



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 349 137**

(51) Int. Cl.:

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 31/711 (2006.01)

A61K 31/7105 (2006.01)

A61K 47/42 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **01938732 .3**

(96) Fecha de presentación : **19.06.2001**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1295611**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **26.03.2003**

(54) Título: **Preparación para transferir oligonucleótidos.**

(30) Prioridad: **20.06.2000 JP 2000-184502**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.12.2010

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.12.2010

(73) Titular/es:
DAINIPPON SUMITOMO PHARMA Co., Ltd.
6-8, Dosho-machi 2-chome Chuo-ku
Osaka-shi, Osaka-fu, JP
KOKEN Co., Ltd. y
NATIONAL CANCER CENTER

(72) Inventor/es: **Itoh, Hiroshi;**
Terada, Masaaki;
Nagahara, Shunji;
Sano, Akihiko;
Ochiya, Takahiro;
Kubota, Shunichiro y
Furuse, Masayasu

(74) Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 349 137 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

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a preparaciones para transferir oligonucleótidos a una célula diana, las cuales contienen un colágeno como componente esencial, siendo utilizadas dichas preparaciones en terapia antisentido. Más específicamente, la presente invención se refiere a una preparación segura que contiene un colágeno como componente esencial, mediante la cual los oligonucleótidos pueden ser transferidos eficazmente a una célula diana.

ANTECEDENTES

Con el rápido progreso de la técnica reciente para el análisis de la información genética, se ha acumulado información de genes que causan enfermedades. Por ejemplo, en el campo de las enfermedades infecciosas se ha clarificado la información sobre genes esenciales para el crecimiento o la supervivencia de bacterias y virus. Además, en varias enfermedades, se ha clarificado la información sobre los genes relacionados con la enfermedad y sobre su sobreexpresión y mutaciones, y se ha investigado la relación entre tal información genética y el mecanismo de la patogénesis.

La terapia antisentido sirve para controlar o inhibir la expresión de la información de los genes relacionados con una enfermedad, según se mostró anteriormente, con el fin de tratar o prevenir la enfermedad.

Específicamente, comprende:

(1) la administración de un oligonucleótido 10 a 30 mero aproximadamente que contiene una secuencia de bases complementaria a un ARNm o a un precursor de ARNm de genes cuya expresión va a ser controlada o inhibida;

(2) el permitir que el oligonucleótido forme una doble cadena junto con el ARNm o con el precursor de ARNm en las células y

(3) la inhibición de la traducción del ARNm por los ribosomas, o la inhibición del corte de la doble cadena por la ARNasa H, o del ajuste del precursor de ARNm; suprimiendo de este modo la expresión de los genes.

5 Además, existe un método que comprende la unión directa del ADN de doble cadena del gen diana para formar una triple hebra, mediante lo cual se inhibe la transcripción a ARNm.

La terapia antisentido ha sido estudiada
10 intensamente desde que fue propuesta al final de los años 70 por Ts'0 y Miller y col., Biochemistry, 16, 1988-1996, 1977; y Zamecnik y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 280-284, 1978. Originalmente, los estudios sobre terapia antisentido se llevaron a cabo utilizando oligonucleótidos de ADN o ARN nativo. Sin embargo, esto tenía ciertos
15 problemas tales como:

(1) la rápida degradación e inactivación de los oligonucleótidos nativos debido a las nucleasas endógenas;

(2) la dificultad que presentan los oligonucleótidos
20 cargados negativamente para penetrar en las células a través de la membrana celular debido a la membrana cargada negativamente; etcétera.

Considerando tales problemas, se han desarrollado y utilizado varios oligonucleótidos modificados que
25 tienen la estructura básica del ADN o del ARN. Entre estos oligonucleótidos modificados, los más prácticos son los oligonucleótidos de tipo fosforotioato, en los cuales los enlaces diéster entre los nucleósidos respectivos están sustituidos por enlaces fosforotioato (referidos de
30 aquí en adelante como S-oligonucleótidos). Los S-oligonucleótidos han sido utilizados en la mayor parte de los ensayos clínicos que se han realizado hasta ahora.

Sin embargo, incluso los S-oligonucleótidos tienen los problemas siguientes:

35 (1) que son degradados e inactivados por la nucleasa

endógena, aunque no tan rápidamente como los oligonucleótidos nativos;

(2) que tienen menos capacidad para formar una doble cadena junto con el ARNm en comparación con los oligonucleótidos nativos;

(3) que deben ser administrados a la célula diana a una mayor concentración debido a su baja capacidad para formar una doble cadena;

(4) que producen la liberación de citoquinas, la inhibición de la coagulación sanguínea, la activación del complemento y reacciones alérgicas o similares cuando son administrados sistémicamente a una concentración más elevada;

(5) que se unen específicamente o no específicamente a proteínas endógenas y, por consiguiente, no pueden formar una doble cadena con el ARNm diana pero producen efectos no específicos.

Los mismos no satisfacen completamente los requisitos de la terapia antisentido, por lo que prácticamente no han sido utilizados. Estos problemas son ciertos no sólo para los oligonucleótidos utilizados como primera generación de S-oligonucleótidos, sino también para los denominados de segunda y tercera generación para terapia antisentido, que han sido desarrollados hasta ahora (Kazunari Yokoyama, *Kagaku-to-Seibutsu*, 36, 556-559, 1998). Debido a estos problemas, se ha reconocido de manera general que la supresión de la expresión de un gen diana utilizando oligonucleótidos no proporcionará buenos resultados *in vivo*, particularmente en ensayos clínicos, aunque pudiera proporcionar buenos resultados *in vitro*. En realidad, los ensayos clínicos para fármacos antisentido son a menudo suspendidos ya que no muestran buenos resultados.

Murakami informó que la suspensión de los ensayos clínicos estaría causada por el problema de la

administración de los fármacos antisentido y que el desarrollo con éxito de los fármacos antisentido depende del desarrollo de métodos de administración (Akira Murakami, *Seitai-no-Kagaku*, 49, 309-314, 1998). Los métodos para administrar oligonucleótidos han sido investigados intensamente dirigiéndose principalmente a la mejora de la penetración y del transporte de los oligonucleótidos en las células. Para solucionar tales problemas, en la revisión de Yokoyama se proponen los métodos siguientes (Kazunari Yokoyama, *Cellular Engineering*, 16, 1463-1473, 1997):

- (1) conjugar los oligonucleótidos con compuestos poliacargados tales como poli-L-lisina y polietilenimina;
- (2) utilizar ADNs conjugados a transferrina/poli-L-lisina en presencia de la cápside de adenovirus defectuosos en replicación;
- (3) utilizar fragmentos de los dominios homeo del péptido fusionado a la membrana derivado de la proteína de superficie HA del virus de la influenza (Bongartz, J.P. y col., *Nucleic Acids Research*, 22, 4681-4688, 1994) y de la proteína *Antennapedia* de *Drosophila*;
- (4) unir los oligonucleótidos a ácido fólico o al receptor de asialoglicoproteínas, o a transferrina, con el fin de que sean dirigidos hacia receptores específicos de la superficie celular;
- (5) conjugar los oligonucleótidos con colesterol;
- (6) encapsular los oligonucleótidos en lípidos catiónicos, etcétera. Estas propuestas están encaminadas principalmente a mejorar la penetración y el transporte de los oligonucleótidos a las células, y experimentos *in vitro* en los cuales los oligonucleótidos pueden ser administrados directamente a las células han proporcionado buenos resultados. Sin embargo, los experimentos *in vivo* no han sido capaces de mostrar resultados suficientes y han sido difíciles de utilizar en la práctica.

Por ejemplo, los métodos que comprenden la administración de los oligonucleótidos encapsulados en lípidos catiónicos (esto es, liposomas) han sido estudiados intensamente ya que transfieren eficazmente oligonucleótidos a las células. Sin embargo, esos métodos tienen problemas ya que, por ejemplo, esos oligonucleótidos no actúan sobre las células diana a una concentración elevada debido a que se difunden por todo el cuerpo inmediatamente después de la administración; las proteínas que existen en el organismo se unen al liposoma para inhibir la adhesión a las células diana y los lípidos catiónicos que constituyen el liposoma pueden tener citotoxicidad, y por tanto no han sido capaces de proporcionar resultados exitosos en la práctica. En realidad, los ensayos clínicos que utilizan S-oligonucleótidos no han utilizado nunca liposomas (Seitai-no-kagaku, 49, 309-314, 1998). Existe todavía la necesidad de desarrollar métodos prácticos para la administración de oligonucleótidos.

Por otra parte, un método para transferir un gen en el cual un ADN plasmídico o un vector vírico es liberado gradualmente a partir de materiales biocompatibles o compatibles con el hueso, ha sido descrito en la Publicación de Patente Japonesa (kokai) N° 71542/1997 y en USP N° 5,763.416. Estos documentos describen que los materiales biocompatibles o compatibles con el hueso liberan gradualmente ADNs plasmídicos con un peso molecular de 2.650.000 a 5.300.000 (correspondiente a 4.000 pb - 8.000 pb) o vectores víricos con el peso molecular más grande para presentar buenas eficacias de expresión. Sin embargo, el número de ADNs plasmídicos o de vectores víricos que pueden ser transferidos a una célula diana en la que se requiere que estos ADNs plasmídicos o vectores víricos sean transferidos, es considerablemente más pequeño en comparación con el número de oligonucleótidos requeridos para ser transferidos en terapia antisentido.

Es suficiente introducir un ADN plasmídico o un vector vírico en una única célula diana, ya que la información sobre los genes codificados en el ADN plasmídico o en el vector vírico es transcrita a muchos ARNms y expresada después de que los mismos son introducidos en la célula diana. Por otra parte, para transferir oligonucleótidos a las células y formar dobles hebras rígidas con el fin de suprimir la expresión génica en la terapia antisentido, la concentración de los oligonucleótidos en las células debe ser aumentada tanto como sea posible. La Publicación de Patente Japonesa (kokai) 71542/1997 y USP N° 5.763.416 mostradas anteriormente sugieren específicamente que ni los materiales biocompatibles ni los materiales compatibles con el hueso liberan gradualmente oligonucleótidos extremadamente pequeños (de hebra sencilla, con un peso molecular de 3.300 a 9.900), en comparación con los ADNs plasmídicos o vectores víricos, que puedan inhibir la expresión génica, ni que la concentración de oligonucleótidos en la célula diana puede ser elevada hasta un nivel clínicamente suficiente.

Además, las publicaciones anteriores no sugieren ninguna preparación para transferir oligonucleótidos que pueda ser utilizada en la terapia antisentido, y tenga las propiedades descritas a continuación:

- 1) proteger los oligonucleótidos administrados a organismos vivos de la degradación con nucleasas;
- 2) proteger los oligonucleótidos administrados a organismos vivos de la unión específica o no específica a proteínas endógenas;
- 3) mantener una concentración elevada de oligonucleótidos alrededor de las células diana con el fin de incrementar la concentración de oligonucleótidos en las células de tal manera que se inhiba la expresión del ARNm diana por la formación de una doble hebra rígida;
- 4) restringir tal concentración elevada de oligonu-

cleótidos solamente a las células alrededor de las células diana con el fin de no producir efectos colaterales sistémicos; y

- 5 5) requerir la extensión del periodo de tiempo durante el cual la expresión del ARNm pueda ser suprimida tras una única dosificación.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

El objeto de la presente invención es proporcionar una preparación para transferir eficazmente a las
10 células un oligonucleótido necesario para terapia antisentido, contribuyendo de este modo al tratamiento de diferentes enfermedades.

Los inventores de la presente solicitud estudiaron intensamente para resolver los problemas anteriores. Como resultado, hemos encontrado que una preparación
15 como la definida en la reivindicación 1, que contiene un oligonucleótido con una secuencia de bases complementaria a una secuencia de un ARNm diana y un colágeno (además de un aditivo farmacéuticamente aceptable), inhibe eficazmente la expresión del ARNm diana sin inducir ningún
20 efecto colateral *in vivo* y mantiene su efecto durante un largo periodo de tiempo. Los inventores han llevado a cabo estudios adicionales y realizaron la presente invención.

25 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra una electroforesis en gel de agarosa al 3% del Experimento 1. La Fig. 1 muestra el efecto de la nucleasa sobre el oligonucleótido antisentido fosforotioato de las preparaciones oligonucleotídicas del Ejemplo 1 y del Ejemplo de Referencia 1. Calle 1:
30 Ejemplo 1 después de 0 minutos, Calle 2: Ejemplo 1 después de 30 minutos, Calle 3: Ejemplo 1 después de 60 minutos, Calle 4: Ejemplo 1 después de 180 minutos, Calle 5: Ejemplo de Referencia 1 después de 0 minutos, Calle 6:
35 Ejemplo de Referencia 1 después de 30 minutos, Calle 7:

Ejemplo de Referencia 1 después de 60 minutos, Calle 8:
Ejemplo de Referencia 1 después de 180 minutos.

La Figura 2 es una gráfica que muestra que la administración de la preparación para transferir un oligonucleótido del Ejemplo 1 a testículos de ratones desnudos, en los cuales se habían trasplantado células tumorales testiculares humanas (NEC-8), inhibía durante largo tiempo el crecimiento de las células NEC-8.

La Figura 3 es una gráfica que muestra que la adición *in vitro* de la preparación para transferir un oligonucleótido del Ejemplo 2 a células de cáncer de estómago humano, inhibía el crecimiento de las células de cáncer de estómago humano y disminuía el número de células en comparación con la solución de atelocolágeno del Ejemplo de Referencia 4, con la solución de nucleótidos antisentido del Ejemplo de Referencia 5 y con la composición de oligonucleótidos desorganizados ("scramble") del Ejemplo de Referencia 6.

La Figura 4 es una gráfica que muestra la comparación de la inhibición *in vitro* del crecimiento de células de rabdomiosarcoma humano entre las concentraciones del oligonucleótido antisentido fosforotioato contenidas en las preparaciones para transferir un oligonucleótido del Ejemplo 2.

La Figura 5 es una gráfica que muestra que la preparación para transferir un oligonucleótido que contiene un liposoma de acuerdo con el Ejemplo 3, cuando fue añadida a células de rabdomiosarcoma humano *in vitro*, mostró un efecto citotóxico más potente en comparación con la preparación de liposomas del Ejemplo de Referencia 7.

La Figura 6 es una gráfica que muestra que la preparación para transferir un oligonucleótido que contiene un liposoma de acuerdo con el Ejemplo 3, cuando fue añadida a células de rabdomiosarcoma humano *in vitro*, re-

dujo la actividad descarboxilasa de ornitina más potentemente que la preparación de liposomas del Ejemplo de Referencia 7.

La Figura 7 es una gráfica que muestra que la
5 preparación para transferir un oligonucleótido del Ejemplo 7, cuando fue administrada a los ratones desnudos que habían sido trasplantados con células de rabdomiosarcoma humano en el lugar del trasplante, inhibió el crecimiento de las células de rabdomiosarcoma durante un periodo de
10 tiempo más largo que la solución de atelocolágeno del Ejemplo de Referencia 4.

La Figura 8 es una gráfica que muestra que la
preparación para transferir un oligonucleótido del Ejemplo 7, cuando fue administrada a los ratones desnudos que
15 habían sido trasplantados con células de rabdomiosarcoma humano en el lugar del trasplante, inhibió durante un periodo de tiempo más largo que la preparación de liposomas del Ejemplo de Referencia 7.

