la etapa final, se agregaron 448 µl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 µl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 minutos, segundo. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 µl de acetonitril. El compuesto se trató con 1.400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante

60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.

5 **[0546]** El acoplamiento se llevó a cabo con 80 µl de 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-metileno-N²-dimetilformamidineguanosina-3'-(2-cianoetil-N,N-diisopropil)fosforamidita (0,07 M) y 236 µl de DCI en acetonitril (0,25 M). Se dejó que la reacción de acoplamiento tuviera lugar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 µl de acetonitril, y se insertaron 640 µl de Beaucage (0,2 M) en la columna durante 180 segundos. El sistema se lavó con 320 µl de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 µl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 µl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 µl de acetonitril. El compuesto se trató con 1.400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.

15 **[0547]** El acoplamiento se llevó a cabo con 80 µl de 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-metileno-N⁶-benzoidenosina-3'-(2-cianoetil-N,N-diisopropil)fosforamidita (0,07 M) y 236 µl de DCI en acetonitril (0,25 M). Se dejó que la reacción de acoplamiento tuviera lugar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 µl de acetonitril, y se insertaron 640 µl de Beaucage (0,2 M) en la columna durante 180 segundos. El sistema se lavó con 320 µl de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 µl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 µl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 µl de acetonitril. El compuesto se trató con 1.400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.

20 **[0548]** El acoplamiento se llevó a cabo con 80 µl de 5'-O-DMT-N⁴-benzoi-2'-desoxicitidina-3'-(2-cianoetil-N,N-diisopropil)fosforamidita (0,07 M) y 236 µl DCI en acetonitril (0,25 M). Se dejó que la reacción de acoplamiento tuviera lugar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 µl de acetonitril, y se insertaron 640 µl de Beaucage (0,2 M) en la columna durante 180 segundos. El sistema se lavó con 320 µl de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 µl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 µl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 µl de acetonitril. El compuesto se trató con 1.400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.

25 **[0549]** El acoplamiento se llevó a cabo con 80 µl de 5'-O-DMT-N⁴-benzoi-2'-desoxicitidina-3'-(2-cianoetil-N,N-diisopropil)fosforamidita (0,07 M) y 236 µl DCI en acetonitril (0,25 M). Se dejó que la reacción de acoplamiento tuviera lugar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 µl de acetonitril, y se insertaron 640 µl de Beaucage (0,2 M) en la columna durante 180 segundos. El sistema se lavó con 320 µl de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 µl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 µl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 µl de acetonitril.

30 **[0550]** El compuesto se trató con 1.400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.

35 **[0551]** El acoplamiento se realizó con 80 µl de 5'-O-DMT-N⁶-benzoi-2'-desoxiadenosina-3'-(2-cianoetil-N,N-diisopropil)fosforamidita (0,07 M) y 236 µl DCI en acetonitril (0,25 M). Se dejó que la reacción de acoplamiento tuviera lugar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 µl de acetonitril, y se insertaron 640 µl de Beaucage (0,2 M) en la columna durante 180 segundos. El sistema se lavó con 320 µl de acetonitril. Para la etapa de tapado, se añadieron 448 µl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 µl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 µl de acetonitril. El compuesto se trató con 1.400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.

40 **[0552]** El acoplamiento se llevó a cabo con 80 µl de 5'-O-DMT-N²-isobutiril-2'-desoxiguanosina-3'-(2-cianoetil-N,N-diisopropil)fosforamidita (0,07 M) y 236 µl DCI en acetonitril (0,25 M). Se dejó que la reacción de acoplamiento tuviera lugar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 µl de acetonitril, y se insertaron 640 µl de Beaucage (0,2 M) en la columna durante 180 segundos. El sistema se lavó con 320 µl de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 µl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 µl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 µl de acetonitril. El compuesto se trató con 1.400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.

45 **[0553]** El acoplamiento se llevó a cabo con 80 µl de 5'-O-DMT-N²-isobutiril-2'-desoxiguanosina-3'-(2-cianoetil-N,N-diisopropil)fosforamidita (0,07 M) y 236 µl DCI en acetonitril (0,25 M). Se dejó que la reacción de acoplamiento tuviera lugar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 µl de acetonitril, y se insertaron 640 µl de Beaucage (0,2 M) en la columna durante 180 segundos. El sistema se lavó con 320 µl de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 µl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 µl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 µl de acetonitril. El compuesto se trató con 1.400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.

- 5 **[0554]** El acoplamiento se llevó a cabo con 80 µl de 5'-O-DMT-2'-desoximidina-3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita (0,07 M) y 236 µl de DCI en acetonitril (0,25 M). Se dejó que la reacción de acoplamiento tuviera lugar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 µl de acetonitril, y se insertaron 640 µl de Beaucage (0,2 M) en la columna durante 180 segundos. El sistema se lavó con 320 µl de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 µl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 µl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 µl de acetonitril. El compuesto se trató con 1.400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.
- 10 **[0555]** El acoplamiento se realizó con 80 µl de 5'-O-DMT-N⁶-benzoil-2'-desoxiadenosina-3'-(2-cianoetil-N,N-diisopropil)fosforamidita (0,07 M) y 236 µl DCI en acetonitril (0,25 M). Se dejó que la reacción de acoplamiento tuviera lugar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 µl de acetonitril, y se insertaron 640 µl de Beaucage (0,2 M) en la columna durante 180 segundos. El sistema se lavó con 320 µl de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 µl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 µl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 µl de acetonitril. El compuesto se trató con 1.400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.
- 15 **[0556]** El acoplamiento se realizó con 80 µl de 5'-O-DMT-N⁶-benzoil-2'-desoxiadenosina-3'-(2-cianoetil-N,N-diisopropil)fosforamidita (0,07 M) y 236 µl DCI en acetonitril (0,25 M). Se dejó que la reacción de acoplamiento tuviera lugar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 µl de acetonitril, y se insertaron 640 µl de Beaucage (0,2 M) en la columna durante 180 segundos. El sistema se lavó con 320 µl de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 µl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 µl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 µl de acetonitril. El compuesto se trató con 1.400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.
- 20 **[0557]** El acoplamiento se llevó a cabo con 80 µl de 5'-O-DMT-N²-isobutiril-2'-desoxiguanosina-3'-(2-cianoetil-N,N-diisopropil)fosforamidita (0,07 M) y 236 µl DCI en acetonitril (0,25 M). Se dejó que la reacción de acoplamiento tuviera lugar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 µl de acetonitril, y se insertaron 640 µl de Beaucage (0,2 M) en la columna durante 180 segundos. El sistema se lavó con 320 µl de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 µl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 µl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 µl de acetonitril. El compuesto se trató con 1.400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.
- 25 **[0558]** El acoplamiento se llevó a cabo con 80 µl de 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-metileno timidina 3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropilo)]-fosforamidita (0,07 M) y 236 µl de DCI en acetonitril (0,25 M). Se dejó que la reacción de acoplamiento tuviera lugar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 µl de acetonitril, y se insertaron 640 µl de Beaucage (0,2 M) en la columna durante 180 segundos. El sistema se lavó con 320 µl de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 µl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 µl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 µl de acetonitril. El compuesto se trató con 1.400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.
- 30 **[0559]** El acoplamiento se llevó a cabo con 80 µl de 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-metileno-N⁶-benzoiladenosina-3'-(2-cianoetil-N,N-diisopropil)fosforamidita (0,07 M) y 236 µl de DCI en acetonitril (0,25 M). Se dejó que la reacción de acoplamiento tuviera lugar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 µl de acetonitril, y se insertaron 640 µl de Beaucage (0,2 M) en la columna durante 180 segundos. El sistema se lavó con 320 µl de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 µl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 µl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 µl de acetonitril. El compuesto fue tratado con 1.400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.
- 35 **[0560]** El acoplamiento se llevó a cabo con 80 µl de 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-metileno-5-metil-N⁴-benzoilcitidina-3'-(2-cianoetil-N,N-diisopropil)fosforamidita (0,07 M) y 236 µl de DCI en acetonitril (0,25 M). Se dejó que la reacción de acoplamiento tuviera lugar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 µl de acetonitril, y se insertaron 640 µl de Beaucage (0,2 M) en la columna durante 180 segundos. El sistema se lavó con 320 µl de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 µl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 µl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 µl de acetonitril. El compuesto se trató con 1.400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.
- 40 **[0561]** Una vez completada la síntesis en fase sólida, se trataron oligonucleótidos antisentido con una solución de dietilamina al 20% en acetonitril (Biosolve BV, Valkenswaard,
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

[0562] Países Bajos) durante 20 min. para eliminar los grupos protectores de cianoetil en el esqueleto de fosfato. Posteriormente, los oligonucleótidos antisentido se escindieron del soporte sólido y se desprotegeron adicionalmente con 5 ml de amoniaco acuoso concentrado durante 16 horas a 55°C. El soporte sólido se separó de los oligonucleótidos antisentido mediante filtración o centrifugación.

[0563] A continuación, los oligonucleótidos antisentido crudos se purificaron mediante cromatografía líquida (HPLC) de alto rendimiento de intercambio aniónico en un sistema AKTA Explorer (GE Healthcare, Freiburg, Alemania) y una columna empaquetada con la Fuente Q15 (GE Healthcare). El tampón A era perclorato sódico 10 mM, Tris 20 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4 y contenía 20% de acetonitril y el tampón B era el mismo que el tampón A, con la excepción del perclorato sódico 500 µM. Se empleó un gradiente de 15% de B a 55% de B dentro de 32 volúmenes de columna (CV). Se registraron trazas UV a 280 nm. Las fracciones apropiadas se agruparon y precipitaron con 3 M NaOAc, pH = 5,2 y etanol al 70%. Finalmente, el sedimento se lavó con etanol al 70%. El oligonucleótido antisentido se recibió con una pureza del 94,8%. ESI-MS: experimental: 5365,80 Da; calculado: 5365.30 da.

Ejemplo 235

C*b¹Ab¹Tb¹dGdAdAdTTdGdGdAdCdCAb¹Gb¹Tb¹Ab¹ (Seq. ID No. 218r)

[0564] El LNA se unió a CPG de acuerdo con el procedimiento general. La reacción de acoplamiento y la etapa de cobertura también se llevaron a cabo como se describe en el ejemplo 234. Después de la etapa de cobertura, el sistema se lavó con 800 µl de acetonitril y se insertaron 400 ml de yodo 0,02 M en THF/piridina/H₂O en la columna para 45 s. El sistema se lavó después de la etapa de oxidación con 24 ml de acetonitril. Después de la purificación, el oligonucleótido antisentido se recibió con una pureza del 97,8%. ESI-MS: experimental: 5125.10 Da.; calculado: 5124,4 da.

Ejemplo 236

/5SpC₃s/C*b¹sAb¹sTb¹sdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsAb¹sGb¹sTb¹sAb¹ (Seq. ID No. 218t)

[0565] El compuesto se sintetizó de acuerdo con el procedimiento general con las unidades de construcción de ADN y LNA apropiadas, como se ejemplificó en el ejemplo 234. Pero con la excepción de que después del último nucleótido se había acoplado al oligonucleótido y se llevaron a cabo las subsiguientes etapas de oxidación y cobertura, se agregaron 80 µl de fosforamidita-C3 (0,07 M) y 236 µl de DCI en acetonitril (0,25 M). Se dejó que el acoplamiento tuviera lugar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 µl de acetonitril. Los pasos subsiguientes se realizaron como se describe en el ejemplo 234. Después de la purificación, el oligonucleótido antisentido se recibió con una pureza del 94,2%. ESI-MS: experimental: 5519,60 Da; calculado: 5519,4 da.

Ejemplo 237

C*b¹sAb¹sTb¹sdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsAb¹sGb¹sTb¹sAb¹s/3SpC₃/ (Seq. ID No. 218u)

[0566] El tratamiento con 3'-espaciador C3 CPG (0,2 mmol) se trató con 1.400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT. Después de varios lavados con una cantidad total de 800 µl de acetonitril, la reacción de acoplamiento se llevó a cabo con 80 µl de 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-metileno-N⁶-benzoidenosina-3'-[(2-cianoetil-N,N-diisopropil)]-fosforamidita (0,07 M) y 236 µl de DCI en acetonitril (0,25 M). Se dejó que la reacción de acoplamiento tuviera lugar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 µl de acetonitril, y se insertaron 640 µl de Beaucage (0,2 M) en la columna durante 180 segundos. El sistema se lavó con 320 µl de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 µl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 µl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 µl de acetonitril. El compuesto fue tratado con 1.400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT. Las reacciones subsiguientes se realizaron como se describe en el ejemplo 234. Después de la purificación, el oligonucleótido antisentido se recibió con una pureza del 94,3%. ESI-MS: experimental: 5519,10 Da; calculado: 5519,4 da.

Ejemplo 238

C*b¹ssAb¹ssTb¹ssdGssdAssdAssdTssdGssdGssdAssdCssdCssAb¹ssGb¹ssTb¹ss Ab¹ (Seq. ID No. 218aa)

[0567] LCAA CPG ligada a 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-metilen-N⁶-benzoidenosina-3'-O-succiniloil (0,2 µmol) se trató con 1400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT. Después de varios lavados con una cantidad total de 800 µl de acetonitril, la reacción de acoplamiento se llevó a cabo con 38 µl de 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-metilen-timidina-3'-[(β-benzoilmercapto)etil]pirrolidinoltiofosforamidita (0,15 M) en diclorometano al 10% (v/v) en acetonitril y 236 ml de DCI en acetonitril (0,25 M). La reacción de acoplamiento se dejó llevar a cabo durante 250 segundos, y los reactivos en

exceso se eliminaron rápidamente con 800 µl de acetonitril y se insertaron 900 ml de DDTT (0,05 M en piridina/acetonitril 4:1 v/v) en la columna para 240 s. El sistema se enjuagó con 320 µl de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 µl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 µl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 µl de acetonitril. El compuesto se trató con 1400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.

[0568] El acoplamiento se llevó a cabo con 38 µl de 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-metileno-N²-dimetilformamidinaguanosina-3'-[(β-benzoilmercapto)etil]pirrolidinoltiofosforamidita (0,15 M) en diclorometano al 10% (v/v) en acetonitril y 236 µl de DCI en acetonitril (0,25 M). La reacción de acoplamiento se dejó llevar a cabo durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 µl de acetonitril y se insertaron 900 µl de DDTT (0,05 M en piridina/acetonitril 4:1 v/v) en la columna para 240 s. El sistema se enjuagó con 320 µl de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 µl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 µl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 µl de acetonitril. El compuesto se trató con 1400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.

[0569] El alargamiento adicional del oligonucleótido se realizó de la misma manera.

[0570] Una vez completada la síntesis en fase sólida, los oligonucleótidos antisentido se trataron con 850 µl de amoníaco en etanol concentrado (amoníaco/etanol 3:1 v/v) a 55°C durante 15 - 16 h para separar el oligonucleótido antisentido del soporte sólido y desproteger el grupo tiol.

[0571] A continuación, se purificó el oligonucleótido antisentido en bruto mediante cromatografía de intercambio aniónico usando una columna Mono Q 10/100 GL. Los tampones se prepararon con agua tratada con DEPC, y sus composiciones fueron las siguientes: Tampón A: Tris-HCl 25 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0; Tampón B: Tris-HCl 25 mM, EDTA 1 mM, NaCl 1 M, pH 8,0.

Ejemplo 239

C*b¹sAb¹sTb¹sdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdC*sAb¹sGb¹sTb¹sAb¹ (Seq. ID No. 218m)

[0572] El compuesto se sintetizó de acuerdo con el procedimiento general con las unidades de construcción de ADN y LNA apropiadas, como se ejemplificó en el ejemplo 234. Después de la purificación, el oligonucleótido antisentido se recibió con una pureza del 93,8%. ESI-MS: experimental: 5394,00 Da; calculado: 5393,3 da.

Ejemplo 240

C*b¹Ab¹Tb¹dGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdC*sAb¹Gb¹Tb¹Ab¹ (Seq. ID No. 218n)

[0573] El compuesto se sintetizó de acuerdo con el procedimiento general con las unidades de construcción de ADN apropiadas y las unidades de construcción de LNA como se ejemplificó en el ejemplo 234 y el ejemplo 235. Después de la purificación, se recibió el oligonucleótido antisentido con una pureza del 94,7%. ESI-MS: experimental: 5297,30 Da; calculado: 5297,0 da.

Ejemplo 241

C*b¹sAb¹sTb¹sdGsdA * sdA * sdTsdGsdGsdA * sdCsdCsAb¹sGb¹sTb¹sAb¹ (Seq. ID No. 218o)

[0574] El compuesto se sintetizó de acuerdo con el procedimiento general con las unidades de construcción de ADN y LNA apropiadas, como se ejemplificó en el ejemplo 234. Después de la purificación, el oligonucleótido antisentido se recibió con una pureza del 92,8%. ESI-MS: experimental: 5410,40 Da; calculado: 5410,3 Da.

Ejemplo 242

C*b¹sAb¹sTb¹sdGsdA*sAdA*sdTsdGsdGsdA*sdc*sdc*sAb¹sGb¹sTb¹sAb¹ (Seq. ID No. 218p)

[0575] El compuesto se sintetizó de acuerdo con el procedimiento general con las unidades de construcción de ADN y LNA apropiadas, como se ejemplificó en el ejemplo 234. Después de la purificación, el oligonucleótido antisentido se recibió con una pureza del 95,3%. ESI-MS: experimental: 5437,40 Da; calculado: 5438,4 da.

Ejemplo 243

C*b¹sAb¹sTb¹sdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdC*sdcCsAbsGb¹sTb¹sAb¹ (Seq. ID No. 218q)

[0576] El compuesto se sintetizó de acuerdo con el procedimiento general con las unidades de construcción de ADN

y LNA apropiadas, como se ejemplificó en el ejemplo 234. Después de la purificación, se recibió el oligonucleótido antisentido con una pureza del 93,9%. ESI-MS: experimental: 5378,80 Da; calculado: 5379,3 da.

Ejemplo 244

C*b¹sAb¹sTb¹sdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdC*sAb¹sGb¹sTb¹sAb¹ (Seq. ID No. 218c)

[0577] El compuesto se sintetizó de acuerdo con el procedimiento general con las unidades de construcción de ADN y LNA apropiadas, como se ejemplificó en el ejemplo 234. Después de la purificación, el oligonucleótido antisentido se recibió con una pureza del 92,9%. ESI-MS: experimental: 5379,10 Da; calculado: 5379,3 da.

Ejemplo 245

C*b¹sAb¹sTb¹sdGdAdAdTdTdGdGdAdC*sdC*sAb¹sGb¹sTb¹sAb¹ (Seq. ID No. 218s)

[0578] El compuesto se sintetizó de acuerdo con el procedimiento general con las unidades de construcción de ADN y LNA apropiadas, como se ejemplificó en el ejemplo 234. Después de la purificación, el oligonucleótido antisentido se recibió con una pureza del 94,5%. ESI-MS: experimental: 5152,70 Da; calculado: 5152,4 da.

Ejemplo 246

[0579]

/5SpC3/sC*b¹sAb¹sTb¹sdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsAb¹sGb¹sTb¹sAb¹/3Sp
C3/ (Seq. ID No. 218v)

[0580] El compuesto se sintetizó de acuerdo con el procedimiento general con las unidades de construcción de ADN apropiadas y las unidades de construcción de LNA como se ejemplificó en el ejemplo 234, el ejemplo 236 y el ejemplo 237. Después de la purificación, el oligonucleótido antisentido se recibió con una pureza del 94,4%. ESI-MS: experimental: 5673,50 Da; calculado: 5673.5 da

Ejemplo 247 - 335

[0581] Los otros oligonucleótidos de la Tabla 8 se sintetizaron de acuerdo con el procedimiento general y como se muestra en los ejemplos. La preparación del antiparasito oligonucleótido que incluye β-D-tio-LNA, α-L-oxi-LNA, β-D-(NH)-LNA o β-D-(NCH₃)-LNA unidades se realizó de la misma forma que los oligonucleótidos antisentido que contienen unidades β-D-oxi-LNA.

Ejemplo 336

C*b¹sGb¹sAb¹sTb¹sdAsdCsdGsdCsdGsdTsdCsdCsAb¹sC*b¹sAb¹ (Seq. ID No. 152h)

[0582] LCAA CPG unida a 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-metileno-N⁶-benzoidenosina-3'-O-succinilo (0,2 μmol) se trató con 1400 μl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT. Después de varios lavados con una cantidad total de 800 μl de acetonitril, la reacción de acoplamiento se llevó a cabo con 80 μl de 5'-O-DMT-2'-O-4'-C-metilen-5-metil-N⁴-benzoidenosina-3'-(2-cianoetil-N,N-diisopropil)fosforamidita (0,07 M) y 236 μl de DCI en acetonitril (0,25 M). Se dejó que la reacción de acoplamiento tuviera lugar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 μl de acetonitril, y se insertaron 640 μl de Beaucage (0,2 M) en la columna durante 180 segundos. El sistema se lavó con 320 μl de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 μl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 μl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 μl de acetonitril. El compuesto se trató con 1400 μl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.

[0583] El acoplamiento se llevó a cabo con 80 μl de 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-metileno-N⁶-benzoidenosina-3'-(2-cianoetil-N,N-diisopropil)fosforamidita (0,07 M) y 236 μl de DCI en acetonitril (0,25 M). Se dejó que la reacción de acoplamiento tuviera lugar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 μl de acetonitril, y se insertaron 640 μl de Beaucage (0,2 M) en la columna durante 180 segundos. El sistema se lavó con 320 μl de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 μl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 μl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 μl de acetonitril. El compuesto se trató con 1400 μl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.

[0584] El acoplamiento se realizó con 80 μl de 5'-O-DMT-N⁴-benzoidenosina-2'-desoxicidina-3'-(2-cianoetil-N,N-diisopropil)fosforamidita (0,07 M) y 236 μl DCI en acetonitril (0,25 M). Se dejó que la reacción de acoplamiento

tuviera lugar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 µl de acetonitril, y se insertaron 640 µl de Beaucage (0,2 M) en la columna durante 180 segundos. El sistema se lavó con 320 µl de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 µl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 µl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 µl de acetonitril. El compuesto se trató con 1400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.

[0585] El acoplamiento se realizó con 80 µl de 5'-O-DMT-N⁴-benzoil-2'-desoxicitidina-3'-(2-cianoetil-N,N-diisopropil)fosforamidita (0,07 M) y 236. ml DCI en acetonitril (0,25 M). La reacción de acoplamiento tuvo lugar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 µl de acetonitril, y se insertaron 640 µl de Beaucage (0,2 M) en la columna durante 180 segundos. El sistema se enjuagó con 320 µl de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 µl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 µl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 µl de acetonitril. El compuesto se trató con 1400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.

[0586] El acoplamiento se llevó a cabo con 80 µl de 5'-O-DMT-2'-desoxitimidina-3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita (0,07 M) y 236 µl de DCI en acetonitril (0,25 M). Se dejó que la reacción de acoplamiento tuviera lugar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 µl de acetonitril, y se insertaron 640 µl de Beaucage (0,2 M) en la columna durante 180 segundos. El sistema se lavó con 320 µl de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 µl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 µl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 µl de acetonitril. El compuesto se trató con 1400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.

[0587] El acoplamiento se llevó a cabo con 80 µl de 5'-O-DMT-N²-isobutiril-2'-desoxiguanosina-3'-(2-cianoetil-N,N-diisopropil)fosforamidita (0,07 M) y 236 µl DCI en acetonitril (0,25 M). Se dejó que la reacción de acoplamiento tuviera lugar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 µl de acetonitril, y se insertaron 640 µl de Beaucage (0,2 M) en la columna durante 180 segundos. El sistema se lavó con 320 µl de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 µl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 µl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 µl de acetonitril. El compuesto se trató con 1400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.

[0588] El acoplamiento se llevó a cabo con 80 µl de 5'-O-DMT-N⁴-benzoil-2'-desoxicitidina-3'-(2-cianoetil-N,N-diisopropil)fosforamidita (0,07 M) y 236. ml DCI en acetonitril (0,25 M). Se dejó que la reacción de acoplamiento tuviera lugar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 µl de acetonitril, y se insertaron 640 µl de Beaucage (0,2 M) en la columna durante 180 segundos. El sistema se lavó con 320 µl de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 µl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 µl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 µl de acetonitril. El compuesto se trató con 1400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.

[0589] El acoplamiento se llevó a cabo con 80 µl de 5'-O-DMT-N²-isobutiril-2'-desoxiguanosina-3'-(2-cianoetil-N,N-diisopropil)fosforamidita (0,07 M) y 236 µl DCI en acetonitril (0,25 M). Se dejó que la reacción de acoplamiento tuviera lugar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 µl de acetonitril, y se insertaron 640 µl de Beaucage (0,2 M) en la columna durante 180 segundos. El sistema se lavó con 320 µl de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 µl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 µl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 µl de acetonitril. El compuesto se trató con 1400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.

[0590] El acoplamiento se llevó a cabo con 80 µl de 5'-O-DMT-N⁴-benzoil-2'-desoxicitidina-3'-(2-cianoetil-N,N-diisopropil)fosforamidita (0,07 M) y 236 µl de DCI en acetonitril (0,25 M). Se dejó que la reacción de acoplamiento tuviera lugar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 µl de acetonitril, y se insertaron 640 µl de Beaucage (0,2 M) en la columna durante 180 segundos. El sistema se lavó con 320 µl de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 µl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 µl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 µl de acetonitril. El compuesto se trató con 1400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.

[0591] El acoplamiento se realizó con 80 µl de 5'-O-DMT-N⁶-benzoil-2'-desoxiadenosina-3'-(2-cianoetil-N,N-diisopropil)fosforamidita (0,07 M) y 236 µl DCI en acetonitril (0,25 M). Se dejó que la reacción de acoplamiento tuviera lugar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 µl de acetonitril, y se insertaron 640 µl de Beaucage (0,2 M) en la columna durante 180 segundos. El sistema se lavó con 320 µl de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 µl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 µl de N-

metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 µl de acetonitril. El compuesto se trató con 1400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.

5 **[0592]** El acoplamiento se llevó a cabo con 80 µl de 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-metilen timidina 3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropilo)]-fosforamidita (0,07 M) y 236 µl de DCI en acetonitril (0,25 M). Se dejó que la reacción de acoplamiento tuviera lugar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 µl de acetonitril, y se insertaron 640 µl de Beaucage (0,2 M) en la columna durante 180 segundos. El sistema se lavó con 320 µl de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 µl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 µl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 µl de acetonitril. El compuesto se trató con 1400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.

15 **[0593]** El acoplamiento se llevó a cabo con 80 µl de 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-metileno-N⁶-benzoidenosina-3'-(2-cianoetil-N,N-diisopropil)fosforamidita (0,07 M) y 236 µl de DCI en acetonitril (0,25 M). Se dejó que la reacción de acoplamiento tuviera lugar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 µl de acetonitril, y se insertaron 640 µl de Beaucage (0,2 M) en la columna durante 180 segundos. El sistema se lavó con 320 µl de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 µl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 µl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 µl de acetonitril. El compuesto se trató con 1400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.

25 **[0594]** El acoplamiento se llevó a cabo con 80 µl de 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-metileno-N²-dimetilformamidineguanosina-3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropilo)]-fosforamidita (0,07 M) y 236 µl de DCI en acetonitril (0,25 M). Se dejó que la reacción de acoplamiento tuviera lugar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 µl de acetonitril, y se insertaron 640 µl de Beaucage (0,2 M) en la columna durante 180 segundos. El sistema se lavó con 320 µl de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 µl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 µl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 µl de acetonitril. El compuesto se trató con 1400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.

35 **[0595]** El acoplamiento se llevó a cabo con 80 µl de 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-metilen-5-metil-N⁴-benzocitidina-3'-(2-cianoetil-N,N-diisopropil)fosforamidita (0,07 M) y 236 µl de DCI en acetonitril (0,25 M). Se dejó que la reacción de acoplamiento tuviera lugar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 µl de acetonitril, y se insertaron 640 µl de Beaucage (0,2 M) en la columna durante 180 segundos. El sistema se lavó con 320 µl de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 µl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 µl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 µl de acetonitril. El compuesto se trató con 1400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.

40 **[0596]** Una vez completada la síntesis en fase sólida, se trataron oligonucleótidos antisentido con una solución de dietilamina al 20% en acetonitril (Biosolve BV, Valkenswaard, Países Bajos) durante 20 min. para eliminar los grupos protectores de cianoetilo en el esqueleto de fosfato.

45 **[0597]** Posteriormente, los oligonucleótidos antisentido se escindieron del soporte sólido y se desprotegeron adicionalmente usando 5 mL de amoniaco acuoso concentrado durante 16 horas a 55°C. El soporte sólido se separó de los oligonucleótidos antisentido por filtración o centrifugación.

50 **[0598]** A continuación, los oligonucleótidos antisentido crudos se purificaron mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de intercambio aniónico en un sistema AKTA Explorer (GE Healthcare, Freiburg, Alemania) y una columna empaquetada con la Fuente Q15 (GE Healthcare) . El tampón A era perclorato sódico 10 mM, Tris 20 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4 y contenía 20% de acetonitril y el tampón B era el mismo que el tampón A, con la excepción del perclorato sódico 500 mM. Se empleó un gradiente de 15% B a 55% B dentro de 32 volúmenes de columna (CV). Se registraron trazas UV a 280 nm. Las fracciones apropiadas se agruparon y precipitaron con NaOAc 3 M, pH = 5,2 y etanol al 70%. Finalmente, el sedimento se lavó con etanol al 70%.

Ejemplo 337

60 **C*b¹Gb¹Ab¹Tb¹dAdCdGdC*dGdTdCdC*Ab¹C*b¹Ab¹** (Seq. ID No. 152q)

65 **[0599]** El LNA se unió a CPG de acuerdo con el procedimiento general. La reacción de acoplamiento y la etapa de cobertura también se llevaron a cabo como se describe en el ejemplo 336. Después de la etapa de acoplamiento, el sistema se lavó con 800 µl de acetonitril y se insertaron 400 ml de yodo 0,02 M en THF/piridina/H₂O en la columna para 45 s. Después de la etapa de oxidación, el sistema se lavó con 24 µl de acetonitril. Después de la purificación, el oligonucleótido antisentido se recibió con una pureza del 93,1%.

Ejemplo 338

/5spC3s/C*b¹sGb¹sAb¹sTb¹sdAsdC*sdGsdC*sdGsdTsdCsdCsAb¹sC*b¹sAb¹ (Seq. ID No. 152s)

5 **[0600]** El compuesto se sintetizó de acuerdo con el procedimiento general con las unidades de construcción de ADN y LNA apropiadas, como se ejemplificó en el ejemplo 336. Pero con la excepción de que después del último nucleótido se había acoplado al oligonucleótido y se llevaron a cabo las etapas subsiguientes de oxidación y tapado, se agregaron 80 µl de fosforamida-C3 (0,07 M) y 236 µl de DCI en acetonitril (0,25 M). Se dejó que el acoplamiento tuviera lugar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 µl de acetonitril.

10 Los pasos subsiguientes se realizaron como se describe en el ejemplo 336. Después de la purificación, el oligonucleótido antisentido se recibió con una pureza de 96,5%.

Ejemplo 339

15 **C*b¹sGb¹sAb¹sTb¹sdAsdC*sdGsdCsdGsdTsdCsdC*sAb¹sC*b¹sAb¹/3spC3s/** (Seq. ID No. 152t)

[0601] Se trató 3'-Espaciador C3 CPG (0,2 µmol) con 1400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT. Después de varios lavados con una cantidad total de 800 µl de acetonitril, la reacción de acoplamiento se llevó a cabo con 80 µl de 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-metileno-N⁶-benzoiladenosina-3'-[(2-cianoetil-N,N-diisopropil)]-fosforamida (0,07 M) y 236 µl de DCI en acetonitril (0,25 M). Se dejó que la reacción de acoplamiento tuviera lugar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 µl de acetonitril, y se insertaron 640 µl de Beaucage (0,2 M) en la columna durante 180 segundos. El sistema se lavó con 320 µl de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 µl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 µl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 µl de acetonitril. El compuesto se trató con 1400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT. Las reacciones posteriores se realizaron como se describe en el ejemplo 336. Después de la purificación, el oligonucleótido antisentido se recibió con una pureza del 92,1%.

Ejemplo 340

C*b¹ssGb¹ssAb¹ssdTssdAssdC*ssdGssdCssdGssdTssdCssdC*sAb¹ssC*b¹ssAb¹ (Seq. ID No. 152aa)

35 **[0602]** 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-metilen-N⁶-benzoiladenosina-3'-O-succinil ligado a LCAA CPG (0,2 µmol) se trató con 1400 µl de tricloroacético al 3%. ácido en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT. Después de varios lavados con una cantidad total de 800 µl de acetonitril, la reacción de acoplamiento se llevó a cabo con 38 µl de 5'-O-DMT-2'-O-4'-C-metilen-5-metil-N⁴-benzoilcitidina-3'-[(β-benzoilmerc apto)etil]pirrolidinolfosforamida (0,15 M) en diclorometano al 10% (v/v) en acetonitril y 236 µl de DCI en acetonitril (0,25 M). La reacción de acoplamiento se dejó llevar a cabo durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 µl de acetonitril y se insertaron 900 µl de DDTT (0,05 M en piridina/acetonitril 4:1 v/v) en la columna para 240 s. El sistema se enjuagó con 320 µl de acetonitril. Para la etapa final, se agregaron 448 µl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 µl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 µl de acetonitril. El compuesto se trató con 1400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.

50 **[0603]** El acoplamiento se llevó a cabo con 38 µl de 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-metilen-N⁶-benzoiladenosina-3'-[(β-benzoilmerc apto)etil]pirrolidinolfosforamida (0,15 M) en diclorometano al 10% (v/v) en acetonitril y 236 µl de DCI en acetonitril (0,25 M). La reacción de acoplamiento se dejó llevar a cabo durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 µl de acetonitril y se insertaron 900 µl de DDTT (0,05 M en piridina/acetonitril 4:1 v/v) en la columna para 240 s. El sistema se lavó con 320 µl de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 µl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 µl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 µl de acetonitril. El compuesto se trató con 1400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.

[0604] El alargamiento adicional del oligonucleótido se realizó de la misma manera.

60 **[0605]** Al finalizar la síntesis en fase sólida, los oligonucleótidos antisentido se trataron con 850 µl de amoníaco en etanol concentrado (amoníaco/etanol 3:1 v/v) a 55°C durante 15 - 16 h para separar el oligonucleótido antisentido del soporte sólido y desproteger el grupo tiol.

65 **[0606]** A continuación, se purificó el oligonucleótido antisentido en bruto mediante cromatografía de intercambio aniónico usando una columna Mono Q 10/100 GL. Los tampones se prepararon con agua tratada con DEPC, y sus composiciones fueron las siguientes: Tampón A: Tris-HCl 25 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0; Tampón B: Tris-HCl 25 mM, EDTA 1 mM, NaCl 1 M, pH 8,0.

Ejemplo 341 - 433

[0607] Los otros oligonucleótidos de la Tabla 5 se sintetizaron de acuerdo con el procedimiento general y como se muestra en los ejemplos. La preparación del oligonucleótido antisentido que incluye unidades de β -D-tio-LNA, α -L-oxi-LNA, β -D-(NH)-LNA o β -D-(NCH₃)-LNA se realizó de la misma forma que los oligonucleótidos antisentido que contienen unidades β -D-oxi-LNA.

Ejemplo 434

C*b¹sTb¹sdCsdGsdTsdCsdAsdTsdAsdGsdAsC*b¹sC*b¹sGb¹ (Seq. ID No. 143h)

[0608] LCAA CPG ligada a 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-metilen-N²-dimetilformamidineguanosina-3'-O-succiniloil (0,2 μ mol) se trató con 1400 μ l de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT. Después de varios lavados con una cantidad total de 800 μ l de acetonitril, la reacción de acoplamiento se llevó a cabo con 80 μ l de 5'-O-DMT-2'-O-4'-C-metilen-5-metil-N⁴-benzoilcitidina-3'-(2-cianoetil-N,N-diisopropil)fosforamidita (0,07 M) y 236 μ l de DCI en acetonitril (0,25 M). Se dejó que la reacción de acoplamiento tuviera lugar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 μ l de acetonitril, y se insertaron 640 μ l de Beaucage (0,2 M) en la columna durante 180 segundos. El sistema se lavó con 320 μ l de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 μ l de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 μ l de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 μ l de acetonitril. El compuesto se trató con 1400 μ l de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.

[0609] El acoplamiento se llevó a cabo con 80 μ l de 5'-O-DMT-2'-O-4'-C-metileno-5-metil-N⁴-benzoilcitidina-3'-(2-cianoetil-N,N-diisopropil)fosforamidita (0,07 M) y 236 μ l de DCI en acetonitril (0,25 M). Se dejó que la reacción de acoplamiento tuviera lugar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 μ l de acetonitril, y se insertaron 640 μ l de Beaucage (0,2 M) en la columna durante 180 segundos. El sistema se lavó con 320 μ l de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 μ l de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 μ l de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 μ l de acetonitril. El compuesto se trató con 1400 μ l de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.

[0610] El acoplamiento se llevó a cabo con 80 μ l de 5'-O-DMT-N⁶-benzoil-2'-desoxiadenosina-3'-(2-cianoetil-N,N-diisopropil)fosforamidita (0,07 M) y 236 μ l DCI en acetonitril (0,25 M). Se dejó que la reacción de acoplamiento tuviera lugar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 μ l de acetonitril, y se insertaron 640 μ l de Beaucage (0,2 M) en la columna durante 180 segundos. El sistema se lavó con 320 μ l de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 μ l de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 μ l de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 μ l de acetonitril. El compuesto se trató con 1400 μ l de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.

[0611] El acoplamiento se llevó a cabo con 80 μ l de 5'-O-DMT-N²-isobutil-2'-desoxiguanosina-3'-(2-cianoetil-N,N-diisopropil)fosforamidita (0,07 M) y 236 μ l DCI en acetonitril (0,25 M). Se dejó que la reacción de acoplamiento tuviera lugar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 μ l de acetonitril, y se insertaron 640 μ l de Beaucage (0,2 M) en la columna durante 180 segundos. El sistema se lavó con 320 μ l de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 μ l de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 μ l de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 μ l de acetonitril. El compuesto se trató con 1400 μ l de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.

[0612] El acoplamiento se llevó a cabo con 80 μ l de 5'-O-DMT-N⁶-benzoil-2'-desoxiadenosina-3'-(2-cianoetil-N,N-diisopropil)fosforamidita (0,07 M) y 236 μ l DCI en acetonitril (0,25 M). Se dejó que la reacción de acoplamiento tuviera lugar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 μ l de acetonitril, y se insertaron 640 μ l de Beaucage (0,2 M) en la columna durante 180 segundos. El sistema se lavó con 320 μ l de acetonitril. Para la etapa de cobertura, se agregaron 448 μ l de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 μ l de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó que reaccionaran durante 45 seg. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 μ l de acetonitril. El compuesto se trató con 1400 μ l de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.

[0613] El acoplamiento se llevó a cabo con 80 μ l de 5'-O-DMT-2'-desoximidina-3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]fosforamidita (0,07 M) y 236 μ l de DCI en acetonitril (0,25 M). Se dejó que la reacción de acoplamiento tuviera lugar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 μ l de acetonitril, y se insertaron 640 μ l de Beaucage (0,2 M) en la columna durante 180 segundos. El sistema se lavó con 320 μ l de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 μ l de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 μ l de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 μ l de acetonitril. El compuesto se trató con 1400 μ l de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s

para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.

[0614] El acoplamiento se llevó a cabo con 80 µl de 5'-O-DMT-N⁶-benzoil-2'-desoxiadenosina-3'-(2-cianoetil-N,N-diisopropil)fosforamidita (0,07 M) y 236 µl DCI en acetonitril (0,25 M). Se dejó que la reacción de acoplamiento tuviera lugar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 µl de acetonitril, y se insertaron 640 µl de Beaucage (0,2 M) en la columna durante 180 segundos. El sistema se lavó con 320 µl de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 µl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 µl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 µl de acetonitril. El compuesto se trató con 1400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.

[0615] El acoplamiento se llevó a cabo con 80 µl de 5'-O-DMT-N⁴-benzoil-2'-desoxicitidina-3'-(2-cianoetil-N,N-diisopropil)fosforamidita (0,07 M) y 236 µl DCI en acetonitril (0,25 M). Se dejó que la reacción de acoplamiento tuviera lugar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 µl de acetonitril, y se insertaron 640 µl de Beaucage (0,2 M) en la columna durante 180 segundos. El sistema se lavó con 320 µl de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 µl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 µl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 µl de acetonitril. El compuesto se trató con 1400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.

[0616] El acoplamiento se llevó a cabo con 80 µl de 5'-O-DMT-2'-desoxitimidina-3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]fosforamidita (0,07 M) y 236 µl de DCI en acetonitril (0,25 M). Se dejó que la reacción de acoplamiento tuviera lugar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 µl de acetonitril, y se insertaron 640 µl de Beaucage (0,2 M) en la columna durante 180 segundos. El sistema se lavó con 320 µl de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 µl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 µl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 µl de acetonitril. El compuesto se trató con 1400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.

[0617] El acoplamiento se llevó a cabo con 80 µl de 5'-O-DMT-N²-isobutil-2'-desoxiguanosina-3'-(2-cianoetil-N,N-diisopropil)fosforamidita (0,07 M) y 236 µl DCI en acetonitril (0,25 M). Se dejó que la reacción de acoplamiento tuviera lugar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 µl de acetonitril, y se insertaron 640 µl de Beaucage (0,2 M) en la columna durante 180 segundos. El sistema se lavó con 320 µl de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 µl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 µl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 µl de acetonitril. El compuesto se trató con 1400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.

[0618] El acoplamiento se llevó a cabo con 80 µl de 5'-O-DMT-N⁴-benzoil-2'-desoxicitidina-3'-(2-cianoetil-N,N-diisopropil)fosforamidita (0,07 M) y 236 µl DCI en acetonitril (0,25 M). Se dejó que la reacción de acoplamiento tuviera lugar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 µl de acetonitril, y se insertaron 640 µl de Beaucage (0,2 M) en la columna durante 180 segundos. El sistema se lavó con 320 µl de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 µl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 µl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 µl de acetonitril. El compuesto se trató con 1400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.

[0619] El acoplamiento se llevó a cabo con 80 µl de 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-metileno timidina 3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]fosforamidita (0,07 M) y 236 µl de DCI en acetonitril (0,25 M). Se dejó que la reacción de acoplamiento tuviera lugar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 µl de acetonitril, y se insertaron 640 µl de Beaucage (0,2 M) en la columna durante 180 segundos. El sistema se lavó con 320 µl de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 µl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 µl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 µl de acetonitril. El compuesto se trató con 1400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.

[0620] El acoplamiento se llevó a cabo con 80 µl de 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-metilen-5-metil-N⁴-benzoilcitidina-3'-(2-cianoetil-N,N-diisopropil)fosforamidita (0,07 M) y 236 µl de DCI en acetonitril (0,25 M). Se dejó que la reacción de acoplamiento tuviera lugar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 µl de acetonitril, y se insertaron 640 µl de Beaucage (0,2 M) en la columna durante 180 segundos. El sistema se lavó con 320 µl de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 µl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 µl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 µl de acetonitril. El compuesto se trató con 1400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.

[0621] Una vez completada la síntesis en fase sólida, los oligonucleótidos antisentido se trataron con una solución

de dietilamina al 20% en acetonitril (Biosolve BV, Valkenswaard, Países Bajos) durante 20 min. para eliminar los grupos protectores de cianoetilo en el esqueleto de fosfato.

Posteriormente, los oligonucleótidos antisentido se escindieron del soporte sólido y se desprotegeron adicionalmente con 5 mL de amoniaco acuoso concentrado durante 16 horas a 55°C. El soporte sólido se separó de los oligonucleótidos antisentido mediante filtración o centrifugación.

[0622] A continuación, los oligonucleótidos antisentido crudos se purificaron mediante cromatografía líquida de alto rendimiento de intercambio aniónico (HPLC) en un sistema AKTA Explorer (GE Healthcare, Freiburg, Alemania) y una columna empaquetada con la Source Q15 (GE Healthcare). El tampón A era perclorato sódico 10 mM, Tris 20 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4 y contenía 20% de acetonitril y el tampón B era el mismo que el tampón A, con la excepción del perclorato sódico 500 mM. Se empleó un gradiente de 15% de B a 55% de B dentro de 32 volúmenes de columna (CV). Se registraron trazas UV a 280 nm. Las fracciones apropiadas se agruparon y precipitaron con NaOAc 3 M, pH = 5,2 y etanol al 70%. Finalmente, el sedimento se lavó con etanol al 70%.

Ejemplo 435

C*b¹Tb¹dC*dGdTdCdAdTdAdGdAC*b¹C*b¹Gb¹ (Seq. ID No. 143ad)

[0623] El LNA se unió a CPG de acuerdo con el procedimiento general. La reacción de acoplamiento y la etapa de taponado también se llevaron a cabo como se describe en el ejemplo 434. Después de la etapa de taponado, el sistema se lavó con 800 µl de acetonitril y se insertaron 400 µl de yodo 0,02 M en THF/piridina/H₂O en la columna para 45 s. El sistema se lavó después de la etapa de oxidación con 24 µl de acetonitril. Después de la purificación, el oligonucleótido antisentido se recibió con una pureza del 88,7%.

Ejemplo 436

/5spC3s/C*b¹sTb¹sdC*dGdTdC*dA*dTdAdGdA*sC*b¹sC*b¹sGb¹ (Seq. ID No. 143af)

[0624] El compuesto se sintetizó de acuerdo con el procedimiento general con las unidades de construcción de ADN y LNA apropiadas, como se ejemplifica en el ejemplo 434 y el ejemplo 435. Pero con la excepción de que después del último nucleótido se ha acoplado al oligonucleótido y se realizaron los posteriores pasos de oxidación y tapado, se agregaron 80 µl de fosforamidita-C3 (0,07 M) y 236 µl de DCI en acetonitril (0,25 M). Se dejó que el acoplamiento tuviera lugar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 µl de acetonitril. Los pasos subsiguientes se realizaron como se describe en el ejemplo 434 y el ejemplo 435. Después de la purificación, el oligonucleótido antisentido se recibió con una pureza del 94,4%.

Ejemplo 437

C*b¹sTb¹sdC*dGdTdC*dA*dTdAdGdA*sC*b¹sC*b¹sGb¹/3spC3s/ (Seq. ID No. 143ag)

[0625] 3'-Espaciador C3 CPG (0,2 µmol) se trató con 1400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT. Después de varios lavados con una cantidad total de 800 µl de acetonitril, la reacción de acoplamiento se llevó a cabo con 80 µl de 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-metilen-N²-diemetilformamidineguanosina-3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita (0,07 M) y 236 µl de DCI en acetonitril (0,25 M). Se dejó que la reacción de acoplamiento tuviera lugar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 µl de acetonitril, y se insertaron 640 µl de Beaucage (0,2 M) en la columna durante 180 segundos. El sistema se lavó con 320 µl de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 µl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 µl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 µl de acetonitril. El compuesto se trató con 1400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT. Las reacciones posteriores se realizaron como se describe en el ejemplo 434 y el ejemplo 435. Después de la purificación, el oligonucleótido antisentido se recibió con una pureza del 91,6%.

Ejemplo 438

C*b¹ssTb¹ssC*b¹ssdGssdTssdC*ssdAssdTssdAssdGssdAssC*b¹ssC*b¹ssGb¹ (Seq. ID No. 143t)

[0626] LCAA ligada a 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-metilen-N²-dimetilformamidineguanosina-3'-O-succiniloil (0,2 µmol) se trató con 1400 µl de ácido tricloroacético al 3% en Diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT. Después de varios lavados con una cantidad total de 800 µl de acetonitril, se llevó a cabo la reacción de acoplamiento con 38 µl de 5'-O-DMT-2'-O-4'-C-metilen-5-metil-N⁴-benzoilciticidina-3'-[(β-benzoilmercapto)etil]pirrolidinoltio-fosforamidita (0,15 M) en 10% de diclorometano (v/v) en acetonitril y 236 µl de DCI en acetonitril (0,25 M). La reacción de acoplamiento debió tener lugar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 µl de acetonitril, y se insertaron 900 µl de DDTT (0,05 M en piridina/acetonitril 4:1 v/v) en la columna para 240 s. El sistema se lavó con 320 µl de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 µl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 µl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina

(1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 µl de acetonitril. El compuesto se trató con 1400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.

5 **[0627]** El acoplamiento se llevó a cabo con 38 µl de 5'-O-DMT-2'-O-4'-C-metilen-5-metil-N⁴-benzoilcididina-3'-[(β-benzoilmercapto)etil]pirrolidinoltiofosforamidita (0,15 M) en diclorometano al 10% (v/v) en acetonitril y 236 µl de DCI en acetonitril (0,25 M). La reacción de acoplamiento se dejó llevar a cabo durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 µl de acetonitril y se insertaron 900 µl de DDTT (0,05 M en piridina/acetonitril 4:1 v/v) en la columna para 240 s. El sistema se enjuagó con 320 µl de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 µl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 µl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 µl de acetonitril. El compuesto se trató con 1400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.

15 **[0628]** El alargamiento adicional del oligonucleótido se realizó de la misma manera.

[0629] Una vez completada la síntesis en fase sólida, los oligonucleótidos antisentido se trataron con 850 µl de amoníaco en etanol concentrado (amoníaco/etanol 3:1 v/v) a 55°C durante 15 - 16 h para separar el oligonucleótido antisentido del soporte sólido y desproteger el grupo tiol.

20 **[0630]** A continuación, se purificó el oligonucleótido antisentido en bruto mediante cromatografía de intercambio aniónico usando una columna Mono Q 10/100 GL. Las burbujas se prepararon con agua tratada con DEPC, y sus composiciones fueron las siguientes: Tampón A: Tris-HCl 25 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0; Tampón B: Tris-HCl 25 mM, EDTA 1 mM, NaCl 1 M, pH 8,0.

25 Ejemplo 439 - 534

[0631] Los otros oligonucleótidos de la Tabla 4 se sintetizaron de acuerdo con el procedimiento general y como se muestra en los ejemplos. La preparación del oligonucleótido antisentido que incluye β-D-tio-LNA, α-L-oxi-LNA, β-D-(NH)-LNA o β-D-(NCH₃)-LNA se realizó en las mismas unidades. así como los oligonucleótidos antisentido que contienen unidades β-D-oxi-LNA.

Ejemplo 535

35 C*b¹sAb¹sGb¹sdGsdCsdAsdTsdTsdAsdAsdTsdAsdAsdAsGb¹sTb¹sGb¹ (Seq. ID No. 213k)

[0632] 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-metilen-N²-dimetilformamidineguanosina-3'-O-succinil ligado a LCAA CPG (0,2 µmol) se trató con 1400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT. Después de varios lavados con una cantidad total de 800 µl de acetonitril, la reacción de acoplamiento se llevó a cabo con 80 µl de 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-metileno timidina 3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita (0,07 M) y 236 µl de DCI en acetonitril (0,25 M). Se dejó que la reacción de acoplamiento tuviera lugar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 µl de acetonitril, y se insertaron 640 µl de Beaucage (0,2 M) en la columna durante 180 segundos. El sistema se lavó con 320 µl de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 µl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 µl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 µl de acetonitril. El compuesto se trató con 1400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.

50 **[0633]** El acoplamiento se llevó a cabo con 80 µl de 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-metileno-N²-dimetilformamidineguanosina-3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropilo)]-fosforamidita (0,07 M) y 236 µl de DCI en acetonitril (0,25 M). Se dejó que la reacción de acoplamiento tuviera lugar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 µl de acetonitril, y se insertaron 640 µl de Beaucage (0,2 M) en la columna durante 180 segundos. El sistema se lavó con 320 µl de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 µl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 µl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 µl de acetonitril. El compuesto se trató con 1400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.

60 **[0634]** El acoplamiento se llevó a cabo con 80 µl de 5'-O-DMT-N⁶-benzoil-2'-desoxiadenosina-3'-(2-cianoetil-N,N-diisopropil)fosforamidita (0,07 M) y 236 µl DCI en acetonitril (0,25 M). Se dejó que la reacción de acoplamiento tuviera lugar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 µl de acetonitril, y se insertaron 640 µl de Beaucage (0,2 M) en la columna durante 180 segundos. El sistema se lavó con 320 µl de acetonitril. Para la etapa de cobertura, se agregaron 448 µl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 µl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó que reaccionaran durante 45 seg. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 µl de acetonitril. El compuesto se trató con 1400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.

se insertaron 640 µl de Beaucage (0,2 M) en la columna durante 180 segundos. El sistema se lavó con 320 µl de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 µl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 µl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 µl de acetonitril. El compuesto se trató con 1400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.

[0643] El acoplamiento se realizó con 80 µl de 5'-O-DMT-N⁴-benzoil-2'-desoxicitidina-3'-(2-cianoetil-N,N-diisopropil)fosforamidita (0,07 M) y 236 µl DCI en acetonitril (0,25 M). Se dejó que la reacción de acoplamiento tuviera lugar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 µl de acetonitril, y se insertaron 640 µl de Beaucage (0,2 M) en la columna durante 180 segundos. El sistema se lavó con 320 µl de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 µl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 µl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 µl de acetonitril. El compuesto se trató con 1400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.

[0644] El acoplamiento se llevó a cabo con 80 µl de 5'-O-DMT-N²-isobutil-2'-desoxiguanosina-3'-(2-cianoetil-N,N-diisopropil)fosforamidita (0,07 M) y 236 µl DCI en acetonitril (0,25 M). Se dejó que la reacción de acoplamiento tuviera lugar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 µl de acetonitril, y se insertaron 640 µl de Beaucage (0,2 M) en la columna durante 180 segundos. El sistema se lavó con 320 µl de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 µl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 µl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 µl de acetonitril. El compuesto se trató con 1400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.

[0645] El acoplamiento se llevó a cabo con 80 µl de 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-metileno-N²-dimetilformamidinaguanosina-3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropilo)]-fosforamidita (0,07 M) y 236 µl de DCI en acetonitril (0,25 M). Se dejó que la reacción de acoplamiento tuviera lugar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 µl de acetonitril, y se insertaron 640 µl de Beaucage (0,2 M) en la columna durante 180 segundos. El sistema se lavó con 320 µl de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 µl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 µl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 µl de acetonitril. El compuesto se trató con 1400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.

[0646] El acoplamiento se llevó a cabo con 80 µl de 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-metileno-N⁶-benzoiladenosina-3'-(2-cianoetil-N,N-diisopropil)fosforamidita (0,07 M) y 236 µl de DCI en acetonitril (0,25 M). La reacción de acoplamiento tuvo lugar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 µl de acetonitril, y se insertaron 640 µl de Beaucage (0,2 M) en la columna durante 180 segundos. El sistema se enjuagó con 320 µl de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 µl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 µl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 µl de acetonitril. El compuesto se trató con 1400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.

[0647] El acoplamiento se llevó a cabo con 80 µl de 5'-O-DMT-2'-O-4'-C-metileno-5-metil-N⁴-benzoilcitidina-3'-(2-cianoetil-N,N-diisopropil)fosforamidita (0,07 M) y 236 µl de DCI en acetonitril (0,25 M). Se dejó que la reacción de acoplamiento tuviera lugar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 µl de acetonitril, y se insertaron 640 µl de Beaucage (0,2 M) en la columna durante 180 segundos. El sistema se lavó con 320 µl de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 µl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 µl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 µl de acetonitril. El compuesto se trató con 1400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.

[0648] Una vez completada la síntesis en fase sólida, los oligonucleótidos antisentido se trataron con una solución de dietilamina al 20% en acetonitril (Biosolve BV, Valkenswaard, Países Bajos) durante 20 min. para eliminar los grupos protectores de cianoetilo en el esqueleto de fosfato.

Posteriormente, los oligonucleótidos antisentido se escindieron del soporte sólido y se desprotegieron adicionalmente con 5 mL de amoniaco acuoso concentrado durante 16 horas a 55°C. El soporte sólido se separó de los oligonucleótidos antisentido mediante filtración o centrifugación.

[0649] A continuación, los oligonucleótidos antisentido crudos se purificaron mediante cromatografía líquida de alto rendimiento de intercambio aniónico (HPLC) en un sistema AKTA Explorer (GE Healthcare, Freiburg, Alemania) y una columna empaquetada con Fuente Q15 (GE Healthcare). El tampón A era perclorato sódico 10 mM, Tris 20 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4 y contenía 20% de acetonitril y el tampón B era el mismo que el tampón A, con la excepción del perclorato sódico 500 mM. Se empleó un gradiente de 15% de B a 55% de B dentro de 32 volúmenes de columna (CV). Se registraron trazas UV a 280 nm. Las fracciones apropiadas se agruparon y precipitaron con NaOAc 3 M, pH = 5,2 y etanol al 70%. Finalmente, el sedimento se lavó con etanol al 70%.

Ejemplo 536

C*b¹Ab¹Gb¹dGdC*dAdTdTdAdAdAdTAdAdAGb¹Tb¹Gb¹ (número de identificación de ID 213n)

5 **[0650]** El LNA se unió a CPG de acuerdo con el procedimiento general. La reacción de acoplamiento y la etapa de terminación también se llevaron a cabo como se describe en el ejemplo 535. Después de la etapa de captura, el sistema se lavó con 800 µl de acetonitril y se insertaron 400 µl de yodo 0,02 M en THF/piridina/H₂O en la columna para 45 s. El sistema se lavó después de la etapa de oxidación con 24 µl de acetonitril. Después de la purificación, el oligonucleótido antisentido se recibió con una pureza de 91,4%.

10

Ejemplo 537

/5spC3s/C*b¹sAb¹sGb¹sdGsdC*sdAsdTsdTsdAsdAsdTsdAsdAsdAsGb¹sTb¹sGb¹ (Seq. ID No. 213o)

15 **[0651]** El compuesto se sintetizó de acuerdo con el procedimiento general con las unidades de construcción de ADN y LNA apropiadas, como se ejemplificó en el ejemplo 535. Pero con la excepción de que después del último nucleótido se había acoplado al oligonucleótido y se llevaron a cabo los pasos subsiguientes de oxidación y tapado, se agregaron 80 µl de fosforamidita-C3 (0,07 M) y 236 µl de DCI en acetonitril (0,25 M). Se dejó que el acoplamiento tuviera lugar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 µl de acetonitril.

20 Los pasos subsiguientes se realizaron como se describe en el ejemplo 535. Después de la purificación, el oligonucleótido antisentido se recibió con una pureza del 87,1%.

Ejemplo 538

25 **C*b¹sAb¹sGb¹**sdGsdC*sdAsdTsdTsdAsdAsdTsdAsdAsdAsGb¹sTb¹sGb¹/3spC3s/ (Seq. ID No. 213p)

[0652] Se trató 3'-Espaciador C3 CPG (0,2 µmol) con 1400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT. Después de varios lavados con una cantidad total de 800 µl de acetonitril, la reacción de acoplamiento se llevó a cabo con 80 µl de 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-metilen-N²-dimetilformamidineguanosina-3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita (0,07 M) y 236 µl de DCI en acetonitril (0,25 M). Se dejó que la reacción de acoplamiento tuviera lugar durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 µl de acetonitril, y se insertaron 640 µl de Beaucage (0,2 M) en la columna durante 180 segundos. El sistema se lavó con 320 µl de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 µl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 µl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 µl de acetonitril. El compuesto se trató con 1400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT. Las reacciones posteriores se realizaron como se describe en el ejemplo 535. Después de la purificación, se recibió el oligonucleótido antisentido con una pureza del 95,7%.

Ejemplo 539

[0653]

45

C*b¹ssAb¹ssGb¹ssdGssdC*ssdAssdTssdTssdAssdAssdTssdAssdAssAb¹ssGb¹ssTb¹ssGb¹ (Seq. ID No. 213ae)

50 **[0654]** 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-metilen-N²-dimetilformamidineguanosina-3'-O-succinil ligado a LCAA CPG (0,2 µmol) se trató con 1400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT. Después de varios lavados con una cantidad total de 800 µl de acetonitril, la reacción de acoplamiento se llevó a cabo con 38 µl de 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-metilen-timidina-3'-[(β-benzoilmercapto)etil]pirrolidinolfosforamidita (0,15 M) en diclorometano al 10% (v/v) en acetonitril y 236 µl de DCI en acetonitril (0,25 M). La reacción de acoplamiento se dejó llevar a cabo durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 µl de acetonitril y se insertaron 900 µl de DDTT (0,05 M en piridina/acetonitril 4:1 v/v) en la columna para 240 s. El sistema se enjuagó con 320 µl de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 µl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 µl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 µl de acetonitril.

60 El compuesto se trató con 1400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.

[0655] El acoplamiento se llevó a cabo con 38 µl de 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-metilen-N²-dimetilformamidineguanosina-3'-[(β-benzoilmercapto)etil]pirrolidinolfosforamidita (0,15 M) en diclorometano al 10% (v/v) en acetonitril y 236 µl de DCI en acetonitril (0,25 M). La reacción de acoplamiento se dejó llevar a cabo durante 250 segundos, y los reactivos en exceso se eliminaron rápidamente con 800 µl de acetonitril y se insertaron 900 µl de DDTT (0,05 M en

65

piridina/acetonitril 4:1 v/v) en la columna para 240 s El sistema se enjuagó con 320 µl de acetonitril. Para la etapa de tapado, se agregaron 448 µl de anhídrido acético en THF (1:9 v/v) y 448 µl de N-metilimidazol (NMI)/THF/piridina (1:8:1) y se dejó reaccionar durante 45 segundos. Al final de este ciclo, el sistema se lavó con 480 µl de acetonitril. El compuesto se trató con 1400 µl de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano durante 60 s para eliminar completamente el grupo de protección 5'-DMT.

[0656] El alargamiento adicional del oligonucleótido se realizó de la misma manera.

[0657] Al finalizar la síntesis en fase sólida, los oligonucleótidos antisentido se trataron con 850 µl de amoníaco en etanol concentrado (amoníaco/etanol 3:1 v/v) a 55°C durante 15 - 16 h para separar el oligonucleótido antisentido del soporte sólido y desproteger el grupo tiol.

[0658] A continuación, se purificó el oligonucleótido antisentido en bruto mediante cromatografía de intercambio aniónico usando una columna Mono Q 10/100 GL. Los tampones se prepararon con agua tratada con DEPC, y sus composiciones fueron las siguientes: Tampón A: Tris-HCl 25 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0; Tampón B: Tris-HCl 25 mM, EDTA 1 mM, NaCl 1 M, pH 8,0.

Ejemplos 540 - 640

[0659] Los otros oligonucleótidos de la Tabla 9 se sintetizaron de acuerdo con el procedimiento general y como se muestra en los ejemplos. La preparación del oligonucleótido antisentido que incluye β-D-tio-LNA, α-L-oxi-LNA, β-D-(NH)-LNA o β-D-(NCH₃)-LNA se realizó en las mismas unidades, así como los oligonucleótidos antisentido que contienen unidades β-D-oxi-LNA.

Listado de secuencias

[0660]

Seq. ID No. 1: Factor de crecimiento transformante de homo sapiens, receptor beta II (TGFB2), variante de transcripción 2, (antisentido; código de ADN)

ES 2 705 066 T3

	TTTAGCTACT	AGGAATGGGA	ACAGGAGGCA	GGATGCTCAC	CTGAGTATTT	TGCTTTATTC	60
5	AATCTAATAA	ACATTTTATT	TATGTAAAAG	ACAAACAATG	CATAGAATAA	AAATAAGTGC	120
	TTGAGACTTT	TGATATAAAA	AGAGTATATA	GCATTACAT	TCCTATTTTA	ATACATGAGT	180
	ACAGCTGAAG	TGTTCCATAA	AAGAATAAAA	CTTCCCTTT	ATGTATAGTA	GTGAAAAAAG	240
10	TCAGTATTTT	TAGGAACTAC	AGAATGTTAT	TCCTTGGTCT	TTTTTCTTGA	ATAAGAAAAA	300
	AAAACATAAA	CAAAACAAGC	CACAGTATCC	TCTGACACTA	CATTCCAGTT	TATGCTGATA	360
	ACCCAGAAGT	GAGAATACTC	TTGAATCTTG	AATATCTCAT	GAATGGACCA	GTATTCTAGA	420
	AACTCACCAC	TAGAGGTCAA	TGGGCAACAG	CTATTGGGAT	GGTATCAGCA	TGCCCTACGG	480
15	TGCAAGTGGA	ATTTCTAGGC	GCCTCTATGC	TACTGCAGCC	ACACTGTCTT	TAACTCTCAG	540
	CCCACCCACA	CTGAGGAGGG	TGCCTAGAGG	TTCTATTTCC	AAACCTTTGC	ATGTATCTTA	600
	AAAATCTCAA	TAAAATGAGA	CCTTCCACCA	TCCAAACAGA	GCTGATATTC	TCACTACCAG	660
20	TCCCTCTCTA	ATATTCCTAT	TTGGCTGAAA	ATAAGTAGCT	TCAAAAAGTT	TTAAAAAGA	720
	GATTACTTGC	AGCATTAAACA	CTTCTTTGTT	GATTAACAAG	TTTCCATATGG	AGTTTTAAAG	780
	CTCATACTTT	GTTCTTGTC	TTGTGGACAC	AAATTTTCTA	ACTGCAAATG	GGACCTTTGT	840
25	GTCCACATT	CAAATCCTCT	CTAGTAATTT	CTGCAAAGGT	TGAGAAGGCT	GGCATGATGG	900
	AGAGAACGGT	AACCATGAGG	AAAGCTTCTT	GGAGTAAAGC	ACTCCTCTCT	CCAATGCAGA	960
	GGGTAAAAC	ATTAACATAT	AAGCAAAAGA	AACTTGGGCT	AACTGAGACC	CTTAAAGGAG	1020
	TTCCCCTTTA	GTCCAATAAA	AGGCCAACTT	CAAATCTTAA	CACCAGATAA	GGTAGTCAAA	1080
30	ATCATATTAT	ATACCCAGAG	AATGACTGCT	TGAATGGACA	TTTCTTACAA	GGGACCTTGG	1140
	TTAGGTGCAG	ATTTAATTCC	TAGACTGGGG	TCCAGGTAGG	CAGTGGAAAG	AGCTAATGTT	1200
	TACAGTGAGA	AGTGAGGCAG	CTTTGTAAAGT	GTCTCCACAC	CTTCACATTT	TGTGAACGTG	1260
35	GACTGGAGAT	AACTGAAAAC	CATCTGCTAT	CCTTACCTGG	GGATCCAGAT	TTTCTGCAA	1320
	AATCTCCAAA	TATTTATAAA	GTGGCTTCAC	TTTTTGA AAC	GCTGTGCTGA	CCAAACAAAA	1380
	CATATGTTTTA	GAGTGCCTGA	GGTCATAGTC	CTGACAATGA	TAGTATTGTG	TAGTTGAAAT	1440
40	CCTCTTCATC	AGGCCAAACT	GTGCTTGAGC	AATCAGGAGC	CCAGAAAGAT	GGAACCCATT	1500
	GGTGTTTGTA	TAGAAAAC	GAAAATCAAG	TCAAGTGTAA	TGAAAAAGTA	AACACGATAA	1560
	AGCCTAGAGT	GAGAATTTGC	TCCTTTTGTAG	AAAAGGATGA	AGGCTGGGAG	CAGAGAATAG	1620
45	TAACATAAGT	GCAGGGGAAA	GATGAAAAAA	AGAACAATTT	TTCATTAGTA	GATGGTGGGG	1680
	CAATCGCATG	GATGGGGACA	TCTGTTCTGA	TTTTTCTGCA	ACCCATGAAG	GTAAAAAGTG	1740
	GGGTTCAAAA	CATTCAAGGT	ATTAAAGATG	GGGTAGAGTT	TCTAAACTAG	GTTGAGGGAG	1800
	AGTTTCTAAA	CTAGCCCCC	AGATTTGGGG	CTTGGAGCTT	AAATGAAAAG	TCCAGGAGAA	1860
50	ATAAGGGCAC	ACAGGAACCC	CGGGAACACT	GGTCCTCAA	CAGTGCCACT	GTACTTAGTT	1920
	CCATGGCCAG	AAGAGAAGTG	CTAGGCAGGG	AATGATTATF	TTGCAAAAGC	AAGTGC AATG	1980
	TGGTCATAGC	TGGCTGTGAG	ACATGGAGCC	TCTTTCCTCA	TGCAAAGTTC	ACTGTTTTAC	2040
55	AGTCAGAGAA	CCACTGCATG	TGTGATTGTC	AAATGCTAAT	GCTGTCATGG	GTCCCTTCC	2100
	TCTCTGCTTG	GTTCTGGAGT	TCTCCAATAA	AACCAATTTT	CTGGGAATAT	TTGATGTTTT	2160