La Figura 9 es una gráfica que muestra que la
20 preparación para transferir un oligonucleótido del Ejemplo 7, cuando fue administrada a los ratones desnudos que habían sido trasplantados con células de rabdomiosarcoma humano en el lugar del trasplante, en el músculo del lomo opuesto al lugar del trasplante y en la cavidad peritoneal, inhibió el crecimiento de las células de rabdomio-
25 sarcoma en todos los lugares de administración durante un periodo de tiempo más largo en comparación con las preparaciones de liposomas administradas en el lugar del rabdomiosarcoma trasplantado.

La Figura 10 es una gráfica que muestra que
30 la preparación para transferir un oligonucleótido del Ejemplo 7, cuando fue administrada a los ratones desnudos que habían sido trasplantados con células de rabdomiosarcoma humano en el lugar del trasplante, incrementó la su-
35 pervivencia de los ratones desnudos en comparación con la

solución de atelocolágeno del Ejemplo de Referencia 4.

La Figura 11 es una gráfica que muestra que la preparación para transferir un oligonucleótido del Ejemplo 7, cuando fue administrada a los ratones desnudos que habían sido trasplantados con células de rabdomiosarcoma humano en el lugar del trasplante, incrementó la supervivencia de los ratones desnudos en comparación con la preparación de liposomas del Ejemplo de Referencia 7.

La Figura 12 es una gráfica que muestra que la preparación para transferir un oligonucleótido del Ejemplo 7, cuando fue administrada a los ratones desnudos que habían sido trasplantados con células de rabdomiosarcoma humano en el lugar del trasplante, inhibió la producción de descarboxilasa de ornitina en las células de rabdomiosarcoma más potentemente en comparación con la solución de atelocolágeno del Ejemplo de Referencia 4.

La Figura 13 es una gráfica que muestra que la preparación para transferir un oligonucleótido del Ejemplo 7, cuando fue administrada a los ratones desnudos que habían sido trasplantados con células de rabdomiosarcoma humano en el lugar del trasplante, inhibió la producción de descarboxilasa de ornitina en las células de rabdomiosarcoma más potentemente en comparación con la preparación de liposomas del Ejemplo de Referencia 7.

La Figura 14 es una gráfica que muestra que la preparación para transferir un oligonucleótido del Ejemplo 7, cuando fue administrada a los ratones desnudos que habían sido trasplantados con células de cáncer de estómago humano en el lugar del trasplante, inhibió el crecimiento de las células de cáncer de estómago durante un periodo de tiempo más largo en comparación con la solución de atelocolágeno del Ejemplo de Referencia 4 y en comparación con la composición en solución del Ejemplo de Referencia 6 que contenía un oligonucleótido fosforotioato con una secuencia heteróloga a la del gen de la

descarboxilasa de ornitina.

La Figura 15 es una gráfica que muestra que la preparación para transferir un oligonucleótido del Ejemplo 7, cuando fue administrada a los ratones desnudos que habían sido trasplantados con células de cáncer de estómago humano en el lugar del trasplante, incrementó la supervivencia de los ratones desnudos en comparación con la solución de atelocolágeno del Ejemplo de Referencia 4 y en comparación con la composición en solución del Ejemplo de Referencia 6 que contenía un oligonucleótido fosforotioato con una secuencia heteróloga a la del gen de la descarboxilasa de ornitina.

La Figura 16 es una gráfica que muestra que la preparación para transferir un oligonucleótido del Ejemplo 7, cuando fue administrada a los ratones desnudos que habían sido trasplantados con células de cáncer de estómago humano en el lugar del trasplante, inhibió la producción de descarboxilasa de ornitina en las células de cáncer de estómago más potentemente en comparación con la solución de atelocolágeno del Ejemplo de Referencia 4 y en comparación con la composición en solución del Ejemplo de Referencia 6 que contenía un oligonucleótido fosforotioato con una secuencia heteróloga a la del gen de la descarboxilasa de ornitina.

La Figura 17 es una gráfica que muestra que la preparación para transferir un oligonucleótido del Ejemplo 7, cuando fue administrada a los ratones desnudos que habían sido trasplantados con células cancerosas de intestino grueso humano en el lugar del trasplante, inhibió el crecimiento de las células cancerosas de intestino grueso durante un periodo de tiempo más largo en comparación con la solución de atelocolágeno del Ejemplo de Referencia 4.

La Figura 18 es una gráfica que muestra que la preparación para transferir un oligonucleótido del

Ejemplo 7, cuando fue administrada a los ratones desnudos que habían sido trasplantados con células cancerosas de intestino grueso humano en el lugar del trasplante, incrementó la supervivencia de los ratones desnudos en comparación con la solución de atelocolágeno del Ejemplo de Referencia 4.

La Figura 19 es una gráfica que muestra que la preparación para transferir un oligonucleótido del Ejemplo 7, cuando fue administrada a los ratones desnudos que habían sido trasplantados con células cancerosas de intestino grueso humano en el lugar del trasplante, inhibió la producción de descarboxilasa de ornitina en las células cancerosas de intestino grueso más potentemente que la solución de atelocolágeno del Control.

La Figura 20 es una gráfica que muestra que la preparación para transferir un oligonucleótido del Ejemplo 7, cuando fue añadida a células de leiomioma de ratón (células LMFS), *in vitro*, inhibió el crecimiento de las células de leiomioma más potentemente que los Ejemplos de Referencia.

La Figura 21 es una gráfica que muestra que la preparación para transferir un oligonucleótido del Ejemplo 7, cuando fue añadida a células de leiomioma de ratón (células LMFS), *in vitro*, inhibió la producción de descarboxilasa de ornitina en las células de leiomioma en comparación con los Ejemplos de Referencia.

MODO MEJOR DE LLEVAR A CABO LA INVENCION

Por consiguiente, la presente invención se refiere a:

(1) Una preparación para transferir un oligonucleótido deseado a una célula diana según se define en la reivindicación 1.

(2) La preparación de acuerdo con (1) en la que la célula diana es una célula animal.

(3) La preparación de acuerdo con (2) en la que la

célula diana es un órgano o un tejido que requiere ser tratado o células a su alrededor.

(4) La preparación de acuerdo con cualquiera de (1) a (3) en la que el colágeno es atelocolágeno.

5 (5) La preparación de acuerdo con cualquiera de (1) a (4) en la que el peso molecular del colágeno es de 300.000 aproximadamente a 900.000 aproximadamente.

(6) La preparación de acuerdo con cualquiera de (1) a (5) donde la preparación es una formulación de liberación
10 mantenida.

(7) La preparación de acuerdo con cualquiera de (1) a (6) en la que el oligonucleótido es de 5 a 30 mero de longitud.

(8) La preparación de acuerdo con (6) o (7) en la que
15 el oligonucleótido es un ADN o un derivado de ADN.

(9) La preparación de acuerdo con (6) o (7) en la que el oligonucleótido es un ARN o un derivado de ARN.

(10) La preparación de acuerdo con (8) o (9) en la que el derivado de ADN o el derivado de ARN tiene al me-
20 nos un enlace fosforotioato.

(11) La preparación de acuerdo con cualquiera de (1) a (10), en la que el oligonucleótido contiene como porción mínima una secuencia de bases que se une de manera complementaria bajo condiciones fisiológicas a una hebra
25 sentido o antisentido de un gen que codifica una proteína que presenta un efecto fisiológico para alterar la homeostasis de un organismo vivo.

(12) La preparación de acuerdo con cualquiera de (1) a (10), en la que el oligonucleótido contiene como porción mínima una secuencia de bases que se une de manera
30 complementaria bajo condiciones fisiológicas a una hebra sentido o antisentido de un gen que es específico de un virus patógeno o de una bacteria patógena.

(13) La preparación de acuerdo con cualquiera de (1)
35 a (10), en la que el oligonucleótido contiene una secuen-

cia complementaria a una región que comprende un codón de inicio de un ARN mensajero o a un lugar de ajuste de un precursor del ARN mensajero.

5 (14) La preparación de acuerdo con (11) en la que el gen que codifica una proteína que presenta un efecto fisiológico para alterar la homeostasis es un gen de cáncer.

10 (15) La preparación de acuerdo con (14), en la que el gen de cáncer es seleccionado de un grupo que consta de factores de crecimiento, quinasas de tirosina de tipo receptor, quinasas de tirosina de tipo no receptor, proteínas que se unen a GTP, quinasas de serina-treonina y factores de transcripción.

15 (16) La preparación de acuerdo con (14) en la que el gen de cáncer es un gen que codifica hst-1 o descarboxilasa de ornitina.

20 (17) La preparación de acuerdo con cualquiera de (1) a (12) en la que el oligonucleótido está contenido en un material que estimula la transferencia del oligonucleótido a las células o el transporte hacia el núcleo, o en la que el oligonucleótido forma complejos con el material.

25 (18) La preparación de acuerdo con (17) en la cual el material que estimula la transferencia a las células es un liposoma catiónico, un liposoma fusionado a membranas o un polímero catiónico.

30 (19) La preparación de acuerdo con (1) en la que el colágeno es un colágeno de tipo 1 derivado de la dermis o un colágeno de tipo 1 preparado mediante ingeniería genética.

(20) La preparación de acuerdo con (1) que comprende además un aditivo farmacéuticamente aceptable.

35 (21) La preparación de acuerdo con (1) en la que el aditivo es un mono-, di- o tri-sacárido o un oligosacárido superior o el alcohol de azúcar correspondiente, un

aminoácido no hidrofóbico o un ácido orgánico con dos o más grupos carboxilo.

(22) La preparación de acuerdo con (1), donde la preparación está en forma de solución, suspensión, esponja, 5 pastilla o polvo.

(23) La preparación de acuerdo con (22), donde la preparación es una solución o una suspensión con un pH de 4 a 8.

(24) La preparación de acuerdo con (22) en la que el 10 contenido de colágeno está en un rango del 0,001% al 10% (p/p), y

(25) La preparación de acuerdo con (22), donde la preparación está en forma de esponja, pella o polvo y tiene un contenido de colágeno del 5 al 99% (p/p).

15 Además, la presente invención se refiere a una terapia antisentido para el tratamiento del cáncer, que comprende la administración de la preparación para transferir un oligonucleótido de acuerdo con la presente invención. Más particularmente, se refiere a una terapia 20 antisentido que comprende la administración de la preparación conteniendo un oligonucleótido deseado y un colágeno a un organismo vivo por vía transdérmica, subcutánea, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intracerebral, intersticial, intravascular, oral, rectal o 25 gastrointestinal, transfiriendo de este modo eficazmente dicho oligonucleótido a una célula.

Una preparación para transferir un oligonucleótido, más particularmente una preparación en forma de solución o suspensión obtenida mezclando una solución del oligonucleótido con una solución de colágeno 30 (así como con un aditivo farmacéuticamente aceptable) de acuerdo con la siguiente invención, se caracteriza por las propiedades siguientes:

1) la misma puede tener forma de película, esponja, 35 de polvo, de minipella o similar, dependiendo del obje-

tivo particular;

2) después de ser administrada al tejido diana o a sus alrededores, la preparación permanecerá en el lugar en el que fue administrada;

5 3) protege al oligonucleótido de ser degradado por una nucleasa;

4) libera gradualmente el oligonucleótido;

5) la velocidad de liberación del oligonucleótido desde la preparación puede ser controlada dependiendo del
10 objetivo particular;

6) la concentración del oligonucleótido alrededor de un tejido diana puede ser mantenida a un nivel elevado;

7) inhibe eficazmente la expresión del ARNm diana *in vivo* sin inducir ningún efecto colateral y conserva la
15 inhibición durante un largo periodo de tiempo.

Además, la presente invención se refiere a un método para el tratamiento y la prevención de enfermedades infecciosas que comprende la utilización de la preparación según se describió anteriormente; o a un método
20 para el tratamiento y la prevención de diferentes enfermedades inducidas por la sobreexpresión de cierta información génica; y particularmente a un método para el tratamiento y la prevención del cáncer.

La preparación para transferir un
25 oligonucleótido de la presente invención puede ser una solución o una suspensión obtenida mezclando una solución del oligonucleótido con una solución de colágeno, o puede ser una película, una esponja, un polvo o una minipella formados a partir de la solución o de la suspensión. Por
30 tanto, un colágeno soluble o un colágeno solubilizado pueden ser empleados de forma deseable como el colágeno utilizado en la presente invención.

Un colágeno soluble incluye todos aquellos que son solubles en agua ácida o neutra o en agua conteniendo una sal. Un colágeno solubilizado incluye, por
35

ejemplo, un colágeno solubilizado enzimáticamente que puede ser solubilizado con un enzima, un colágeno solubilizado en álcali que puede ser solubilizado con un álcali, etcétera.

5 Preferiblemente, estos colágenos pueden penetrar a través de un filtro de membrana con un tamaño de poro de 1 micrómetro. La solubilidad del colágeno puede variar dependiendo del grado de entrecruzamiento del colágeno. Cuanto mayor es el grado de entrecruzamiento, más
10 difícilmente es solubilizado el colágeno. Por consiguiente, el grado de entrecruzamiento del colágeno utilizado en la presente invención es, por ejemplo, no más de 3 (trímero), más preferiblemente no más de 2 (dímero).

 El peso molecular preferible del colágeno es,
15 por ejemplo, de 300.000 a 900.000 aproximadamente y, más preferiblemente, de 300.000 aproximadamente a 600.000 aproximadamente.

 Los colágenos, según son utilizados en la presente, incluyen los extraídos de cualquier especie
20 animal y los recombinantes genéticos de los mismos. El colágeno preferible es extraído de vertebrados o recombinantes genéticos del mismo, más preferiblemente colágenos extraídos de un mamífero, un ave, un pez o un recombinante genético de los mismos, y más preferiblemente el
25 colágeno es extraído de un mamífero o de un ave que tiene una elevada temperatura de desnaturalización, o recombinantes genéticos del mismo. Puede utilizarse cualquier tipo de colágeno, y debido al tipo existente en los organismos animales, son preferibles los colágenos de tipo I
30 - V o recombinantes genéticos de los mismos.

 Por ejemplo, tales colágenos incluyen un colágeno de tipo 1 obtenido mediante extracción ácida de la dermis de un mamífero o un recombinante genético del mismo. Más preferiblemente, incluyen, por ejemplo, un
35 colágeno de tipo 1 obtenido mediante extracción ácida de la

dermis de ternera, un colágeno de tipo 1 producido mediante ingeniería genética, etcétera. Como colágeno de tipo 1 producido mediante ingeniería genética, son preferibles los derivados de dermis de ternera o de dermis humana. Los colágenos derivados de tendón, que son también colágenos de tipo 1, no son adecuados en la presente, ya que tienen un elevado grado de entrecruzamiento y son insolubles.

Además, un atelocolágeno que es obtenido extrayendo enzimáticamente un telopéptido con una elevada antigenicidad o un atelocolágeno producido mediante ingeniería genética es preferible por cuestiones de seguridad. Es más preferible un atelocolágeno que tenga tres o menos residuos de tirosina por molécula.

El colágeno puede ser obtenido cultivando una línea celular de un cultivo primario o una línea celular establecida que produzca colágeno, seguido por la separación y purificación a partir del cultivo (el sobrenadante del cultivo, las células del cultivo). Además, un gen que codifique colágeno es incorporado en un vector apropiado por ingeniería genética y, posteriormente, el vector es transferido a huésped apropiados para su transformación, obteniendo de este modo un colágeno recombinante deseado a partir del sobrenadante del cultivo de los transformantes. La célula huésped utilizada en la presente no está limitada a una célula particular, e incluye varias células huésped que han sido utilizadas convencionalmente en ingeniería genética tales como una célula de *E. coli*, de *Bacillus subtilis*, de levadura, de una planta o de un animal.