ES 2 705 066 T3

	TCCTTGTCTC	TTTTCAAGGT	ATGGCTATAT	ATATAGAGCT	ATAGACATAT	ATAGATATAT	2220
5	ATATATATAT	ATAAAACATA	GCTATTGATA	TTTATATACA	GGCATTAAATA	AAGTGCAAAT	2280
	GTTATTGGCT	ATTGTAAAAA	TCAATCTCAT	TTCCTGAGGA	AGTGCTAACA	CAGCTTATCC	2340
	TATGACAATG	TCAAAGGCAT	AGAATGCTCT	ATGTACCCCA	CTCCCTGCTG	CTGTTGTTTC	2400
	TGCTTATCCC	CACAGCTTAC	AGGGAGGGGA	GTGACCCCT	TGGTTTTCCA	GGAAAGCATCA	2460
10	GTTCAGGGGC	AGCTTCCTGC	TGCCTCTGTT	CTTTGGTGAG	AGGGGCAGCC	TCTTTGGACA	2520
	TGGCCCAGCC	TGCCCCAGAA	GAGCTATTTG	GTAGTGTTTA	GGGAGCCGTC	TTCAGGAATC	2580
	TTCTCCTCCG	AGCAGCTCCT	CCCCGAGAGC	CTGTCCAGAT	GCTCCAGCTC	ACTGAAGCGT	2640
15	TCTGCCACAC	ACTGGGCTGT	GAGACGGGCC	TCTGGGTCGT	GGTCCCAGCA	CTCAGTCAAC	2700
	GTCTCACACA	CCATCTGGAT	GCCCTGGTGG	TTGAGCCAGA	AGCTGGGAAT	TTCTGGTCCG	2760
	CCTCGATCTC	TCAACACGTT	GTCCTTCATG	CTTTCGACAC	AGGGGTGCTC	CCGCACCTTG	2820
	GAACCAAATG	GAGGCTCATA	ATCTTTTACT	TCTCCCACTG	CATTACAGCG	AGATGTCATT	2880
20	TCCCAGAGCA	CCAGAGCCAT	GGAGTAGACA	TCGGTCTGCT	TGAAGGACTC	AACATTCTCC	2940
	AAATTCATCC	TGGATTCTAG	GACTTCTGGA	GCCATGTATC	TTGCAGTTCC	CACCTGCCCA	3000
	CTGTTAGCCA	GGTCATCCAC	AGACAGAGTA	GGGTCCAGAC	GCAGGGAAAG	CCCAAAGTCA	3060
25	CACAGGCAGC	AGGTTAGGTC	GTTCTTCACG	AGGATATTGG	AGCTCTTGAG	GTCCCTGTGC	3120
	ACGATGGGCA	TCTTGGGCTT	CCCACATGGA	GTGTGATCAC	TGTGGAGGTG	AGCAATCCCC	3180
	CGGGCGAGGG	AGCTGCCAG	CTTGCAGCAG	TCCTCCCAGC	TGATGACATG	CCGCGTCAGG	3240
	TACTCCTGTA	GGTTGCCCTT	GGCGTGGAAG	GCGGTGATCA	GCCAGTATTG	TTTCCCCAAC	3300
30	TCCGTCTTCC	GCTCCTCAGC	CGTCAGGAAC	TGGAGTATGT	TCTCATGCTT	CAGATTGATG	3360
	TCTGAGAAGA	TGTCCTTCTC	TGTCCTCCAA	GAGGCATACT	CCTCATAGGG	AAAGATCTTG	3420
	ACTGCCACTG	TCTCAAAGTG	CTCTGAAAGT	TTCTGCTTCA	GCTTGGCCTT	ATAGACCTCA	3480
35	GCAAAGCGAC	CTTCCCCAC	CAGGGTGTCC	AGCTCAATGG	GCAGCAGCTC	TGTGTTGTGG	3540
	TTGATGTTGT	TGGCACACGT	GGAGCTGATG	TCAGAGCGGT	CATCTTCCAG	GATGATGGCA	3600
	CAGTCTCCG	TGAACTCCAT	GAGCTTCCGC	GTCTTCCCG	TTECCAGGT	TGAACTCAGC	3660
	TTCTGCTGCC	GGTTAACCG	GTAGCAGTAG	AAGATGATGA	TGACAGATAT	GGCAACTCCC	3720
40	AGTGGTGGCA	GGAGGCTGAT	GCCTGTCACT	TGAAATATGA	CTAGCAACAA	GTCAGGATTG	3780
	CTGGTGTAT	ATTCTTCTGA	GAAGATGATG	TTGTCAATTG	ACTCATCAGA	GCTACAGGAA	3840
	CACATGAAGA	AAGTCTCACC	AGGCTTTTTT	TTTTCTTCA	TAATGCACTT	TGGAGAAGCA	3900
45	GCATCTTCCA	GAATAAAGTC	ATGGTAGGGG	AGCTTGGGGT	CATGGCAAAC	TGTCTCTAGT	3960
	GTTATGTTCT	CGTCATTCTT	TCTCCATACA	GCCACACAGA	CTTCTGTGG	CTTCTCACAG	4020
	ATGGAGGTGA	TGCTGCAGTT	GCTCATGCAG	GATTTCTGGT	TGTCACAGGT	GGAAAATCTC	4080
	ACATCACAAA	ATTTACACAG	TTGTGGAAC	TTGACTGCAC	CGTTGTTGTC	AGTGACTATC	4140
50	ATGTCGTTAT	TAACCGACTT	CTGAACGTGC	GGTGGGATCG	TGCTGGCGAT	ACGCGTCCAC	4200
	AGGACGATGT	GCAGCGGCCA	CAGGCCCTTG	AGCAGCCCCC	GACCCATGGC	AGACCCCGCT	4260
	GCTCGTCATA	GACCGAGCCC	CCAGCGCAGC	GGACGGCGCC	TTCCCGGACC	CCTGGCTGCG	4320
55	CCTCCGCGCC	GCGCCCTCTC	CGGACCCCGC	GCCGGGCGCG	CAGCGCAGAT	GTGCGGGCCA	4380
	GATGTGGGCG	CCGCTCGCCA	GCCAGGAGGG	GGCCTGGAGG	CCGGCGAGGC	GCGGGGAGGC	4440
	CCCCGGCGGC	CGAGGGAAGC	TGCACAGGAG	TCCGGCTCCT	GTCCCGAGCG	GGTGCACGCG	4500
	CGGGGGTGTG	GTCGCTCCGT	GCGGCGGAGT	GACTCACTCA	ACTTCAACTC	AGCGCTGCGG	4560
60	GGGAAACAGG	AAACTCCTCG	CCAACAGCTG	GGCAGGACCT	CTCTCCGCC	GAGAGCCTTC	4620
	TCCCTCTCC						4629

ES 2 705 066 T3

Seq. ID No. 2: Factor de crecimiento transformante de homo sapiens, receptor beta II (TGFB2), variante de transcripción 2, ARNm (sentido; escrito en código de ADN)

5	GGAGAGGGAG AAGGCTCTCG GGCGGAGAGA GGTCTGCCC AGCTGTTGGC GAGGAGTTTC	60
	CTGTTTCCCC CGCAGCGCTG AGTTGAAGTT GAGTGAGTCA CTCGCGCGCA CGGAGCGACG	120
	ACACCCCCGC GCGTGCACCC GCTCGGGACA GGAGCCGGAC TCCTGTGCAG CTTCCCTCGG	180
10	CCGCCGGGGG CCTCCCCGCG CCTCGCCGGC CTCCAGGCC CCTCCTGGCT GGCGAGCGGG	240
	CGCCACATCT GGCCCGCACA TCTGCGCTGC CGGCCGGCG CGGGGTCCGG AGAGGGCGCG	300
	GCGCGGAGGC GCAGCCAGGG GTCCGGGAAG GCGCCGTCCG CTGCGCTGGG GGCTCGGTCT	360
	ATGACGAGCA GCGGGGTCTG CCATGGGTCTG GGGGCTGCTC AGGGGCCTGT GGCCGCTGCA	420
15	CATCGTCTTG TGGACGCGTA TCGCCAGCAC GATCCCACCG CACGTTGAGA AGTCGGTTAA	480
	TAACGACATG ATAGTCACTG ACAACAACGG TGCAGTCAAG TTTCCACAAC TGTGTAAATT	540
	TTGTGATGTG AGATTTTCCA CCTGTGACAA CCAGAAATCC TGCATGAGCA ACTGCAGCAT	600
20	CACCTCCATC TGTGAGAAGC CACAGGAAGT CTGTGTGGCT GTATGGAGAA AGAATGACGA	660
	GAACATAACA CTAGAGACAG TTTGCCATGA CCCCAGCTC CCCTACCATG ACTTTATTCT	720
	GGAAGATGCT GCTTCTCCAA AGTGCATTAT GAAGGAAAAA AAAAAGCCTG GTGAGACTTT	780
25	CTTCATGTGT TCCTGTAGCT CTGATGAGTG CAATGACAAC ATCATCTTCT CAGAAGAATA	840
	TAACACCAGC AATCCTGACT TGTTGCTAGT CATATTTCAA GTGACAGGCA TCAGCCTCCT	900
	GCCACCCTG GGAGTTGCCA TATCTGTCAT CATCATCTTC TACTGCTACC GCGTTAACCG	960
30	GCAGCAGAAG CTGAGTTCAA CCTGGGAAAC CGGCAAGACG CGGAAGCTCA TGGAGTTCAG	1020
	CGAGCACTGT GCCATCATCC TGGAAGATGA CCGCTCTGAC ATCAGCTCCA CGTGTGCCAA	1080
	CAACATCAAC CACAACACAG AGCTGCTGCC CATTGAGCTG GACACCCTGG TGGGGAAAGG	1140
	TCGCTTTGCT GAGGTCTATA AGGCCAAGCT GAAGCAGAAC ACTTCAGAGC AGTTTGAGAC	1200
35	AGTGGCAGTC AAGATCTTTC CCTATGAGGA GTATGCCTCT TGGAAGACAG AGAAGGACAT	1260
	CTTCTCAGAC ATCAATCTGA AGCATGAGAA CATACTCCAG TTCTTGACGG CTGAGGAGCG	1320
	GAAGACGGAG TTGGGGAAAC AATACTGGCT GATCACCGCC TTCCACGCCA AGGGCAACCT	1380
40	ACAGGAGTAC CTGACGCGGC ATGTCATCAG CTGGGAGGAC CTGCGCAAGC TGGGCAGCTC	1440
	CCTCGCCCGG GGGATTGCTC ACCTCCACAG TGATCACACT CCATGTGGGA GGCCCAAGAT	1500
	GCCCATCGTG CACAGGGACC TCAAGAGCTC CAATATCCTC GTGAAGAACG ACCTAACCTG	1560
45	CTGCCTGTGT GACTTTGGGC TTTCCCTGCG TCTGGACCCT ACTCTGTCTG TGGATGACCT	1620
	GGCTAACAGT GGGCAGGTGG GAACTGCAAG ATACATGGCT CCAGAAGTCC TAGAATCCAG	1680
	GATGAATTTG GAGAATGTTG AGTCCTTCAA GCAGACCGAT GTCTACTCCA TGGCTCTGGT	1740
	GCTCTGGGAA ATGACATCTC GCTGTAATGC AGTGGGAGAA GTAAAAGATT ATGAGCCTCC	1800
50	ATTTGGTTCC AAGGTGCGGG AGCACCCCTG TGTCGAAAAGC ATGAAGGACA ACGTGTGAG	1860
	AGATCGAGGG CGACCAGAAA TTCCAGCTT CTGGCTCAAC CACCAGGGCA TCCAGATGGT	1920
	GTGTGAGACG TTGACTGAGT GCTGGGACCA CGACCAGAG GCCCGTCTCA CAGCCCAGTG	1980
55	TGTGGCAGAA CGCTTCAGTG AGCTGGAGCA TCTGGACAGG CTCTCGGGGA GGAGCTGCTC	2040
	GGAGGAGAAG ATTCCTGAAG ACGGCTCCCT AAACACTACC AAATAGCTCT TCTGGGGCAG	2100
	GCTGGGCCAT GTCCAAAGAG GCTGCCCTC TCACCAAAGA ACAGAGGCAG CAGGAAGCTG	2160

ES 2 705 066 T3

	CCCCTGAACT	GATGCTTCCT	GGAAAACCAA	GGGGGTCACT	CCCCTCCCTG	TAAGCTGTGG	2220
	GGATAAGCAG	AAACAACAGC	AGCAGGGAGT	GGGTGACATA	GAGCATTCTA	TGCCTTTGAC	2280
5	ATTGTCATAG	GATAAGCTGT	GTTAGCACTT	CCTCAGGAAA	TGAGATTGAT	TTTTACAATA	2340
	GCCAATAACA	TTTGCACTTT	ATTAATGCCT	GTATATAAAT	ATGAATAGCT	ATGTTTTATA	2400
	TATATATATA	TATATCTATA	TATGTCTATA	GCTCTATATA	TATAGCCATA	CCTTGAAAAG	2460
	AGACAAGGAA	AAACATCAAA	TATTCCCAGG	AAATTGGTTT	TATTGGAGAA	CTCCAGAACC	2520
10	AAGCAGAGAA	GGAAGGGACC	CATGACAGCA	TTAGCATTTG	ACAATCACAC	ATGCAGTGGT	2580
	TCCTTGACTG	TAAAACAGTG	AAC'TTTGCAT	GAGGAAAGAG	GCTCCATGTC	TCACAGCCAG	2640
	CTATGACCAC	ATTGCACTTG	CTTTTGCAAA	ATAATCATT	CCTGCCTAGC	ACTTCTCTTC	2700
15	TGGCCATGGA	ACTAAGTACA	GTGGCACTGT	TTGAGGACCA	GTGTTCCCGG	GGTTCCTGTG	2760
	TGCCCTTATT	TCCTCTGGAC	TTTTCAATTA	AGCTCCAAGC	CCCAAATCTG	GGGGGCTAGT	2820
	TTAGAAACTC	TCCCTCAACC	TAGTTTAGAA	ACTCTACCCC	ATCTTTAATA	CCTTGAATGT	2880
	TTTGAACCCC	ACTTTTTACC	TTCATGGGTT	GCAGAAAAAT	CAGAACAGAT	GTCCCCATCC	2940
20	ATGCGATTGC	CCCACCATCT	ACTAATGAAA	AATTGTTCTT	TTTTTCATCT	TTCCCCTGCA	3000
	CTTATGTTAC	TATCTCTGTC	TCCCAGCCTT	CATCCTTTTC	TAAAAAGGAG	CAAATTCTCA	3060
	CTCTAGGCTT	TATCGTGTTT	ACTTTTTCAT	TACACTTGAC	TTGATTTTCT	AGTTTTCTAT	3120
25	ACAAACACCA	ATGGGTTCCA	TCTTTCTGGG	CTCCTGATTG	CTCAAGCACA	GTTTGGCCTG	3180
	ATGAAGAGGA	TTTCAACTAC	ACAATACTAT	CATTGTCAGG	ACTATGACCT	CAGGCACCTCT	3240
	AAACATATGT	TTTGTGTTGGT	CAGCACAGCG	TTTCAAAAAG	TGAAGCCACT	TTATAAATAT	3300
30	TTGGAGATTT	TGCAGGAAAA	TCTGGATCCC	CAGGTAAGGA	TAGCAGATGG	TTTTCAGTTA	3360
	TCTCCAGTCC	ACGTTACAAA	AATGTGAAGG	TGTGGAGACA	CTTACAAAGC	TGCCTCACTT	3420
	CTCACTGTAA	ACATTAGCTC	FTTCCACTGC	CTACCTGGAC	CCCAGTCTAG	GAATTAATC	3480
	TGCACCTAAC	CAAGGTCCCT	TGTAAGAAAT	GTCCATTCAA	GCAGTCATTC	TCTGGGTATA	3540
35	TAATATGATT	TTGACTACCT	TATCTGGTGT	TAAGATTTGA	AGTTGGCCTT	TTATTGGACT	3600
	AAAGGGGAAC	TCCTTTAAGG	GTCTCAGTTA	GCCCAAGTTT	CTTTTGCTTA	TATGTTAATA	3660
	GTTTTACCCT	CTGCATTGGA	GAGAGGAGTG	CTTTACTCCA	AGAAGCTTTC	CTCATGGTTA	3720
40	CCGTCTCTC	CATCATGCCA	GCCTTCTCAA	CCTTTGCAGA	AATTACTAGA	GAGGATTTGA	3780
	ATGTGGGACA	CAAAGGTCCC	ATTTGCAGTT	AGAAAATTTG	TGTCCACAAG	GACAAGAACA	3840
	AAGTATGAGC	TTTAAAACCT	CATAGGAAAC	TTGTTAATCA	ACAAAGAAGT	GTTAATGCTG	3900
	CAAGTAATCT	CTTTTTTAAA	ACTTTTTGAA	GCTACTTATT	FTCAGCCAAA	TAGGAATATT	3960
45	AGAGAGGGAC	TGGTAGTGAG	AATATCAGCT	CTGTTTGGAT	GGTGGGAAGG	CTCATTTTAT	4020
	TGAGATTTTT	AAGATACATG	CAAAGGTTTG	GAAATAGAAC	CTCTAGGCAC	CCTCCTCAGT	4080
	GTGGGTGGGC	TGAGAGTTAA	AGACAGTGTG	GCTGCAGTAG	CATAGAGGCG	CCTAGAAATT	4140
50	CCACTTGAC	CGTAGGGCAT	GCTGATACCA	TCCCAATAGC	TGTTGCCCAT	TGACCTCTAG	4200
	TGGTGAGTTT	CTAGAATACT	GGTCCATTCA	TGAGATATTC	AAGATTCAAG	AGTATTCTCA	4260
	CTTCTGGGTT	ATCAGCATAA	ACTGGAATGT	AGTGTGAGAG	GATACTGTGG	CTTGTTTTGT	4320
	TTATGTTTTT	TTTTCTTATT	CAAGAAAAAA	GACCAAGGAA	TAACATTCTG	TAGTTCCTAA	4380
55	AAATACTGAC	TTTTTTCACT	ACTATACATA	AAGGGAAAGT	TTTATTCTTT	TATGGAACAC	4440
	TTCAGCTGTA	CTCATGTATT	AAAATAGGAA	TGTGAATGCT	ATATACTCTT	TTTATATCAA	4500
	AAGTCTCAAG	CACTTATTTT	TATCTATGTC	ATTGTTTGTG	TTTTACATAA	ATAAAATGTT	4560
60	TATTAGATTG	AATAAAGCAA	AATACTCAGG	TGAGCATCCT	GCCTCCTGTT	CCCATTCTCA	4620
	GTAGCTAAA						4629

ES 2 705 066 T3

Seq. ID No. 3: Factor de crecimiento transformante de homo sapiens, receptor beta II (TGFB2), variante de transcripción 2, ARNm (sentido; escrito en código de ADN)

5	GGAGAGGGAG AAGGCUCUCG GGCGGAGAGA GGUCCUGCCC AGCUGUUGGC GAGGAGUUUC	60
	CUGUUUCCCC CGCAGCGCUG AGUUGAAGUU GAGUGAGUCA CUCGCGCGCA CGGAGCGACG	120
	ACACCCCCGC GCGUGCAGCC GCUCGGGACA GGAGCCGGAC UCCUGUGCAG CUUCCCUCGG	180
10	CCGCCGGGGG CCUCCCCGCG CCUCGCCGGC CUCCAGGCC CCUCCUGGCU GGCGAGCGGG	240
	CGCCACAUCU GGCCCGCACA UCUGCGCUGC CGGCCCGGCG CGGGGUCCGG AGAGGGCGCG	300
	GCGCGGAGGC GCAGCCAGGG GUCCGGGAAG GCGCCGUCCG CUGCGCUGGG GGCUCGGUCU	360
15	AUGACGAGCA GCGGGGUCUG CCAUGGGUUG GGGGCUGCUC AGGGGCCUGU GGCCGCUGCA	420
	CAUCGUCCUG UGGACGCGUA UGCCAGCAC GAUCCACCG CACGUUCAGA AGUCGGUUA	480
	UAACGACAUG AUAGUCACUG ACAACAACGG UGCAGUCAAG UUCCACAAC UGUGUAAAUU	540
20	UUGUGAUGUG AGAUUUUCCA CCUGUGACAA CCAGAAUCC UGCAUGAGCA ACUGCAGCAU	600
	CACCUCCAUC UGUGAGAAGC CACAGGAAGU CUGUGUGGCU GUAUGGAGAA AGAAUGACGA	660
	GAACAUAACA CUAGAGACAG UUUGCCAUGA CCCAAGCUC CCCUACCAUG ACUUUAUUCU	720
	GGAAGAUGCU GCUUCUCCAA AGUGCAUUAU GAAGGAAAA AAAAGCCUG GUGAGACUUU	780
25	CUUCAUGUGU UCCUGUAGCU CUGAUGAGUG CAAUGACAAC AUCAUCUUCU CAGAAGAAUA	840
	UAACACCAGC AAUCCUGACU UGUUGCUAGU CAUAAUUCAA GUGACAGGCA UCAGCCUCCU	900
	GCCACCACUG GGAGUUGCCA UAUCUGUCAU CAUCAUCUUC UACUGCUACC GCGUUAACCG	960
30	GCAGCAGAAG CUGAGUUCAA CCUGGGAAAC CGGCAAGACG CGGAAGCUCA UGGAGUUCAG	1020
	CGAGCACUGU GCCAUCAUCC UGGAAGAUGA CCGCUCUGAC AUCAGCUCCA CGUGUGCCAA	1080
	CAACAUAAC CACAACACAG AGCUGCUGCC CAUUGAGCUG GACACCCUGG UGGGGAAAGG	1140
35	UCGCUUUGCU GAGGUCUAUA AGGCCAAGCU GAAGCAGAAC ACUUCAGAGC AGUUUGAGAC	1200
	AGUGGCAGUC AAGAUCUUUC CUAUGAGGA GUAUGCCUCU UGGAAGACAG AGAAGGACAU	1260
	CUUCUCAGAC AUCAAUCUGA AGCAUGAGAA CAUACUCCAG UUCCUGACGG CUGAGGAGCG	1320
40	GAAGACGGAG UUGGGGAAAC AAUACUGGCU GAUCACCGCC UUCCACGCCA AGGGCAACCU	1380
	ACAGGAGUAC CUGACGCGGC AUGUCAUCAG CUGGGAGGAC CUGCGCAAGC UGGGCAGCUC	1440
	CCUCGCCCGG GGGAUUGCUC ACCUCCACAG UGAUCACACU CCAUGUGGGA GGCCCAAGAU	1500
45	GCCCAUCGUG CACAGGGACC UCAAGAGCUC CAAUAUCCUC GUGAAGAACG ACCUAACCUG	1560
	CUGCCUGUGU GACUUUGGGC UUUCCCUGCG UCUGGACCCU ACUCUGUCUG UGGAUGACCU	1620
	GGCUAACAGU GGGCAGGUGG GAACUGCAAG AUACAUGGCU CCAGAAGUCC UAGAAUCCAG	1680
50	GAUGAAUUUG GAGAAUGUUG AGUCCUCAA GCAGACCGAU GUCUACUCCA UGGCUCUGGU	1740
	GCUCUGGGAA AUGACAUCUC GCUGUAAUGC AGUGGGAGAA GUAAAAGAUU AUGAGCCUCC	1800
	AUUUGGUUCC AAGGUGCGGG AGCACCCUG UGUCGAAAGC AUGAAGGACA ACGUGUUGAG	1860
	AGAUCGAGGG CGACCAGAAA UUCCCAGCUU CUGGCUCAAC CACCAGGGCA UCCAGAUGGU	1920
55	GUGUGAGACG UUGACUGAGU GCUGGGACCA CGACCCAGAG GCCCGUCUCA CAGCCCAGUG	1980
	UGUGGCAGAA CGCUUCAGUG AGCUGGAGCA UCUGGACAGG CUCUCGGGGA GGAGCUGCUC	2040
	GGAGGAGAAG AUUCCUGAAG ACGGCUCCU AAACACUACC AAUAGCUCU UCUGGGGCAG	2100
60	GCUGGGCCAU GUCCAAGAG GCUGCCCCUC UCACCAAAGA ACAGAGGCAG CAGGAAGCUG	2160

65

ES 2 705 066 T3

	CCCCUGAACU GAUGCUUCCU GGAAAACCAA GGGGGUCACU CCCCUCCCUG UAAGCUGUGG	2220
5	GGAUAAAGCAG AAACAACAGC AGCAGGGAGU GGGUGACAUU GAGCAUUCUA UGCCUUUGAC	2280
	AUUGUCAUAG GAUAAGCUGU GUUAGCACUU CCUCAGGAAA UGAGAUUGAU UUUUACAAUA	2340
	GCCAAUAACA UUUGCACUUU AUUAAUGCCU GUUAUAAAAU AUGAAUAGCU AUGUUUUUAU	2400
10	UAUAUAUAUA UAUAUCUAUA UAUGUCUAUA GCUCUAUAUA UAUAGCCAUU CCUUGAAAAG	2460
	AGACAAGGAA AAACAUCAAA UAUUCCCAGG AAAUUGGUUU UAUUGGAGAA CUCCAGAAAC	2520
	AAGCAGAGAA GGAAGGGACC CAUGACAGCA UUAGCAUUUG ACAAUACAC AUGCAGUGGU	2580
	UCUCUGACUG UAAAACAGUG AACUUUGCAU GAGGAAAGAG GCUCCAUGUC UCACAGCCAG	2640
15	CUAUGACCAC AUUGCACUUG CUUUUGCAAU AUAUUAUUC CCUGCCUAGC ACUUCUCUUC	2700
	UGGCCAUGGA ACUAAGUACA GUGGCACUGU UUGAGGACCA GUGUUCCTGG GGUUCCUGUG	2760
	UGCCUUUAUU UCUCUGGAC UUUUCAUUUA AGCUCCAAGC CCCAAAUCUG GGGGGCUAGU	2820
20	UUAGAAACUC UCCCUCAACC UAGUUUAGAA ACUCUACCCC AUCUUUAAUA CCUUGAAUGU	2880
	UUUGAACCCC ACUUUUUACC UUCAUGGGUU GCAGAAAAAU CAGAACAGAU GUCCCCAUCC	2940
	AUGCGAUUGC CCCACCAUCU ACUAAUGAAA AAUUGUUCUU UUUUUCAUCU UUCCCUGCA	3000
25	CUUAUGUUAC UAUUCUCUGC UCCAGCCUU CAUCCUUUUC UAAAAAGGAG CAAAUUCUCA	3060
	CUCUAGGCUU UAUCGUGUUU ACUUUUUCAU UACACUUGAC UUGAUUUUCU AGUUUUUAU	3120
	ACAAACACCA AUGGGUUGCA UCUUUCUGGG CUCCUGAUUG CUCAAGCACA GUUUGGCCUG	3180
	AUGAAGAGGA UUUCAACUAC ACAAUACUAU CAUUGUCAGG ACUAUGACCU CAGGCACUCU	3240
30	AAACAUUUGU UUUGUUUGGU CAGCACAGCG UUUCAAAAAG UGAAGCCACU UUAUAAAUAU	3300
	UUGGAGAUUU UGCAGGAAAA UCUGGAUCCC CAGGUAAGGA UAGCAGAUGG UUUUCAGUUA	3360
	UCUCCAGUCC ACGUUCACAA AAUGUGAAGG UGUGGAGACA CUUACAAAGC UGCCUCACUU	3420
35	CUCACUGUAA ACAUUAGCUC UUUCCACUGC CUACCUGGAC CCCAGUCUAG GAAUUAAAUC	3480
	UGCACCUAAC CAAGGUCCCC UGUUAGAAAU GUCCAUUCAA GCAGUCAUUC UCUGGGUAUA	3540
	UAAUAUGAUU UUGACUACCU UAUCUGGUGU UAAGAUUUGA AGUUGGCCUU UUAUUGGACU	3600
40	AAAGGGGAAC UCCUUUAAGG GUCUCAGUUA GCCCAAGUUU CUUUUGCUUA UAUGUAAAUA	3660
	GUUUUACCCU CUGCAUUGGA GAGAGGAGUG CUUUACUCCA AGAAGCUUUC CUCAUGGUUA	3720
	CCGUUCUCUC CAUCAUGCCA GCCUUCUCA CCUUUGCAGA AAUUACUAGA GAGGAUUUGA	3780
	AUGUGGGACA CAAAGGUCCC AUUUGCAGUU AGAAAAUUUG UGUCCACAAG GACAAGAACA	3840
45	AACUAUGACC UUUAAAACUC CAUAGCAAAC UUGUUAUUA ACAAAAGAAGU GUUAAUGCUG	3900
	CAAGUAAUCU CUUUUUUAAA ACUUUUUGAA GCUACUUUUU UUCAGCCAAA UAGGAAUAUU	3960
	AGAGAGGGAC UGGUAGUGAG AAUAUCAGCU CUGUUUGGAU GGUGGAAGGU CUCAUUUUUAU	4020
50	UGAGAUUUUU AAGAUACAUG CAAAGGUUUG GAAAUAGAAC CUCUAGGCAC CCUCCUCAGU	4080
	GUGGGUGGGC UGAGAGUUAA AGACAGUGUG GCUGCAGUAG CAUAGAGGCG CCUAGAAAUU	4140
	CCACUUGCAC CGUAGGGCAU GCUGAUACCA UCCCAAUAGC UGUUGCCCAU UGACCUCUAG	4200
	UGGUGAGUUU CUAGAAUACU GGUCCAUUCA UGAGAUUUUC AAGAUUCAAG AGUAUUCUCA	4260
55	CUUCUGGGUU AUCAGCAUAA ACUGGAAUGU AGUGUCAGAG GAUACUGUGG CUUGUUUUUU	4320
	UUAUGUUUUU UUUUCUUUUU CAAGAAAAAA GACCAAGGAA UAACAUCUCG UAGUCCUAA	4380
	AAAUACUGAC UUUUUUCACU ACUAUACAUU AAGGGAAAGU UUUUUUCUUU UAUGGAACAC	4440
60	UUCAGCUGUA CUCAUGUAUU AAAAUAGGAA UGUGAAUGCU AUUAUCUCUU UUUUAUCAA	4500
	AAGUCUCAAG CACUUUUUUU UAUUCUAUGC AUUGUUUGUC UUUUACAUAA AUAAAUGUU	4560
	UAUUAGAUUG AAUAAAAGCAA AAUACUCAGG UGAGCAUCCU GCCUCCUGUU CCCAUUCCUA	4620
	GUAGCUAAA	4629

ES 2 705 066 T3

LISTADO DE SECUENCIAS

[0661]

- 5 <110> Neurovision Pharma GmbH
- <120> Oligonucleótidos antisentido como inhibidores de señalización de TGF-R
- <130> NVP-P03653WO
- 10 <150> EP14193368
- <151> 2014-11-16
- <160> 508
- 15 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 4629
- 20 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Factor de crecimiento transformante de homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2, ADN anti-sentido
- 25 <400> 1

```

30      tttagctact aggaatggga acaggaggca ggatgctcac ctgagtattt tgctttattc      60
      aatctaataa acatttttatt tatgtaaaag acaacaatg catagaataa aaataagtgc      120
      ttgagacttt tgatataaaa agagtatata gcattcacat tcctatttta atacatgagt      180
35      acagctgaag tgttccataa aagaataaaa ctttcccttt atgtatagta gtgaaaaaag      240
      tcagtatttt taggaactac agaatgttat tccttgggtct tttttcttga ataagaaaa      300
      aaaacataaa caaaacaagc cacagtatcc tctgacacta cattccagtt tatgctgata      360
40      acccagaagt gagaataact ttgaatcttg aatatctcat gaatggacca gtattctaga      420
      aactcaccac tagaggtcaa tgggcaacag ctattgggat ggtatcagca tgcacctagg      480
      tgcaagtgga atttctaggg gcctctatgc tactgcagcc aactgtctt taactctcag      540
45      cccaccaca ctgaggaggg tgcctagagg ttctatttcc aaacctttgc atgtatctta      600
      aaaatctcaa taaaatgaga ccttccacca tccaacaga gctgatattc tcactaccag      660
50      tcctctcta atattctctat ttggctgaaa ataagtagct tcaaaaagt ttaaaaaaga      720
      gattacttgc agcattaaca cttctttggt gattaacaag tttcctatgg agttttaaag      780
      ctcatacttt gttcttgtcc ttgtggacac aaatcttcta actgcaaatg ggacctttgt      840
55      gtcccacatt caaatctct ctagtaattt ctgcaaaggt tgagaaggct ggcatgatgg      900
      agagaacggg aacctatgag aaagcttctt ggagtaaagc actcctctct ccaatgcaga      960
      gggtaaaact attaacatat aagcaaaaaga aacttgggct aactgagacc cttaaaggag      1020
60      ttccccttta gtccaataaa aggccaactt caaatcttaa caccagataa ggtagtcaaa      1080
      atcatattat ataccagag aatgactgct tgaatggaca tttcttaca gggaccttgg      1140

```

65

ES 2 705 066 T3

5 ttaggtgcag atttaattcc tagactgggg tccaggtagg cagtggaaa agctaattgtt 1200
 tacagtgaga agtgaggcag ctttgtaagt gtctccacac cttcacattt tgtgaacgtg 1260
 gactggagat aactgaaaac catctgctat ccttacctgg ggatccagat tttcctgcaa 1320
 10 aatctccaaa tatttataaa gtggcttcac tttttgaaac gctgtgctga ccaaacaaaa 1380
 catatgttta gagtgcctga ggtcatagtc ctgacaatga tagtattgtg tagttgaaat 1440
 cctcttcatac aggccaaact gtgcttgagc aatcaggagc ccagaaagat ggaaccatt 1500
 15 ggtgtttgta tagaaaacta gaaaatcaag tcaagtgtaa tgaaaaagta aacacgataa 1560
 agcctagagt gagaatttgc tccttttttag aaaaggatga aggctgggag cagagaatag 1620
 taacataagt gcaggggaaa gatgaaaaaa agaacaattt ttcattagta gatggtgggg 1680
 20 caatcgcatg gatggggaca tctgttctga tttttctgca acccatgaag gtaaaaagtg 1740
 gggttcaaaa cattcaaggt attaaagatg gggtagagtt tctaaactag gttgagggag 1800
 agtttctaaa ctagccccc agatttgggg cttggagctt aatgaaaag tccagagaaa 1860
 25 ataagggcac acaggaaccc ogggaacact ggtcctcaaa cagtgccact gtacttagtt 1920
 ccatggccag aagagaagtg ctaggcaggg aatgattatt ttgcaaaagc aagtgcaatg 1980
 tggctatagc tggtgtgag acatggagcc tctttcctca tgcaaagttc actgttttac 2040
 30 agtcagagaa ccaactgcatg tgtgattgtc aaatgctaata gctgtcatgg gtcccttctc 2100
 tctctgcttg gttctggagt tctccaataa aaccaatttc ctgggaatat ttgatgtttt 2160
 tccttgtctc ttttcaaggt atggctatat atatagagct atagacatat atagatatat 2220
 35 atatatatat ataaaacata gctattcata tttatataca ggcathtaata aagtgcaaat 2280
 gttattggct attgtaaaaa tcaatctcat ttctgagga agtgctaaca cagcttatcc 2340
 40 tatgacaatg tcaaaggcat agaatgctct atgtcaccca ctccctgctg ctgttgtttc 2400
 tgcttatccc cacagcttac agggagggga gtgaccocct tggttttcca ggaagcatca 2460
 gttcaggggc agcttctctc tgcctctgtt ctttgggtgag aggggcagcc tctttggaca 2520
 45 tggcccagcc tgcccagaa gagctatttg gtagtgttta gggagccgtc ttcaggaatc 2580
 ttctcctccg agcagctcct ccccgagagc ctgtccagat gctccagctc actgaagcgt 2640
 50 tctgccacac actgggctgt gagacgggcc tctgggtcgt ggtcccagca ctcagtcaac 2700
 gtctcacaca ccactctggat gccctggtgg ttgagccaga agctgggaat ttctggtcgc 2760
 cctcgatctc tcaaacagtt gtccttcatg ctttcgacac aggggtgctc ccgcaccttg 2820
 55 gaaccaaagtg gaggtcata atcttttact tctcccactg cattacagcg agatgtcatt 2880
 tcccagagca ccagagccat ggagtagaca tcggtctgct tgaaggactc aacattctcc 2940
 60 aaattcatcc tggattctag gacttctgga gccatgtatc ttgcagttcc cacctgccca 3000
 ctgttagcca ggtcatccac agacagagta ggtccagac gcagggaaaag cccaaagtca 3060