El oligonucleótido utilizado en la presente invención es un 5 mero o un 30 mero de longitud y, más específicamente, de 15 mero a 25 mero de longitud.

El oligonucleótido utilizado en la presente invención incluye, por ejemplo, un ADN, un derivado de

ADN, un ARN, un derivado de ARN, etcétera. Más específicamente, un derivado de ADN o un derivado de ARN es uno tal como un oligonucleótido con al menos uno o más enlaces fosforotioato.

5 Más específicamente, el oligonucleótido utilizado en la presente invención puede contener como porción mínima una secuencia de bases que se una complementariamente bajo condiciones fisiológicas a una hebra sentido o antisentido de un gen que codifique una proteína que tenga un efecto fisiológico para alterar la homeostasis de organismos vivos, de un gen específico de virus patógenos, de bacterias patógenas o similares y, más específicamente, contiene una secuencia que se une de manera complementaria al ARN mensajero de un gen específico de un virus patógeno, de una bacteria patógena o similar, o de un gen que codifica una proteína que tiene un efecto fisiológico para alterar la homeostasis de un organismo vivo.

Más específicamente, el oligonucleótido utilizado en la presente invención puede contener una secuencia complementaria a una región que contenga un codón de inicio de un ARN mensajero, o a un sitio de ajuste de un precursor del ARN mensajero. Ejemplos de los oligonucleótidos utilizados en la presente invención incluyen, por ejemplo, los utilizados para el tratamiento o la prevención de un cáncer, tal como un oligonucleótido que tiene la secuencia 5'-CTCGTAGGCGTTGTAGTTGT-3' (SEC ID N°:1) que inhibe específicamente la expresión de hst-1; ISIS3521 que inhibe específicamente la expresión de la proteína quinasa C α para tratar eficazmente cánceres progresivos tales como el carcinoma de pulmón de células no pequeñas y el cáncer de colon y que ha sido aplicado en ensayos para el tratamiento del cáncer de próstata, del cáncer de mama, del cáncer de ovario, del cáncer de páncreas, del cáncer de intestino grueso y del carcinoma

pulmonar de células pequeñas; ISIS5132/CGP69846A que inhibe específicamente la expresión de la quinasa C-raf y que ha sido aplicado en ensayos para el tratamiento del cáncer de próstata, del cáncer de mama, del cáncer de ovario, de cefalofima, del cáncer de páncreas, del cáncer de intestino grueso, del carcinoma pulmonar de células pequeñas; ISIS2503 que inhibe específicamente la expresión de Haras y ha sido aplicado en ensayos para el tratamiento del cáncer de intestino grueso, del cáncer de mama, de cefalofima, del cáncer de páncreas y del cáncer de células pequeñas; GEM231 que inhibe específicamente la expresión de la proteína quinasa A de tipo I; MG98 que inhibe específicamente la expresión de la metiltransferasa de ADN; INXC-6295 que inhibe la expresión de c-myc; INX-3001 que inhibe la expresión de c-myb y que ha sido considerado para ser aplicado para el tratamiento de la leucemia; G-3139 (Genasense) que inhibe la expresión de bcl-2 y que ha sido considerado para ser aplicado en el tratamiento del linfoma no Hodgkin, del cáncer de intestino grueso, del carcinoma de pulmón de células pequeñas, de la leucemia linfática crónica, de la leucemia mieloide aguda, del cáncer de mama, del linfoma, del melanoma, del mieloma, del carcinoma pulmonar de células no pequeñas, del cáncer de próstata; un oligonucleótido que inhibe la expresión de la proteína MDM2; un oligonucleótido que inhibe la expresión de VEGF, etcétera. Además, ejemplos de oligonucleótidos utilizados para el tratamiento o la prevención de enfermedades infecciosas incluyen GEM92 y GPI-2A que inhibe el crecimiento del VIH. ISIS2922, Vitra-vene, ISIS13312 y GEM132 (fomivirsén) que inhibe el crecimiento de citomegalovirus, ISIS14803 que inhibe el crecimiento del virus de la hepatitis C, etcétera. Ejemplos de oligonucleótidos utilizados para el tratamiento de la inflamación incluyen ISIS2302 que inhibe específicamente la expresión de ICAM-1 y que ha sido aplicado en ensayos

para el tratamiento de la enfermedad de Crohn, de la colitis ulcerosa, para inhibir el rechazo del trasplante renal, para el tratamiento de la psoriasis, del asma; EPI-2000 que inhibe la expresión del receptor de adenosina A y que ha sido aplicado en ensayos para el tratamiento del asma; y oligonucleótidos que inhiben la expresión de TNF- α , CD49d (VLA-4), VCAM-1, PECAM-1, etcétera. Además, ejemplos de oligonucleótidos que previenen la restenosis después de una angiogénesis coronaria transluminal percutánea incluyen Resten-NG, que inhibe la expresión de c-myc.

Genes que codifican una proteína que presenta un efecto fisiológico para alterar la homeostasis incluyen, por ejemplo, una serie de genes denominados genes cancerosos y, más específicamente, incluyen genes de factores de crecimiento, de quinasas de tirosina de tipo receptor, de quinasas de tirosina de tipo no receptor, de proteínas de unión a GTP, de quinasas de serina-treonina, de factores de transcripción, etcétera. Más específicamente, se ejemplifican los genes que codifican hst-1 o descarboxilasa de ornitina, etcétera.

Según se utiliza en la presente, el oligonucleótido puede estar contenido de forma general en un material que estimule la transferencia del oligonucleótido a las células o en un material que estimule el transporte del oligonucleótido hacia el núcleo, o puede formar un complejo junto con dichos materiales. Ejemplos del primero incluyen un lípido catiónico, un polímero catiónico, un polímero hidrofóbico, etcétera. Los "lípidos catiónicos" incluyen DOTMA (cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxy)propil]-N-trimetil-amonio), DOSPA (trifluoroacetato de 2,3-dioleiloxy-N-[2-(espermincarboxamido)etil]-N,N-dimetil-1-propanaminio), DDAB (bromuro de dimetildioctacresilamonio), TM-TPS (N,NI,NII,NIII-tetrametil-N,N',N'',N'''-tetrapalmitilespermina), DMRIE (bromuro de

1,2-dimiristiloxipropil-3-dimetilhidroxietilamonio), cloruro de N-(α -trimetil amonio acetil)-didodecil-D-glutamato (Biochemical Biophysical Research Communication, 196, 1042 (1994)), etcétera. Pueden utilizarse liposomas
 5 catiónicos que constan de lípidos catiónicos como los descritos anteriormente y lípidos neutros tales como DOPE (dioleilfosfatidil etanol amina), o una mezcla de lípidos catiónicos y colesterol. Los "polímeros catiónicos" son polímeros que tienen interacción electrostática con oligonucleótidos e incluyen, por ejemplo, lipopoliaminas tales como DOGS (dioctadecilamida glicilespermina) o similares; péptidos tales como AlkCWK18 o similares; poliaminoácidos catiónicos y sus derivados tales como polilisina y sus derivados (Proceedings of Academy Sciences of the
 10 USA, 89, 6094 (1992)), polietilénimina, dendrímero de poliamina y similares; "los polímeros hidrofóbicos" son polímeros que interaccionan hidrofóbicamente con los genes e incluyen, por ejemplo, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, etcétera. Además, pueden emplearse péptidos
 15 tales como AlkCWK18.

Ejemplos de los liposomas catiónicos incluyen, pero no se limitan a, LIPOFECTAMINE (nombre comercial, Life Technologies, Inc., Rockville, MD, EE.UU.) que contiene DOSPA y DOPE (1:1), los que contienen DOTMA y
 25 DOPE (1:1), LIPOFECTACE (nombre comercial, Life Technologies, Inc., Rockville, MD, EE.UU.) que contiene DDAB y DOPE (1:2,5), ELLFECTIN (nombre comercial, Life Technologies, Inc., Rockville, MD, EE.UU.) que contiene TM-TPS y DOPE (1:1,5), etcétera. Además, una mezcla de dicho lípido catiónico y colesterol incluye, por ejemplo, DMRIE-C (Life Technologies, Inc., Rockville, MD, EE.UU.) que contiene DMRIE y colesterol (1:1 por mol).

Los oligonucleótidos pueden estar contenidos en un liposoma fusionado a una membrana, o pueden estar
 35 formando complejos con un liposoma. Tales liposomas fu-

sionados a una membrana incluyen, por ejemplo, liposomas HVJ.

Los materiales que estimulan el transporte de un gen hacia el núcleo incluyen una mezcla de HMG-1 y 2
5 (mezcla de grupos 1, 2 de movilidad elevada: *Experimental Medicine*, 12, 184 (1994)), etcétera.

La proporción de colágeno respecto al oligonucleótido en la preparación para transferir un oligonucleótido de la presente invención es importante en
10 cuanto a que los colágenos consiguen: 1) la protección del oligonucleótido frente a una nucleasa o a otras proteínas, 2) la liberación mantenida del oligonucleótido, 3) la retención local del oligonucleótido para mantener localmente una concentración elevada del oligonucleótido,
15 4) la estimulación de la transferencia del oligonucleótido a las células. La proporción del colágeno respecto al oligonucleótido puede ser expresada como el número de cargas negativas del oligonucleótido en una molécula de colágeno, ya que la longitud de la cadena del oligonucleótido puede ser seleccionada apropiadamente dependiendo del objetivo particular. El número preferido de cargas negativas del oligonucleótido en una molécula de colágeno de la preparación para transferir un oligonucleótido de la presente invención es 10 - 5.000, preferi-
20 blemente 10 - 2.500 y, más preferiblemente, 10 - 1000.

La preparación para transferir un oligonucleótido de la presente invención puede contener adicionalmente un aditivo farmacéuticamente aceptable además del oligonucleótido y el colágeno.

30 Por ejemplo, tales aditivos incluyen sales, aminoácidos y aminas, que son utilizados para ajustar el pH de la preparación de tipo solución o suspensión para transferir un oligonucleótido; o aquellos que controlan la liberación del oligonucleótido a partir de la preparación
35 ción para transferir un oligonucleótido en forma de solu-

ción o suspensión muy viscosa, o en forma de esponja, de película, de cilindro y polvo. Ejemplos de sales, aminoácidos y aminas incluyen tris(hidroximetil)aminometano, citrato de sodio, dihidrógeno citrato de sodio, fosfato 5 trisódico, hidrógeno fosfato de sodio, fosfato monosódico anhidro, dihidrógeno fosfato de sodio anhidro, lisina, arginina, etcétera.

Aditivos que controlan la liberación incluyen, por ejemplo, monosacáridos, disacáridos, trisacáridos u oligosacáridos superiores o alcoholes de azúcar o 10 derivados de los mismos; aminoácidos, ácidos orgánicos con dos o más grupos carboxilo; gelatina, albúmina, fibrina, ácido algínico, agarosa, goma arábica, etcétera.

Los monosacáridos incluyen, por ejemplo, glucosa, galactosa, fructosa, etcétera, y preferiblemente 15 glucosa. Los disacáridos incluyen, por ejemplo, sacarosa, maltosa, lactosa, trehalosa, etcétera.

Los alcoholes de azúcar incluyen, por ejemplo, sorbitol, manitol y, preferiblemente, sorbitol.

20 Los derivados de azúcar incluyen, por ejemplo, desoxi azúcares, amino azúcares, ésteres fosfato y disacáridos que consten de los mismos.

Los aminoácidos incluyen, por ejemplo, aminoácidos farmacéuticamente aceptables y sales de los 25 mismos, e incluyen aminoácidos ácidos tales como ácido glutámico, ácido aspártico; aminoácidos básicos tales como lisina, arginina, histidina; glicina, alanina, metionina, prolina, cistina, serina, treonina, asparragina, glutamina, isoleucina, cisteína, tirosina, triptófano, 30 leucina, etcétera. Los aminoácidos según son utilizados en la presente incluyen además aminoácidos que contengan una cadena lateral básica o neutra. Las sales de aminoácidos incluyen, por ejemplo, una sal de sodio, una sal de potasio.

35 Ácidos orgánicos con dos o más grupos carboxi

y sales de los mismos incluyen preferiblemente, por ejemplo, ácidos orgánicos con dos o tres grupos carboxi y sales de los mismos, y más preferiblemente ácidos orgánicos de la serie de ácidos grasos saturados o insaturados y sales de los mismos. Ácidos orgánicos con dos o tres grupos carboxi y sales de los mismos incluyen, por ejemplo, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido málico, ácido fumárico y sales de los mismos. Por ejemplo, se prefieren el ácido cítrico, el ácido tartárico y sales de los mismos. Alternativamente, puede utilizarse un adenovirus inactivado que tenga la capacidad de liberar el contenido de un endosoma, CHEMS (sal morfolina hemosuccinato de colesterol) o similar, con el fin de inhibir la descomposición del oligonucleótido en el endosoma de las células.

La preparación para transferir un oligonucleótido de la presente invención puede incluir aquéllas que contienen cualquiera de los azúcares, los aminoácidos y los ácidos orgánicos con dos o más grupos carboxilo según se describió anteriormente; y aquéllas que contienen dos o tres de cualquier combinación de los mismos.

El control de la liberación utilizando aditivos puede ser ajustado cambiando el contenido de los aditivos. Por ejemplo, el contenido de los aditivos debe ser disminuido para extender el periodo de liberación, mientras que el contenido de los aditivos debe ser incrementado para acortar el periodo. La cantidad de aditivos puede ser seleccionada desde 0 hasta 19.800% p/p aproximadamente sobre la base del colágeno. El rango preferido es de 0 aproximadamente a 1.890% p/p aproximadamente, más preferiblemente de 0 aproximadamente a 900% p/p aproximadamente y, más preferiblemente de 0 aproximadamente a 300% p/p aproximadamente.

La preparación para transferir un

oligonucleótido de la presente invención puede estar en forma de solución o suspensión, o en forma de una esponja, un cilindro o un polvo formados a partir de la solución o la suspensión. La preparación para transferir un
5 oligonucleótido de la presente invención en forma de solución o suspensión tiene un rango de pH de 4 a 8 y contiene un colágeno en una cantidad del 0,001% al 10% (p/p), preferiblemente del 0,1% al 5% (p/p). La preparación en forma de esponja, pella o polvo contiene un colá-
10 geno en una cantidad del 5 - 99% (p/p), preferiblemente del 10 - 70% (p/p) y, más preferiblemente, del 25 - 50% (p/p).

Las preparaciones de la presente invención pueden ser administradas, por ejemplo, transdérmicamente, subcutáneamente, intradérmicamente, intramuscularmente,
15 intracerebralmente, intersticialmente, intravascularmente. Las mismas pueden ser administradas desde una vez cada tres días hasta una vez en dos meses aproximadamente, preferiblemente desde una vez por semana hasta una
20 vez al mes.

La dosis de la presente preparación puede ser ajustada fácilmente cambiando el volumen del líquido en el caso de las preparaciones en forma de solución o suspensión; cambiando el diámetro y la longitud en caso de
25 preparaciones cilíndricas y cambiando el volumen o el peso en caso de preparaciones en forma de polvo. Además, la dosis puede ser también ajustada cambiando la cantidad de los oligonucleótidos contenidos en las preparaciones.