65

ES 2 705 066 T3

ctgtttcccc cgcagcgcctg agttgaagtt gagtgagtca ctgcgcgcga cggagcgcag 120
 acacccccgc gcgtgcaccc gctcgggaca ggagccggac tcctgtgcag cttccctcgg 180
 5 cgcgccgggg cctccccgcg cctcgcgggc ctccaggccc cctcctggct ggcgagcggg 240
 cgccacatct ggccccgaca tctgcgctgc cggccccggc cggggtccgg agagggcggc 300
 10 gcgcggaggc gcagccaggg gtccgggaag gcgcgctccg ctgcgctggg ggctcggctc 360
 atgacgagca gcggggtctg ccatgggtcg ggggctgctc aggggcctgt ggccgctgca 420
 catcgtcctg tggacgcgta togccagcac gatcccaccg cacgttcaga agtcggttaa 480
 15 taacgacatg atagtcactg acaacaacgg tgcagtcaag tttccacaac tgtgtaaatt 540
 ttgtgatgtg agattttcca cctgtgacaa ccagaaatcc tgcagtgcga actgcagcat 600
 cacctccatc tgtgagaagc cacaggaagt ctgtgtggct gtatggagaa agaatgacga 660
 20 gaacataaca ctagagacag tttgccaatga cccaagctc ccctaccatg actttattct 720
 ggaagatgct gcttctccaa agtgcattat gaaggaaaaa aaaaagcctg gtgagacttt 780
 cttcatgtgt tcctgtagct ctgatgagtg caatgacaac atcatcttct cagaagaata 840
 25 taacaccagc aatcctgact tgttgctagt catatttcaa gtgacaggca tcagcctcct 900
 gccaccactg ggagttgcca tatctgtcat catcatcttc tactgctacc gcgtaaccg 960
 30 gcagcagaag ctgagttcaa cctgggaaac cggcaagacg cgggaagctca tggagttcag 1020
 cgagcactgt gccatcatcc tggaagatga ccgctctgac atcagctcca cgtgtgcca 1080
 caacatcaac cacaacacag agctgctgcc cattgagctg gacaccctgg tgggaaagg 1140
 35 tcgctttgct gaggtctata aggccaagct gaagcagaac acttcagagc agtttgagac 1200
 agtggcagtc aagatctttc cctatgagga gtatgcctct tggaagacag agaaggacat 1260
 cttctcagac atcaatctga agcatgagaa catactccag ttctgacgg ctgaggagcg 1320
 40 gaagacggag ttggggaaac aatactggct gatcacccgc ttccacgcca agggcaacct 1380
 acaggagtac ctgacgcggc atgtcatcag ctgggaggac ctgcgcaagc tgggcagctc 1440
 cctcgcggcg gggattgctc acctccacag tgatcacact ccatgtggga ggcccaagat 1500
 45 gcccatcgtg cacagggacc tcaagagctc caatatactc gtgaagaacg acctaacctg 1560
 ctgcctgtgt gactttgggc tttccctcgc tctggaccct actctgtctg tggatgacct 1620
 50 ggctaacagt ggcaggtgg gaactgcaag atacatggct ccagaagtcc tagaatocag 1680
 gatgaatttg gagaatggtg agtccttcaa gcagaccgat gtctactcca tggctctggt 1740
 gctctgggaa atgacatctc gctgtaatgc agtgggagaa gtaaaagatt atgagcctcc 1800
 55 atttggttcc aaggtgcggg agcaccctcg tgtcgaaagc atgaaggaca acgtgttgag 1860
 agatcgaggg cgaccagaaa ttcccagctt ctggctcaac caccagggca tccagatggt 1920

60

65

ES 2 705 066 T3

5 gtgtgagacg ttgactgagt gctgggacca cgaccagag gccogtctca cagcccagtg 1980
 tgtggcagaa cgcttcagtg agctggagca tctggacagg ctctcgggga ggagctgctc 2040
 ggaggagaag attcctgaag acggctccct aaacactacc aaatagctct tctggggcag 2100
 10 gctgggcat gtccaaagag gctgcccctc tcaccaaaga acagaggcag caggaagctg 2160
 ccctgaact gatgcttctt ggaaaaccaa gggggtcact ccctccctg taagctgtgg 2220
 ggataagcag aaacaacagc agcagggagt ggggtgacata gagcattcta tgctttgac 2280
 15 attgtcatag gataagctgt gttagcactt cctcaggaaa tgagattgat tttacaata 2340
 gccataaca tttgcacttt attaatgcct gtatataaat atgaatagct atgttttata 2400
 20 tatatatata tatatctata tatgtctata gctctatata tatagccata ccttgaaaag 2460
 agacaaggaa aaacatcaaa tattcccagg aaattggttt tattggagaa ctccagaacc 2520
 aagcagagaa ggaagggacc catgacagca ttagcatttg acaatcacac atgcagtgg 2580
 25 tctctgactg taaaacagtg aactttgcat gaggaagag gctccatgtc tcacagccag 2640
 ctatgaccac attgcacttg cttttgcaaa ataatcattc cctgcctagc acttctcttc 2700
 30 tggccatgga actaagtaca gtggcactgt ttgaggacca gtgttcccgg ggttcctgtg 2760
 tgcccttatt tctcctggac ttttcattta agctccaagc cccaaatctg gggggctagt 2820
 ttagaaactc tccctcaacc tagtttagaa actctacccc atctttaata cttgaaatg 2880
 35 tttgaacccc actttttacc ttcattgggt gcagaaaaat cagaacagat gtcccatcc 2940
 atgcgattgc cccaccatct actaatgaaa aattgttctt tttttcatct tcccctgca 3000
 40 cttatgttac tattctctgc tcccagcctt catccttttc taaaaggag caaattctca 3060
 ctctaggctt tatcgtgttt actttttcat tacacttgac ttgattttct agttttctat 3120
 acaaacacca atgggttcca tctttctggg ctctgattg ctcaagcaca gtttggcctg 3180
 45 atgaagagga tttcaactac acaatactat cattgtcagg actatgacct caggcactct 3240
 aaacatatgt tttgtttggg cagcacagcg tttcaaaaag tgaagccact ttataaatat 3300
 50 ttggagattt tgcaggaaaa tctggatccc caggtaagga tagcagatgg ttttcagtta 3360
 tctccagtc acgttcacaa aatgtgaagg tgtggagaca cttacaaagc tgcctcaact 3420
 ctactgtaa acattagctc tttccactgc ctacctggac ccagctctag gaattaaatc 3480
 55 tgcacctaac caaggtccct tgtaagaaat gtccattcaa gcagtcattc tctgggtata 3540
 taatatgatt ttgactacct tatctggtgt taagatttga agttggcctt ttattggact 3600
 60 aaaggggaa tcctttaagg gtctcagtta gcccaagttt cttttgctta tatgttaata 3660
 gttttaccct ctgcattgga gagaggagtg ctttactcca agaagcttcc ctcatggtta 3720
 ccgttctctc catcatgcca gccttctcaa cctttgcaga aattaactaga gaggatttga 3780
 65 atgtgggaca caaaggtccc atttgcagtt agaaaatttg tgtccacaag gacaagaaca 3840

ES 2 705 066 T3

5 aagtatgagc tttaaaactc cataggaaac ttgttaatca acaaagaagt gttaatgctg 3900
 caagtaatct cttttttaa actttttgaa gctacttatt ttcagccaaa taggaatatt 3960
 agagaggggac tggtagtgag aatatcagct ctgtttggat ggtggaaggt ctcattttat 4020
 tgagatTTTT aagatacatg caaaggtttg gaaatagaac ctctaggcac cctcctcagt 4080
 10 gtgggtgggc tgagagttaa agacagtgtg gctgcagtag catagaggcg cctagaaatt 4140
 ccaacttgcac cgtagggcat gctgatacca tccaatagc tgttgccc atgacctag 4200
 tggtaggttt ctagaatact ggtccattca tgagatattc aagattcaag agtattctca 4260
 15 cttctgggtt atcagcataa actggaatgt agtgtcagag gatactgtgg cttgttttgt 4320
 ttatgttttt ttttcttatt caagaaaaa gaccaaggaa taacattctg tagttcctaa 4380
 aaatactgac ttttttcaact actatacata aagggaaagt tttattcttt tatggaacac 4440
 20 ttcagctgta ctcatgtatt aaaataggaa tgtgaatgct atatactctt tttatatcaa 4500
 aagtctcaag cacttatttt tattctatgc attgtttgtc ttttacataa ataaaatggt 4560
 25 tattagattg aataaagcaa aatactcagg tgagcatcct gcctcctggt cccattccta 4620
 gtagctaaa 4629

30 <210> 3
 <211> 4629
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

35 <400> 3

ggagagggag aaggcucucg ggcggagaga gguccugccc agcuguuggc gaggaguuu 60
 40 cuguuuccc cgcagcgug aguugaagu gagugaguca cucgcgcgca cggagcgacg 120
 acacccccgc gcgugcacc gcucgggaca ggagccggac uccugugcag cuucccugg 180
 ccgcccgggg ccuccccg cgucggcggc cuccaggccc ccuccuggcu ggcgagcggg 240
 45 cgccacaucu ggcccgcaca ucugcgucg cgcccggcg cgggguccgg agagggcgcg 300
 gcgcggaggc gcagccagg guccgggaag gcgccgucg cugcgucggg ggucgguc 360
 augacgagca gcggggucug ccaugggucg ggggucguc aggggcccugu ggcccugca 420
 50 caucguccug uggacgguua ucgcccagc gaucaccgc cacguucaga agucgguuaa 480
 uaacgacaug auagucacug acaacaacgg ugcagucaag uuuccacaac uguguaaa 540
 55 uugugaugug agauuuucca ccugugacaa ccagaaaucc ugcaugagca acugcagcau 600
 caccuccauc ugugagaagc cacaggaagu cuguguggcu guauggagaa agaaugacga 660
 gaacauaaca cuagagacag uuugccauga cccaagcuc cccuaccag acuuuauucu 720
 60 ggaagaugcu gcuucuccaa agugcauuau gaaggaaaa aaaagccug gugagacuuu 780
 cuucaugugu uccugugcu cugaugagug caaugacaac aucaucuucu cagaagaaua 840

65

ES 2 705 066 T3

5 uaacaccagc aauccugacu uguugcuagu cauauuucaa gugacaggca ucagccuccu 900
 gccaccacug ggaguugcca uaucugucau caucaucuuc uacugcuacc gcguaaacccg 960
 gcagcagaag cugaguucua ccugggaaac cggcaagacg cggaaagcuca uggaguucag 1020
 10 cgagcacugu gccaucaucc uggaagauga ccgucugac aucagcucca cgugugccaa 1080
 caacaucaac cacaacacag agcugcugcc cauugagcug gacaccucgg uggggaagg 1140
 ucgcuuugcu gagguaua aggccaaagcu gaagcagaac acuucagagc aguuugagac 1200
 15 aguggcaguc aagauuuuc ccuaugagga guaugccucu uggaagacag agaaggacau 1260
 cuucucagac aucaaucuga agcaugagaa cauacuccag uuccugacgg cugaggagcg 1320
 20 gaagacggag uugggaaac aaucuggcg gaucaccgcc uuccacgcca agggcaaccu 1380
 acaggaguac cugacggcg augucaucag cugggaggac cugcgcaagc ugggcagcuc 1440
 ccucgcccgg gggauugcuc accuccacag ugaucacacu ccauguggga ggccaagau 1500
 25 gcccaucgug cacagggacc ucaagagcuc caauauccuc gugaagaacg accuaaccug 1560
 cugccugugu gacuuugggc uuuccucgug ucuggaccuc acucugucug uggauagccu 1620
 ggcuaacagu gggcaggugg gaacugcaag auacauggcu ccagaagucc uagaauccag 1680
 30 gaugaauuug gagaauuug aguccuuca gcagaccgau gucuacucca uggcucuggu 1740
 gcucugggaa augacaucuc gcuguaaugc agugggagaa guaaaagauu augagccucc 1800
 35 auuugguucc aagugcggg agcaccucug ugucgaaagc augaaggaca acguguugag 1860
 agaucgaggg cgaccagaaa ucccagcuc cuggcucaac caccagggca uccagauggu 1920
 gugugagacg uugacugagu gcugggacca cgaccagag gcccgucuca cagcccagug 1980
 40 uguggcagaa cgcuucagug agcuggagca ucuggacagg cucucgggga ggagcugcuc 2040
 ggaggagaag auuccugaag acggcucucc aaacacuacc aaauagcucu ucuggggcag 2100
 gcuggggccau guccaagag gcugccccuc ucaccaaga acagaggcag caggaagcug 2160
 45 ccccugaacu gaugcuuccu ggaaaaccaa gggggucacu cccuuccug uaagcugugg 2220
 ggauaagcag aaacaacagc agcagggagu gggugacaua gagcauucua ugccuuugac 2280
 auugucauag gauaagcugu guuagcacuu ccucaggaaa ugagauugau uuuuacaaua 2340
 50 gccaauaaca uuugcacuuu auuaaugccu guauauaaau augaaugcu auguuuuaa 2400
 uauauauua uauaucuaa uaugucuua gcucuauua uauagccaua ccuugaaaag 2460
 55 agacaaggaa aaacaucaaa uaucccagc aaauugguuu uauuggagaa cuccagaacc 2520
 aagcagagaa ggaagggacc caugacagca uuagcauuug acaaucacac augcaguggu 2580
 ucucugacug uaaaaagug aacuuugcau gaggaaagag gcuccauguc ucacagccag 2640
 60 cuaugaccac auugcacuug cuuuugcaaa auaaucuuuc ccugccuagc acuucucuuc 2700

65

ES 2 705 066 T3

5	uggccaugga	acuaaguaca	guggcacugu	uugaggacca	guguucccgg	gguuccugug	2760
	ugcccuuauu	ucuccuggac	uuuucuuua	agcuccaagc	cccaaaucug	gggggcuagu	2820
	uuagaaacuc	ucccucaacc	uaguuuagaa	acucuacccc	aucuuuaaau	ccuugaaugu	2880
10	uuugaacccc	acuuuuuacc	uucauggguu	gcagaaaaau	cagaacagau	guccccaucc	2940
	augcgauugc	cccaccaucu	acuaaugaaa	aauguuucu	uuuuucaucu	uuccccugca	3000
	cuuauguuac	uauucucugc	ucccagccuu	cauccuuuuc	uaaaaaggag	caaaauucua	3060
15	cucuaggguu	uaucguguuu	acuuuuucau	uacacuugac	uugauuuucu	aguuuuucua	3120
	acaaacacca	auggguucca	ucuuucuggg	cuccugauug	cucaagcaca	guuuggccug	3180
	augaagagga	uuucaacuac	acaauacuau	cauugucagg	acuaugaccu	caggcacucu	3240
20	aaacauaugu	uuuguuuggu	cagcacagcg	uucaaaaag	ugaagccacu	uuauaaaau	3300
	uuggagauuu	ugcaggaaaa	ucuggauccc	cagguaagga	uagcagaugg	uuuucaguua	3360
	ucuccagucc	acguucacaa	aaugugaagg	uguggagaca	cuuacaaagc	ugccucacuu	3420
25	cucacuguaa	acauuagcuc	uuuccacugc	cuaccuggac	cccagucua	gaauuaaauc	3480
	ugcaccuaac	caaggucccu	uguaagaaau	guccauucaa	gcagucauuc	ucuggguaua	3540
	uaauaugauu	uugacuaccu	uaucuggugu	uaagauuuga	aguuggccuu	uuauuggacu	3600
30	aaaggggaac	uccuuuaag	gucucaguua	gcccaaguuu	cuuuugcuua	uauuuuaa	3660
	guuuuacccu	cugcauugga	gagaggagug	cuuuacucca	agaagcuuuc	cucauggguu	3720
35	ccguucucuc	caucaugcca	gccuucucua	ccuuugcaga	aauuacuaga	gaggauuuga	3780
	augugggaca	caaagguccc	auuugcaguu	agaaaauuug	uguccacaag	gacaagaaca	3840
	aaguaugagc	uuuaaaacuc	cauaggaaac	uuguuaauca	acaaagaagu	guuaaugcug	3900
40	caaguaaucu	cuuuuuuaa	acuuuuugaa	gcuaucuauu	uucagccaaa	uaggaauuu	3960
	agagagggac	ugguagugag	aaauacagcu	cuguuuggau	gguggaaggu	cucauuuuau	4020
	ugagauuuuu	aagauacaug	caaagguuug	gaaauagaac	cucuaggcac	ccuccucagu	4080
45	gugggugggc	ugagaguuaa	agacagugug	gcugcaguag	cauagaggcg	ccuagaaau	4140
	ccacuugcac	cguagggcgu	gcugauacca	ucccaauagc	uguugcccau	ugaccucua	4200
50	uggugaguuu	cuagaauacu	gguccauuca	ugagauauuc	aagauucaag	aguauucua	4260
	cuucuggguu	aucagcauaa	acuggaauug	agugucagag	gauacugugg	cuuguuuugu	4320
	uuauuuuuu	uuuuuuuuu	caagaaaaaa	gaccaaggaa	uaacauucug	uaguuccuaa	4380
55	aaauacugac	uuuuuucacu	acuauacaua	aagggaaagu	uuuuuucuuu	uauugaacac	4440
	uucagcugua	cucauguauu	aaaauaggaa	ugugaaugcu	auauacucuu	uuuauucaa	4500
	aagucucaag	cacuuuuuu	uauucuaugc	auuguuuguc	uuuuacauaa	auaaauguu	4560
60	uauuagauug	aaauaagcaa	aaucucagc	ugagcauccu	gccuccuguu	cccuuuccua	4620

65

guagcuaaa

4629

5
 <210> 4
 <211> 10
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10
 <220>
 <223> Secuencia diana dentro del factor de crecimiento transformante de homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2, sentido

15
 <400> 4
 tggtcattc 10

20
 <210> 5
 <211> 10
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25
 <220>
 <223> Secuencia diana dentro del factor de crecimiento transformante de homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2, sentido

30
 <400> 5
 ccctaaacac 10

35
 <210> 6
 <211> 10
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40
 <220>
 <223> Secuencia diana dentro del factor de crecimiento transformante de homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2, sentido

45
 <400> 6
 actaccaaat 10

50
 <210> 7
 <211> 10
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55
 <220>
 <223> Secuencia diana dentro del factor de crecimiento transformante de homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2, sentido

60
 <400> 7
 ggacgcgtat 10

65
 <210> 8
 <211> 10
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

70
 <220>
 <223> Secuencia diana dentro del factor de crecimiento transformante de homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2, sentido

75
 <400> 8
 gtctatgacg 10

ES 2 705 066 T3

<210> 9
<211> 10
<212> ADN
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia diana dentro del factor de crecimiento transformante de homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2, sentido
10

<400> 9
ttattaatgc 10

<210> 10
<211> 10
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial

<220>
20 <223> Fórmula general S3

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
25 <223> n puede representar 5'TGCCCCAGAAGAGCTATTTGGTAG'3 o secuencias derivadas de 5'TGCCCCAGAAGAGCTATTTGGTAG'3, en donde uno o más nucleótidos se eliminan del extremo 5' y en donde n es al menos G

<220>
30 <221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> n puede representar 5'GAGCCGTCTTCAGGAATCTTCTCC'3 o secuencias derivadas de 5'GAGCCGTCTTCAGGAATCTTCTCC'3, en donde uno o más nucleótidos se eliminan del extremo 3' y en donde n es al menos G

35 <400> 10
ntgttaggn 10

<210> 11
40 <211> 10
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
45 <223> Fórmula general S4

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
50 <223> n puede representar 5'GCCCAGCCTGCCCCAGAAGAGCTA'3 o secuencias derivadas de 5'GCCCAGCCTGCCCCAGAAGAGCTA'3, en donde uno o más nucleótidos se eliminan del extremo 5' y en donde n es al menos A

<220>
55 <221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> n puede representar 5'TGTTTAGGGAGCCGTCTTCAGGAA'3 o secuencias derivadas de 5'TGTTTAGGGAGCCGTCTTCAGGAA'3, en donde uno o más nucleótidos se eliminan del extremo 3' y en donde n es al menos T

60 <400> 11
ntttgtagn 10

<210> 12

ES 2 705 066 T3

- <211> 10
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 5 <220>
<223> Fórmula general S1
- <220>
<221> misc_feature
10 <222> (1)..(1)
<223> n puede representar 5'CATGGCAGACCCCGCTGCTC'3 o secuencias derivadas de 5'CATGGCAGACCCCGCTGCTC'3, en donde uno o más nucleótidos se eliminan del extremo 5' y en donde n es al menos C
- 15 <220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> n puede representar 5'CCGAGCCCCCAGCGCAGCGG'3 o secuencias derivadas de 5'CCGAGCCCCCAGCGCAGCGG'3, en donde uno o más nucleótidos se eliminan del extremo 3' y en donde n es al menos C
- 20 <400> 12
ngtcatagan 10
- 25 <210> 13
<211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 30 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2
- <400> 13
35 gctcgtcata gaccga 16
- <210> 14
<211> 16
<212> ADN
40 <213> Secuencia artificial
- <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2
- 45 <400> 14
cgatacgcgt ccacag 16
- <210> 15
50 <211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- <220>
55 <223> Oligonucleótido antisentido contra Homo sapiens (TGFBR2), variante de transcripción 2
- <400> 15
gtagtgttta gggagc 16
- 60 <210> 16
<211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 705 066 T3

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

5 <400> 16
gctatttgg agtggt 16

<210> 17
<211> 16
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra Homo sapiens (TGFBR2), variante de transcripción 2

15 <400> 17
catgaatgga ccagta 16

<210> 18
20 <211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
25 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

<400> 18
30 aggcattaat aaagtg 16

<210> 19
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

40 <400> 19
ccgctgctcg tcatagac 18

<210> 20
<211> 18
45 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
50 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

<400> 20
cgctgctcgt catagacc 18

55 <210> 21
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

ES 2 705 066 T3

<400> 21
gctgctcgtc atagaccg 18

5 <210> 22
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

<400> 22
15 ctgctcgtca tagaccga 18

<210> 23
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

25 <400> 23
tgctcgtcat agaccgag 18

<210> 24
<211> 18
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

<400> 24
gctcgtcata gaccgagc 18

40 <210> 25
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

<400> 25
50 ctcgtcatag accgagcc 18

<210> 26
<211> 18
<212> ADN
55 <213> Secuencia artificial

<220>
60 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

<400> 26
tcgtcataga ccgagccc 18

<210> 27

ES 2 705 066 T3

<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

<400> 27
10 cgtcatagac cgagcccc 18

<210> 28
<211> 17
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

20 <400> 28
cgctgctcgt catagac 17

<210> 29
25 <211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
30 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

<400> 29
35 gctgctcgtc atagacc 17

<210> 30
<211> 17
<212> ADN
40 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

45 <400> 30
ctgctcgtca tagaccg 17

<210> 31
<211> 17
50 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

55 <400> 31
tgctcgtcat agaccga 17

60 <210> 32
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 705 066 T3

- <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2
- 5 <400> 32
gctcgtcata gaccgag 17
- <210> 33
<211> 17
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
- <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2
- 15 <400> 33
ctcgtcatag accgagc 17
- 20 <210> 34
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 25 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2
- 30 <400> 34
tcgcataga ccgagcc 17
- <210> 35
<211> 17
<212> ADN
35 <213> Secuencia artificial
- <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2
- 40 <400> 35
cgtcatagac cgagccc 17
- <210> 36
45 <211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2
- 50 <400> 36
gctgctcgtc atagac 16
- 55 <210> 37
<211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 60 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

ES 2 705 066 T3

<400> 37
ctgctcgtca tagacc 16

5 <210> 38
<211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

<400> 38
15 tgctcgtcat agaccg 16

<210> 39
<211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

25 <400> 39
gctcgtcata gaccga 16

<210> 40
<211> 16
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

<400> 40
ctcgtcatag accgag 16

40 <210> 41
<211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

<400> 41
50 tcgtcataga ccgagc 16

<210> 42
<211> 16
<212> ADN
55 <213> Secuencia artificial

<220>
60 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

<400> 42
cgtcatagac cgagcc 16

<210> 43

ES 2 705 066 T3

<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

<400> 43
10 ctgctcgtca tagac 15

<210> 44
<211> 15
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

20 <400> 44
tgctcgcat agacc 15

<210> 45
25 <211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
30 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

<400> 45
35 gctcgtcata gaccg 15

<210> 46
<211> 15
<212> ADN
40 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

45 <400> 46
ctcgtcatag accga 15

<210> 47
<211> 15
50 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

55 <400> 47
tcgcataga ccgag 15

<210> 48
60 <211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 705 066 T3

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

5 <400> 48
cgtcatagac cgagc 15

<210> 49
<211> 14
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

15 <400> 49
tgctcgcat agac 14

20 <210> 50
<211> 14
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

30 <400> 50
gctcgcata gacc 14

<210> 51
<211> 14
<212> ADN
35 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

40 <400> 51
ctcgcatag accg 14

<210> 52
<211> 14
<212> ADN
45 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

50 <400> 52
tcgtcataga ccga 14

55 <210> 53
<211> 14
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

<400> 53
 cgatcatagac cgag 14

5 <210> 54
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 10 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

<400> 54
 15 gctggcgata cgctcca 18

<210> 55
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

25 <400> 55
 ctggcgatac gctccac 18

<210> 56
 <211> 18
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 35 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

<400> 56
 tggcgatacg cgtccaca 18

40 <210> 57
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

<400> 57
 50 ggcgatacgc gtccacag 18

<210> 58
 <211> 18
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

60 <400> 58
 gcgatacgcg tccacagg 18

<210> 59

ES 2 705 066 T3

<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

<400> 59
10 cgatacgcgt ccacagga 18

<210> 60
<211> 18
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

20 <400> 60
gatacgcgtc cacaggac 18

<210> 61
25 <211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
30 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

<400> 61
35 atacgcgtcc acaggacg 18

<210> 62
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

45 <400> 62
tacgcgtcca caggacga 18

<210> 63
<211> 17
50 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

55 <400> 63
ctggcgatac gcggtcca 17

60 <210> 64
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 705 066 T3

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

5 <400> 64
tggcgatacg cgtccac 17

<210> 65
<211> 17
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

15 <400> 65
ggcgatacgc gtccaca 17

20 <210> 66
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

30 <400> 66
gcgatacgcg tccacag 17

<210> 67
<211> 17
<212> ADN
35 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

40 <400> 67
cgatacgcgt ccacagg 17

45 <210> 68
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

50 <400> 68
gatacgcgtc cacagga 17

55 <210> 69
<211> 12
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> Secuencia general

<220>

- 5 <221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> n puede representar 5'CATGGCAGACCCCGCTGCT'3 o secuencias derivadas de 5'CATGGCAGACCCCGCTGCT'3, en donde uno o más nucleótidos se eliminan del extremo 5' y en donde n es al menos T
- 10 <220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> n puede representar 5'CGAGCCCCCAGCGCAGCGG'3 o secuencias derivadas de 5'CGAGCCCCCAGCGCAGCGG'3, en donde uno o más nucleótidos se eliminan del extremo 3' y en donde n es al menos C
- 15 <220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> n es a, c, g, o t
- 20 <400> 69
ncgtcataga cn 12
- 25 <210> 70
<211> 12
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 30 <220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> n puede representar 5'GGTGGGATCGTGCTGGCGA'3 o secuencias derivadas de 5'GGTGGGATCGTGCTGGCGA'3, en donde uno o más nucleótidos se eliminan del extremo 5' y en donde n es al menos A
- 35 <220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> n puede representar 5'CAGGACGATGTGCAGCGGC'3 o secuencias derivadas de 5'CAGGACGATGTGCAGCGGC'3, en donde uno o más nucleótidos se eliminan del extremo 3' y en donde n es al menos C
- 40 <400> 70
ntacgctcc an 12
- 45 <210> 71
<211> 12
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 50 <220>
<223> Secuencia general
- 55 <220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> n puede representar 5'TGCCCCAGAAGAGCTATTTGGTA'3 o secuencias derivadas de 5'TGCCCCAGAAGAGCTATTTGGTA'3, en donde uno o más nucleótidos se eliminan del extremo 5' y en donde n es al menos A
- 60 <220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> n puede representar 5'AGCCGTCTTCAGGAATCTTCTCC'3 o secuencias derivadas de 5'AGCCGTCTTCAG-

ES 2 705 066 T3

GAATCTTCTCC'3, en donde uno o más nucleótidos se eliminan del extremo 3' y en donde n es al menos A

- 5 <400> 71
ngtgtagg gn 12
- <210> 72
<211> 12
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 10 <220>
<223> Secuencia general
- <220>
15 <221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> n puede representar 5'GCCCAGCCTGCCCCAGAAGAGCT'3 o secuencias derivadas de 5'GCCCAGCCT-
GCCCCAGAAGAGCT'3, en donde uno o más nucleótidos se eliminan del extremo 5' y en donde n es al menos T
- 20 <220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> n puede representar 5'GTTTAGGGAGCCGTCTTCAGGAA'3 o secuencias derivadas de 5'GTTTAG-
GGAGCCGTCTTCAGGAA'3, en donde uno o más nucleótidos se eliminan del extremo 3' y en donde n es al menos
25 G
- <400> 72
nattgtagg tn 12
- 30 <210> 73
<211> 12
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 35 <220>
<223> Secuencia general
- <220>
<221> misc_feature
40 <222> (1)..(1)
<223> n puede representar 5'TGAATCTTGAATATCTCAT'3 o secuencias derivadas de
5'TGAATCTTGAATATCTCAT'3, en donde uno o más nucleótidos se eliminan del extremo 5' y en donde n es al
menos T
- 45 <220>
<221> misc_feature

<222> (12)..(12)
<223> n puede representar 5'GTATTCTAGAACTCACCA'3 o secuencias derivadas de
50 5'GTATTCTAGAACTCACCA'3, en donde uno o más nucleótidos se eliminan del extremo 5' y en donde n es al
menos G
- <400> 73
ngaatggacc an 12
- 55 <210> 74
<211> 12
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 60 <220>
<223> Secuencia general

<220>

ES 2 705 066 T3

<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> n puede representar 5'ATTCATATTTATATACAGG'3 o secuencias derivadas de 5'ATTCATATTTATATACAGG'3, en donde uno o más nucleótidos se eliminan del extremo 5' y en donde n es al menos G
5

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> n puede representar 5'GTGCAAATGTTATTGGCTA'3 o secuencias derivadas de 5'GTGCAAATGTTATTGGCTA'3, en donde uno o más nucleótidos se eliminan del extremo 3' y en donde n es al menos G
10

<400> 74
ncattaataa an 12
15

<210> 75
<211> 41
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
20

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2
25

<400> 75
gaatcttgaa tatctcatga atggaccagt attctagaaa c 41

<210> 76
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
30

<220>
<223> Oligonucleótido de referencia (control aleatorizado)
35

<400> 76
aacacgtcta tacgc 15

<210> 77
<211> 41
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
40

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2
45

<400> 77
ttcatattta tatacaggca ttaataaagt gcaaatgta t 41
50

<210> 78
<211> 42
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
55

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2
60

<400> 78
tgaggaagtg ctaacacagc ttatcctatg acaatgcaa ag 42

<210> 79

ES 2 705 066 T3

<211> 49
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

10 <400> 79
 gcctgcccc gaagagctat ttgtagtgt ttagggagcc gtcttcagg 49

<210> 80
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido de referencia

20 <400> 80
 ttgaatatct catgaatgga 20

<210> 81
 <211> 49
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

30 <400> 81
 cgcaggctct cccagctgat gacatgccgc gtcaggctact cctgtaggt 49

35 <210> 82
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Oligonucleótido de referencia

<400> 82
 45 cagaagagct attgtagt 20

<210> 83
 <211> 78
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

55 <400> 83

atgtcgttat taaccgactt ctgaacgtgc ggtgggatcg tgctggcgat acgcgtccac 60
 aggaacgatgt gcagcggc 78

60

<210> 84
 <211> 74
 <212> ADN

ES 2 705 066 T3

<400> 88
caagtggaat ttctaggcgc ctctatgcta ctg 33

5 <210> 89
<211> 31
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

<400> 89
15 atttatatac aggcattaat aaagtgcaaa t 31

<210> 90
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

25 <400> 90
aagtgctaac acagcttatc ctatgacaat gt 32

<210> 91
<211> 39
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

<400> 91
ccccagaaga gctatttggg agtgtttagg gagccgtct 39

40 <210> 92
<211> 78
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

50 <400> 92

55 ctggctgccc tcgatctctc aacacgttgt ccttcatgct ttogacacag ggggtgctccc 60
gcaccttgga accaaatg 78

60 <210> 93
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 705 066 T3

<220>
 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

5 <400> 93
 gtcctcccag ctgatgacat gccgcgtcag gtactcctg 39

<210> 94
 <211> 40
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

15 <400> 94
 ctcagcttct gctgccggtt aacgcggtag cagtagaaga 40

20 <210> 95
 <211> 68
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

30 <400> 95

gttattaacc gacttctgaa cgtgccggtgg gatcgtgctg gcgatacgcg tccacaggac	60
gatgtgca	68

35 <210> 96
 <211> 64
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

45 <400> 96

caggcccctg agcagccccc gacccatggc agaccccgct gctcgtcata gaccgagccc	60
ccag	64

50 <210> 97
 <211> 52
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

60 <400> 97
 caccgcggg ggtgtcgtcg ctccgtgcgc gcgagtgact cactcaact ca 52

<210> 98

- <211> 10
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 5 <220>
 <223> Fórmula general S2
- <220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (1)..(1)
 <223> w puede representar 5'GGTGGGATCGTGCTGGCGAT'3 o secuencias derivadas de 5'GGTGGGATCGTGCTGGCGAT'3, en donde uno o más nucleótidos se eliminan del extremo 5' y en donde w es al menos T
- 15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> r puede representar 5'ACAGGACGATGTGCAGCGGC'3 o secuencias derivadas de 5'ACAGGACGATGTGCAGCGGC'3, en donde uno o más nucleótidos se eliminan del extremo 3' y en donde w es al menos A
- 20 <400> 98
 nacgcgtccn 10
- 25 <210> 99
 <211> 10
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 30 <220>
 <223> Fórmula general S5
- <220>
 <221> misc_feature
 35 <222> (1)..(1)
 <223> w puede representar 5'CCCAGCCTGCCCCAGAAGAGCTATTTG'3 o secuencias derivadas de 5'CCCAGCCTGCCCCAGAAGAGCTATTTG'3, en donde uno o más nucleótidos se eliminan del extremo 5' y en donde w es al menos G
- 40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> r puede representar 5'TAGGGAGCCGTCTTCAGGAATCTTCTC'3 o secuencias derivadas de 5'TAGGGAGCCGTCTTCAGGAATCTTCTC'3, en donde uno o más nucleótidos se eliminan del extremo 3' y en donde w es al menos G
- 45 <400> 99
 ngtagttn 10
- 50 <210> 100
 <211> 10
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 55 <220>
 <223> Fórmula general S6
- <220>
 <221> misc_feature
 60 <222> (1)..(1)
 <223> w puede representar 5'TGAATCTTGAATATCTCATG'3 o secuencias derivadas de 5'TGAATCTTGAATATCTCATG'3, en donde uno o más nucleótidos se eliminan del extremo 5' y en donde w es al menos G
- <220>

<221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> n puede representar 5'TGAATCTTGAATATCTCATG'3 o secuencias derivadas de 5'TGAATCTTGAATATCT-
 CATG'3, en donde uno o más nucleótidos se eliminan del extremo 5' y en donde n es al menos G
 5
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> r puede representar 5'AGTATTCTAGAACTCACCA'3 o secuencias derivadas de
 10 5'AGTATTCTAGAACTCAC- CA'3, en donde uno o más nucleótidos se eliminan del extremo 3' y en donde w es al
 menos A
 <400> 100
 naatggaccn 10
 15
 <210> 101
 <211> 10
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> Fórmula general S7
 <220>
 25 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> w puede representar 5'ATTCATATTTATATACAGGC'3 o secuencias derivadas de
 5'ATTCATATTTATATACAGGC'3, en donde uno o más nucleótidos se eliminan del extremo 5' y en donde w es al
 menos C
 30
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> r puede representar 5'AGTGCAAATGTTATTGGCTA'3 o secuencias derivadas de
 35 5'AGTGCAAATGTTATTGGCTA'3, en donde uno o más nucleótidos se eliminan del extremo 3' y en donde w es al
 menos A
 <220>
 <221> misc_feature
 40 <222> (10)..(10)
 <223> n puede representar 5'AGTGCAAATGTTATTGGCTA'3 o secuencias derivadas de 5'AGTGCAAATGTTATT-
 GGCTA'3, en donde uno o más nucleótidos se eliminan del extremo 3' y en donde n es al menos A
 <400> 101
 45 nattaataan 10
 <210> 102
 <211> 17
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II
 (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2
 55
 <400> 102
 gcgagtgact cactcaa 17
 <210> 103
 60 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 705 066 T3