La dosis óptimas de las preparaciones de la presente invención puede variar dependiendo de la enfermedad, el lugar de aplicación, el método de administración, la forma de dosificación, el sexo, la edad, la condición del paciente, etcétera. La cantidad del oligonu-
30 cleótido contenido en la preparación es de 0,001 mg/kg a 40 mg/kg, preferiblemente de 0,01 mg/kg a 30 mg/kg del
35

sujeto.

Las preparaciones para transferir un oligonucleótido de la presente invención en forma de solución o suspensión pueden ser preparadas, por ejemplo, mediante:

- 5 1) un proceso en el cual una solución del oligonucleótido deseado es añadida a una solución de colágeno, y un aditivo es disuelto en la mezcla según necesidad para obtener una preparación en forma de solución o suspensión homogénea;
- 10 2) un proceso en el cual una solución del oligonucleótido deseado es añadida a una solución de colágeno a la cual se había añadido un aditivo según necesidad, y la combinación es mezclada para obtener una preparación en forma de solución o suspensión homogénea;
- 15 3) un proceso en el cual una solución del oligonucleótido deseado a la cual se había añadido un aditivo según necesidad, es añadida a una solución de colágeno y la combinación es mezclada para obtener una preparación en forma de solución o suspensión homogénea;
- 20 4) un proceso en el cual una solución de colágeno a la cual se había añadido un aditivo según necesidad es desecada, y el producto desecado resultante es disuelto en una solución del oligonucleótido deseado para obtener una preparación en forma de solución o suspensión homogénea;
- 25 5) un proceso en el cual una solución de colágeno es desecada y el producto desecado es disuelto en una solución del oligonucleótido deseado a la cual se había añadido un aditivo según necesidad, para obtener una preparación en forma de solución o suspensión homogénea;
- 30 6) un proceso en el cual una solución del oligonucleótido deseado es desecada y el producto desecado es disuelto en una solución de colágeno a la cual se había añadido un aditivo según necesidad, para obtener una preparación en forma de solución o suspensión homogénea; y
- 35

7) un proceso en el cual una solución del oligonucleótido deseado a la cual se había añadido un aditivo según necesidad es desecada, y el producto desecado resultante es disuelto en una solución de colágeno para obtener una preparación en forma de solución o suspensión homogénea.

En los métodos anteriores, la suspensión o la solución pueden ser obtenidas controlando la concentración de la solución de oligonucleótido o de la solución de colágeno.

Los procesos para preparar la preparación para transferir un oligonucleótido en forma de película incluyen, por ejemplo:

1) un proceso en el cual una solución del oligonucleótido deseado es añadida a una solución de colágeno y un aditivo es disuelto según necesidad en la mezcla para obtener una solución o una suspensión homogénea, la cual es posteriormente desecada lentamente para obtener una preparación en forma de película;

2) un proceso en el cual una solución del oligonucleótido deseado es añadida a una solución de colágeno a la cual se había añadido un aditivo según necesidad, y la combinación es mezclada para obtener una solución o una suspensión homogénea, la cual es posteriormente desecada lentamente para obtener una preparación en forma de película;

3) un proceso en el cual una solución del oligonucleótido deseado a la cual se había añadido un aditivo según necesidad es añadida a una solución de colágeno, y la combinación es mezclada para obtener una solución o una suspensión homogénea, la cual es posteriormente desecada lentamente para obtener una preparación en forma de película;

4) un proceso en el cual una solución de colágeno a la cual se había añadido un aditivo según necesidad es

desezada, y el producto desecado es disuelto en una solución del oligonucleótido deseado para obtener una solución o una suspensión homogénea, la cual es posteriormente desecada lentamente para obtener una preparación en forma de película;

5 5) un proceso en el cual una solución de colágeno es desecada y el producto desecado es disuelto en una solución del oligonucleótido deseado a la cual se había añadido un aditivo según necesidad, para obtener una solución o una suspensión homogénea, la cual es posteriormente desecada lentamente para obtener una preparación en forma de película;

10 6) un proceso en el cual una solución del oligonucleótido deseado es desecada, y el producto desecado es disuelto en una solución de colágeno a la que se había añadido un aditivo según necesidad, para obtener una solución o una suspensión homogénea, la cual es posteriormente desecada lentamente para obtener una preparación en forma de película;

15 7) un proceso en el cual una solución del oligonucleótido deseado a la que se había añadido un aditivo según necesidad es desecada, y el producto desecado es disuelto en una solución de colágeno para obtener una solución o una suspensión homogénea, la cual es posteriormente desecada lentamente para obtener una preparación en forma de película.

Los procesos para preparar una preparación para transferir un oligonucleótido en forma de esponja incluyen, por ejemplo:

30 1) un proceso en el cual una solución del oligonucleótido deseado es añadida a una solución de colágeno, y un aditivo es disuelto según necesidad en la mezcla para obtener una solución o una suspensión homogénea, la cual es posteriormente liofilizada para obtener una preparación en forma de esponja;

2) un proceso en el cual una solución del oligonucleótido deseado es añadida a una solución de colágeno a la que se había añadido un aditivo según necesidad, y la combinación es mezclada para obtener una solución o una
5 suspensión homogénea, la cual es posteriormente liofilizada para obtener una preparación en forma de esponja;

3) un proceso en el cual una solución del oligonucleótido deseado a la cual se había añadido un aditivo según necesidad es añadida a una solución de colágeno, y
10 la combinación es mezclada para obtener una solución o una suspensión homogénea, la cual es posteriormente liofilizada para obtener una preparación en forma de esponja;

4) un proceso en el cual una solución de colágeno a la que se había añadido un aditivo según necesidad es desecada, y el producto desecado es disuelto en una solución del oligonucleótido deseado, para obtener una solución o una suspensión homogénea, la cual es posteriormente liofilizada para obtener una preparación en forma
20 de esponja;

5) un proceso en el cual una solución de colágeno es desecada, y el producto desecado es disuelto en una solución del oligonucleótido deseado a la cual se había añadido un aditivo según necesidad, para obtener una solución o una suspensión homogénea, la cual es posteriormente liofilizada para obtener una preparación en forma
25 de esponja.

Los procesos para preparar una preparación para transferir un oligonucleótido en forma de polvo incluyen, por ejemplo:

1) un proceso en el cual una solución del oligonucleótido deseado es añadida a una solución de colágeno, y un aditivo es disuelto según necesidad en la mezcla para obtener una solución homogénea, la cual es posteriormente desecada por aspersion para obtener una preparación
35

en forma de polvo;

2) un proceso en el cual una solución del oligonucleótido deseado es añadida a una solución de colágeno a la cual se había añadido un aditivo según necesidad, y la
5 combinación es mezclada para obtener una solución homogénea, la cual es posteriormente desecada por aspersión para obtener una preparación en forma de polvo;

3) un proceso en el cual una solución del oligonucleótido deseado a la cual se había añadido un aditivo
10 según necesidad es añadida a una solución de colágeno, y la combinación es mezclada para obtener una solución homogénea, la cual es posteriormente desecada por aspersión para obtener una preparación en forma de polvo;

4) un proceso en el cual una solución de colágeno a
15 la cual se había añadido un aditivo según necesidad es desecada, y el producto desecado es disuelto en una solución del oligonucleótido deseado para obtener una solución homogénea, la cual es posteriormente desecada por aspersión para obtener una preparación en forma de polvo;

20 5) un proceso en el cual una solución de colágeno es desecada, el producto desecado es disuelto en una solución del oligonucleótido deseado a la cual se había añadido un aditivo según necesidad para obtener una solución homogénea, la cual es posteriormente desecada por aspersión
25 para obtener una preparación en forma de polvo;

6) un proceso en el cual una solución del oligonucleótido deseado es añadida a una solución de colágeno, y un aditivo es disuelto según necesidad en la mezcla para obtener una solución o una suspensión homogénea, la cual
30 es posteriormente liofilizada y la esponja resultante es triturada para obtener una preparación en forma de polvo;

7) un proceso en el cual una solución del oligonucleótido deseado es añadida a una solución de colágeno a la cual se había añadido un aditivo según necesidad, y la
35 combinación es mezclada para obtener una solución o una

suspensión homogénea, la cual es posteriormente liofilizada y la esponja resultante es triturada para obtener una preparación en forma de polvo;

5 8) un proceso en el cual una solución del oligonucleótido deseado a la cual se había añadido un aditivo según necesidad es añadida a una solución de colágeno, y la combinación es mezclada para obtener una solución o una suspensión homogénea, la cual es posteriormente liofilizada y la esponja resultante es triturada para obtener una preparación en forma de polvo;

9) un proceso en el cual una solución de colágeno a la cual se había añadido un aditivo según necesidad es desecada, y el producto desecado es disuelto en una solución del oligonucleótido deseado para obtener una solución o una suspensión homogénea, la cual es posteriormente liofilizada, y la esponja resultante es triturada para obtener una preparación en forma de polvo;

10) un proceso en el cual una solución de colágeno es desecada, y el producto desecado es disuelto en una solución del oligonucleótido deseado a la cual se había añadido un aditivo según necesidad, para obtener una solución o una suspensión homogénea, la cual es posteriormente liofilizada, y la esponja resultante es triturada para obtener una preparación en forma de polvo;

11) un proceso en el cual una solución del oligonucleótido deseado es añadida a una solución de colágeno, en la cual se añade un aditivo según necesidad, la suspensión resultante es filtrada y el precipitado resultante es utilizado directamente o triturado para obtener una preparación en forma de polvo;

12) un proceso en el cual una solución del oligonucleótido deseado es añadida a una solución de colágeno a la cual se había añadido un aditivo según necesidad, la suspensión resultante es filtrada y el precipitado resultante es utilizado directamente o triturado para obtener

una preparación en forma de polvo;

13) un proceso en el cual una solución del oligonucleótido deseado a la cual se había añadido un aditivo según necesidad es añadida a una solución de colágeno, la suspensión resultante es filtrada y el precipitado resultante es utilizado directamente o triturado para obtener una preparación en forma de polvo;

14) un proceso en el cual una solución de colágeno a la cual se había añadido un aditivo según necesidad es desecada, el producto desecado resultante es disuelto en una solución del oligonucleótido deseado, la suspensión resultante es filtrada y el precipitado resultante es utilizado directamente o triturado para obtener una preparación en forma de polvo;

15) un proceso en el cual una solución de colágeno es desecada, el producto desecado es disuelto en una solución del oligonucleótido deseado a la cual se había añadido un aditivo según necesidad, la suspensión resultante es filtrada y el precipitado resultante es utilizado directamente o triturado para obtener una preparación en forma de polvo;

16) un proceso en el cual una solución del oligonucleótido deseado es desecada, el producto desecado es disuelto en una solución de colágeno a la cual se había añadido un aditivo según necesidad, la suspensión resultante es filtrada y el precipitado resultante es utilizado directamente o triturado para obtener una preparación en forma de polvo;

17) un proceso en el cual una solución del oligonucleótido deseado a la cual se había añadido un aditivo según necesidad es desecada, el producto desecado es disuelto en una solución de colágeno, la suspensión resultante es filtrada y el precipitado resultante es utilizado directamente o triturado para obtener una preparación en forma de polvo.

Los procesos para preparar una preparación para transferir un oligonucleótido en forma cilíndrica incluyen, por ejemplo:

1) un proceso en el cual una solución del oligonucleótido deseado es añadida a una solución de colágeno, en la cual se disuelve un aditivo según necesidad, la solución homogénea resultante es desecada por aspersión y el polvo resultante es comprimido en forma de cilindros;

2) un proceso en el cual una solución del oligonucleótido deseado es añadida a una solución de colágeno a la cual se había añadido un aditivo según necesidad, la solución homogénea resultante es desecada por aspersión y el polvo resultante es comprimido en forma de cilindros;

3) un proceso en el cual una solución del oligonucleótido deseado a la cual se había añadido un aditivo según necesidad, es añadida a una solución de colágeno, la solución homogénea resultante es desecada por aspersión y el polvo resultante es comprimido en forma de cilindros;

4) un proceso en el cual una solución de colágeno a la cual se había añadido un aditivo según necesidad es desecada, el producto desecado es disuelto en una solución del oligonucleótido deseado, la solución homogénea resultante es desecada por aspersión y el polvo resultante es comprimido en forma de cilindros;

5) un proceso en el cual una solución de colágeno es desecada, el producto desecado es disuelto en una solución del oligonucleótido deseado a la cual se había añadido un aditivo según necesidad, la solución homogénea resultante es desecada por aspersión y el polvo resultante es comprimido en forma de cilindros;

6) un proceso en el cual una solución del oligonucleótido deseado es añadida a una solución de colágeno, en la cual se disuelve un aditivo según necesidad, la solución o suspensión homogénea resultante es liofilizada,

la esponja resultante es triturada para dar un polvo que es comprimido en forma de cilindros;

7) un proceso en el cual una solución del oligonucleótido deseado es añadida a una solución de colágeno a la cual se había añadido un aditivo según necesidad, la solución o suspensión homogénea resultante es liofilizada y la esponja resultante es triturada para dar un polvo que es comprimido en forma de cilindros;

8) un proceso en el cual una solución del oligonucleótido deseado a la cual se había añadido un aditivo según necesidad es añadida a una solución de colágeno, la solución o suspensión homogénea resultante es liofilizada y la esponja resultante es triturada para dar un polvo que es comprimido en forma de cilindros;

9) un proceso en el cual una solución de colágeno a la cual se había añadido un aditivo según necesidad es desecada, el producto desecado es disuelto en una solución del oligonucleótido deseado, la solución o suspensión homogénea resultante es liofilizada y la esponja así obtenida es triturada para dar un polvo, que es comprimido en forma de cilindros;

10) un proceso en el cual una solución de colágeno es desecada, el producto desecado es disuelto en una solución del oligonucleótido deseado a la cual se había añadido un aditivo según necesidad, la solución o suspensión homogénea resultante es liofilizada y la esponja así obtenida es triturada para dar un polvo, el cual es comprimido en forma de cilindros;

11) un proceso en el cual una solución del oligonucleótido deseado es añadida a una solución de colágeno, en la cual se disuelve un aditivo según necesidad, la suspensión resultante es filtrada y el precipitado así obtenido es, directamente o después de ser triturado para dar un polvo, comprimido en forma de cilindros;

12) un proceso en el cual una solución del oligonu-

cleótido deseado es añadida a una solución de colágeno a la cual se había añadido un aditivo según necesidad, la suspensión resultante es filtrada y el precipitado así obtenido es, directamente o después de ser triturado para dar un polvo, comprimido en forma de cilindros;

13) un proceso en el cual una solución del oligonucleótido deseado a la cual se había añadido un aditivo según necesidad es añadida a una solución de colágeno, la suspensión resultante es filtrada y el precipitado así obtenido es, directamente o después de ser triturado para dar un polvo, comprimido en forma de cilindros;

14) un proceso en el cual una solución de colágeno a la que se había añadido un aditivo según necesidad es desecada, el producto desecado resultante es disuelto en una solución del oligonucleótido deseado, la suspensión resultante es filtrada y el precipitado así obtenido es, directamente o después de haber sido triturado para dar un polvo, comprimido en forma de cilindros;

15) un proceso en el cual una solución de colágeno es desecada, el producto desecado es disuelto en una solución del oligonucleótido deseado a la cual se había añadido un aditivo según necesidad, la suspensión resultante es filtrada y el precipitado así obtenido es, directamente o después de haber sido triturado para obtener polvo, comprimido en forma de cilindros;

16) un proceso en el cual una solución del oligonucleótido deseado es desecada, el producto desecado es disuelto en una solución de colágeno a la cual se había añadido un aditivo según necesidad, la suspensión resultante es filtrada y el precipitado así obtenido es, directamente o después de haber sido triturado para dar un polvo, comprimido en forma de cilindros;

17) un proceso en el cual una solución del oligonucleótido deseado a la cual se había añadido un aditivo según necesidad es desecada, el producto desecado es di-

suelto es una solución de colágeno, la suspensión resultante es filtrada y el precipitado así obtenido es, directamente o después de haber sido triturado para dar un polvo, comprimido en forma de cilindros;

5 18) un proceso en el cual una solución del oligonucleótido deseado es añadida a una solución de colágeno, en la cual se disuelve un aditivo según necesidad, la solución o suspensión homogénea resultante es liofilizada para dar una esponja, la cual es comprimida en forma de
10 cilindros;

19) un proceso en el cual una solución del oligonucleótido deseado es añadida a una solución de colágeno a la cual se había añadido un aditivo según necesidad, la solución o la suspensión homogénea resultante es liofilizada para dar una esponja, la cual es comprimida en forma
15 de cilindros;

20) un proceso en el cual una solución del oligonucleótido deseado a la cual se había añadido un aditivo según necesidad es añadida a una solución de colágeno, la solución o la suspensión homogénea resultante es liofilizada para dar una esponja, la cual es comprimida en forma
20 de cilindros;

21) un proceso en el cual una solución de colágeno a la cual se había añadido un aditivo según necesidad es desecada, el producto desecado es disuelto en una solución del oligonucleótido deseado, la solución o la suspensión homogénea resultante es liofilizada para dar una esponja, la cual es comprimida en forma de cilindros;

22) un proceso en el cual una solución de colágeno es desecada, el producto desecado es disuelto en una solución del oligonucleótido deseado a la cual se habían añadido aditivos, la solución o la suspensión homogénea resultante es liofilizada para dar una esponja, la cual es comprimida en forma de cilindros;

35 23) un proceso en el cual una solución del oligonu-

cleótido deseado es añadida a una solución de colágeno, en la cual se disuelve un aditivo según necesidad, la solución o la suspensión homogénea resultante es liofilizada para dar lugar a una esponja, la cual es, después de
5 la adición de agua o similar, amasada, extruída en forma de cilindro a través de una boquilla y desecada;

24) un proceso en el cual una solución del oligonucleótido deseado es añadida a una solución de colágeno a la cual se había añadido un aditivo según necesidad, la
10 solución o la suspensión homogénea resultante es liofilizada para dar lugar a una esponja, la cual es, después de la adición de agua o similar, amasada, extruída en forma de cilindro a través de una boquilla y desecada;

25) un proceso en el cual una solución del oligonucleótido deseado a la cual se había añadido un aditivo según necesidad es añadida a una solución de colágeno, la
15 solución o la suspensión homogénea resultante es liofilizada para dar lugar a una esponja, la cual es, después de la adición de agua o similar, amasada, extruída en forma de cilindro a través de una boquilla y desecada;

26) un proceso en el cual la solución de colágeno a la cual se había añadido un aditivo según necesidad es desecada, el producto desecado es disuelto en una solución del oligonucleótido deseado, la solución o suspensión homogénea resultante es liofilizada para dar lugar a
25 una esponja, la cual es, después de la adición de agua o similar, amasada, extruída en forma de cilindro a través de una boquilla y desecada;

27) un proceso en el cual una solución de colágeno es desecada, el producto desecado es disuelto en una solución del oligonucleótido deseado a la cual se había añadido un aditivo según necesidad, la solución o suspensión homogénea resultante es liofilizada para dar lugar a una esponja, la cual es, después de la adición de agua o si-
30 milar, amasada, extruída en forma de cilindro a través de
35

una boquilla y desecada;

28) un proceso en el cual una solución del oligonucleótido deseado es añadida a una solución de colágeno, en la cual se disuelve un aditivo según necesidad, la solución o suspensión homogénea resultante es desecada por
5 aspersion para dar lugar a un polvo, el cual es, después de la adición de agua o similar, amasado, extruído en forma de cilindro a través de una boquilla y desecado;

29) un proceso en el cual una solución del oligonucleótido deseado es añadida a una solución de colágeno a
10 la cual se había añadido un aditivo según necesidad, la solución homogénea resultante es desecada por aspersion para dar lugar a un polvo, el cual es, después de la adición de agua o similar, amasado, extruído en forma de cilindro a través de una boquilla y desecado;
15

30) un proceso en el cual una solución del oligonucleótido deseado a la cual se había añadido un aditivo según necesidad es añadida a una solución de colágeno, la solución homogénea resultante es desecada por aspersion
20 para dar lugar a un polvo, el cual es, después de la adición de agua o similar, amasado, extruído en forma de cilindro a través de una boquilla y desecado;

31) un proceso en el cual una solución de colágeno a la cual se había añadido un aditivo según necesidad es
25 desecada, se añade una solución del oligonucleótido deseado al producto desecado, posteriormente se amasa, se extruye en forma de cilindro a través de una boquilla y se deseca;

32) un proceso en el cual una solución de colágeno es
30 desecada, el producto desecado es añadido a una solución del oligonucleótido deseado a la cual se había añadido un aditivo según necesidad, posteriormente se amasa, se extruye en forma de cilindro a través de una boquilla y se deseca.

Ejemplos

La presente invención está ilustrada adicionalmente por los siguientes Ejemplos y Experimentos, pero no está limitada de ninguna forma por estos
5 Ejemplos y Experimentos.

Ejemplo 1

La preparación en forma de solución para transferir un oligonucleótido que contiene atelocolágeno a la concentración final del 0,5%, fue preparada mezclando el oligonucleótido antisentido fosforotioato (5'-CTCGTAGGCGTTGTAGTTGT-3' (SEC ID N°: 1); peso molecular, 6.500 aproximadamente)) (producido por Sawaday) que tiene una secuencia complementaria a una secuencia desde el pb 4196 al pb 4216 del gen del factor de crecimiento de fibroblastos HST-1 (FGF4) (descrita en Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 2890-2984 (1987)) con una solución neutra de atelocolágeno (implante de atelocolágeno fabricado por KOKEN CO., LTD.; solución de atelocolágeno al 2%) para que la concentración final fuera de 10 μ moles/l).

20 Ejemplo 2

La preparación en forma de solución para transferir un oligonucleótido fue preparada mezclando el oligonucleótido antisentido de tipo fosforotioato (AS-ODC, 5'-TCATGATTTCTTGATGTTCC-3' (SEC ID N°: 2) producido por ESPEC OLIGO SERVICE CORP.) que tiene una secuencia complementaria a una secuencia desde el pb 319 al pb 338 del gen de la descarboxilasa de ornitina con una solución neutra de atelocolágeno (implante de atelocolágeno fabricado por KOKEN CO., LTD.; solución de atelocolágeno al 3,5% p/p; concentración final, 1,75% p/p) para llevar la concentración final del oligonucleótido a 0,5, 1,5, 2, 2,5 mmoles/l.

Ejemplo 3

La preparación para transferir un
35 oligonucleótido que contiene un liposoma fue preparada

mezclando AS-ODC con 0,5 μ l de una solución neutra de atelocolágeno (implante de atelocolágeno fabricado por KOKEN CO., LTD.; solución de atelocolágeno al 3,5% p/p; concentración final, 1,75% en peso) y 1,5 μ l de Transfast (Promega) para llevar la concentración final de oligonucleótido a 1,0 mmoles/l.

Ejemplo 4

La preparación en forma de solución para transferir un oligonucleótido según se preparó en el Ejemplo 1 (3 ml) fue vertida en una placa de poliestireno (35 mm de diámetro) y la placa fue colocada en un desecador que contenía gel de sílice a 5°C para ser desecada lentamente mientras se estabilizaba, para dar lugar a una preparación en forma de película para transferir un oligonucleótido que contenía 32,5 μ g de oligonucleótido por 1 mg de colágeno.

Ejemplo 5

La preparación en forma de solución para transferir un oligonucleótido según se preparó en el Ejemplo 1 (3 ml) fue vertida en una placa de poliestireno (35 mm de diámetro) y la placa fue congelada a -40°C, posteriormente desecada durante una noche bajo presión reducida a temperatura ambiente, para dar lugar a una preparación en forma de esponja para transferir un oligonucleótido que contenía 32,5 μ g del oligonucleótido por 1 mg de colágeno.

Ejemplo 6

Después de añadir agua (52,5 g) y una solución de glucosa de 10 mg/ml (10 ml) a una solución de atelocolágeno al 2% p/p (17,5 g), se añadió a la mezcla una solución de 5 mg/ml (10 ml) del oligonucleótido antisentido de tipo fosforotioato (5'-CTCGTAGGCGTTGTAGTTGT-3' (SEC ID N°: 1); peso molecular: 6.500 aproximadamente), y se mezcló la combinación. La solución resultante fue congelada a -40°C y posteriormente desecada durante una no-

che bajo presión reducida a temperatura ambiente. Se añadió la cantidad adecuada de agua destilada al producto liofilizado así obtenido y se amasó la mezcla. Posteriormente, el producto amasado fue extruido a través de una boquilla para formar varillas y desecado para dar lugar a preparaciones en forma de varilla. Esto dio lugar a preparaciones génicas en forma de varilla que contenían 1 mg del oligonucleótido por 10 mg de la preparación.

Ejemplo 7

10 Cincuenta microlitros de solución salina fisiológica que contenía 10 mg/ml del oligonucleótido antisentido de tipo fosforotioato (AS-ODC, 5'-TCATGATTTCTTGATGTTCC-3' (SEC ID N°: 2) (producido por ESPEC OLIGO SERVICE CORP.) que tiene una secuencia complementaria a una secuencia desde el pb 319 al pb 338 del gen de la descarboxilasa de ornitina, fueron mezclados con 50 µl de una solución de atelocolágeno (3,5%) a temperatura ambiente, para dar lugar a una preparación en forma de solución para transferir un oligonucleótido que
15 contenía 5 g/µl de AS-ODC y 1,75% de atelocolágeno.

Ejemplo de Referencia 1

Se preparó una solución del oligonucleótido antisentido de tipo fosforotioato de la misma manera que en el Ejemplo 1, excepto en que la solución neutra de atelocolágeno fue sustituida por agua destilada.

Ejemplo de Referencia 2

Se obtuvo una preparación en forma de solución de la misma manera que en el Ejemplo 1, excepto en que el oligonucleótido antisentido de tipo fosforotioato que tenía una secuencia complementaria a una secuencia desde la b 4196 a la b 4216 del gen del factor de crecimiento de fibroblastos HST-1 (FGF4) (descrita en Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 2890-2894 (1987)) fue sustituido por el oligonucleótido sentido de tipo fosforotioato (5'-ACAACTACAACGCCTACGAG-3') (SEC ID N°: 3) que
35

tenía la misma secuencia.

Ejemplo de Referencia 3

El oligonucleótido antisentido de tipo fosforotioato (5'-CTCGTAGGCGTTGTAGTTGT-3' (SEC ID N°: 1);
5 peso molecular: 6.500 aproximadamente) que tiene una secuencia complementaria a una secuencia desde la b 4196 a la b 4216 del gen del factor de crecimiento de fibroblastos HST-1 (FGF4) (descrita en Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 2890-2984 (1987)) fue disuelto en un tampón fosfato
10 (500 µl) para llevar la concentración a 20 µmoles/l. La solución fue mezclada con un tampón fosfato (500 µl) que contenía lipofectamina (GIBCO BRL) (25 µl) disuelta en el mismo, y posteriormente la mezcla se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 20 minutos con el fin de ob-
15 tener una preparación oligonucleótido-liposomas (concentración final del oligonucleótido 10 µmoles/l).

Ejemplo de Referencia 4

De acuerdo con los procedimientos descritos en el Ejemplo 2, excepto en que se añadió tampón fosfato
20 en lugar de AS-ODC, se preparó una solución de atelocolágeno que contenía un 1,75% p/p de atelocolágeno.

Ejemplo de Referencia 5

De acuerdo con los procedimientos descritos en el Ejemplo 2, excepto en que la solución neutra de
25 atelocolágeno fue sustituida por tampón fosfato, se preparó una solución del oligonucleótido antisentido de tipo fosforotioato que contenía AS-ODC a la concentración de 1,0 mmol/l.

Ejemplo de Referencia 6

De acuerdo con los procedimientos descritos en el Ejemplo 2, excepto en que el oligonucleótido desorganizado ("scramble") de tipo fosforotioato (5'-
30 AGTACTAAAGAACTACAAGG-3') (SEC ID N°: 4) (ESPEC OLIGO SERVICE CORP.) que contenía una secuencia heteróloga, estaba
35 contenido a la concentración de 1,0 mmol/l, en lugar de

AS-ODC, se obtuvo una composición de oligonucleótido desorganizado ("scramble") de tipo fosforotioato en forma de solución.

Ejemplo de Referencia 7

5 La preparación de liposomas fue obtenida mezclando un tampón fosfato y un tampón fosfato que contenía disuelto en el mismo Transfast (Promega) (15 μ l) para llevar la concentración final de AS-ODC a 1,0 mmol/l.

Experimento 1

10 La preparación para transferir un oligonucleótido según se preparó en el Ejemplo 1 (2 μ l) fue mezclada con una solución de PBS (-) (100 μ l) que contenía un 20% de suero bovino fetal, y la mezcla se colocó a 37°C. Después de mezclar, se tomaron alícuotas de
15 la solución mezclada después de 30, 60, 180 minutos y se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 3% con el fin de evaluar la estructura primaria del oligonucleótido antisentido de tipo fosforotioato en la preparación. Los resultados están mostrados en la Figura 1. Para el
20 oligonucleótido antisentido de tipo fosforotioato de la preparación de tipo oligonucleótido preparada en el Ejemplo 1, se observó una banda en la posición de migración del oligonucleótido antisentido de tipo fosforotioato no tratado incluso 180 minutos después de haber sido mez-
25 clado con la solución de PBS (-) que contenía un 20% de suero bovino fetal. Por otra parte, la preparación del Ejemplo de Referencia 1 no presentaba ninguna banda después de 30 minutos. Los resultados mostraban que el oligonucleótido de tipo fosforotioato de la preparación de
30 la presente invención estaba protegido de la degradación por un enzima.

Experimento 2

 Células de carcinoma embrionario testicular humano (NEC-8) (10×10^5) productoras de HST-1, fueron
35 trasplantadas en los testículos de ratones desnudos macho

de 10 semanas de edad. Diez días después del trasplante, se administró la preparación según se preparó en el Ejemplo 1 a la dosis de 50 μ l por testículo. Diez, veinte y treinta días después de la administración, los ratones desnudos fueron sacrificados y se pesaron las células tumorales de los testículos. Los resultados están mostrados en la Figura 2. El crecimiento de las células de carcinoma embrionario testicular en los testículos de los ratones desnudos fue inhibido muy potentemente por la preparación del Ejemplo 1, en comparación con la composición en forma de gel del Ejemplo de Referencia 2 y con la composición de liposomas del Ejemplo de Referencia 3 (administrada cada una de ellas a 50 μ l/testículo). En particular, la composición de liposomas del Ejemplo de Referencia 3 mostró un efecto inhibidor similar al de la preparación para transferir un oligonucleótido del Ejemplo 1 hasta 20 días, pero no mostró ningún efecto inhibidor del crecimiento después de 30 días. Este resultado muestra que la preparación de la presente invención se mantiene en los testículos de los ratones desnudos después de la administración, protege al oligonucleótido de tipo fosforotioato que inhibe la producción de HST-1 en los ratones desnudos de la degradación enzimática y, además, tiene actividad para inhibir eficazmente el crecimiento de las células tumorales durante un largo periodo liberando localmente y gradualmente este oligonucleótido de tipo fosforotioato.