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

5 <400> 103
cgagtgactc actca 15

<210> 104
<211> 16
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

15 <400> 104
gcgagtgact cactca 16

20 <210> 105
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

30 <400> 105
cgcgagtgac tcactca 17

<210> 106
<211> 14
<212> ADN
35 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

40 <400> 106
cgagtgactc actc 14

<210> 107
45 <211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

50 <400> 107
cgcgagtgac tcactc 16

55 <210> 108
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

ES 2 705 066 T3

<400> 108
gcgcgagtga ctcaact 17

5 <210> 109
<211> 14
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

15 <400> 109
gcgagtgact cact 14

20 <210> 110
<211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

30 <400> 110
gcgcgagtga ctcaact 16

35 <210> 111
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

45 <400> 111
cgcgcgagtg actcaact 17

50 <210> 112
<211> 12
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

60 <400> 112
cgagtgactc ac 12

65 <210> 113
<211> 13
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

70 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

75 <400> 113
gcgagtgact cac 13

80 <210> 114

ES 2 705 066 T3

<211> 14
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

10 <400> 114
cgcgagtgcac 14

<210> 115
<211> 16
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

20 <400> 115
cgcgcgagtgcac 16

<210> 116
<211> 17
<212> ADN
25 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

30 <400> 116
gcgcgcgagtgcac 17

35 <210> 117
<211> 13
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

45 <400> 117
cgcgagtgcac 13

<210> 118
<211> 14
<212> ADN
50 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

55 <400> 118
gcgcgagtgcac 14

60 <210> 119
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 705 066 T3

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

5 <400> 119
cgcgcgagtg actca 15

<210> 120
<211> 16
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

15 <400> 120
gcgcgcgagt gactca 16

20 <210> 121
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

30 <400> 121
tgcgcgcgag tgactca 17

<210> 122
<211> 14
<212> ADN
35 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

40 <400> 122
cgcgcgagtg actc 14

<210> 123
45 <211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

50 <400> 123
tgcgcgcgag tgactc 16

55 <210> 124
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

ES 2 705 066 T3

<400> 124
gtgcgcgca gtagctc 17

5 <210> 125
<211> 13
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

15 <400> 125
cgcgcgagtg act 13

20 <210> 126
<211> 14
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

30 <400> 126
tgcgcgag tgac 14

35 <210> 127
<211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

45 <400> 127
cgtgcgcg agtgac 16

50 <210> 128
<211> 13
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

60 <400> 128
tgcgcgag tga 13

65 <210> 129
<211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

70 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

75 <400> 129
gtcgtcgtc cgtgcg 16

80 <210> 130

ES 2 705 066 T3

<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

10 <400> 130
gtcgtcgctc cgtgc 15

<210> 131
<211> 17
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

20 <400> 131
gtgtcgctgc tccgtgc 17

<210> 132
<211> 13
<212> ADN
25 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

30 <400> 132
tcgtcgctcc gtg 13

35 <210> 133
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

45 <400> 133
tgtcgtcgct ccgtg 15

<210> 134
<211> 12
50 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

55 <400> 134
tcgtcgctcc gt 12

60 <210> 135
<211> 13
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 705 066 T3

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

5 <400> 135
gtcgtcgctc cgt 13

<210> 136
<211> 14
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

15 <400> 136
tgtcgtcgct ccgt 14

20 <210> 137
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

30 <400> 137
gtgtcgtcgc tccgt 15

<210> 138
<211> 16
<212> ADN
35 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

40 <400> 138
ggtgtcgtcg ctccgt 16

45 <210> 139
<211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

50 <400> 139
cgtcatagac cgagcc 16

55 <210> 140
<211> 12
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

ES 2 705 066 T3

<400> 140
atagaccgag cc 12

5 <210> 141
<211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

<400> 141
gctcgtcata gaccga 16

15 <210> 142
<211> 13
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

25 <400> 142
cgtcatagac cga 13

<210> 143
<211> 14
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

<400> 143
ctcgtcatag accg 14

40 <210> 144
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

<400> 144
50 gctcgtcata gaccg 15

<210> 145
<211> 14
<212> ADN
55 <213> Secuencia artificial

<220>
60 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

<400> 145
gctcgtcata gacc 14

<210> 146

ES 2 705 066 T3

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

5 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

<400> 146
10 cagccccga cccatg 17

<210> 147
<211> 16
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido de referencia

20 <400> 147
cagccccga cccatg 16

<210> 148
<211> 14
25 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

30 <400> 148
agccccgac ccat 14

35 <210> 149
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

<400> 149
45 cagccccga cccaagcccc cgacccat 28

<210> 150
<211> 17
<212> ADN
50 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

55 <400> 150
cggtccaca ggacgat 17

<210> 151
<211> 14
<212> ADN
60 <213> Secuencia artificial

ES 2 705 066 T3

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

5 <400> 151
cgcggtccaca ggac 14

<210> 152
<211> 15
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

15 <400> 152
cgatacgcgt ccaca 15

20 <210> 153
<211> 13
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

30 <400> 153
cgatacgcgt cca 13

<210> 154
<211> 16
35 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

40 <400> 154
tggcgatacg cgtcca 16

45 <210> 155
<211> 12
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

55 <400> 155
cgatacgcgt cc 12

<210> 156
<211> 13
<212> ADN
60 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

ES 2 705 066 T3

<400> 156
gcgatacgcg tcc 13

5 <210> 157
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

<400> 157
gctggcgata cgcgcc 17

15 <210> 158
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

25 <400> 158
ctggcgatac gcgtc 15

30 <210> 159
<211> 12
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

<400> 159
gcgatacgcg tc 12

40 <210> 160
<211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

<400> 160
50 gctggcgata cgcgtc 16

<210> 161
<211> 14
<212> ADN
55 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

60 <400> 161
tggcgatacg cgtc 14

<210> 162

ES 2 705 066 T3

<211> 13
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

<400> 162
10 tggcgatacg cgt 13

<210> 163
<211> 14
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

20 <400> 163
ctggcgatac gcgt 14

<210> 164
25 <211> 12
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
30 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

<400> 164
35 ggcgatacgc gt 12

<210> 165
<211> 13
<212> ADN
40 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

45 <400> 165
ctggcgatac gcg 13

<210> 166
<211> 12
50 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

55 <400> 166
tggcgatacg cg 12

<210> 167
60 <211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 705 066 T3

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

5 <400> 167
atcgtgctgg cgatacg 17

<210> 168
<211> 16
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

15 <400> 168
cgtgcggtg gatcgt 16

20 <210> 169
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

30 <400> 169
acgtgcggtg ggatcgt 17

<210> 170
<211> 17
<212> ADN
35 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

40 <400> 170
aacgtgcggt gggatcg 17

<210> 171
45 <211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

50 <400> 171
aacgtgcggt gggat 15

55 <210> 172
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

ES 2 705 066 T3

<400> 172
tgaacgtgcg gtgggat 17

5 <210> 173
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

<400> 173
cgacttctga acgtgcg 17

15 <210> 174
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

25 <400> 174
ttaacgcggt agcagta 17

30 <210> 175
<211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

<400> 175
taacgcgta gcagta 16

40 <210> 176
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

<400> 176
50 gttaacgcgg tagcagt 17

<210> 177
<211> 15
<212> ADN
55 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

60 <400> 177
ttaacgcggt agcag 15

<210> 178

ES 2 705 066 T3

<211> 13
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

<400> 178
10 taacgcggtg gca 13

<210> 179
<211> 12
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

20 <400> 179
taacgcggtg gc 12

<210> 180
25 <211> 13
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
30 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

<400> 180
35 ttaacgcggt agc 13

<210> 181
<211> 12
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

45 <400> 181
ttaacgcggt ag 12

<210> 182
<211> 13
50 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

55 <400> 182
gttaacgcggt tag 13

60 <210> 183
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 705 066 T3

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

5 <400> 183
cggttaacgc ggtag 15

<210> 184
<211> 16
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

15 <400> 184
ccggttaacg cggtag 16

20 <210> 185
<211> 14
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

30 <400> 185
cggttaacgc ggta 14

<210> 186
<211> 13
<212> ADN
35 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

40 <400> 186
ggttaacgcg gta 13

<210> 187
45 <211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

50 <400> 187
ccggttaacg cggtta 15

55 <210> 188
<211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

ES 2 705 066 T3

<400> 188
gccggttaac gcgga 16

5 <210> 189
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

<400> 189
15 tgccggtaa cgcgga 17

<210> 190
<211> 13
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

25 <400> 190
cggtaacgc ggt 13

<210> 191
<211> 13
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

<400> 191
ccggttaacg cgg 13

40 <210> 192
<211> 14
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

<400> 192
50 gccggttaac gcgg 14

<210> 193
<211> 15
<212> ADN
55 <213> Secuencia artificial

<220>
60 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

<400> 193
tgccggtaa cgcg 15

<210> 194

ES 2 705 066 T3

<211> 13
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

<400> 194
10 gccgggtaac gcg 13

<210> 195
<211> 15
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

20 <400> 195
ctgccgggta acgcg 15

<210> 196
<211> 16
<212> ADN
25 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

30 <400> 196
gctgccgggtt aacgcg 16

35 <210> 197
<211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

45 <400> 197
atgcccggtc aggtac 16

<210> 198
<211> 13
50 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

55 <400> 198
acatgccgcg tca 13

60 <210> 199
<211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 705 066 T3

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

5 <400> 199
gatgacatgc cgcgtc 16

<210> 200
<211> 12
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

15 <400> 200
gacatgccgc gt 12

20 <210> 201
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

30 <400> 201
gatgacatgc cgcgt 15

<210> 202
<211> 13
<212> ADN
35 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

40 <400> 202
atgacatgcc gcg 13

45 <210> 203
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

50 <400> 203
tccgcacct tgaacc 17

55 <210> 204
<211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

ES 2 705 066 T3

<400> 204
cgatctctca acacgt 16

5 <210> 205
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

<400> 205
15 tcgatctctc aacacgt 17

<210> 206
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

25 <400> 206
cgatctctca acacg 15

<210> 207
<211> 16
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

<400> 207
tcgatctctc aacacg 16

40 <210> 208
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

<400> 208
50 ctcgatctct caacacg 17

<210> 209
<211> 16
<212> ADN
55 <213> Secuencia artificial

<220>
60 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

<400> 209
gtagtggtta gggagc 16

<210> 210

ES 2 705 066 T3

<211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

<400> 210
10 gctatttggt agtggt 16

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

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

20 <400> 211
agcttatcct atgac 15

<210> 212
<211> 14
<212> ADN
25 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

30 <400> 212
agcttatcct atga 14

35 <210> 213
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

45 <400> 213
caggcattaa taaagtg 17

<210> 214
<211> 16
<212> ADN
50 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

55 <400> 214
ctaggcgct ctatgc 16

60 <210> 215
<211> 14
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 705 066 T3

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

5 <400> 215
taggcgcctc tatg 14

<210> 216
<211> 15
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

15 <400> 216
ctaggcgctc ctatg 15

20 <210> 217
<211> 13
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

30 <400> 217
taggcgcctc tat 13

<210> 218
<211> 16
<212> ADN
35 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

40 <400> 218
catgaatgga ccagta 16

45 <210> 219
<211> 10
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

55 <400> 219
gaatggacca 10

<210> 220
<211> 12
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

ES 2 705 066 T3

<400> 220
tgaatggacc ag 12

5 <210> 221
<211> 13
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

<400> 221
15 tgaatggacc agt 13

<210> 222
<211> 14
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

25 <400> 222
atgaatggac cagt 14

<210> 223
<211> 15
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

<400> 223
atgaatggac cagta 15

40 <210> 224
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

<400> 224
50 catgaatgga ccagtat 17

<210> 225
<211> 18
<212> ADN
55 <213> Secuencia artificial

<220>
60 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

<400> 225
tcatgaatgg accagtat 18

ES 2 705 066 T3

<210> 226
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5
<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

10 <400> 226
tcatgaatgg accagtatt 19

<210> 227
<211> 20
15 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

20 <400> 227
ctcatgaatg gaccagtatt 20

25 <210> 228
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

35 <400> 228
tctcatgaat ggaccagtat tc 22

<210> 229
<211> 24
<212> ADN
40 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

45 <400> 229
atctcatgaa tggaccagta ttct 24

<210> 230
<211> 26
<212> ADN
50 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

55 <400> 230
tatctcatga atggaccagt attcta 26

60 <210> 231
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 705 066 T3

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

5 <400> 231
atatctcatg aatggaccag tattctag 28

<210> 232
<211> 10
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

15 <400> 232
cgtcatagac 10

20 <210> 233
<211> 12
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

30 <400> 233
tcgcataga cc 12

<210> 234
<211> 13
<212> ADN
35 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

40 <400> 234
tcgcataga ccg 13

45 <210> 235
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

55 <400> 235
ctcgtcatag accga 15

60 <210> 236
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

<400> 236
 atatacaggc attaataaag tgcaaatg 28

5 <210> 237
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 10 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

<400> 237
 15 tgctcgcat agaccga 17

<210> 238
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

25 <400> 238
 tgctcgcat agaccgag 18

<210> 239
 <211> 19
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 35 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

<400> 239
 tgctcgcat agaccgagc 19

40 <210> 240
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

<400> 240
 50 ctgctcgta tagaccgagc 20

<210> 241
 <211> 22
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

60 <400> 241
 gctgctgctc atagaccgag cc 22

<210> 242

ES 2 705 066 T3

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

5 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

10 <400> 242
cgctgctcgt catagaccga gcc 24

<210> 243
<211> 26
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

20 <400> 243
ccgctgctcg tcatagaccg agcccc 26

<210> 244
<211> 28
<212> ADN
25 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

30 <400> 244
cccgtgctc gtcatagacc gagcccc 28

35 <210> 245
<211> 10
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

45 <400> 245
tacgctcca 10

<210> 246
<211> 12
50 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

55 <400> 246
atacgcgtcc ac 12

60 <210> 247
<211> 13
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 705 066 T3

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

5 <400> 247
gatacgcgtc cac 13

<210> 248
<211> 14
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

15 <400> 248
gatacgcgtc caca 14

20 <210> 249
<211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

30 <400> 249
cgatacgcgt ccacag 16

<210> 250
<211> 17
<212> ADN
35 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

40 <400> 250
gcgatacgcg tccacag 17

45 <210> 251
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

50 <400> 251
gcgatacgcg tccacagg 18

55 <210> 252
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

<400> 252
 gcgatacgcg tccacagga 19

5 <210> 253
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 10 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

<400> 253
 15 ggcgatacgc gtccacagga 20

<210> 254
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

25 <400> 254
 tggcgatacg cgtccacagg ac 22

<210> 255
 <211> 24
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 35 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

<400> 255
 ctggcgatac gcgtccacag gacg 24

40 <210> 256
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

<400> 256
 50 gctggcgata cgcgtccaca ggacga 26

<210> 257
 <211> 28
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

60 <400> 257
 tgctggcgat acgcgtccac aggacgat 28

<210> 258

ES 2 705 066 T3

<211> 10
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

10 <400> 258
gtgtttaggg 10

<210> 259
<211> 12
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

20 <400> 259
agtgttagg ga 12

<210> 260
<211> 13
<212> ADN
25 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

30 <400> 260
tagtgttag gga 13

35 <210> 261
<211> 14
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

45 <400> 261
tagtgttag ggag 14

<210> 262
<211> 15
50 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

55 <400> 262
tagtgttag ggagc 15

60 <210> 263
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 705 066 T3

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

5 <400> 263
gtagtgttta gggagcc 17

<210> 264
<211> 18
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

15 <400> 264
gtagtgttt agggagcc 18

20 <210> 265
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

30 <400> 265
gtagtgttt agggagccg 19

<210> 266
<211> 20
<212> ADN
35 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

40 <400> 266
tgtagtgft tagggagccg 20

45 <210> 267
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

50 <400> 267
ttgtagtgt ttagggagcc gt 22

55 <210> 268
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

ES 2 705 066 T3

<400> 268
tttgtagtg tttagggagc cgtc 24

5 <210> 269
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

<400> 269
15 atttgtagt gtttagggag ccgtct 26

<210> 270
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

25 <400> 270
tatttgtag tgtttagga gccgtct 28

<210> 271
<211> 10
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

<400> 271
atttgtagt 10

40 <210> 272
<211> 12
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

<400> 272
50 tatttgtag tg 12

<210> 273
<211> 13
<212> ADN
55 <213> Secuencia artificial

<220>
60 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

<400> 273
tatttgtag tgt 13

<210> 274

ES 2 705 066 T3

<211> 14
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

10 <400> 274
ctatttgga gtgt 14

<210> 275
<211> 15
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

20 <400> 275
ctatttgga gtgtt 15

<210> 276
25 <211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
30 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

<400> 276
gctatttgg agtggtt 17

35 <210> 277
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

45 <400> 277
agctatttgg tagtggtt 18

<210> 278
<211> 19
50 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

55 <400> 278
agctatttgg tagtggtta 19

60 <210> 279
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 705 066 T3

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

5 <400> 279
gagctattg gtagtgтта 20

<210> 280
<211> 22
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

15 <400> 280
agagctatt gtagtgтт ag 22

20 <210> 281
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

30 <400> 281
aagagctatt tgtagtgтт tagg 24

<210> 282
<211> 26
<212> ADN
35 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

40 <400> 282
gaagagctat ttgtagtgt ttaggg 26

<210> 283
45 <211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

50 <400> 283
agaagagcta ttgtagtg ttaggga 28

55 <210> 284
<211> 10
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

ES 2 705 066 T3

<400> 284
cattaataaa 10

5 <210> 285
<211> 12
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

<400> 285
gcattaataa ag 12

15 <210> 286
<211> 13
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

25 <400> 286
gcattaataa agt 13

<210> 287
<211> 14

30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

<400> 287
ggcattaata aagt 14

40 <210> 288
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

<400> 288
50 ggcattaata aagtg 15

<210> 289
<211> 16
<212> ADN

55 <213> Secuencia artificial

<220>
60 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

<400> 289
aggcattaat aaagtg 16

<210> 290

ES 2 705 066 T3

<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

<400> 290
10 caggcattaa taaagtgc 18

<210> 291
<211> 19
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

20 <400> 291
acaggcatta ataaagtgc 19

<210> 292
<211> 20
<212> ADN
25 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

30 <400> 292
acaggcatta ataaagtgc 20

35 <210> 293
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

45 <400> 293
tacaggcatt aataaagtgc aa 22

<210> 294
<211> 24
50 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

55 <400> 294
atacaggcat taataaagtg caaa 24

60 <210> 295
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 705 066 T3

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

5 <400> 295
tatacaggca ttaataaagt gcaaat 26

<210> 296
<211> 11
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia diana dentro del factor de crecimiento transformante de homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2, sentido

15 <400> 296
ctggccatt c 11

20 <210> 297
<211> 11
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Secuencia diana dentro del factor de crecimiento transformante de homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2, sentido

30 <400> 297
tggccattc a 11

<210> 298
<211> 12
<212> ADN
35 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia diana dentro del factor de crecimiento transformante de homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2, sentido

40 <400> 298
ctggccatt ca 12

<210> 299
<211> 11
<212> ADN
45 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia diana dentro del factor de crecimiento transformante de homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2, sentido

50 <400> 299
tccctaaaca c 11

55 <210> 300
<211> 11
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> Secuencia diana dentro del factor de crecimiento transformante de homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2, sentido

ES 2 705 066 T3

<400> 300
ccctaaacac t 11

5 <210> 301
<211> 12
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Secuencia diana dentro del factor de crecimiento transformante de homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa)
(TGFB2), variante de transcripción 2, sentido

<400> 301
15 tccctaaaca ct 12

<210> 302
<211> 11
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Secuencia diana dentro del factor de crecimiento transformante de homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa)
(TGFB2), variante de transcripción 2, sentido

25 <400> 302
cactacaaa t 11

<210> 303
<211> 11
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Secuencia diana dentro del factor de crecimiento transformante de homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa)
(TGFB2), variante de transcripción 2, sentido

35 <400> 303
actaccaa a 11

40 <210> 304
<211> 12
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Secuencia diana dentro del factor de crecimiento transformante de homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa)
(TGFB2), variante de transcripción 2, sentido

<400> 304
50 cactacaaa ta 12

<210> 305
<211> 11
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Secuencia diana dentro del factor de crecimiento transformante de homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa)
(TGFB2), variante de transcripción 2, sentido

60 <400> 305
tggacgcgta t 11

<210> 306

ES 2 705 066 T3

<211> 11
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Secuencia diana dentro del factor de crecimiento transformante de homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2, sentido

10 <400> 306
ggacgcgtat c 11

<210> 307
<211> 12
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia diana dentro del factor de crecimiento transformante de homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2, sentido

20 <400> 307
tggacgcgta tc 12

<210> 308
<211> 11
<212> ADN
25 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia diana dentro del factor de crecimiento transformante de homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2, sentido

30 <400> 308
ggtctatgac g 11

35 <210> 309
<211> 11
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Secuencia diana dentro del factor de crecimiento transformante de homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2, sentido

45 <400> 309
gtctatgacg a 11

<210> 310
<211> 12
50 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia diana dentro del factor de crecimiento transformante de homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2, sentido

55 <400> 310
ggtctatgac ga 12

60 <210> 311
<211> 11
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 705 066 T3

<220>
<223> Secuencia diana dentro del factor de crecimiento transformante de homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2, sentido

5 <400> 311
tttattaatg c 11

<210> 312
<211> 11
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia diana dentro del factor de crecimiento transformante de homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2, sentido

15 <400> 312
ttattaatgc c 11

20 <210> 313
<211> 12
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Secuencia diana dentro del factor de crecimiento transformante de homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2, sentido

30 <400> 313
tttattaatg cc 12

<210> 314
<211> 12
<212> ADN
35 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia diana dentro del factor de crecimiento transformante de homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2, sentido

40 <400> 314
actggtccat tc 12

45 <210> 315
<211> 12
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia diana dentro del factor de crecimiento transformante de homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2, sentido

50 <400> 315
tgggtccattc at 12

55 <210> 316
<211> 13
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia diana dentro del factor de crecimiento transformante de homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2, sentido

60 <400> 316
ctggtccatt cat 13

ES 2 705 066 T3

<210> 317
<211> 13
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5
<220>
<223> Secuencia diana dentro del factor de crecimiento transformante de homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2, sentido

10 <400> 317
actggtccat tca 13

<210> 318
<211> 14
15 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia diana dentro del factor de crecimiento transformante de homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2, sentido

20 <400> 318
actggtccat tcat 14

25 <210> 319
<211> 12
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Secuencia diana dentro del factor de crecimiento transformante de homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2, sentido

35 <400> 319
ctccctaac ac 12

<210> 320
<211> 12
<212> ADN
40 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia diana dentro del factor de crecimiento transformante de homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2, sentido

45 <400> 320
ccctaacac ta 12

<210> 321
<211> 13
<212> ADN
50 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia diana dentro del factor de crecimiento transformante de homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2, sentido

55 <400> 321
tccctaacac cta 13

60 <210> 322
<211> 13
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 705 066 T3

<220>
<223> Secuencia diana dentro del factor de crecimiento transformante de homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2, sentido

5 <400> 322
ctccctaaac act 13

<210> 323
<211> 14
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia diana dentro del factor de crecimiento transformante de homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2, sentido

15 <400> 323
ctccctaaac acta 14

20 <210> 324
<211> 12
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Secuencia diana dentro del factor de crecimiento transformante de homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2, sentido

30 <400> 324
acactaccaa at 12

<210> 325
<211> 12
35 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia diana dentro del factor de crecimiento transformante de homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2, sentido

40 <400> 325
actaccaa at ag 12

45 <210> 326
<211> 13
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Secuencia diana dentro del factor de crecimiento transformante de homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2, sentido

55 <400> 326
cactaccaa tag 13

<210> 327
<211> 13
<212> ADN
60 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia diana dentro del factor de crecimiento transformante de homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2, sentido

ES 2 705 066 T3

<400> 327
acactaccaa ata 13

5 <210> 328
<211> 14
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Secuencia diana dentro del factor de crecimiento transformante de homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa)
(TGFB2), variante de transcripción 2, sentido

<400> 328
acactaccaa atag 14

15 <210> 329
<211> 12
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Secuencia diana dentro del factor de crecimiento transformante de homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa)
(TGFB2), variante de transcripción 2, sentido

25 <400> 329
gtggacgcgt at 12

<210> 330
<211> 12
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> Secuencia diana dentro del factor de crecimiento transformante de homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa)
(TGFB2), variante de transcripción 2, sentido

<400> 330
ggacgcgtat cg 12

40 <210> 331
<211> 13
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Secuencia diana dentro del factor de crecimiento transformante de homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa)
(TGFB2), variante de transcripción 2, sentido

<400> 331
50 tggacgcgta tcg 13

<210> 332
<211> 13
<212> ADN
55 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia diana dentro del factor de crecimiento transformante de homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa)
(TGFB2), variante de transcripción 2, sentido

60 <400> 332
gtggacgcgt atc 13

<210> 333

ES 2 705 066 T3

<211> 14
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Secuencia diana dentro del factor de crecimiento transformante de homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2, sentido

<400> 333
10 ggggacgcgt atcg 14

<210> 334
<211> 12
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia diana dentro del factor de crecimiento transformante de homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2, sentido

20 <400> 334
cggctatga cg 12

<210> 335
<211> 12
<212> ADN
25 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia diana dentro del factor de crecimiento transformante de homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2, sentido

30 <400> 335
gtctatgacg ag 12

35 <210> 336
<211> 13
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Secuencia diana dentro del factor de crecimiento transformante de homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2, sentido

45 <400> 336
ggtctatgac gag 13

<210> 337
<211> 13
50 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia diana dentro del factor de crecimiento transformante de homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2, sentido

55 <400> 337
cggctatga cga 13

60 <210> 338
<211> 14
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 705 066 T3

<220>
<223> Secuencia diana dentro del factor de crecimiento transformante de homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2, sentido

5 <400> 338
cggctcatga cgag 14

<210> 339
<211> 12
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia diana dentro del factor de crecimiento transformante de homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2, sentido

15 <400> 339
cttattaat gc 12

20 <210> 340
<211> 12
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Secuencia diana dentro del factor de crecimiento transformante de homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2, sentido

30 <400> 340
ttattaatgc ct 12

<210> 341
<211> 13
<212> ADN
35 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia diana dentro del factor de crecimiento transformante de homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2, sentido

40 <400> 341
tttattaatg cct 13

45 <210> 342
<211> 13
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia diana dentro del factor de crecimiento transformante de homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2, sentido

50 <400> 342
ctttattaat gcc 13

55 <210> 343
<211> 14
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> Secuencia diana dentro del factor de crecimiento transformante de homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2, sentido

<400> 343
 ctttattaat gcct 14

5 <210> 344
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Oligonucleótido de referencia

<400> 344
 gtcagggga aagatgaaa 20

15 <210> 345
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Oligonucleótido de referencia

<400> 345
 gagctctga ggtccctgtg 20

25 <210> 346
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Oligonucleótido de referencia

<400> 346
 35 agcctcttc ctcatgcaa 20

<210> 347
 <211> 20
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido de referencia

45 <400> 347
 ccttctctgc ttggtctgg 20

<210> 348
 <211> 20
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido de referencia

55 <400> 348
 gccatggagt agacatcgg 20

<210> 349
 <211> 17
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia artificial

ES 2 705 066 T3

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

5 <400> 349
atacgcgtcc acaggac 17

<210> 350
<211> 17
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

15 <400> 350
tacgcgtcca caggacg 17

20 <210> 351
<211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

30 <400> 351
tggcgatacg cgtcca 16

<210> 352
<211> 16
<212> ADN
35 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

40 <400> 352
ggcgatacgc gtccac 16

<210> 353
45 <211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
50 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

<400> 353
gcgatacgcg tccaca 16

55 <210> 354
<211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

ES 2 705 066 T3

<400> 354
cgatacgcgt ccacag 16

5 <210> 355
<211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

<400> 355
gatacgcgtc cacagg 16

15 <210> 356
<211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

25 <400> 356
atacgcgtcc acagga 16

30 <210> 357
<211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

<400> 357
tacgcgtcca caggac 16

40 <210> 358
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

<400> 358
50 ggcgatacgc gtcca 15

<210> 359
<211> 15
<212> ADN
55 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

60 <400> 359
gcgatacgcg tccac 15

<210> 360

ES 2 705 066 T3

<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

<400> 360
10 cgatacgcgt ccaca 15

<210> 361
<211> 15
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

20 <400> 361
gatacgcgtc cacag 15

<210> 362
25 <211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
30 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

<400> 362
35 atacgcgtcc acagg 15

<210> 363
<211> 15
<212> ADN
40 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

45 <400> 363
tacgcgtcca cagga 15

<210> 364
<211> 14
50 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

55 <400> 364
gcgatacgcg tcca 14

60 <210> 365
<211> 14
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 705 066 T3

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

5 <400> 365
cgatacgcgt ccac 14

<210> 366
<211> 14
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

15 <400> 366
gatacgcgtc caca 14

20 <210> 367
<211> 14
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

30 <400> 367
atacgcgtcc acag 14

<210> 368
<211> 14
<212> ADN
35 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

40 <400> 368
tacgcgtcca cagg 14

45 <210> 369
<400> 369
000

50 <210> 370
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

55 <400> 370
tttgtagtg ttaggga 18

60 <210> 371
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 705 066 T3

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

5 <400> 371
ttgtagtgt ttagggag 18

<210> 372
<211> 18
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

15 <400> 372
tgtagtggt tagggagc 18

20 <210> 373
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

30 <400> 373
gtagtggtt agggagcc 18

<210> 374
<211> 18
<212> ADN
35 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

40 <400> 374
gtaggttta gggagccg 18

<210> 375
45 <211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
50 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

<400> 375
tagtgtag ggagccgt 18

55 <210> 376
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

<400> 376
 agtgtttagg gagccgtc 18

5 <210> 377
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 10 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

<400> 377
 15 ggttttagg agccgtct 18

<210> 378
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

25 <400> 378
 ttgtagtg ttaggg 17

<210> 379
 <211> 17
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 35 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

<400> 379
 ttgtagtg ttagga 17

40 <210> 380
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

<400> 380
 50 tggtagtgt tagggag 17

<210> 381
 <211> 17
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

60 <400> 381
 ggtagtgtt agggagc 17

<210> 382

ES 2 705 066 T3

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

5 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

<400> 382
10 gtagtgttta gggagcc 17

<210> 383
<211> 17
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

20 <400> 383
tagtgtttag ggagccg 17

<210> 384
25 <211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
30 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

<400> 384
35 agtgtttagg gagccgt 17

<210> 385
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

45 <400> 385
gtgtttaggg agccgtc 17

<210> 386
<211> 16
50 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

55 <400> 386
ttgtagtgt ttaggg 16

60 <210> 387
<211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 705 066 T3

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

5 <400> 387
tggtagtgtt taggga 16

<210> 388

10 <400> 388
000

<210> 389
<211> 16
15 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

20 <400> 389
gtagtgttta gggagc 16

25 <210> 390
<211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

35 <400> 390
tagtgtttag ggagcc 16

<210> 391
<211> 16
<212> ADN
40 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

45 <400> 391
agtgtttagg gagccg 16

<210> 392
<211> 16
<212> ADN
50 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

55 <400> 392
gtgttaggg agccgt 16

60 <210> 393
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 705 066 T3

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

5 <400> 393
tggtagtgtt taggg 15

<210> 394
<211> 15
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

15 <400> 394
ggtagtgtt aggga 15

20 <210> 395
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

30 <400> 395
gtagtgtta gggag 15

<210> 396
<211> 15
<212> ADN
35 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

40 <400> 396
tagtgttag ggagc 15

<210> 397
45 <211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
50 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

<400> 397
agtgtagg gagcc 15

55 <210> 398
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

ES 2 705 066 T3

<400> 398
gtgttttaggg agccg 15

5 <210> 399
<211> 14
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

<400> 399
15 ggtagtgttt aggg 14

<210> 400
<211> 14
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

25 <400> 400
gtagtgttta gggg 14

<210> 401
<211> 14
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

<400> 401
tagtgtttag ggag 14

40 <210> 402
<211> 14
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

<400> 402
50 agtgtttagg gagc 14

<210> 403
<211> 14
<212> ADN
55 <213> Secuencia artificial

<220>
60 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

<400> 403
gtgttttaggg agcc 14

<210> 404

ES 2 705 066 T3

<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

<400> 404
10 gaagagctat ttgtagt 18

<210> 405
<211> 18
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

20 <400> 405
aagagctatt tggtagtg 18

<210> 406
<211> 18
<212> ADN
25 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

30 <400> 406
agagctattt ggtagtgt 18

35 <210> 407
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

45 <400> 407
gagctatttg gtagtggt 18

<210> 408
<211> 18
<212> ADN
50 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

55 <400> 408
agctatttg tagtggtt 18

60 <210> 409
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 705 066 T3

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

5 <400> 409
gctatttggg agtggtta 18

<210> 410
<211> 18
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

15 <400> 410
ctatttgga gtgttag 18

20 <210> 411
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

30 <400> 411
tatttgtag tgttagg 18

<210> 412
<211> 18
<212> ADN
35 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

40 <400> 412
atttgtagt gtttagg 18

45 <210> 413
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

55 <400> 413
aagagctatt tgtagt 17

<210> 414
<211> 17
60 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 705 066 T3

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

5 <400> 414
agagctattt ggtagtg 17

<210> 415
<211> 17
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

15 <400> 415
gagctatttg gtagtgt 17

20 <210> 416
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

30 <400> 416
agctatttgg tagtggt 17

<210> 417
<211> 17
<212> ADN
35 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

40 <400> 417
gctatttgg agtggtt 17

<210> 418
45 <211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

50 <400> 418
ctatttggta gtgttta 17

55 <210> 419
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

ES 2 705 066 T3

<400> 419
atttgtagt gtttagg 17

5 <210> 420
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

<400> 420
atttgtagt gtttagg 17

15 <210> 421
<211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

25 <400> 421
agagctattt gtagt 16

<210> 422
<211> 16
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

<400> 422
gagctatttg gtagtg 16

40 <210> 423
<211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

<400> 423
50 agctatttgg tagtgt 16

<210> 424
<211> 16
<212> ADN
55 <213> Secuencia artificial

<220>
60 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

<400> 424
gctatttgg agtggt 16

<210> 425

ES 2 705 066 T3

<211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

10 <400> 425
ctatttgga gtgttt 16

<210> 426
<211> 16
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

20 <400> 426
tatttgtag tgttta 16

<210> 427
25 <211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
30 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

<400> 427
atttgtagt gtttag 16

35 <210> 428
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

45 <400> 428
gagctattg gtagt 15

<210> 429
<211> 15
50 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

55 <400> 429
agctattg tagtg 15

60 <210> 430
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 705 066 T3

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

5 <400> 430
gctatttgg agtgt 15

<210> 431
<211> 15
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

15 <400> 431
ctatttgga gtgtt 15

20 <210> 432
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

30 <400> 432
tatttgtag tgttt 15

<210> 433
<211> 15
<212> ADN
35 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

40 <400> 433
atttgtagt gttta 15

<210> 434
45 <211> 14
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
50 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