Experimento 3

A 5×10^5 células de cáncer de estómago humano (células MKN 45) (Japan Health Sciences Foundation) cultivadas en DMEM (500 μ l) que contenía un 10% de suero bovino fetal, se añadieron 5 μ l de la preparación en forma de solución para transferir un oligonucleótido según se preparó en el Ejemplo 2 (conteniendo 1,0 mmol/l de AS-ODC) (concentración final, 10 μ moles/l) y se culti-

varon a 37°C. Veinticuatro horas después de la adición, el medio que contenía la preparación para transferir un oligonucleótido fue sustituido por medio fresco y se llevó a cabo el cultivo durante 6 días a la vez que se
5 sustituía el medio cada 24 horas. Después de la adición, se midió el número de células cada 2 días utilizando bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-2H-tetrazolio (ensayo MTT). De manera similar, la solución de atelocolágeno según se preparó en el Ejemplo de Referen-
10 cia 4, la solución del oligonucleótido antisentido de tipo fosforotioato según se preparó en el Ejemplo de Referencia 5 y la composición de oligonucleótido desorganizado ("scramble") de tipo fosforotioato para transferir un oligonucleótido en forma de solución según se preparó
15 en el Ejemplo de Referencia 6, fueron añadidas a células MKN 45 y se midió el número de células. Los resultados están mostrados en la Figura 3. Cuando se administró la preparación en forma de solución del Ejemplo 2, el crecimiento de las células MKN 45 fue inhibido significativa-
20 mente en comparación con el control al cual no se había añadido nada. Además, el número de células MKN 45 disminuyó después de 6 días, en comparación con el número presente en el momento de la adición. Por otra parte, cuando se añadieron las preparaciones del Ejemplo de Referencia
25 4 (solución de atelocolágeno), del Ejemplo de Referencia 5 (que contenía AS-ODC solo) y del Ejemplo de Referencia 6 (que contenía el oligonucleótido desorganizado ("scramble") de tipo fosforotioato y atelocolágeno), el crecimiento de las células MKN 45 fue inhibido en comparación
30 con el control, pero el efecto fue menor que el del Ejemplo 2. Estos resultados muestran que el efecto inhibidor del crecimiento del oligonucleótido antisentido de tipo fosforotioato sobre las células tumorales, puede ser incrementado mezclando dicha preparación con atelocolágeno
35 para preparar la preparación de la presente invención, y

que el mecanismo de la inhibición del crecimiento de las células tumorales por la preparación de la presente invención deriva no sólo de la coexistencia de atelocolágeno o del oligonucleótido de tipo fosforotioato con las células diana, sino de la inhibición del crecimiento de la célula diana y de la citotoxicidad producida en la célula diana por el oligonucleótido antisentido de tipo fosforotioato.

Experimento 4

Las preparaciones en forma de solución para transferir un oligonucleótido según se prepararon en el Ejemplo 2 (conteniendo 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5 mmoles/l de AS-ODC) fueron añadidas a 5×10^5 células de rabdomiosarcoma humano (células RD) (Japan Health Sciences Foundation) que habían sido cultivadas en 500 μ l de DMEM que contenía un 10% de suero bovino fetal (concentración final, 5, 10, 15, 20, 25 μ moles/l) y las células se cultivaron a 37°C. Veinticuatro horas después de la adición, los medios que contenían las preparaciones fueron sustituidos por medio fresco y el cultivo se llevó a cabo durante 5 días a la vez que se sustituían los medios cada 24 horas. Uno y 35 días después de la adición, se midieron las tasas de supervivencia de las células utilizando tinción con Azul Trypan. Los resultados están mostrados en la Figura 4. Todas las preparaciones medidas mostraron una disminución de la proporción de supervivencia de las células RD. Incluso a la concentración más baja, esto es, 5 μ moles/l, la preparación mostraba efecto citotóxico.

Experimento 5

La preparación conteniendo liposomas para transferir un oligonucleótido según se preparó en el Ejemplo 3 (5 μ l) fue añadida a 5×10^5 células de rabdomiosarcoma humano (células RD) que habían sido cultivadas en 500 μ l de DMEM que contenía un 10% de suero bovino fetal, y las células fueron cultivadas a 37°C. Veinticuatro

horas después de la adición, el medio que contenía la preparación fue sustituido por medio fresco, posteriormente el cultivo se llevó a cabo durante 8 días a la vez que se sustituía el medio cada 24 horas. Se midió la tasa de supervivencia de las células 2, 4, 6 y 8 días después de la adición utilizando tinción con Azul Trypan. Se midió también la actividad descarboxilasa de ornitina en las células RD 2, 4 y 6 días después de la adición. De manera similar, se añadió la preparación de liposomas del Ejemplo de Referencia 7, y posteriormente se investigó la supervivencia de las células RD y la actividad descarboxilasa de ornitina en las células. Los resultados están mostrados en las Figuras 5 y 6. La preparación que contenía liposomas para transferir un oligonucleótido del Ejemplo 3 y la preparación de liposomas del Ejemplo de Referencia 7 disminuían ambas la supervivencia de las células RD, aunque la preparación para transferir un oligonucleótido presentaba la citotoxicidad más potente. De manera similar, la preparación que contenía liposomas para transferir un oligonucleótido y la preparación de liposomas disminuían ambas la actividad descarboxilasa de ornitina en las células RD, siendo el grado de disminución producido por la preparación para transferir un oligonucleótido mayor que el mostrado por la preparación de liposomas. Esto es debido a que la preparación para transferir un oligonucleótido conteniendo liposomas del Ejemplo 3 inhibía más potentemente la expresión del gen diana, el gen de la descarboxilasa de ornitina, en comparación con la preparación de liposomas del Ejemplo de Referencia 7, y disminuía el número de células RD. Estos resultados muestran que la preparación para transferir un oligonucleótido de la presente invención, incluso cuando contiene liposomas, incrementa la citotoxicidad producida por el oligonucleótido de tipo fosforotioato y es superior en tal incremento a las preparaciones de liposomas

convencionales.

Experimento 6

Se trasplantaron subcutáneamente 5×10^7 células RD, que sobreexpresan descarboxilasa de ornitina, en el lomo de ratones desnudos macho de 4 semanas de edad. Siete días después del trasplante, la preparación para transferir un oligonucleótido según se preparó en el Ejemplo 7 fue administrada en el lugar del trasplante, en el músculo del lomo opuesto al lugar del trasplante y en la cavidad peritoneal. De manera similar, la solución de atelocolágeno del Ejemplo de Referencia 4, la preparación de liposomas del Ejemplo de Referencia 7 y tampón fosfafo (Control) fueron administrados respectivamente en el lugar en el cual las células RD habían sido trasplantadas. Después de la administración, se sacrificaron los ratones desnudos cada 7 días y se pesaron las células RD. Los resultados están mostrados en las Figuras 7, 8 y 9. La Figura 7 muestra la comparación entre las preparaciones del Ejemplo 7 y del Ejemplo de Referencia 4 administradas en el lugar en el cual habían sido trasplantadas las células RD. La Figura 8 muestra la comparación entre las preparaciones del Ejemplo 7 y del Ejemplo de Referencia 7 administradas en el lugar en el cual habían sido trasplantadas las células RD. La Figura 9 muestra el resultado de la administración de la preparación del Ejemplo 7 en el lugar en el cual habían sido trasplantadas las células RD (inyección local), intramuscularmente (inyección intramuscular) e intraperitonealmente (inyección intraperitoneal). El crecimiento de las células RD en el músculo del lomo de los ratones desnudos fue inhibido muy potentemente por la preparación para transferir un oligonucleótido según se preparó en el Ejemplo 7 en todos los ratones desnudos cuando fue administrada en el lugar del trasplante de las células RD, intramuscularmente en el lado opuesto del trasplante e intraperitonealmente (Fig.

9), en comparación con la solución de atelocolágeno del Ejemplo de referencia 4 (Fig. 7), con la preparación de liposomas del Ejemplo de Referencia 7 (Fig. 8) y con el tampón fosfato. En particular, la preparación de liposomas del Ejemplo de Referencia 7, mostraba una inhibición correspondiente a la de la preparación para transferir un oligonucleótido del Ejemplo 7 hasta 7 días, pero no mostraba inhibición del crecimiento después de 14 días. Estos hechos muestran que la preparación para transferir un oligonucleótido de la presente invención inhibe el crecimiento de las células RD más potentemente en comparación con la preparación de liposomas, que tal inhibición del crecimiento de las células RD puede durar largo tiempo y que tal inhibición del crecimiento puede no verse afectada por el lugar de administración. Este resultado sugiere que la preparación de oligonucleótidos de la presente invención tiene un efecto inhibidor eficaz sobre el crecimiento de células tumorales, el cual dura mucho tiempo. Las Figuras 10 y 11 muestran la curva de supervivencia acumulativa de ratones desnudos a los que se habían trasplantado células RD por la protección del oligonucleótido antisentido de tipo fosforotioato de la degradación por un enzima en los ratones desnudos después de la administración, y por la liberación gradual del oligonucleótido de tipo fosforotioato. La Figura 10 muestra la comparación entre las preparaciones del Ejemplo 7 y del Ejemplo de Referencia 4 cuando son administradas en el lugar del trasplante de las células RD. La Figura 11 muestra la comparación entre las preparaciones del Ejemplo 7 y del Ejemplo de Referencia 7 cuando son administradas en el lugar del trasplante de RD. Cuando la preparación para transferir un oligonucleótido del Ejemplo 7 fue administrada en el lugar del trasplante de RD, el periodo viable medio de los ratones fue de 52,6 días, que fue prolongado enormemente en comparación con los ratones

desnudos a los que se administró el tampón fosfato (media de 20,5 días), la solución de atelocolágeno del Ejemplo de Referencia 4 (media de 40,3 días) (Fig. 10) y la preparación de liposomas del Ejemplo de Referencia 7 (media de 37,8 días) (Fig. 11). Este resultado muestra que la inhibición del crecimiento de las células RD que puede ser obtenida mediante la administración de la presente preparación para transferir un oligonucleótido, incrementará la supervivencia de los ratones desnudos que habían sido trasplantados con células RD. Además, la actividad descarboxilasa de ornitina en las células RD después de la administración de la preparación para transferir un oligonucleótido del Ejemplo 7, de la solución de atelocolágeno del Ejemplo de Referencia 4, de la preparación de liposomas del Ejemplo de Referencia 7 y del tampón fosfato, está mostrada en las Figuras 12 y 13. La Figura 12 muestra la comparación entre las preparaciones del Ejemplo 7 y del Ejemplo de Referencia 4 administradas en el lugar del trasplante de RD. La Figura 13 muestra la comparación entre las preparaciones del Ejemplo 7 y del Ejemplo de Referencia 7 cuando se administraron en el lugar del trasplante de RD. La actividad descarboxilasa de ornitina en las células RD tratadas con la preparación para transferir un oligonucleótido es menor que en las células tratadas con la solución de atelocolágeno, con la preparación de liposomas y con el tampón fosfato. Esto sugiere que la producción de descarboxilasa de ornitina es inhibida por la administración de la preparación para transferir un oligonucleótido, y que la inhibición del crecimiento de las células RD observada después de la administración de la preparación para transferir un oligonucleótido es obtenida por la inhibición de la expresión del gen de la descarboxilasa de ornitina llevada a cabo por el oligonucleótido de tipo fosforotioato contenido en la preparación para transferir un oligonucleótido.

Experimento 7

Se trasplantaron subcutáneamente 5×10^7 células MKN 45 superproductoras de descarboxilasa de ornitina en el lomo de ratones desnudos macho de 4 semanas de edad. Siete días después del trasplante, la preparación para transferir un oligonucleótido según se preparó en el Ejemplo 7 fue administrada en el lugar en el cual las células MKN 45 habían sido trasplantadas. De manera similar, la solución de atelocolágeno del Ejemplo de Referencia 4, la composición de oligonucleótidos desorganizados ("scramble") de tipo fosforotioato en forma de solución del Ejemplo de Referencia 6 y tampón fosfato (Control) fueron administrados respectivamente en el lugar en el cual las células MKN 45 habían sido trasplantadas. Después de la administración, los ratones desnudos fueron sacrificados cada 7 días y se pesaron las células MKN 45. El resultado está mostrado en la Figura 14. El crecimiento de las células MKN 45 en el músculo del lomo de los ratones desnudos fue inhibido muy potentemente por la preparación para transferir un oligonucleótido según se preparó en el Ejemplo 7 en comparación con la solución de atelocolágeno del Ejemplo de Referencia 4, con la composición de oligonucleótidos desorganizados ("scramble") de tipo fosforotioato en forma de solución del Ejemplo de Referencia 6 y con el tampón fosfato. Este resultado sugiere que la preparación para transferir un oligonucleótido de la presente invención inhibe el crecimiento de las células MKN 45 y mantiene el efecto inhibidor del crecimiento de las células MKN 45 durante largo tiempo. La Figura 15 muestra una curva de supervivencia acumulativa de los ratones desnudos trasplantados con células MKN. El periodo viable medio de los ratones desnudos a los que se administró la preparación para transferir un oligonucleótido del Ejemplo 7 en el lugar del trasplante fue de 48,5 días, el cual fue prolongado enormemente en

comparación con el de los ratones a los que se administró la solución de atelocolágeno del Ejemplo de Referencia 4 (39,1 días), la composición de oligonucleótidos desorganizados ("scramble") de tipo fosforotioato en forma de solución del Ejemplo de Referencia 6 (39,1 días) y el tampón fosfato (21,3 días). El resultado sugiere que la inhibición del crecimiento de las células MKN obtenido por la administración de la presente preparación de oligonucleótidos incrementará la supervivencia de los ratones desnudos trasplantados con células MKN. Además, la actividad descarboxilasa de ornitina en células MKN 45 a los 35 días después de la administración de la preparación para transferir un oligonucleótido del Ejemplo 7, de la solución de atelocolágeno del Ejemplo de Referencia 4, de la composición de oligonucleótidos desorganizados ("scramble") de tipo fosforotioato en forma de solución del Ejemplo de Referencia 6 y del tampón fosfato, está mostrada en la Figura 16. La actividad descarboxilasa de ornitina en las células MKN 45 tratadas con la preparación para transferir un oligonucleótido fue significativamente más baja que en las células tratadas con la solución de atelocolágeno, con la composición de oligonucleótidos desorganizados ("scramble") de tipo fosforotioato en forma de solución y con el tampón fosfato. Esto sugiere que la producción de descarboxilasa de ornitina es inhibida por la administración de la preparación para transferir un oligonucleótido y que tal inhibición del crecimiento de las células MKN 45 observada después de la administración de la preparación para transferir un oligonucleótido, está causada por la inhibición de la expresión del gen de la descarboxilasa de ornitina llevada a cabo por el oligonucleótido de tipo fosforotioato contenido en la preparación para transferir un oligonucleótido.