<400> 434
agctatttg tagt 14

55 <210> 435
<211> 14
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

ES 2 705 066 T3

<400> 435
gctatttggg agtg 14

5 <210> 436
<211> 14
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

<400> 436
ctatttgga gtgt 14

15 <210> 437
<211> 14
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

25 <400> 437
tatttgtag tggt 14

<210> 438
<211> 14
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

<400> 438
atttgtagt gttt 14

40 <210> 439
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

<400> 439
50 tatctcatga atggacca 18

<210> 440
<211> 18
<212> ADN
55 <213> Secuencia artificial

<220>
60 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

<400> 440
atctcatgaa tggaccag 18

<210> 441

ES 2 705 066 T3

<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

<400> 441
10 tctcatgaat ggaccagt 18

<210> 442
<211> 18
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

20 <400> 442
ctcatgaatg gaccagta 18

<210> 443
<211> 18
<212> ADN
25 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

<400> 443
30 tcatgaatgg accagtat 18

35 <210> 444
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

<400> 444
45 catgaatgga ccagtatt 18

<210> 445
<211> 18
<212> ADN
50 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

55 <400> 445
atgaatggac cagtattc 18

60 <210> 446
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 705 066 T3

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

5 <400> 446
tgaatggacc agtattct 18

<210> 447
<211> 18
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

15 <400> 447
gaatggacca gtattcta 18

20 <210> 448
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

30 <400> 448
atctcatgaa tggacca 17

<210> 449
<211> 17
<212> ADN
35 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

40 <400> 449
tctcatgaat ggaccag 17

45 <210> 450
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

55 <400> 450
ctcatgaatg gaccagt 17

60 <210> 451
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

ES 2 705 066 T3

- <400> 451
tcatgaatgg accagta 17
- 5 <210> 452
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- <220>
10 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2
- <400> 452
15 catgaatgga ccagtat 17
- <210> 453
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 20 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2
- 25 <400> 453
atgaatggac cagtatt 17
- <210> 454
<211> 17
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
- <220>
35 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2
- <400> 454
tgaatggacc agtattc 17
- 40 <210> 455
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 45 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2
- <400> 455
50 gaatggacca gtattct 17
- <210> 456
<211> 16
<212> ADN
55 <213> Secuencia artificial
- <220>
60 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2
- <400> 456
tctcatgaat ggacca 16
- <210> 457

ES 2 705 066 T3

<211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

<400> 457
10 ctcataaatg gaccag 16

<210> 458
<211> 16
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

20 <400> 458
tcatgaatgg accagt 16

<210> 459
25 <211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
30 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

<400> 459
35 catgaatgga ccagta 16

<210> 460
<211> 16
<212> ADN
40 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

45 <400> 460
atgaatggac cagtat 16

<210> 461
<211> 16
50 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

55 <400> 461
tgaatggacc agtatt 16

60 <210> 462
<211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 705 066 T3

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

5 <400> 462
gaatggacca gtattc 16

<210> 463
<211> 15
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

15 <400> 463
ctcatgaatg gacca 15

20 <210> 464
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

30 <400> 464
tcatgaatgg accag 15

<210> 465
<211> 15
<212> ADN
35 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

40 <400> 465
catgaatgga ccagt 15

45 <210> 466
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

50 <400> 466
atgaatggac cagta 15

55 <210> 467
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

ES 2 705 066 T3

<400> 467
tgaatggacc agtat 15

5 <210> 468
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

<400> 468
15 gaatggacca gtatt 15

<210> 469
<211> 14
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

25 <400> 469
tcatgaatgg acca 14

<210> 470
<211> 14
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

<400> 470
catgaatgga ccag 14

40 <210> 471
<211> 14
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

<400> 471
50 atgaatggac cagt 14

<210> 472
<211> 14
<212> ADN
55 <213> Secuencia artificial

<220>
60 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

<400> 472
tgaatggacc agta 14

<210> 473

ES 2 705 066 T3

<211> 14
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

<400> 473
10 gaatggacca gtat 14

<210> 474
<211> 18
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

20 <400> 474
tatacaggca ttaataaa 18

<210> 475
<211> 18
<212> ADN
25 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

30 <400> 475
atacaggcat taataaag 18

35 <210> 476
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

45 <400> 476
tacaggcatt aataaagt 18

<210> 477
<211> 18
<212> ADN
50 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

55 <400> 477
acaggcatta ataaagt 18

60 <210> 478
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 705 066 T3

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

5 <400> 478
caggcattaa taaagtgc 18

<210> 479
<211> 18
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

15 <400> 479
aggcattaat aaagtgca 18

20 <210> 480
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

30 <400> 480
ggcattaata aagtgcaa 18

<210> 481
<211> 18
35 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

40 <400> 481
gcattaataa agtgcaaa 18

45 <210> 482
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

55 <400> 482
cattaataaa gtgcaaat 18

<210> 483
<211> 17
<212> ADN
60 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

ES 2 705 066 T3

<400> 483
atacaggcat taataaa 17

5 <210> 484
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

<400> 484
15 tacaggcatt aataaag 17

<210> 485
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

25 <400> 485
acaggcatta ataaagt 17

<210> 486
<211> 17
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

<400> 486
caggcattaa taaagtg 17

40 <210> 487
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

<400> 487
50 aggcattaat aaagtgc 17

<210> 488
<211> 17
<212> ADN
55 <213> Secuencia artificial

<220>
60 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFB2), variante de transcripción 2

<400> 488
ggcattaata aagtgca 17

<210> 489

ES 2 705 066 T3

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

5 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

<400> 489
10 gcattaataa agtgcaa 17

<210> 490
<211> 17
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

20 <400> 490
cattaataaa gtgcaaa 17

<210> 491
25 <211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
30 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

<400> 491
35 tacaggcatt aataaa 16

<210> 492
<211> 16
<212> ADN
40 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

45 <400> 492
acaggcatta ataaag 16

<210> 493
<211> 16
50 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

55 <400> 493
caggcattaa taaagt 16

<210> 494
60 <211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 705 066 T3

- <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2
- 5 <400> 494
aggcattaat aaagtg 16
- <210> 495
<211> 16
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
- <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2
- 15 <400> 495
ggcattaata aagtgc 16
- 20 <210> 496
<211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 25 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2
- 30 <400> 496
gcattaataa agtgca 16
- <210> 497
<211> 16
<212> ADN
35 <213> Secuencia artificial
- <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2
- 40 <400> 497
cattaataaa gtgcaa 16
- 45 <210> 498
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 50 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2
- 55 <400> 498
acaggcatta ataaa 15
- 60 <210> 499
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

ES 2 705 066 T3

<400> 499
caggcattaa taaag 15

5 <210> 500
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

<400> 500
15 aggcattaat aaagt 15

<210> 501
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

25 <400> 501
ggcattaata aagtg 15

<210> 502
<211> 15
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

<400> 502
gcattaataa agtgc 15

40 <210> 503
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

<400> 503
50 cattaataaa gtgca 15

<210> 504
<211> 14
<212> ADN
55 <213> Secuencia artificial

<220>
60 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

<400> 504
caggcattaa taaa 14

<210> 505

ES 2 705 066 T3

<211> 14
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

10 <400> 505
aggcattaat aaag 14

<210> 506
<211> 14
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

20 <400> 506
ggcattaata aagt 14

<210> 507
25 <211> 14
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
30 <223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

<400> 507
gcattaataa agtg 14

35 <210> 508
<211> 14
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido contra factor de crecimiento transformante de Homo sapiens, receptor beta II (70/80kDa) (TGFBR2), variante de transcripción 2

45 <400> 508
cattaataaa gtgc 14

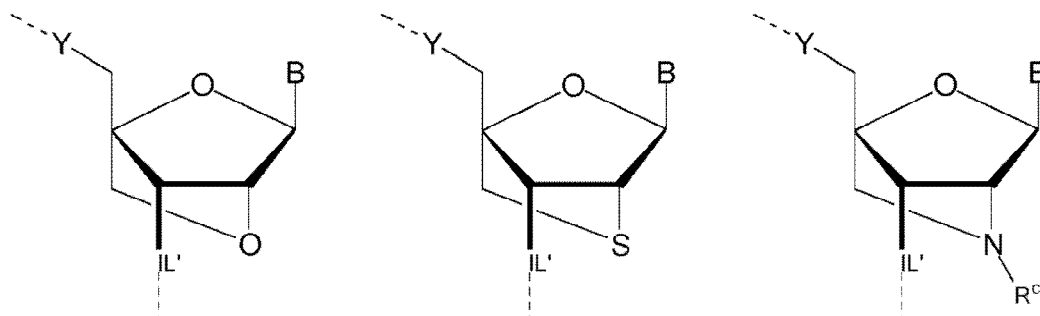
50

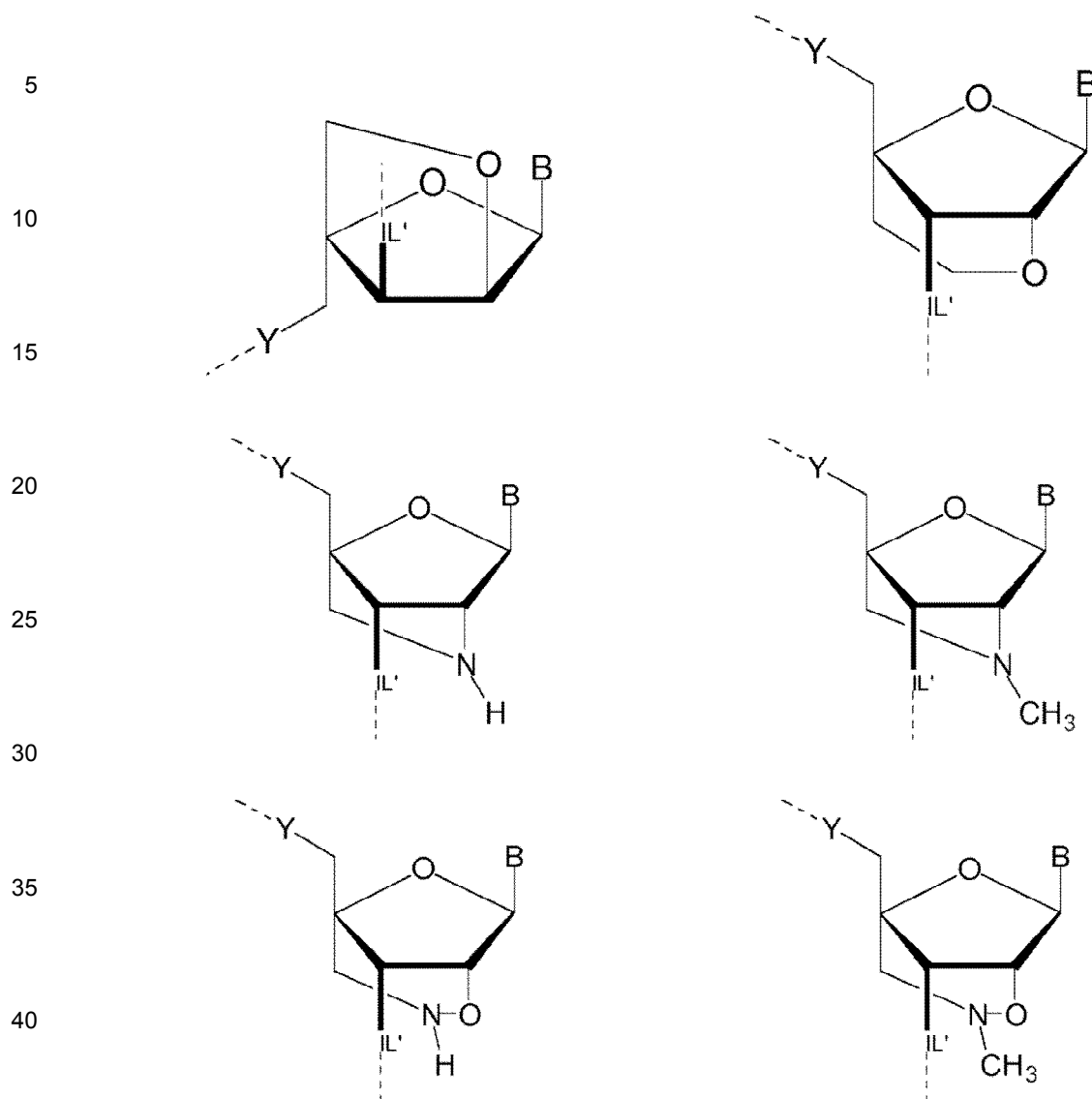
55

60

REIVINDICACIONES

1. El oligonucleótido antisentido que consta de 10 a 28 nucleótidos y al menos dos de los 10 a 28 nucleótidos son LNA y el oligonucleótido antisentido es capaz de hibridarse con una región del gen que codifica el TGF-R_{II} o con una región del ARNm que codifica el TGF-R_{II}, en donde la región del gen que codifica el TGF-R_{II} o la región del ARNm que codifica el TGF-R_{II} comprende la secuencia **TGGTCCATTC** (Seq. ID No. 4), y el oligonucleótido antisentido comprende una secuencia complementaria a la secuencia **TGGTCCATTC** (Seq. ID No. 4) y sales e isómeros ópticos de dicho oligonucleótido antisentido.
2. Oligonucleótido antisentido según la reivindicación 1, en el que el oligonucleótido antisentido hibrida selectivamente solo con la secuencia **TGGTCCATTC** (Seq. ID No. 4) de la región del gen que codifica el TGF-R_{II} o de la región del ARNm que codifica el TGF-R_{II}.
3. Oligonucleótido antisentido según la reivindicación 1 o 2, en el que el oligonucleótido antisentido tiene una longitud de 12 a 20 nucleótidos y/o el oligonucleótido antisentido tiene una estructura espaciadora con 1 a 5 unidades de LNA en el extremo terminal 3' y 1 a 5 unidades de LNA en el extremo terminal 5' y/o en las que el oligonucleótido antisentido tiene fosfato, fosforotioato y/o fosforoditioato como enlaces internucleótidos.
4. Oligonucleótido antisentido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el oligonucleótido antisentido está representado por la siguiente fórmula general (S6):
5'-N⁷-AATGGACC-N⁸-3' (Seq. ID No. 100)
en donde
N⁷ representa: TGAATCTTGAATATCTCATG-, GAATCTTGAATATCTCATG-, AATCTTGAATATCTCATG-, ATCTTGAATATCTCATG-, TCTTGAATATCTCATG-, CTTGAATATCTCATG-, TTGAATATCTCATG-, TGAATATCTCATG-, GAATATCTCATG-, AATATCTCATG-, ATATCTCATG-, TATCTCATG-, ATCTCATG-, TCTCATG-, CTCATG-, TCATG-, CATG-, ATG-, TG- o G-;
y
N⁸ se selecciona entre: -AGTATTCTAGAACTCACCA, -AGTATTCTAGAACTCAC, -AGTATTCTAGAACTCAC, -AGTATTCTAGAACTCA, -AGTATTCTAGAACTC, -AGTATTCTAGAACT, -AGTATTCTAGAAAC, -AGTATTCTAGAAA, -AGTATTCTAGAA, -AGTATTCTAGA, -AGTATTCTAG, -AGTATTCTA, -AGTATTCT, -AGTATTC, -AGTATT, -AGTAT, -AGTA, -AGT, -AG, o -A.
5. Oligonucleótido antisentido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que los últimos 2 a 4 nucleótidos en el extremo terminal 5' son nucleótidos de LNA y los últimos 2 a 4 nucleótidos en el extremo terminal 3' son nucleótidos de LNA y entre los nucleótidos LNA en el extremo terminal 5' y los nucleótidos LNA en el extremo terminal 3' están presentes al menos 6 nucleótidos consecutivos que son nucleótidos no LNA o que son nucleótidos de ADN.
6. Oligonucleótido antisentido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que los nucleótidos LNA están unidos entre sí a través de un grupo fosforotioato o un grupo fosforoditioato o en el que todos los nucleótidos están unidos entre sí a través de un grupo fosfato o un grupo fosforotioato o grupo fosforoditioato.
7. Oligonucleótido antisentido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que los nucleótidos de LNA se seleccionan del siguiente grupo:





45 en donde

IL' representa $-X''-P(=X')(X^-)-$;
 X' representa = O or = S;
 X' representa $-O^- -OH, -O^H, -NHR^H, -N(R^H)_2, -OCH_2CH_2OR^H, -OCH_2CH_2SR^H, -BH_3^-, -R^H, -SH, -SR^H, o -S^-$;
 X'' representa $-O-, -NH-, -NR^H-, -CH_2-$ o $-S-$;
 Y es $-O-, -NH-, -NR^H-, -CH_2-$ o $-S-$;
 R^C y R^H se seleccionan independientemente entre sí de hidrógeno y alquilo C_{1-4} ;
 B representa una nucleobase seleccionada del siguiente grupo: adenina, timina, guanina, citosina, uracilo, 5-
 55 metilcitosina, 5-hidroximetilcitosina, N⁴-metilcitosina, xantina, hipoxantina, 7-deazaxantina, 2-metilcinasina, 6-
 metilazina, 6-metilguanina, 6-etiladenina, 6-etilguanina, 2-propiladenina, 2-propil-guanina, 6-carboxiuracilo, 5,6-
 dihidrouracilo, 5-propinil uracilo, 5-propinil citosina, 6-aza uracilo, 6-aza uracilo, 6-aza citosina, timina 6-aza, 5-
 uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 8-fluoroadenina, 8-cloroadenina, 8-bromoadenina, 8-io-doadenina, 8-
 aminoadenina, 8-tioladenina, 8-tioalquilamina, 8- hidroxiladenina, 8-fluoroguanina, 8-cloro-guanina, 8-
 60 bromoguanina, 8-yodoguanina, 8-aminoguanina, 8-tiolguanina, 8-tioalquilguanina, 8-hidroxilgua-nueve, 5-
 fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clouracilo, 5-yodouracilo, 5-trifluorometiluracilo, 5-fluorocitosina, 5-
 bromocitosina, 5-clorcitosina, 5-yodocitosina, 5-trifluorometilcitosina, 7-metilguanina, 7-metiladenina, 8-
 aza-guanina, 8-azaadenina, 7-deazaguanina, 7-deazaadenina, 7-deaza-8-azaadenina, 3-deazaguanina, 3-
 65 deazaadenina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina.

8. Oligonucleótido antisentido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que tiene una de las siguientes estructuras separadoras: 3-8-3, 4-8-2, 2-8-4, 3-8-4, 4-8-3, 4-8-4, 3-9-3, 4-9-2, 2-9-4, 4-9-3, 3-9-4, 4-9-4, 3-10-3, 2 -

10-4, 4-10-2, 3-10-4, 4-10-3, 4-10-4, 2-11-4, 4-11-2, 3-11-4, 4-11-3.

9. Oligonucleótido antisentido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que los oligonucleótidos antisentido se unen con 100% de complementariedad al ARNm que codifica TGF-R_{II} y no se unen a ninguna otra región en el transcriptoma humano.

10. Oligonucleótido antisentido seleccionado del siguiente grupo:

Seq ID No.	Secuencia, 5'-3'
219a	Gb ¹ sAb ¹ sdAsdTsdGsdGsdAsdCsC ^b 1sAb ¹
219b	Gb ¹ Ab ¹ dAdTdGdGdAdCC ^b 1Ab ¹
220a	Tb ¹ sGb ¹ sAb ¹ sdAsdTsdGsdGsdAsdCsC ^b 1sAb ¹ sGb ¹
220b	Tb ¹ Gb ¹ Ab ¹ dAdTdGdGdAdCC ^b 1Ab ¹ Gb ¹
220c	Tb ¹ sGb ¹ sAb ¹ sdAsdTsdGsdGsdAsdCsdC ^s Ab ¹ sGb ¹
220d	Tb ¹ sdGsdA ^s sdAsdTsdGsdGsdAsdC ^s sdCsAb ¹ sGb ¹
220e	Tb ¹ sGb ¹ sdA ^s sdA ^s sdTsdGsdGsdA ^s sdC ^s sdC ^s sdAsGb ¹
221a	Tb ¹ sGb ¹ sAb ¹ sAb ¹ sdTsdGsdGsdAsdCsdCsAb ¹ sGb ¹ sTb ¹
221b	Tb ¹ Gb ¹ Ab ¹ Ab ¹ dUdGdGdAdCdCAb ¹ Gb ¹ Tb ¹
221c	Tb ¹ sGb ¹ sAb ¹ sAb ¹ sdTsdGsdGsdAsdCsdC ^s Ab ¹ sGb ¹ sTb ¹
221d	Tb ¹ sGb ¹ sAb ¹ sdAsdTsdGsdGsdA ^s sdCsdC ^s sdAsGb ¹ sTb ¹
221e	Tb ¹ sGb ¹ sdA ^s sdAsdTsdGsdGsdAsdC ^s sdCsdAsdGsTb ¹
221f	Tb ¹ sdGsdAsdA ^s sdTsdGsdGsdAsdCsC ^b 1sAb ¹ sGb ¹ sTb ¹
222a	Ab ¹ sTb ¹ sGb ¹ sAb ¹ sdAsdTsdGsdGsdAsdCsC ^b 1sAb ¹ sGb ¹ sTb ¹
222b	Ab ¹ Tb ¹ Gb ¹ Ab ¹ dAsdTsdGsdGsdAsdCsdC ^s Ab ¹ Gb ¹ Tb ¹
222c	Ab ¹ Tb ¹ dGdA ^d AdTdGdGdA ^d CC ^b 1Ab ¹ Gb ¹ Tb ¹
222d	Ab ⁴ sTb ⁴ sGb ⁴ sdA ^s sdAsdTsd GsdGsdAsdCsdC ^s Ab ⁴ sTb ⁴
222e	Ab ¹ sdTsdGsdA ^s sdA ^s sdTsdGsdGsdA ^s sdC ^s sdC ^s sdA ^s sdGsTb ¹
222f	Ab ² sTb ² sGb ² sdA ^s sdAsdUsdGsd GsdAsdCsdCsAb ² sGb ² sTb ²
222g	Ab ⁴ ssTb ⁴ ssdGssdAssdAssdTssdGssdGssdAssdCssdC ^s Ab ⁴ ssGb ⁴ ssTb ⁴
223a	Ab ¹ sTb ¹ sGb ¹ sAb ¹ sdAdTdGdGdAdCdC ^s Ab ¹ sGb ¹ sTb ¹ sAb ¹
223b	Ab ¹ ssTb ¹ ssdGssdAssdAssdTssdGssdGssdAssdCssdC ^s sdAssdGssdTssAb ¹
223c	Ab ¹ dTdGdAdAdTdGdGdAdCdCdAdGdTAb ¹
223d	Ab ¹ sTb ¹ sdGsdAsdAsdUsdGsdGsdA ^s sdCsdCsdAsGb ¹ sTb ¹ sAb ¹
223e	Ab ⁶ Tb ⁶ Gb ⁶ dA ^d AdTdGdGdAdCdC ^d AGb ⁶ Tb ⁶ Ab ⁶
223f	Ab ¹ Tb ¹ dGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdC ^s sdC ^s Ab ¹ Gb ¹ Tb ¹ Ab ¹
223g	Ab ⁴ sTb ⁴ sGb ⁴ sdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsdAsdGsTb ⁴ sAb ⁴
223h	Ab ¹ sTb ¹ sGb ¹ sAb ¹ sdAsdTsdGsdGsdAsdC ^s sdC ^s sdAsdGsdTsAb ¹
223i	Ab ¹ ssTb ¹ ssdGssdAssdAssdUssdGssdGssdA ^s ssdCssdC ^s sdAssdGssTb ¹ ssAb ¹
218y	C ^b 2sAb ² sTb ² sdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsAb ² sGb ² sTb ² sAb ²
218z	C ^b 1sAb ¹ sTb ¹ sdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdC ^s sdC ^s Ab ¹ sGb ¹ sTb ¹ sAb ¹

(continúa)

Seq ID No.	Secuencia, 5'-3'
218aa	C*b¹ssAb¹ssTb¹ssdGssdAssdAssdTssdGssdGssdAssdCssdCssAb¹ssGb¹ss Tb¹ssAb¹
218ab	C*b¹Ab¹Tb¹dGsdAsdAsdUsdGsdGsdAsdC*sdC*sAb¹Gb¹Tb¹Ab¹
218ac	C*b¹Ab¹Tb¹dGsdA*s dA*s dTsdGsdGsdA*s dCsdCsAb¹Gb¹Tb¹Ab¹
218ad	C*b⁶sAb⁶sTb⁶sdGdAdAdTdGdGdAdCdCAB⁶sGb⁶sTb⁶sAb⁶
218ae	C*b⁷sAb⁷sTb⁷sGb⁷sdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsAsGb⁷sTb⁷sAb⁷
218af	C*bs¹Ab¹sdUsdGsdAsdAsdUsdGsdGsdUsdCsdCsAb¹sGb¹sTb¹sAb¹
218b	C*b¹sAb¹sTb¹sdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsAb¹sGb¹sTb¹sAb¹
218m	C*b¹sAb¹sTb¹sdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdC*sdC*sAb¹sGb¹sTb¹sAb¹
218n	C*b¹Ab¹Tb¹dGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdC*sdC*sAb¹Gb¹Tb¹Ab¹
218o	C*b¹sAb¹sTb¹sdGsdA*s dA*s dTsdGsdGsdA*s dCsdCsAb¹sGb¹sTb¹sAb¹
218p	C*b¹sAb¹sTb¹sdGsdA*s dA*s dTsdGsdGsdA*s dC*sdC*sAb¹sGb¹sTb¹sAb¹
218q	C*b¹sAb¹sTb¹sdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdC*sdCsAb¹sGb¹sTb¹sAb¹
218c	C*b¹sAb¹sTb¹sdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCs dC*sAb¹sGb¹sTb¹sAb¹
218r	C*b¹Ab¹Tb¹dGdAdAdTdGdGdAdCdCAB¹Gb¹Tb¹Ab¹
218s	C*b¹sAb¹sTb¹sdGdAdAdTdGdGdAdC*sdC*sAb¹sGb¹sTb¹sAb¹
218t	/5SpC3s/C*b¹sAb¹sTb¹sdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCs dCsAb¹sGb¹sTb¹sAb¹
218u	C*b¹sAb¹sTb¹sdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCs dCsAb¹sGb¹sTb¹sAb¹/3SpC3s/
218v	/5SpC3s/C*b¹sAb¹sTb¹sdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCs dCsAb¹sGb¹sTb¹sAb¹ /3SpC3s/
218ag	C*b¹sAb¹sTb¹sdGsdA*s dA*s dUsdGsdGsdA*s dCsdCsAb¹sGb¹sTb¹sAb¹
218ah	C*b⁴ssAb⁴ssTb⁴ssdGssdA*ssdA*ssdTssdGssdGssdA*ssdCssdCssdAssdGss Tb⁴ssAb⁴
218ai	C*b²ssAb²ssTb²ssGb²ssdAssdAssdTssdGssdGssdAssdCssdCssdAssdGssdT ssAb²
218aj	C*b¹Ab¹Tb¹Gb¹dAdAdUdGdGdAdCdCAB¹Gb¹Tb¹Ab¹
218ak	C*b¹sAb¹sTb¹sGb¹sAb¹sdA*s dUsdGsdGsdAsdCsdCs dA*sGb¹sTb¹sAb¹
218am	C*b¹sAb¹sdUsdGsdAsdAsdUsdGsdGsdAsdCsC*b¹sAb¹sGb¹sTb¹sAb¹
218an	C*b⁶sAb⁶sTb⁶sGb⁶sdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCs dAsGb⁶sTb⁶sAb⁶
218ao	C*b⁷sAb⁷sTb⁷sdGsdA*s dA*s dUsdGsdGsdAsdCsdCs dA*sGb⁷sTb⁷sAb⁷
218ap	C*b⁴sAb⁴sTb⁴sGb⁴sdA*s dAsdTsdGsdGsdAsdCsdC*s dAsdGsTb⁴sAb⁴
218aq	C*b⁴Ab⁴Tb⁴Gb⁴dAdAdTdGdGdAdCdCdAdGTb⁴Ab⁴
218ar	C*b¹sAb¹sTb¹sdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCs dAsGb¹sTb¹sAb¹
224a	C*b¹sAb¹sTb¹sGb¹sAb¹sdAsdTsdGsdGsdAsdCs dCsAb¹sGb¹sTb¹sAb¹sTb¹
224b	C*b²sAb²sTb²sdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCs dCsAb²sGb²sTb²sAb²sTb²
224c	C*b¹sAb¹sTb¹sGb¹sdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCs dAsdGsTb¹sAb¹sTb¹

(continúa)

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

Seq ID No.	Secuencia, 5'-3'
224d	C*b¹sdAsdUsdGsdAsdAsdUsdGsdGsdAsdC*sdC*sAb¹sGb¹sTb¹sAb¹sTb¹
224e	C*b¹sAb¹sTb¹sdGsdA*sDA*sdTsdGsdGsdA*sdC*sdC*sAb¹sGb¹sTb¹sAb¹sTb¹
224f	C*b¹Ab¹dTdGdAdAdTdGdGdAdCdCdAGb¹Tb¹Ab¹Tb¹
224g	C*b¹sdAsdTsdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsdAsdGsTb¹sAb¹sTb¹
224h	C*b¹Ab¹Tb¹Gb¹Ab¹dA*dTdGdGdA*dC*dC*dAdGdTAB¹Tb¹
224i	C*b¹ssAb¹ssTb¹ssGb¹ssAb¹sssdAssdTssdGssdGssdAssdCssdCssdAssdGssTb¹ssAb¹ssTb¹
224j	C*b⁴Ab⁴Tb⁴dGdA*dA*dTdGdGdA*dCdCdAGb⁴Tb⁴Ab⁴Tb⁴
224k	C*b⁶sAb⁶sTb⁶sdGsdA*sDA*sdUsdGsdGsdA*sdC*sdC*sdAsdGsTb⁶sAb⁶sTb⁶
224m	C*b⁷sAb⁷sTb⁷sGb⁷sdAdAdTdGdGdAdC*dC*dAsGb⁷sTb⁷sAb⁷sTb⁷
225a	Tb¹sC*b¹sAb¹sTb¹sGb¹sdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsAb¹sGb¹sTb¹sAb¹sTb¹
225b	Tb⁷sC*b⁷sAb⁷sTb⁷sGb⁷sdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsdAsdGsTsdAsTb⁷
225c	Tb¹sC*b¹sAb¹sTb¹sdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdC*sdC*sdAsGb¹sTb¹sAb¹sTb¹
225d	Tb¹sC*b¹sAb¹sdTsdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsdAsGb¹sTb¹sAb¹sTb¹
225e	Tb¹sC*b¹sAb¹sTb¹sdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsdAsdGsTb¹sAb¹sTb¹
225f	Tb¹C*b¹dA*dTdGdAdAdUdGdGdAdCdC*Ab¹Gb¹Tb¹Ab¹Tb¹
225g	Tb⁴C*b⁴Ab⁴Tb⁴sdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCs dCsAb⁴Gb⁴Tb⁴Ab⁴Tb⁴
225h	Tb¹ssC*b¹ssAb¹ssdTssdGssdA*ssdA*ssdTssdGssdGssdAssdCssdC*ssdA*ssdGssTb¹ssAb¹ssTb¹
225i	Tb²C*b²Ab²dTdGdAdAdTdGdGdAdC*dC*Ab²Gb²Tb²Ab²Tb²
226a	Tb¹sC*b¹sAb¹sTb¹sGb¹sdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsdAsGb¹sTb¹sAb¹sTb¹sTb¹
226b	Tb⁶C*b⁶Ab⁶Tb⁶Gb⁶dAdAdTdGdGdAdCdCdAGb⁶Tb⁶Ab⁶Tb⁶Tb⁶
226c	Tb¹sC*b¹sAb¹sTb¹sdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsdAsdGsdTsAb¹sTb¹sTb¹
226d	Tb¹sdCsdAsdTsdGsdAsdA*s dUsdGsdGsdAsdCsdCsdAsGb¹sTb¹sAb¹sTb¹sTb¹
226e	Tb⁴sC*b⁴sdAsdUsdGsdAsdAsdUsdGsdGsdAsdCsdC*sdAsdGsTb⁴sAb⁴sTb⁴sTb⁴
226f	Tb²ssC*b²ssAb²ssTb²ssGb²sssdAssdAssdTssdGssdGssdAssdCssdCssdAssdGssdTssdAssTb²ssTb²
227a	C*b¹sTb¹sC*b¹sAb¹sTb¹sdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsdAsGb¹sTb¹sAb¹sTb¹sTb¹
227b	C*b²sTb²sC*b²sdAsdTsdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsdAsGb²sTb²sAb²sTb²sTb²
227c	C*b¹Tb¹C*b¹dAdTdGdAdAdTdGdGdAdCdC*dAdGTb¹Ab¹Tb¹Tb¹

5 **12.** El oligonucleótido antisentido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para su uso en la profilaxis y el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, trastornos neuroinflamatorios, trastornos traumáticos o postraumáticos, trastornos neurovasculares, trastornos hipóxicos, trastornos del sistema nervioso central postinfecciosos, enfermedades fibróticas, enfermedades hiperproliferativas, cáncer, tumores, presbiacusia y presbicia.

10 **13.** Oligonucleótido antisentido para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, en el que las enfermedades neurodegenerativas y los trastornos neuroinflamatorios se seleccionan del grupo que consiste en: enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Creutzfeldt Jakob, nueva variante de enfermedad de Creutzfeldt Jakobs, enfermedad de Hallervorden Spatz, enfermedad de Huntington, atrofia multisistémica, demencia, demencia frontotemporal, trastornos de las neuronas motoras, esclerosis lateral amiotrófica, atrofia muscular espinal, atrofias espinocerebelosas, esquizofrenia, trastornos afectivos, depresión mayor, cefalitis meningoenegra, meningoencefalitis bacteriana, meningoencefalitis viral, meningéica, autoinmunidad, autoinmunismo, lesiones agudas isquémicas/hipóxicas, accidentes cerebrovasculares, traumatismo de la médula espinal y del sistema nervioso central, traumatismo craneal y espinal, traumatismos cerebrales, arteriosclerosis, aterosclerosis, demencia microangiopática, enfermedad de Binswanger, degeneración de la retina, degeneración coclear, degeneración macular, sordera coclear, demencia relacionada con el SIDA, retinitis pigmentosa, síndrome de temblor/ataxia asociado con X frágil, parálisis supranuclear progresiva, degeneración estriatonigral, degeneración olivopontocerebelear, síndrome de Shy Drager, déficits de memoria dependientes de la edad, trastornos del neurodesarrollo asociados con demencia, síndrome de Down, síndrome de sinucleinopatías, trinucleótidos, trauma, enfermedades vasculares, inflamaciones vasculares y envejecimiento del SNC y en donde las enfermedades fibróticas se seleccionan del grupo que consiste en: fibrosis pulmonar, fibrosis quística, cirrosis hepática, fibrosis endomiocárdica, infarto de miocardio antiguo, fibrosis auricular, fibrosis mediastínica, mielofibrosis, fibrosis retroperitoneal, fibrosis masiva progresiva, fibrosis sistémica nefrogénica, enfermedad de Crohn, queloide, esclerosis sistémica, artrofibrosis, enfermedad de Peyronie, contractura de Dupuytren y residuos después de los eritemodos de lupus.

20 **14.** Composición farmacéutica que contiene al menos un oligonucleótido antisentido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, junto con al menos un vehículo, excipiente, adyuvante, disolvente o diluyente farmacéuticamente aceptable.