Experimento 8

Se trasplantaron subcutáneamente 5×10^7 células de cáncer de intestino grueso humano (células COLO201) (Japan Health Sciences Foundation), que
5 superproducen descarboxilasa de ornitina, a ratones desnudos macho de 4 semanas de edad. Siete días después del trasplante, la preparación para transferir un oligonucleótido según se preparó en el Ejemplo 7 fue administrada en el lugar en el cual las células COLO201 habían
10 sido trasplantadas. De manera similar, la solución de atelocolágeno según se preparó en el Ejemplo de Referencia 4 y el tampón fosfato (Control) fueron administrados respectivamente en el lugar en el cual las células COLO201 habían sido trasplantadas. Después de la administración, los ratones desnudos fueron sacrificados cada 7
15 días y se pesaron las células COLO201. Los resultados están mostrados en la Figura 17. El crecimiento de las células COLO201 en el músculo del lomo de los ratones desnudos fue inhibido muy potentemente por la preparación para transferir un oligonucleótido del Ejemplo 7, en comparación con la solución de atelocolágeno del Ejemplo de Referencia 4 y con el tampón fosfato. El peso de las células COLO201 fue también disminuido en comparación con el de las células en el momento del trasplante. Estos re-
20 sultados sugieren que la presente preparación para transferir un oligonucleótido inhibe el crecimiento de las células COLO201 y mata a las células COLO201, y que tal efecto inhibidor del crecimiento de las células COLO201 puede durar mucho tiempo. La Figura 18 muestra una curva de supervivencia acumulativa de los ratones desnudos trasplantados con las células COLO201. El periodo viable medio de los ratones desnudos tratados con la preparación para transferir un oligonucleótido del Ejemplo 7 fue de 39,8 días, el cual fue mayor que el obtenido con la solución de atelocolágeno y con el tampón fosfato (39,8 días
35

y 20,6 días, respectivamente). Este resultado sugiere que tal inhibición del crecimiento de las células COLO201 obtenida por la administración de la presente preparación para transferir un oligonucleótido incrementaba la supervivencia de los ratones desnudos trasplantados con COLO201. Además, la Figura 19 muestra la actividad descarboxilasa de ornitina en las células COLO201 35 días después de la administración de la preparación para transferir un oligonucleótido del Ejemplo 7, de la solución de atelocolágeno del Ejemplo de Referencia 4 y del tampón fosfato. La actividad descarboxilasa de ornitina en las células COLO201 tratadas con la preparación para transferir un oligonucleótido era menor que en las células tratadas con la solución de atelocolágeno y con el tampón fosfato. Este resultado sugiere que la administración de la preparación para transferir un oligonucleótido inhibe la producción de descarboxilasa de ornitina. El resultado sugiere que la inhibición del crecimiento de las células COLO201 observada después de la administración de la preparación para transferir un oligonucleótido está producida por la inhibición de la expresión del gen de la descarboxilasa de ornitina llevada a cabo por el oligonucleótido de tipo fosforotioato contenido en la preparación para transferir un oligonucleótido.

Experimento 9

La preparación en forma de solución para transferir un oligonucleótido (conteniendo 100 μ moles/l de AS-ODC y un 0,175% de AS-ODC) (10 μ l) fue añadida a 1×10^5 células de leiomioma de ratón (células LMFS) cultivadas en 0,5 ml de medio DMEM que contenía un 10% de suero bovino fetal, y las células fueron cultivadas a 37°C. Veinticuatro horas después de la adición, el medio que contenía la preparación del oligonucleótido fue sustituido por medio fresco y posteriormente el cultivo se llevó acabo durante 6 días a la vez que se sustituía el

medio cada 24 horas. Después de la adición, se midieron el número de células y la actividad descarboxilasa de ornitina. Los resultados están mostrados en las Figuras 20 y 21, respectivamente. Después de la adición de la preparación en forma de solución para transferir un oligonucleótido del Ejemplo 7, el crecimiento de las células LMFS fue inhibido significativamente en comparación con los controles sin adición, y se redujo la actividad descarboxilasa de ornitina. El resultado sugiere que la presente preparación para transferir un oligonucleótido puede inhibir el crecimiento de las células LMFS, las cuales presentan propiedades proliferativas y metastásicas extremadamente potentes, mediante el reconocimiento de manera específica de la secuencia de bases diana.

15 APLICABILIDAD INDUSTRIAL

La preparación que contiene un oligonucleótido con una secuencia de bases complementaria a la de un ARNm diana y un colágeno (además de un aditivo farmacéuticamente aceptable), inhibe eficazmente la expresión del ARNm diana sin inducir ningún efecto colateral *in vivo*, y mantiene el efecto inhibidor durante un largo periodo de tiempo, mediante lo cual se consigue la terapia génica.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> SUMITOMO PHARMACEUTICALS COMPANY LIMITED; KOKEN
25 CO., LTD.

<120> PREPARACIONES PARA TRANSFERIR OLIGONUCLEÓTIDOS

<130> 663591HT

<150> JP 2000-184502

<151> 20-06-2000

30 <160> 4

<210> 1

<211> 20

<212> ADN

35 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido antisentido de tipo fosforotioato
 <400> 1
 ctcgtaggcg ttgtagttgt 20
 5
 <210> 2
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido de tipo fosforotioato
 <400> 2
 tcatgatttc ttgatgttcc 20
 15 <210> 3
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 <223> Oligonucleótido sentido de tipo fosforotioato
 <400> 3
 acaactacaa cgcctacgag 20
 <210> 4
 25 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido desorganizado ("scramble") de tipo
 30 fosforotioato
 <400> 4
 agtactaaag aactacaagg 20

REIVINDICACIONES

1.- Una preparación para transferir a una célula diana un oligonucleótido deseado, que contiene como componente esencial colágeno soluble de tipo 1 derivado de dermis o un colágeno soluble de tipo 1 preparado mediante ingeniería genética, liberando dicha preparación un oligonucleótido 5 a 30 mero.

2.- Una preparación de acuerdo con la Reivindicación 1, en la que la célula diana es una célula animal.

3.- Una preparación de acuerdo con la Reivindicación 2, en la que la célula diana es un órgano o un tejido que requiere ser tratado por una enfermedad del sujeto, o las células de su alrededor.

4.- Una preparación de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3, en la que el colágeno es atelocolágeno.

5.- Una preparación de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 4, en la que el peso molecular del colágeno es de 300.000 aproximadamente a 900.000 aproximadamente.

6.- Una preparación de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 5, donde la preparación es una formulación de liberación mantenida.

7.- Una preparación de acuerdo con la Reivindicación 6, en la cual el oligonucleótido es un ADN o un derivado de ADN.

8.- Una preparación de acuerdo con la Reivindicación 6, en la que el oligonucleótido es un ARN o un derivado de ARN.

9.- Una preparación de acuerdo con la Reivindicación 1, en la que el oligonucleótido tiene al menos un enlace fosforotioato.

10.- Una preparación de acuerdo con la Reivindicación 1, en la que el oligonucleótido contiene

como porción mínima una secuencia de bases que se une de manera complementaria bajo condiciones fisiológicas a una hebra sentido o antisentido de un gen que codifica una proteína que presenta un efecto fisiológico para alterar
5 la homeostasis de un organismo vivo.