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1

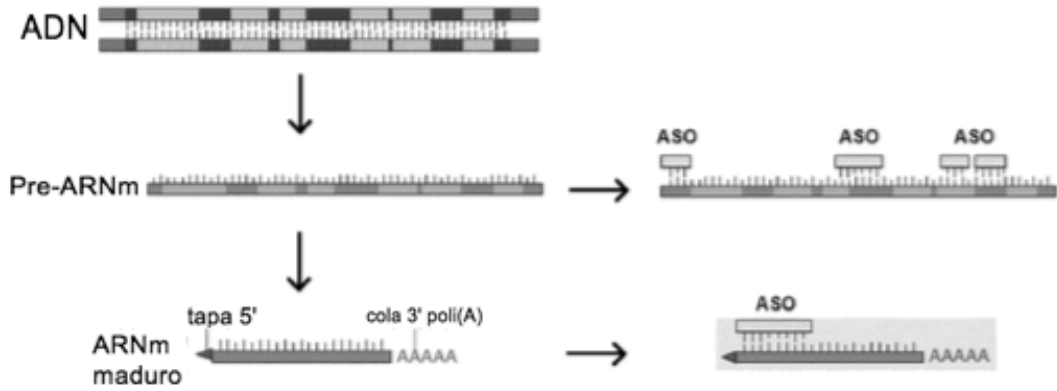


Figura 2

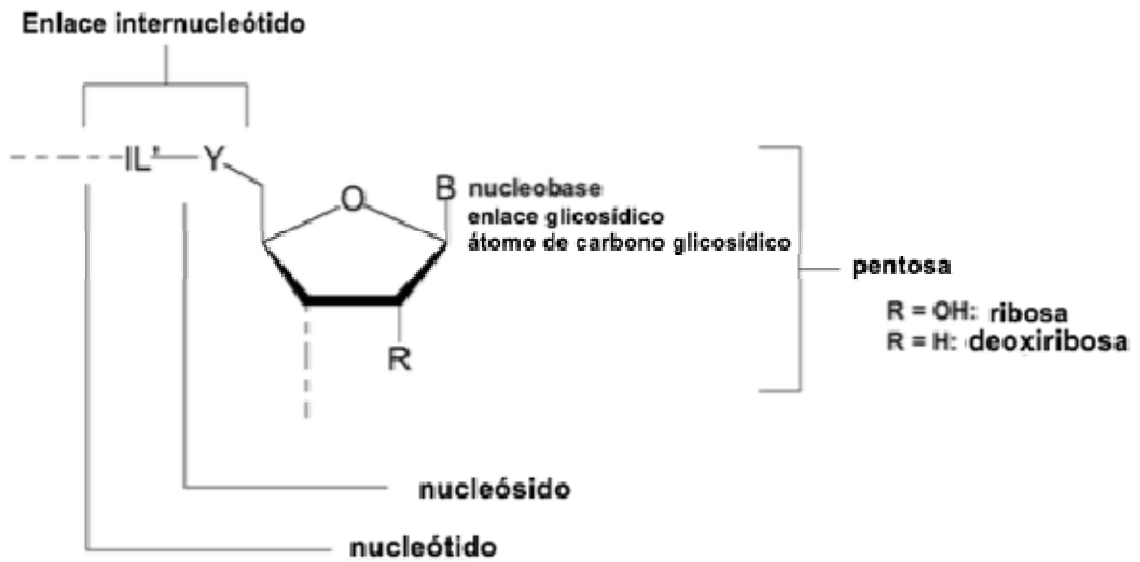


Figura 3

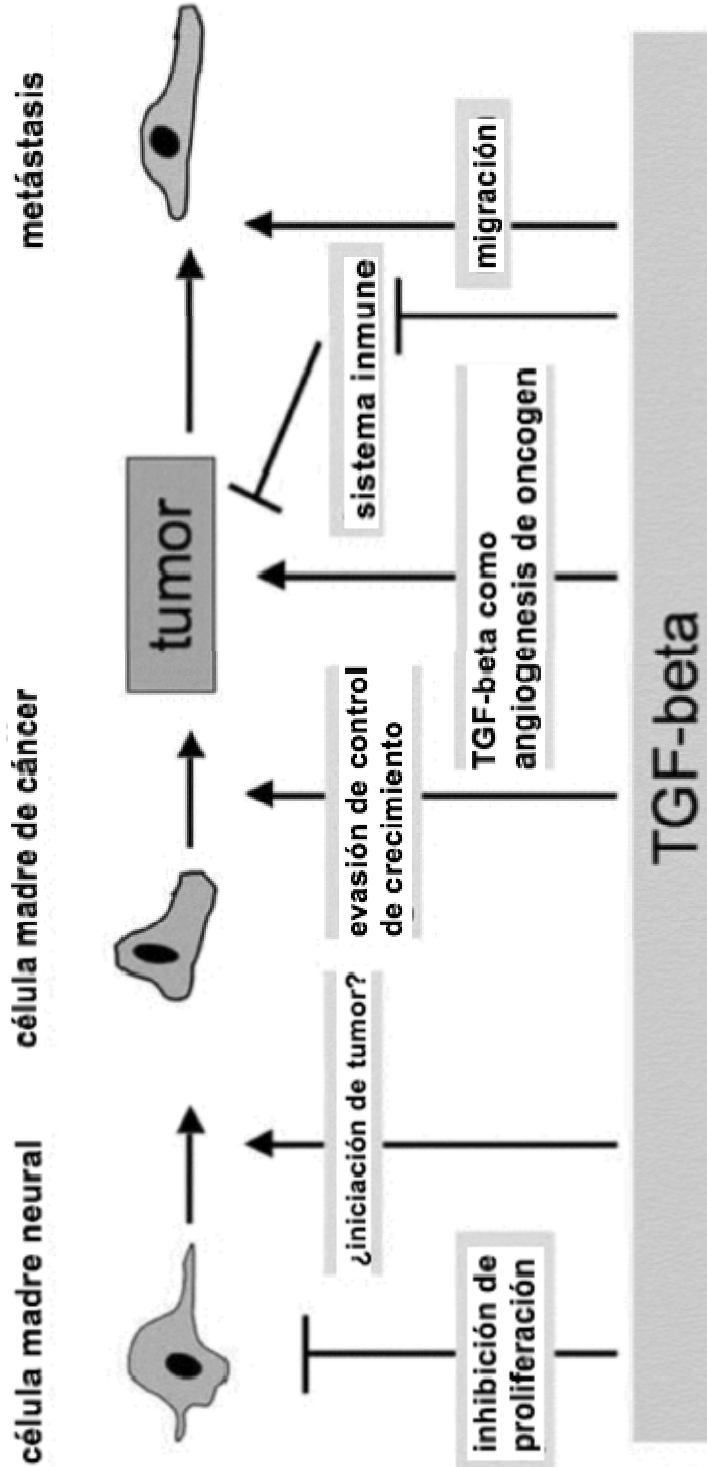


Figura 4

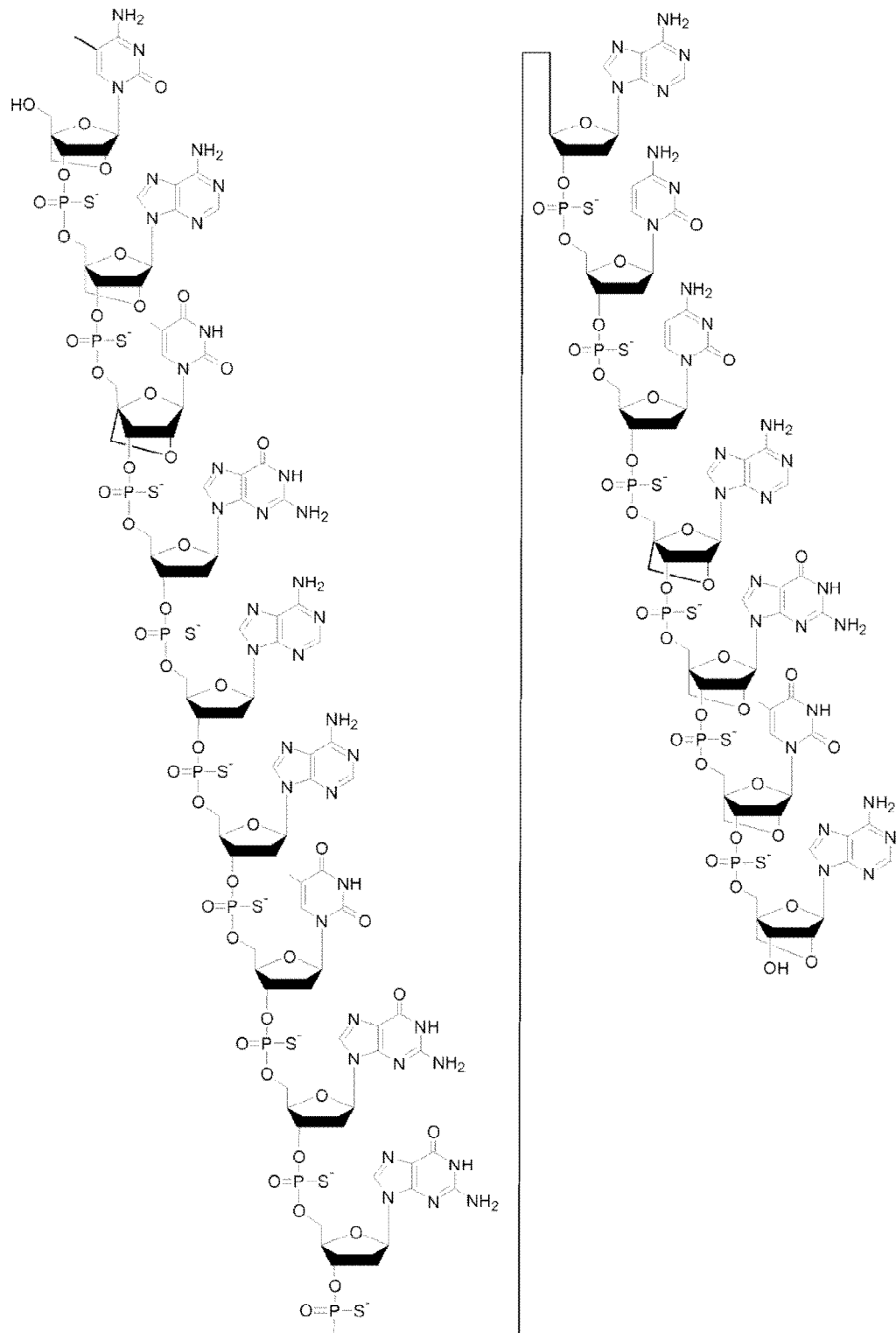


Figura 5

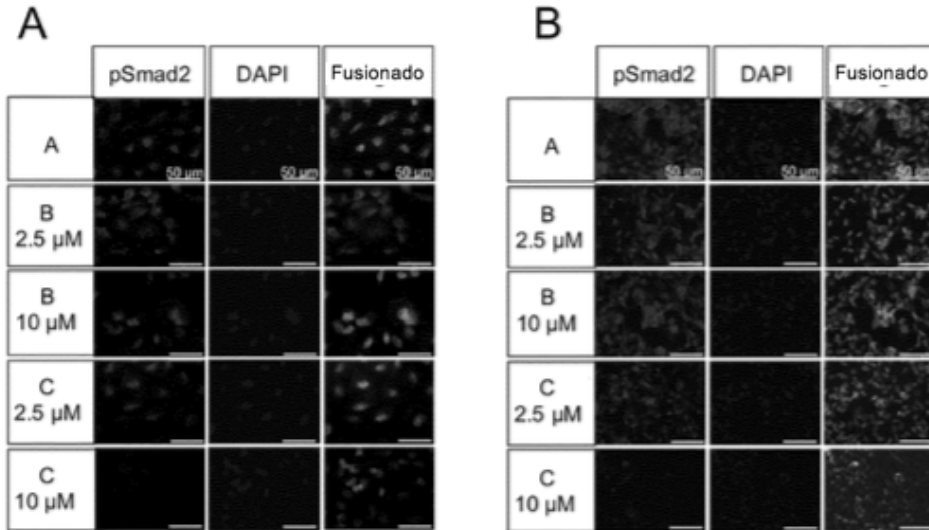


Figura 6

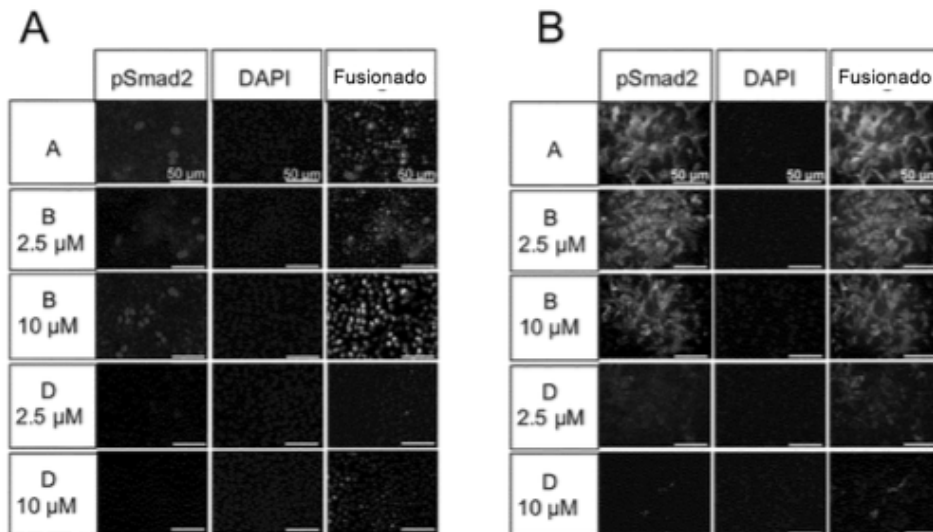


Figura 7

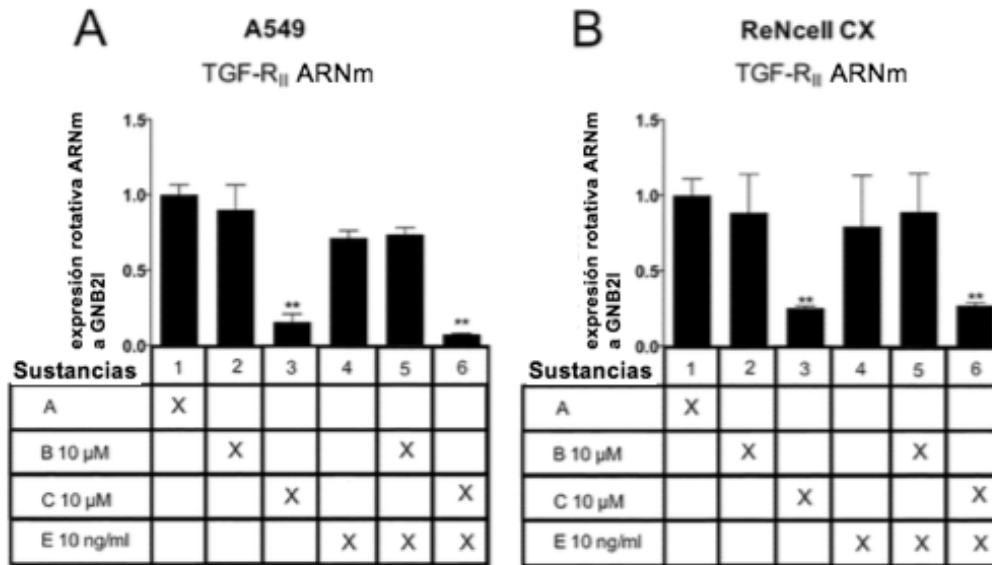


Figura 8

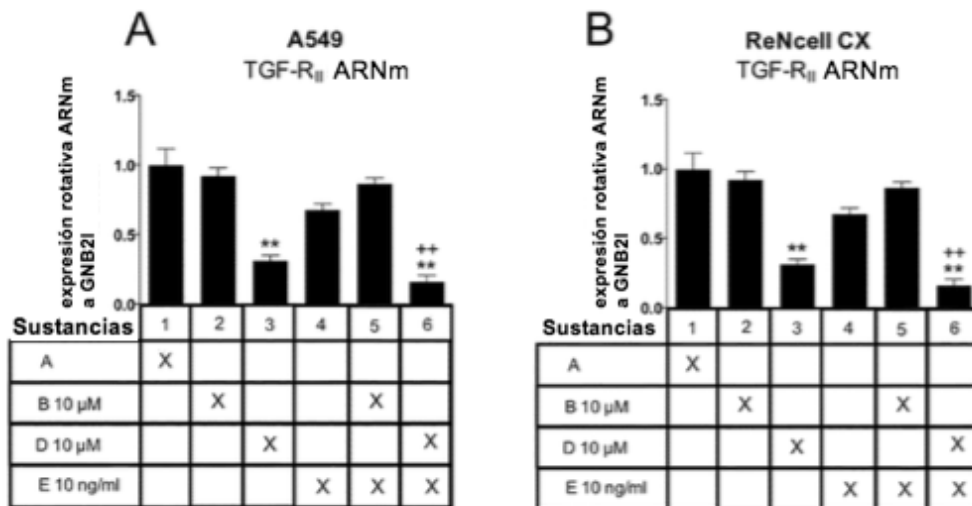


Figura 9

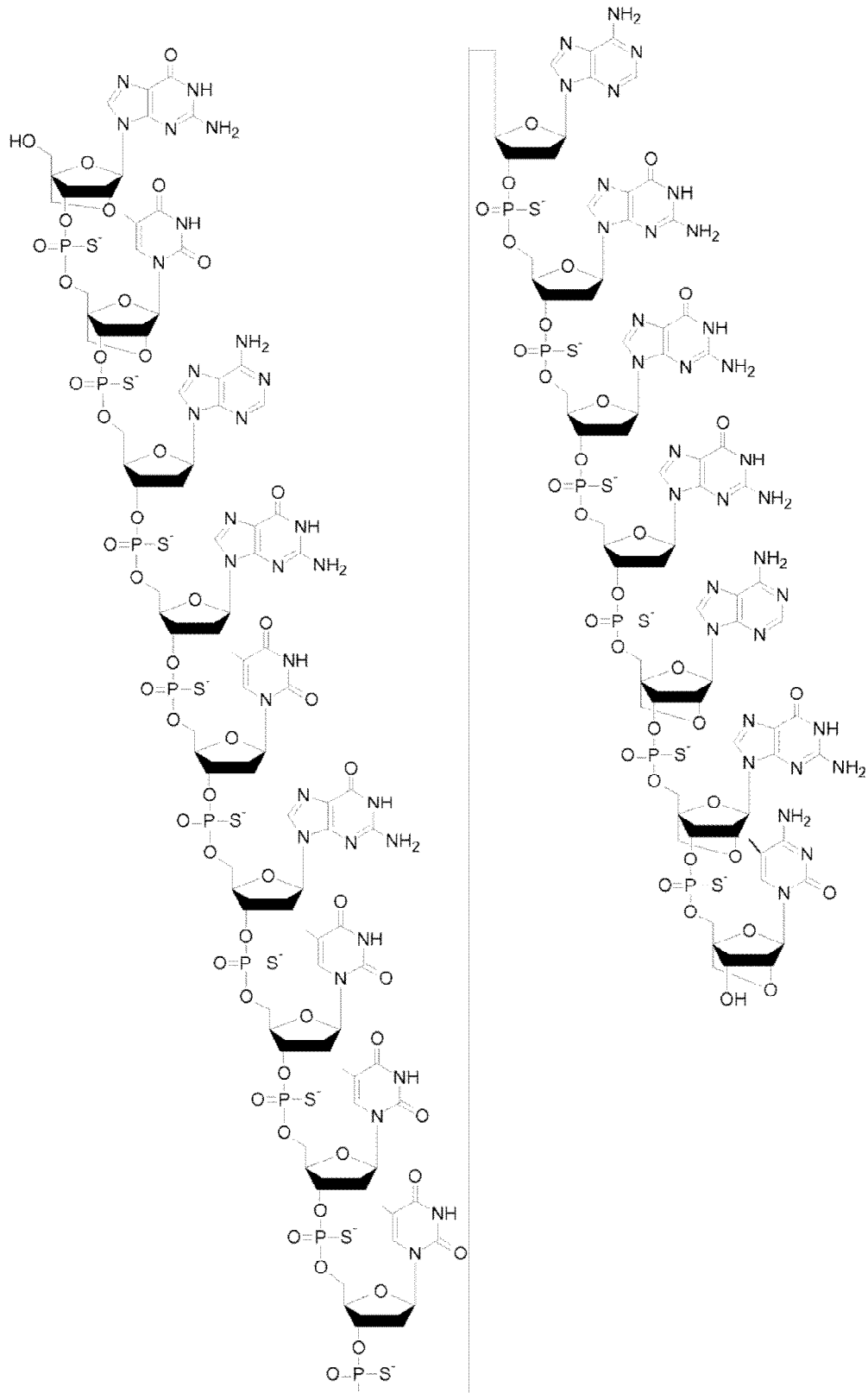


Figura 10

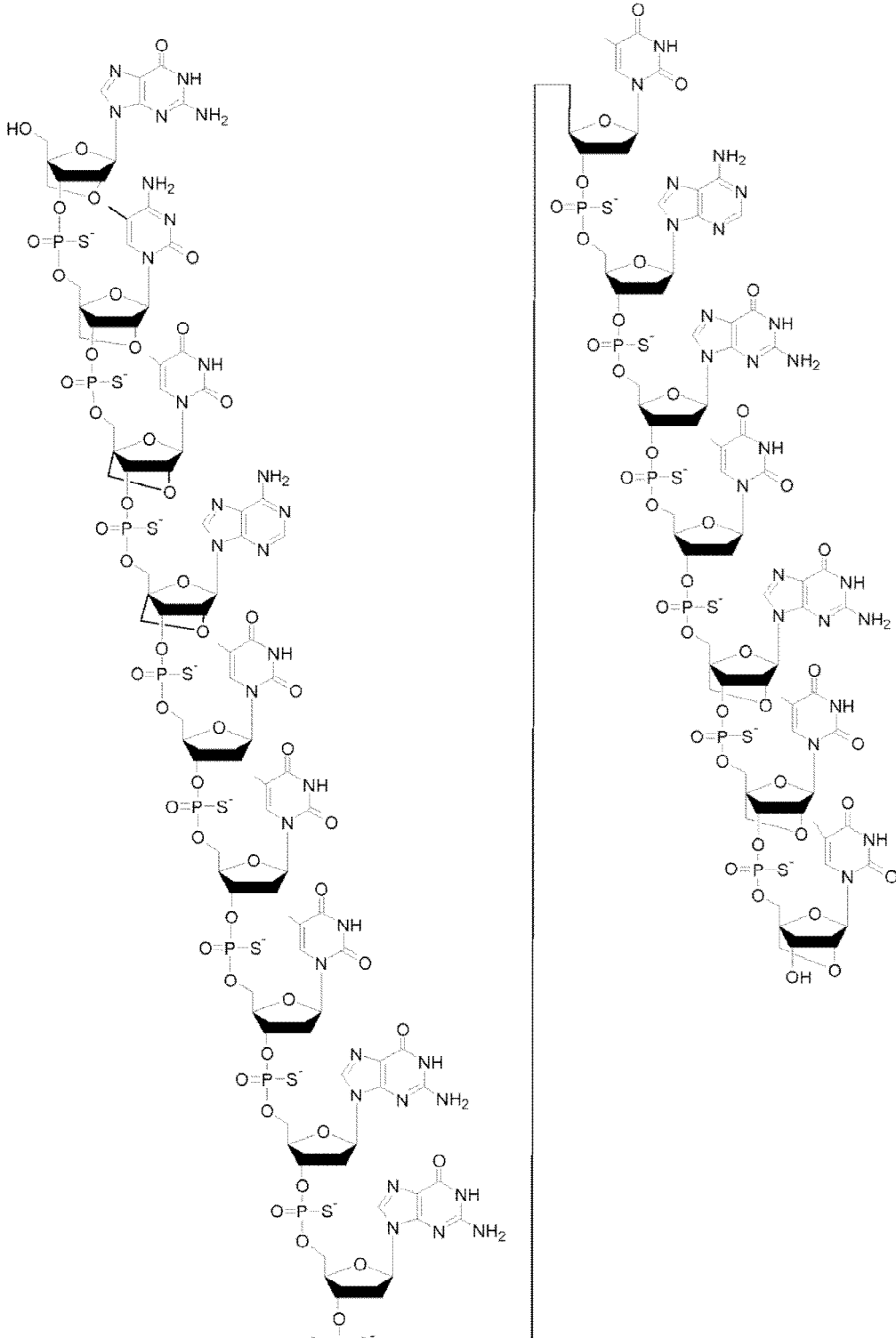


Figura 11

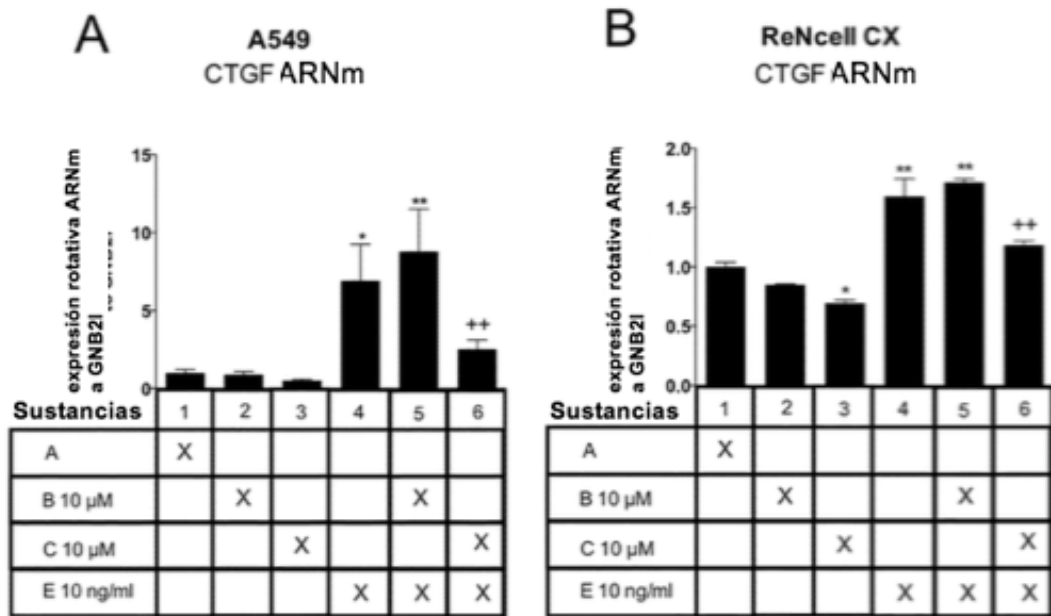


Figura 12

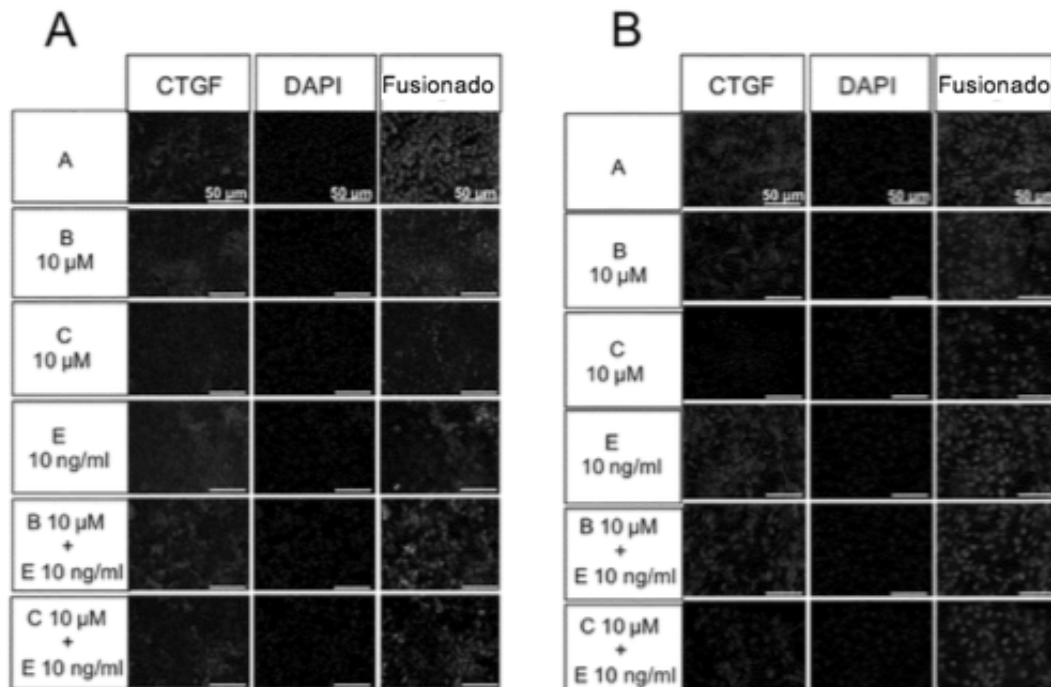


Figura 13

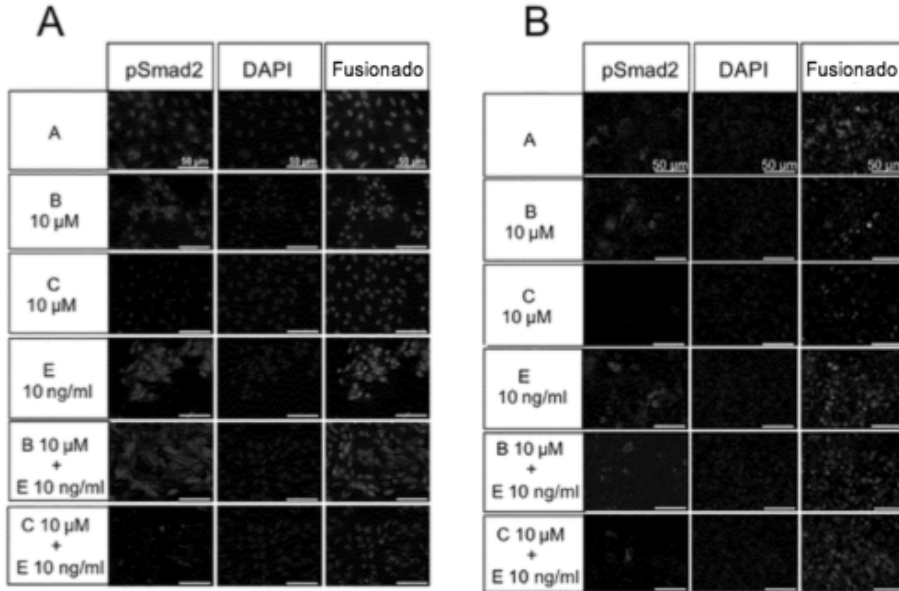


Figura 14

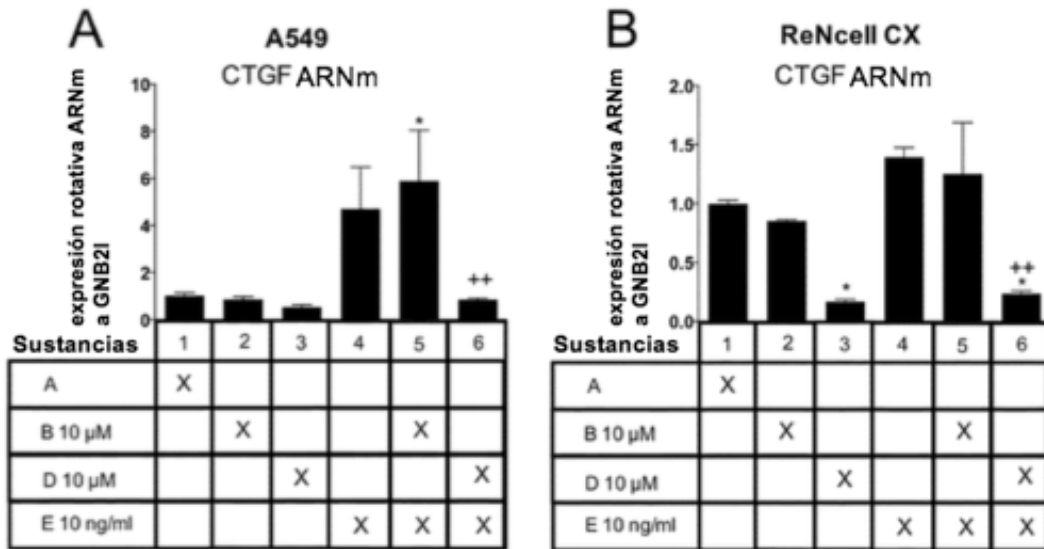


Figura 15

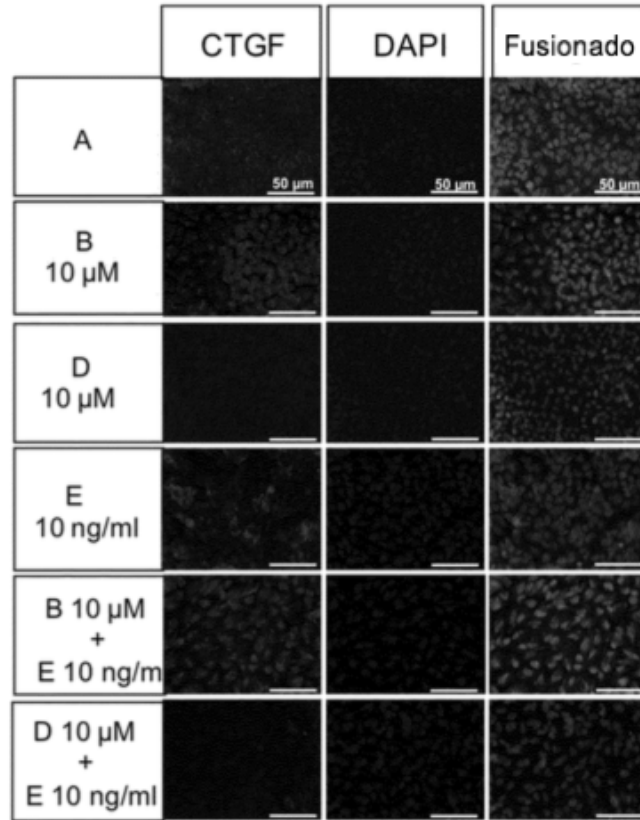


Figura 16

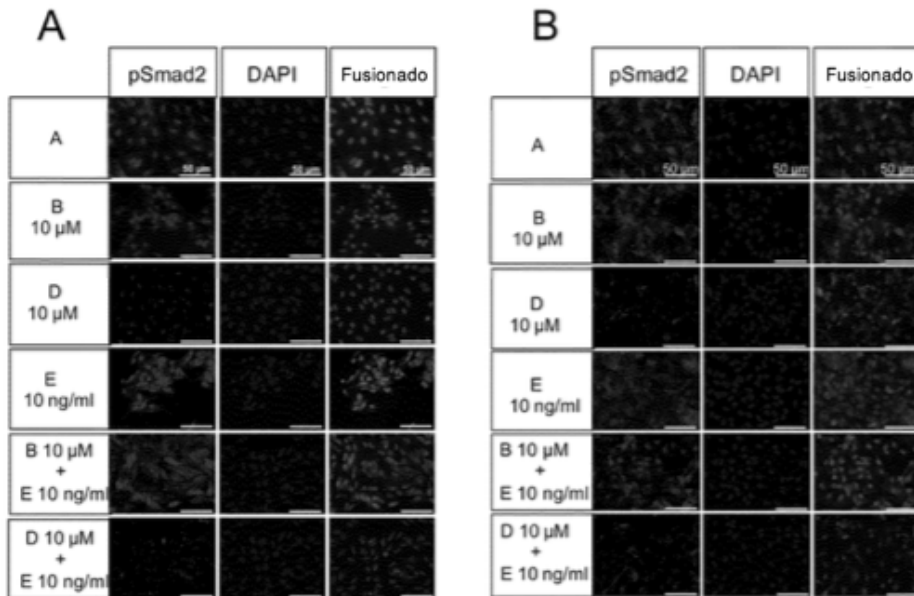


Figura 17

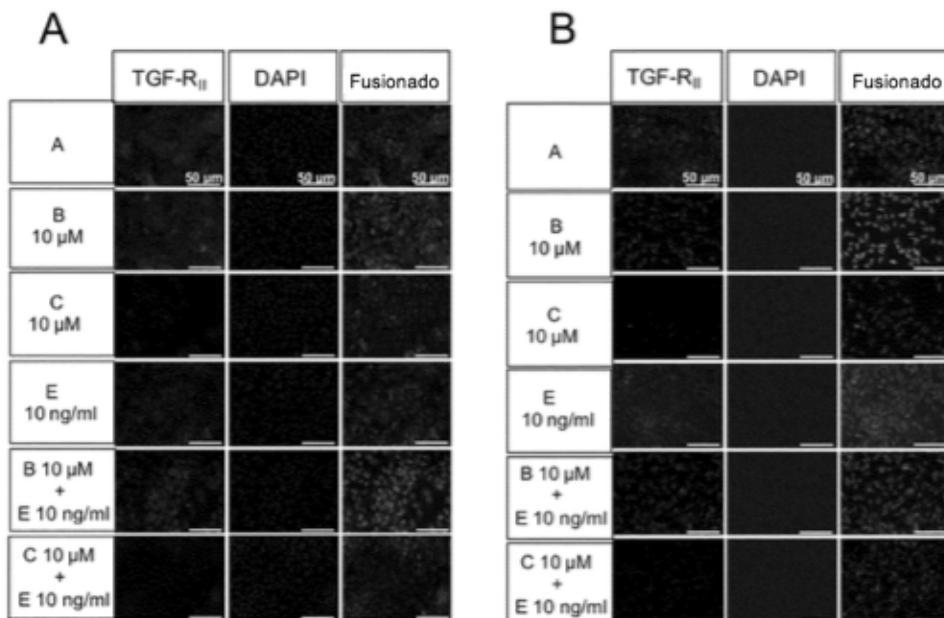


Figura 18

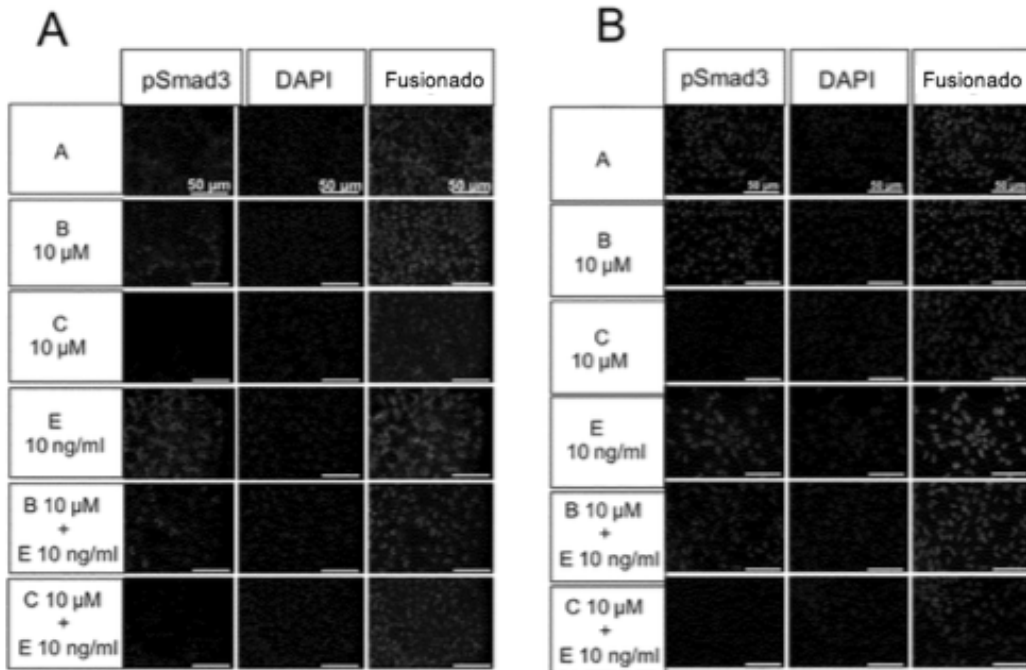


Figura 19

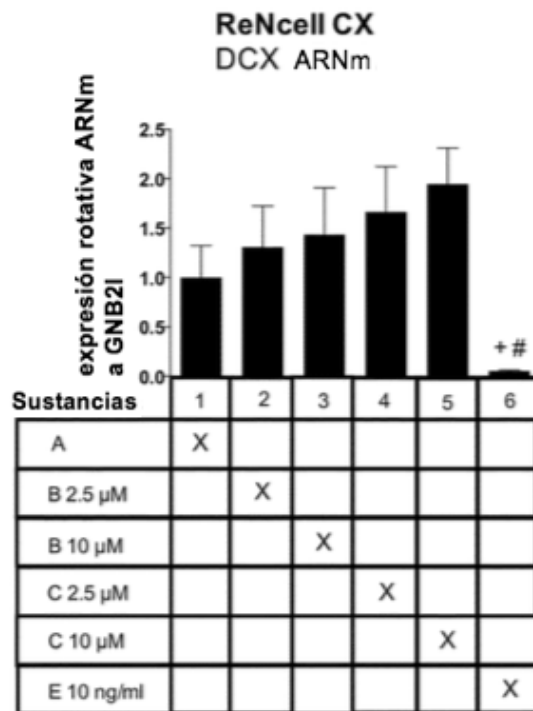


Figura 20

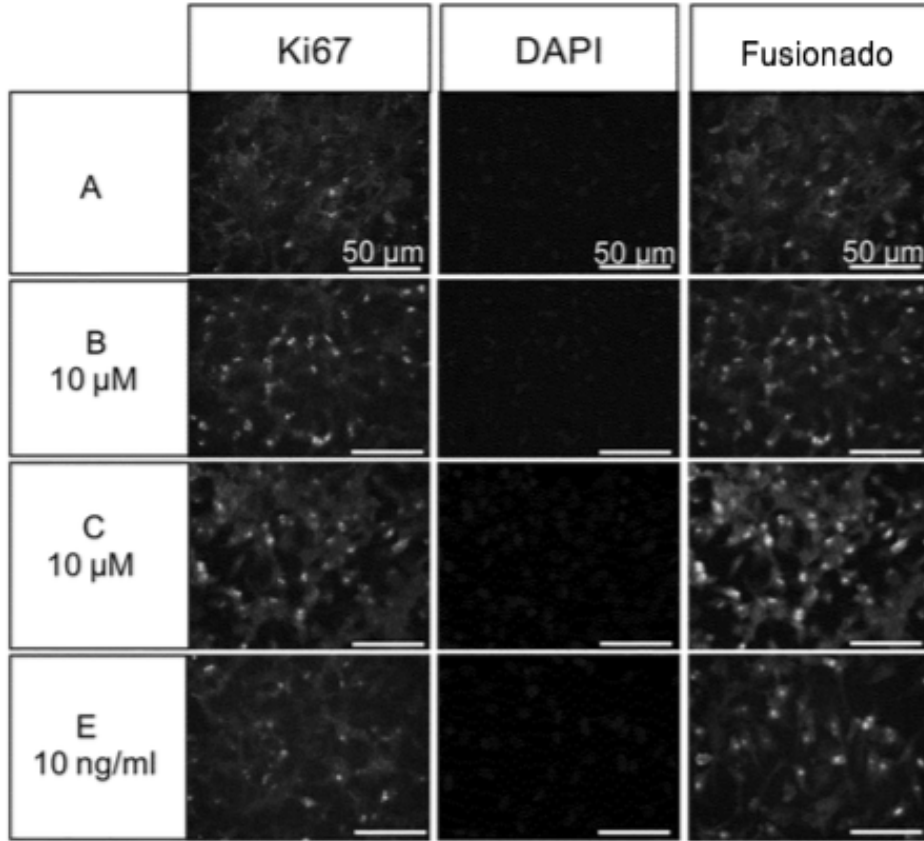


Figura 21

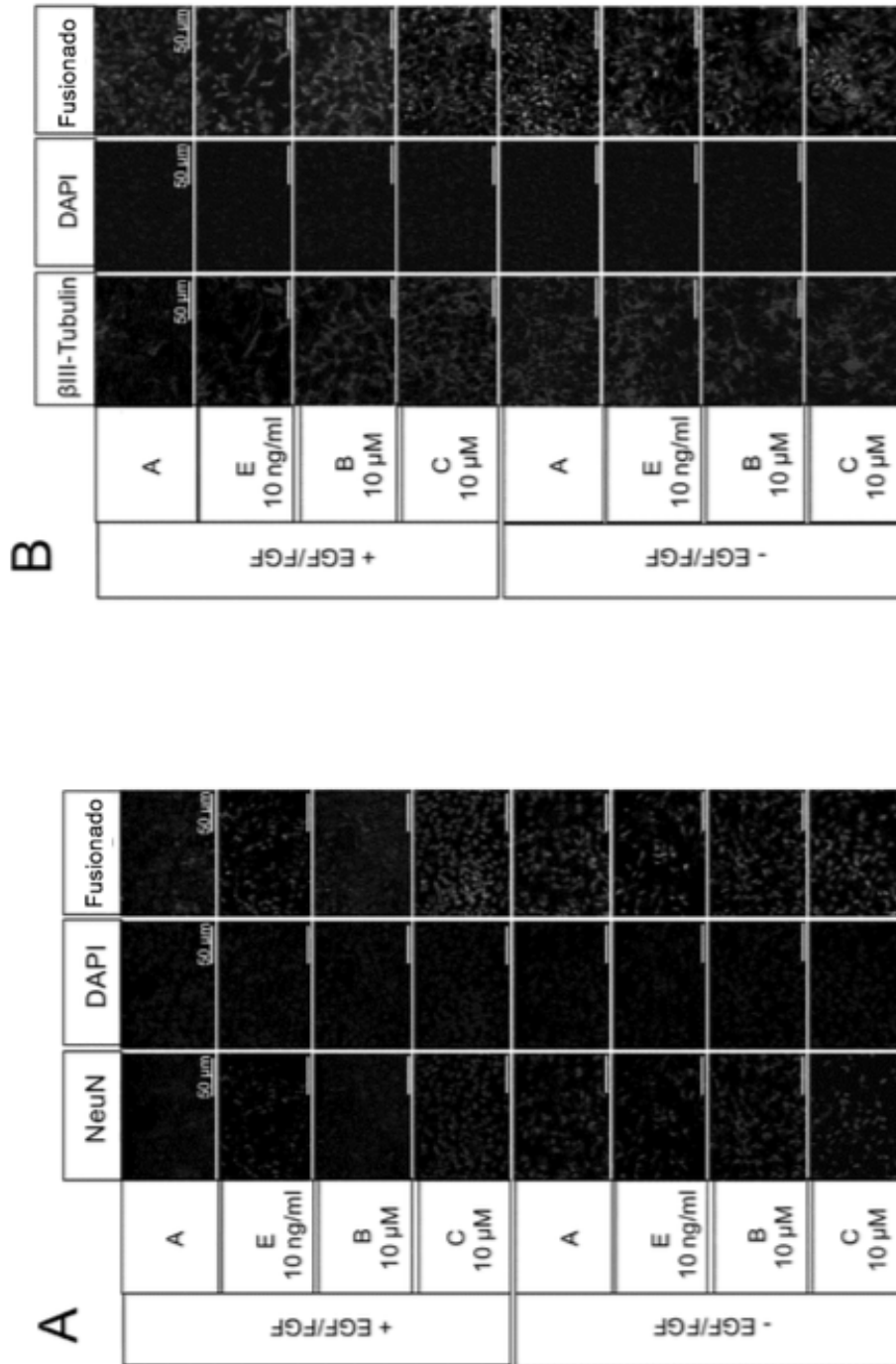


Figura 22

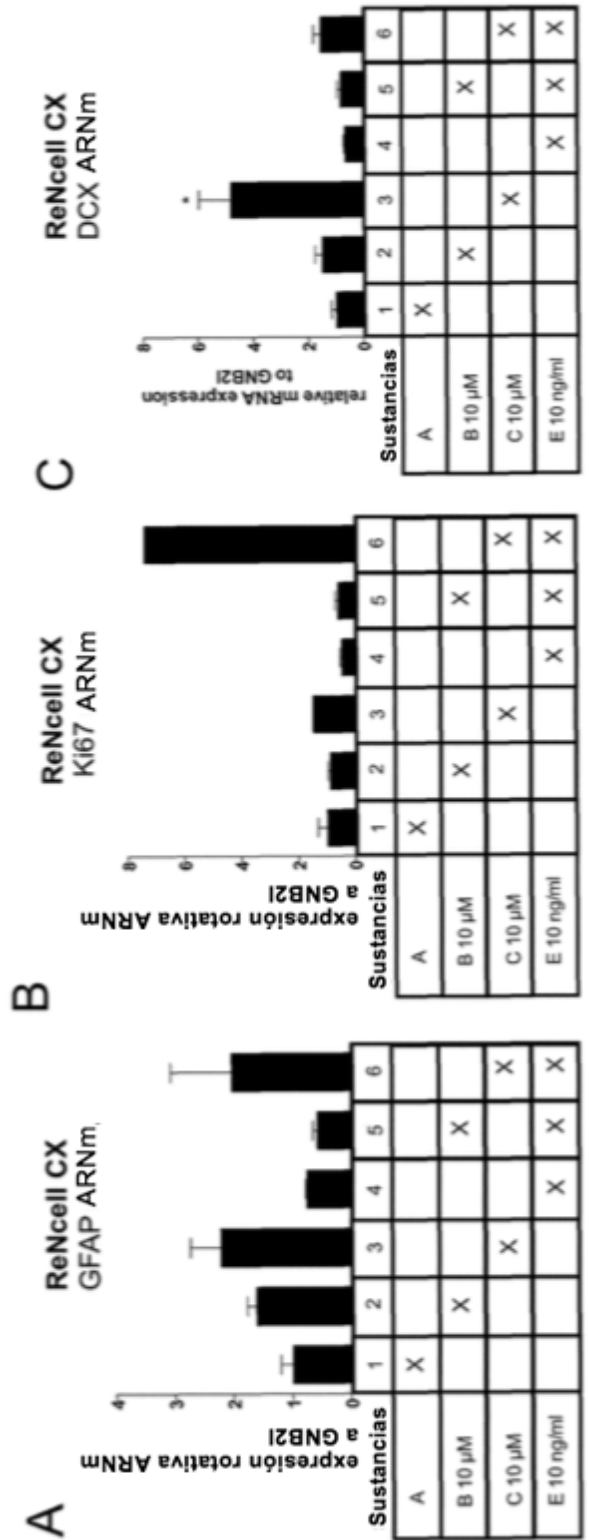


Figura 23

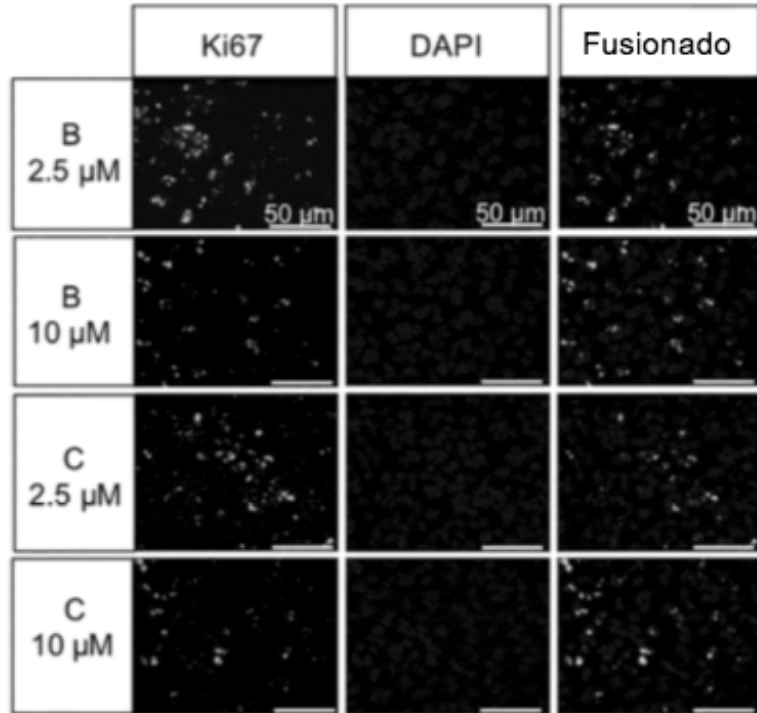


Figura 24

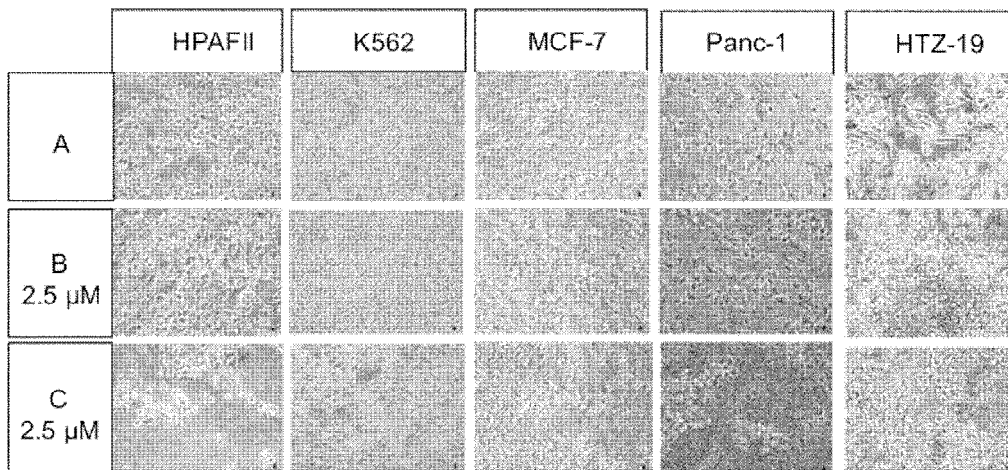


Figura 25

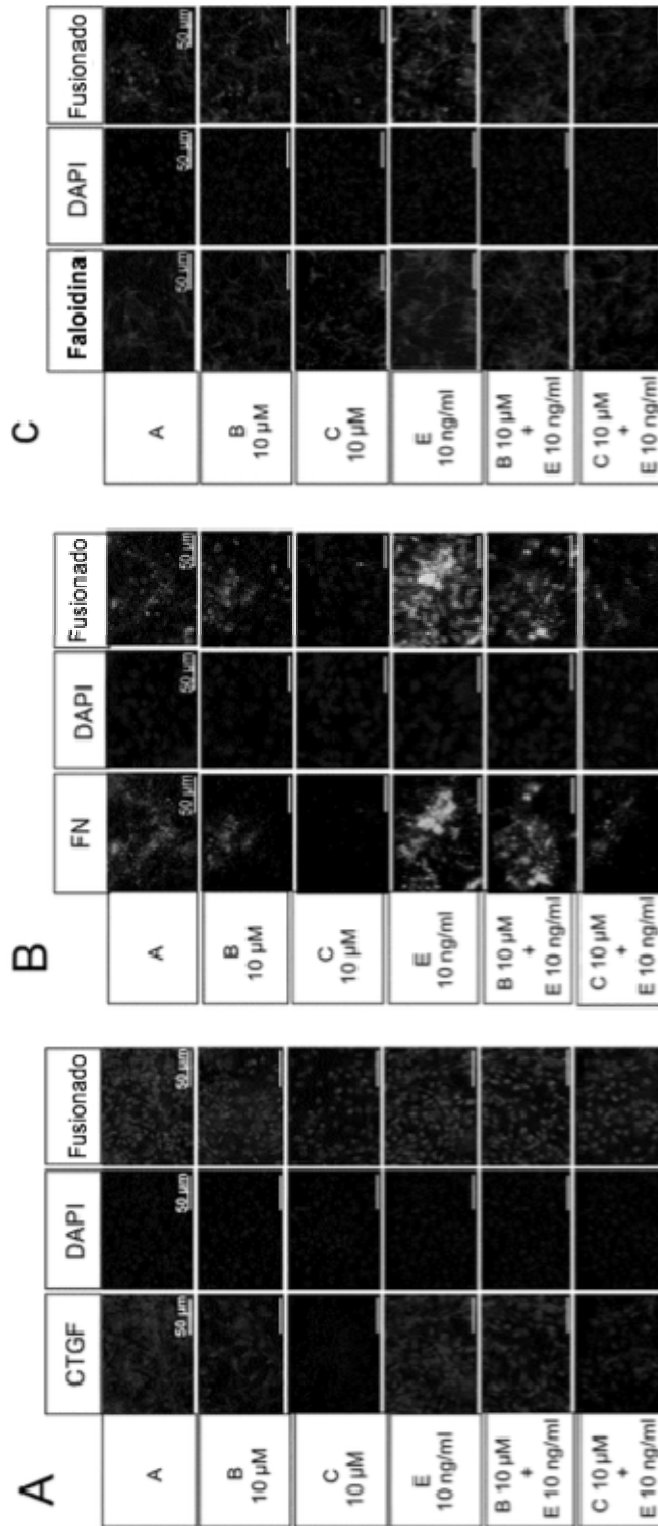


Figura 26

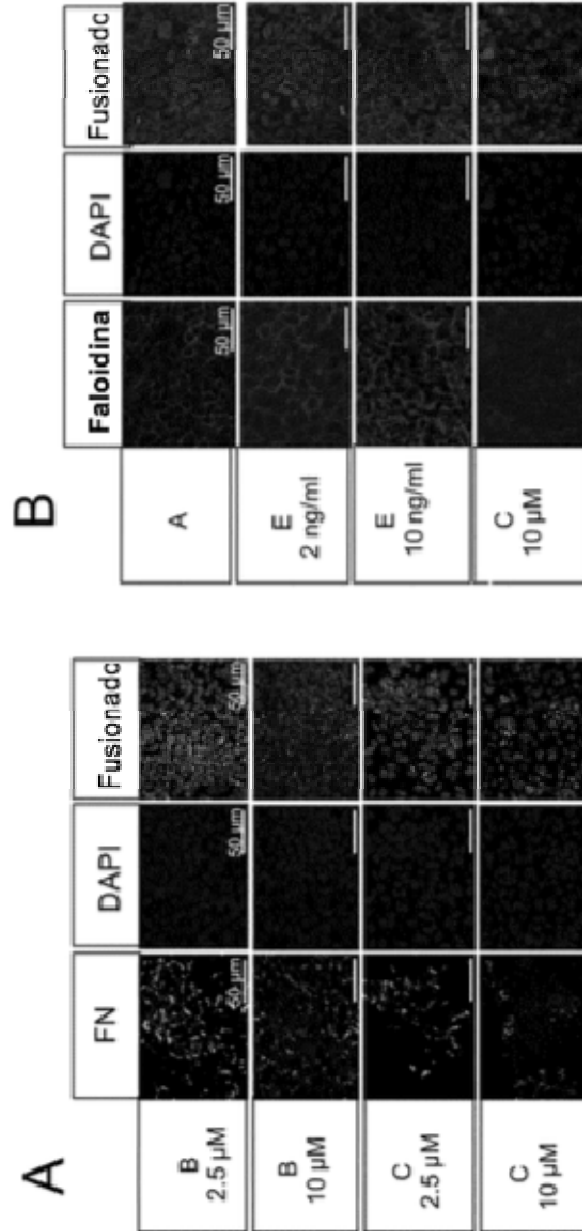


Figura 27

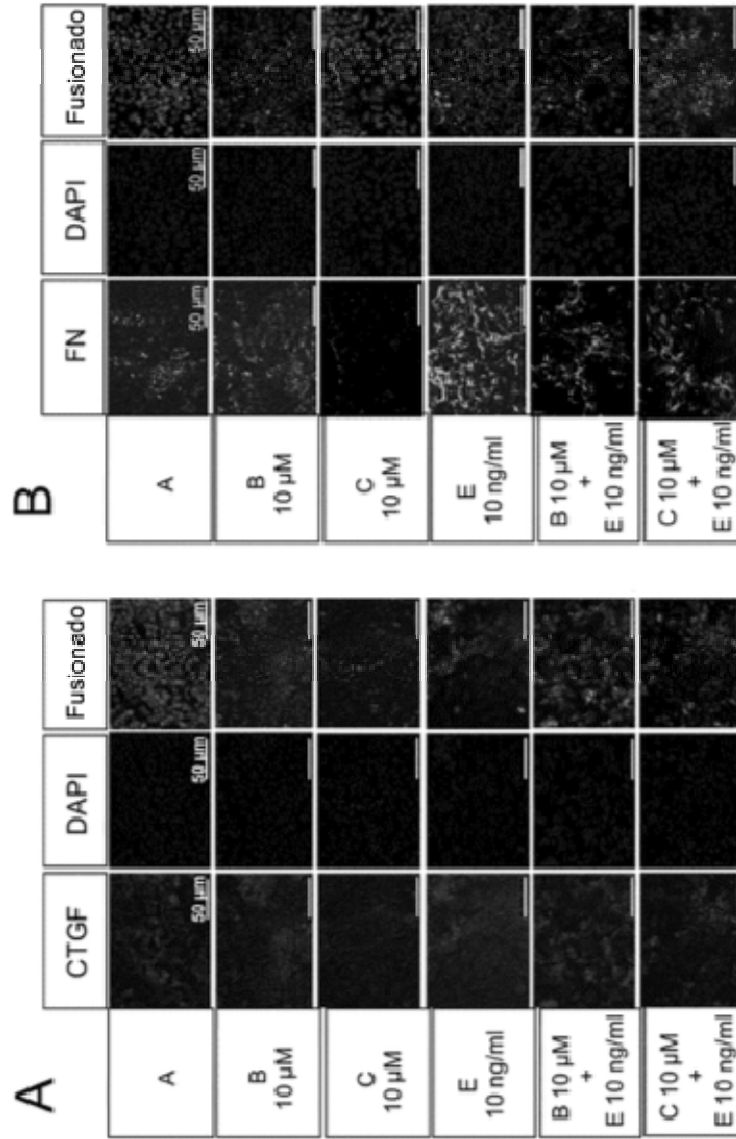


Figura 28

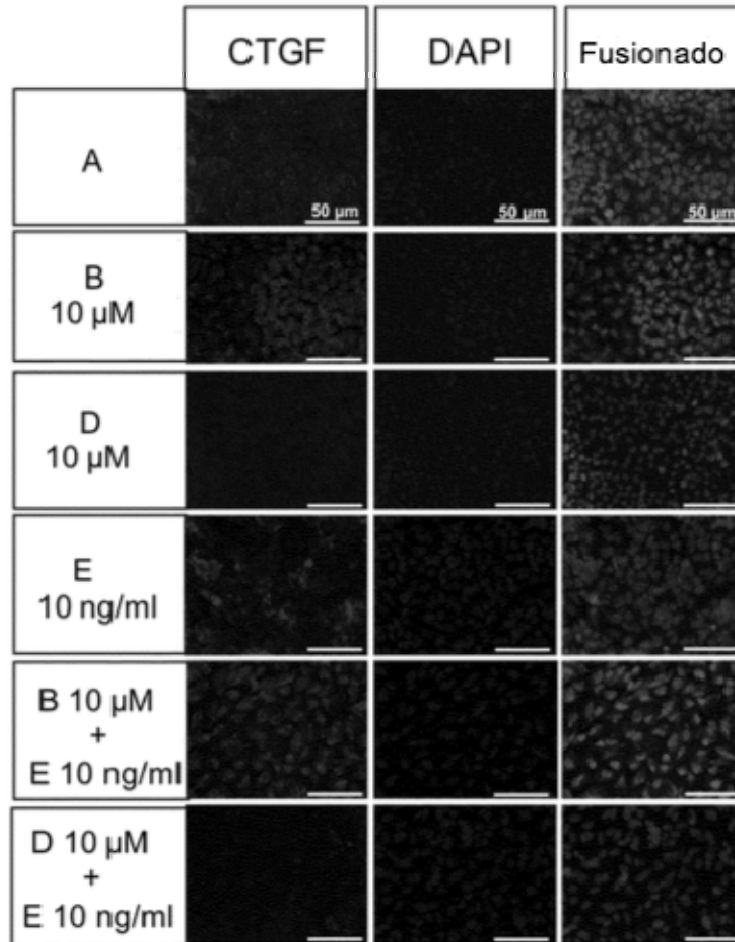


Figura 30

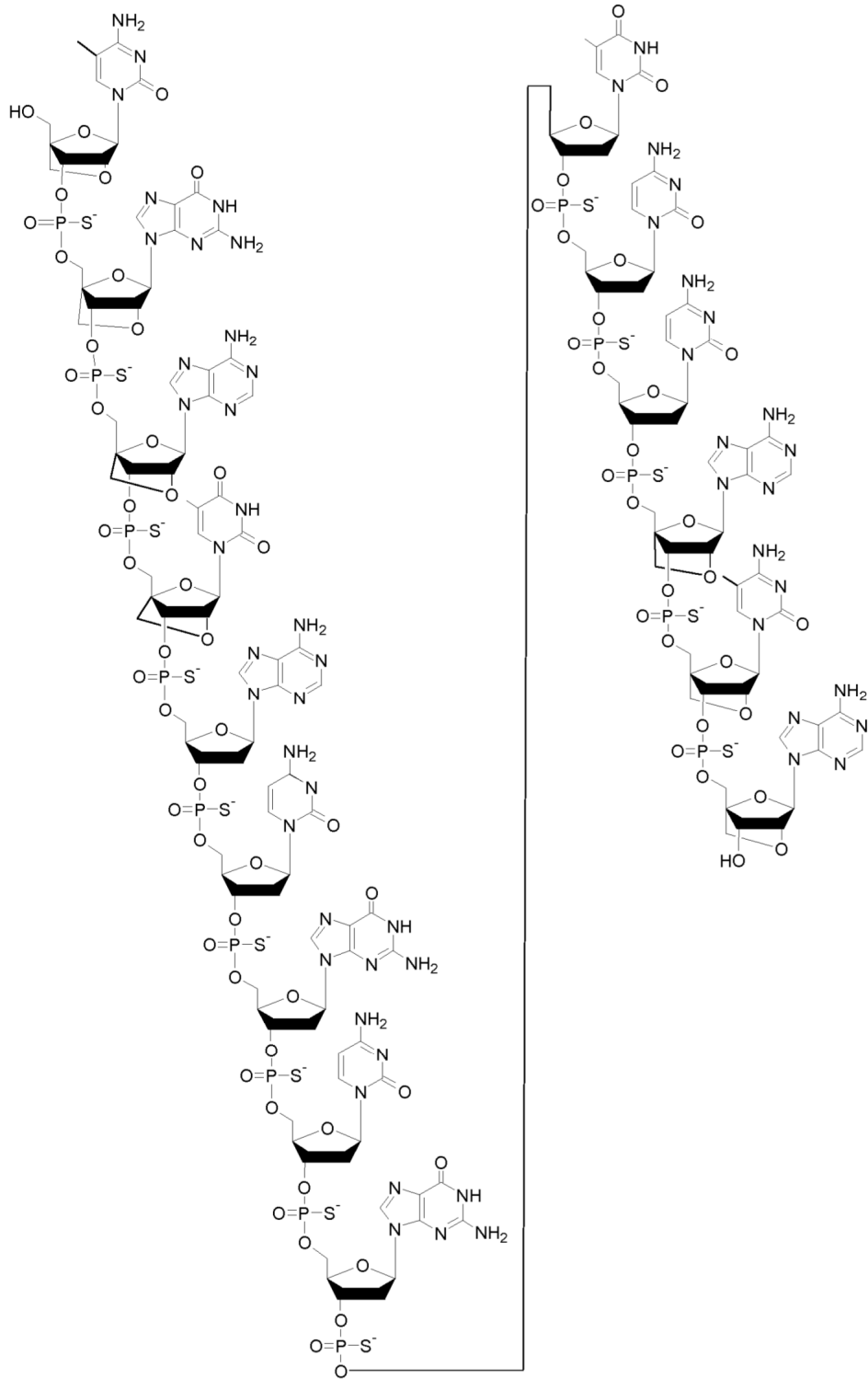


Figura 31

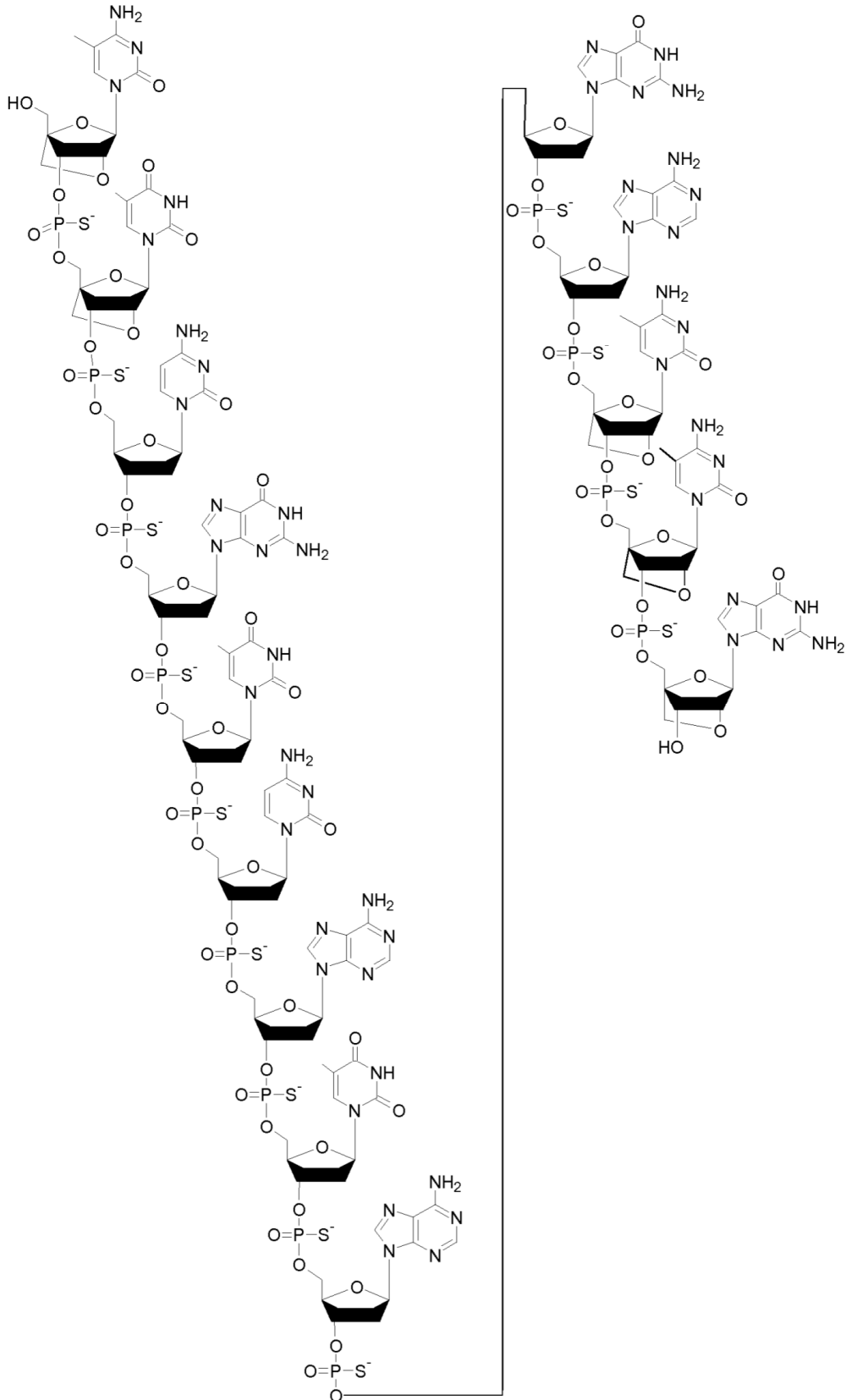


Figura 32