Fig. 1

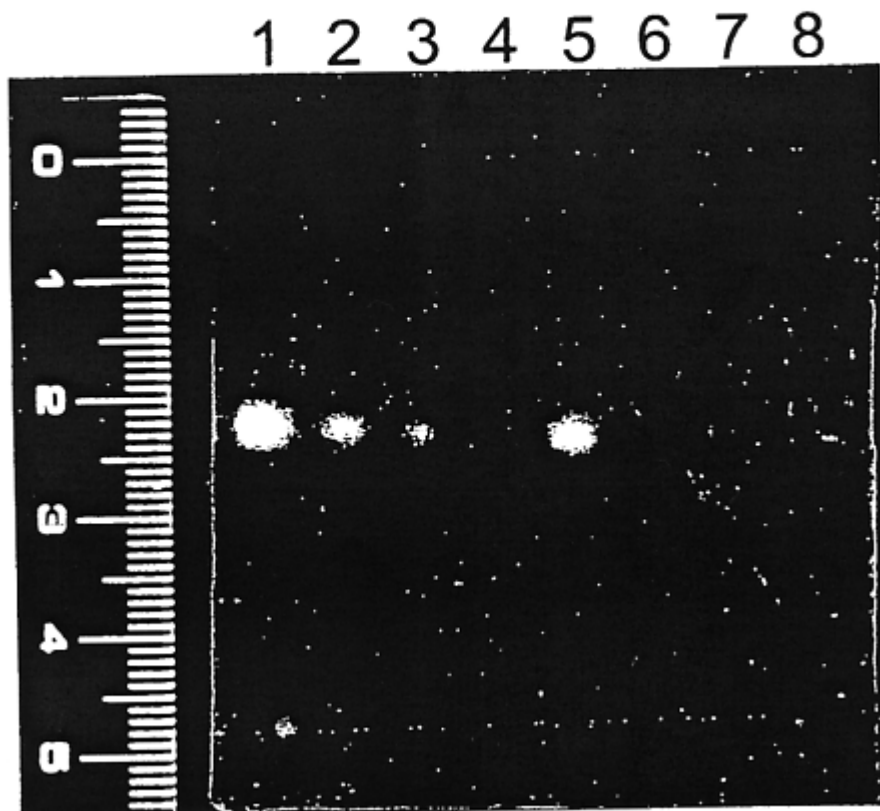


Fig. 2

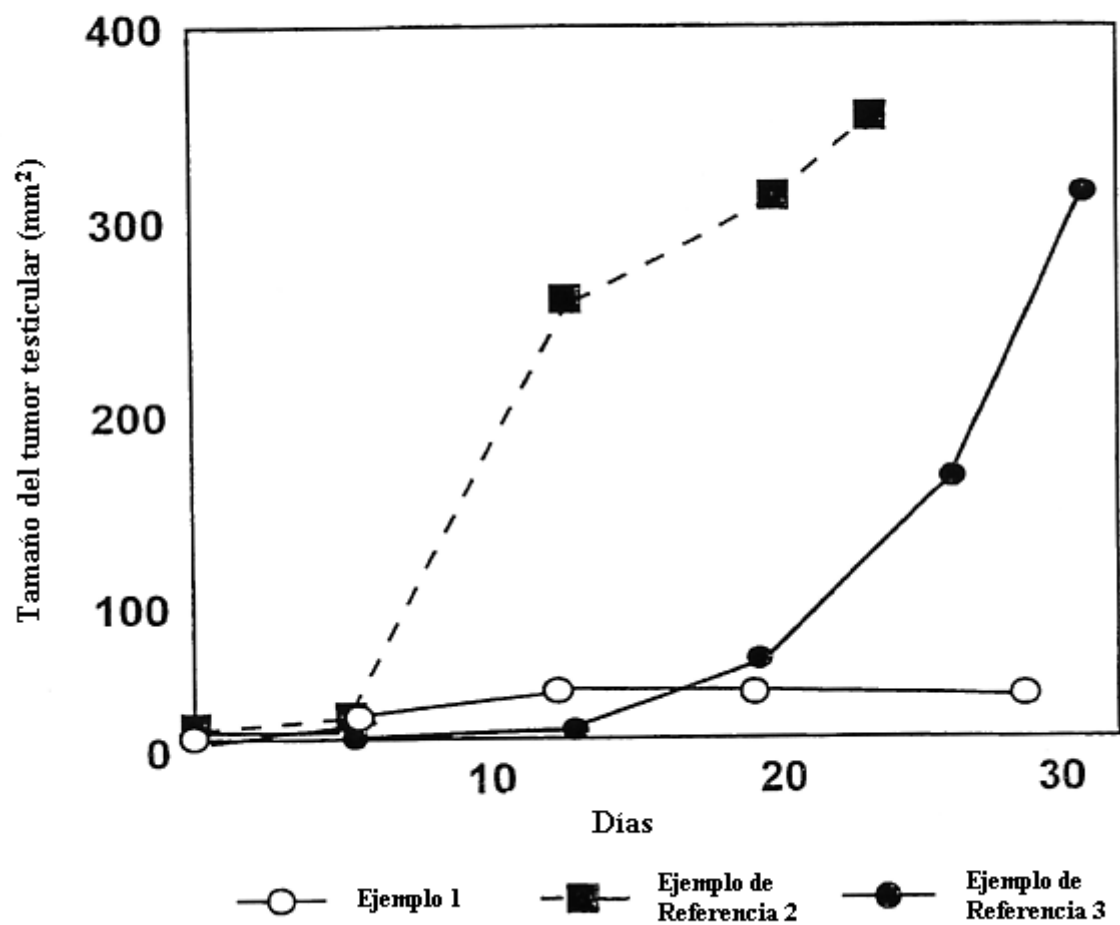


Fig. 3

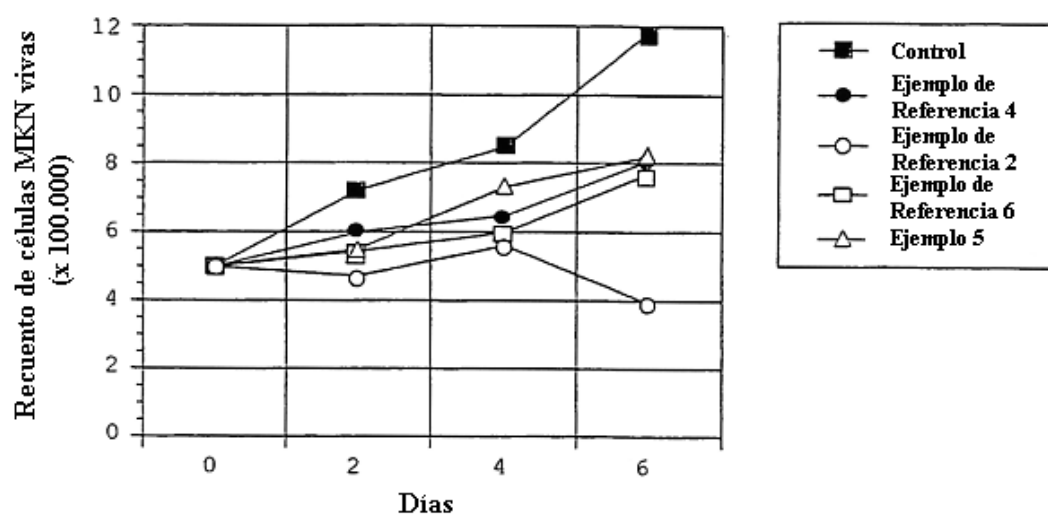


Fig. 4

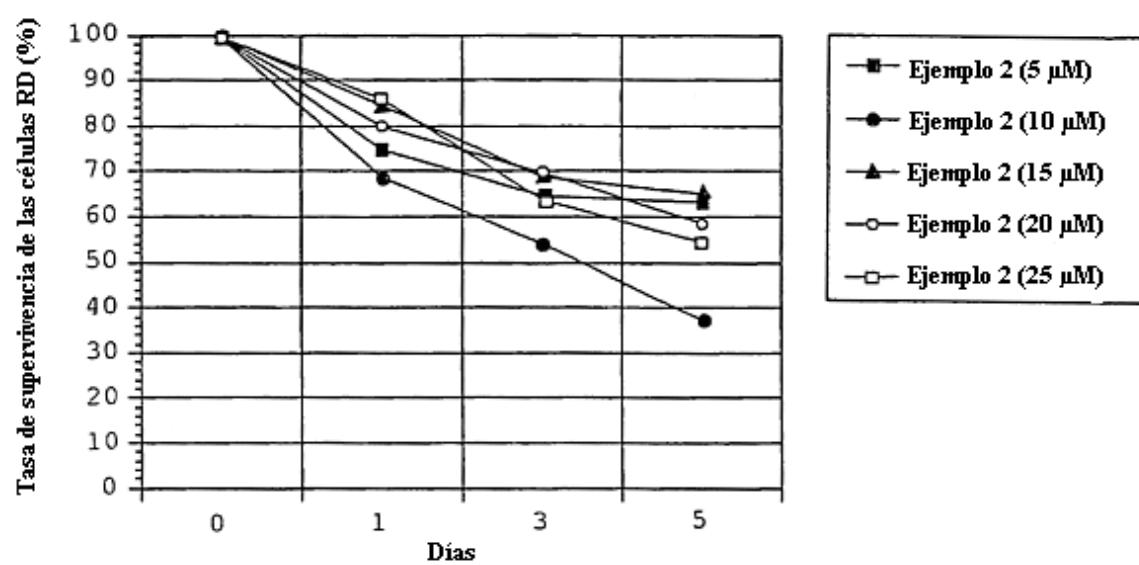


Fig. 5

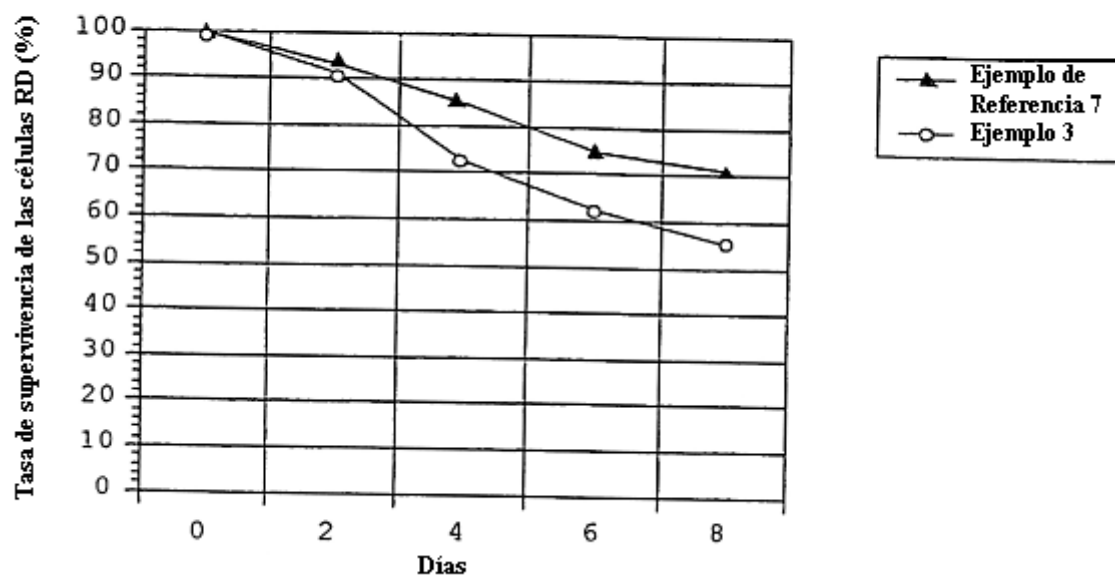


Fig. 6

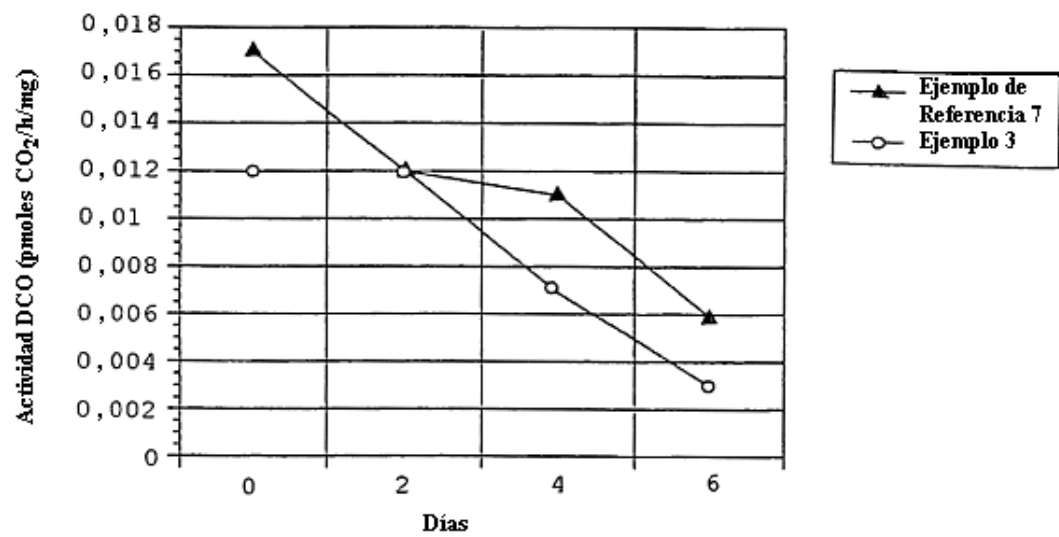


Fig. 7

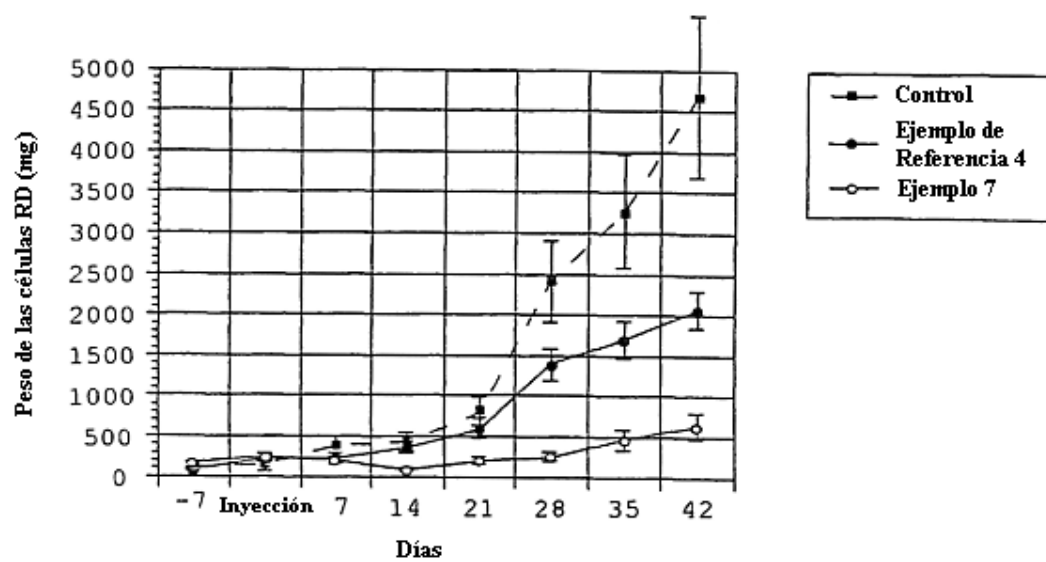


Fig. 8

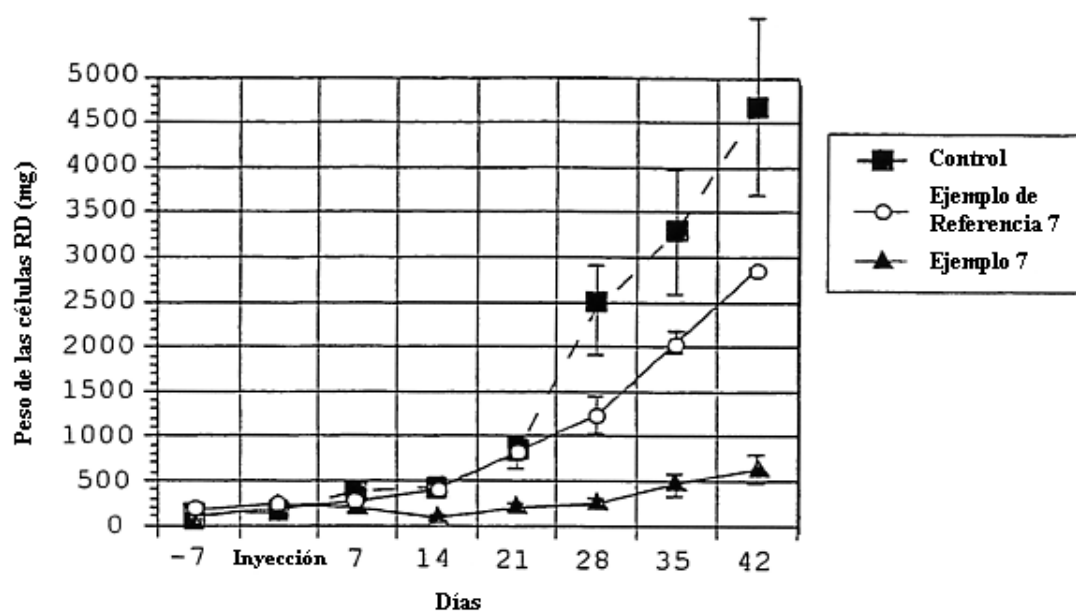


Fig. 9

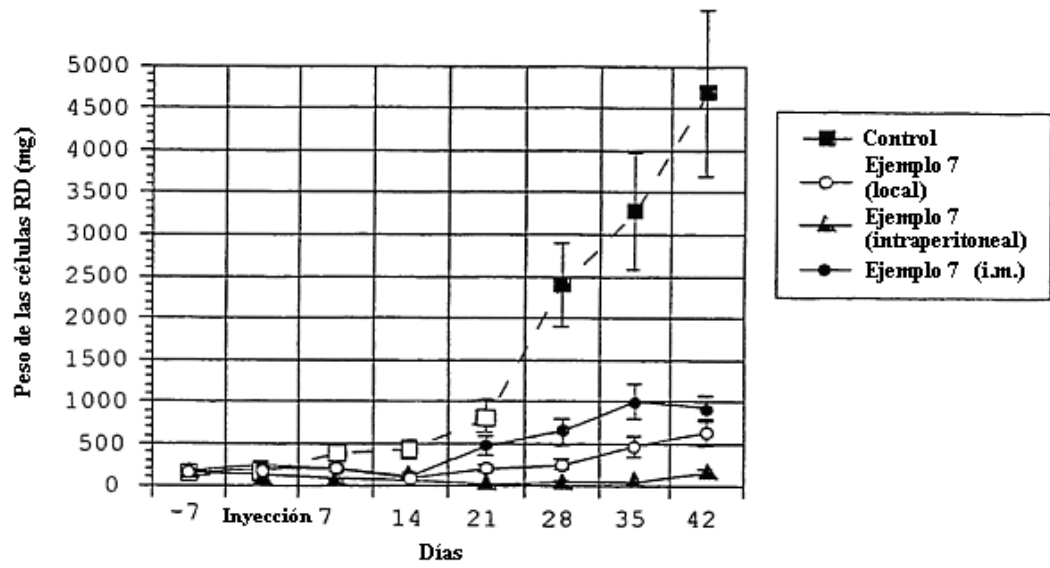


Fig. 10

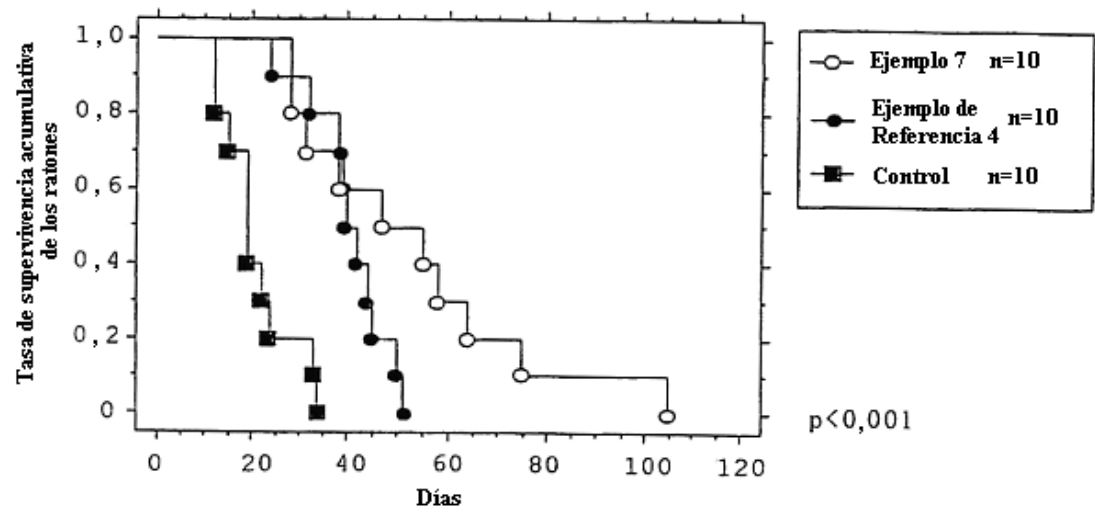


Fig. 11

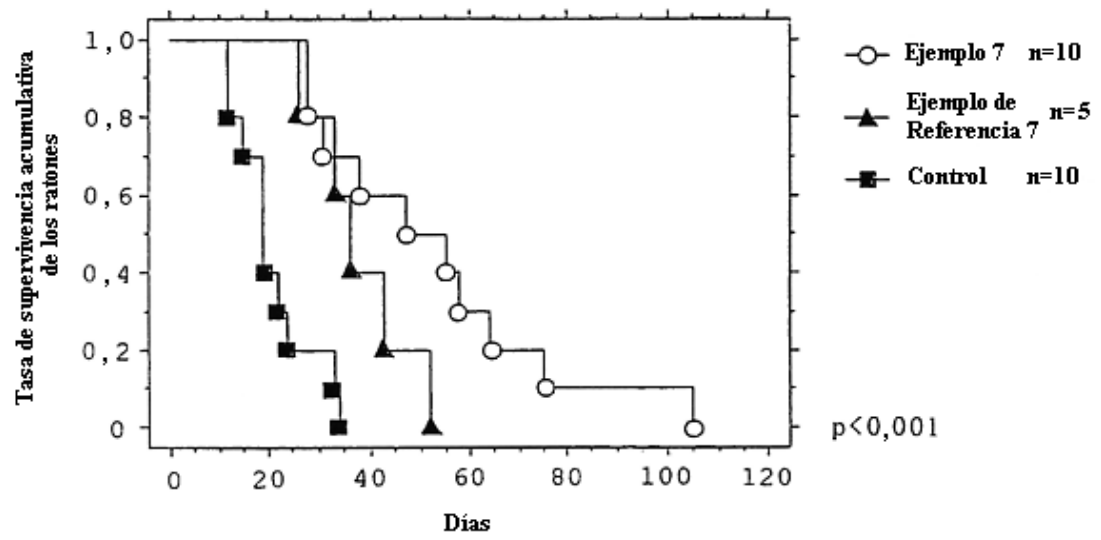


Fig. 12

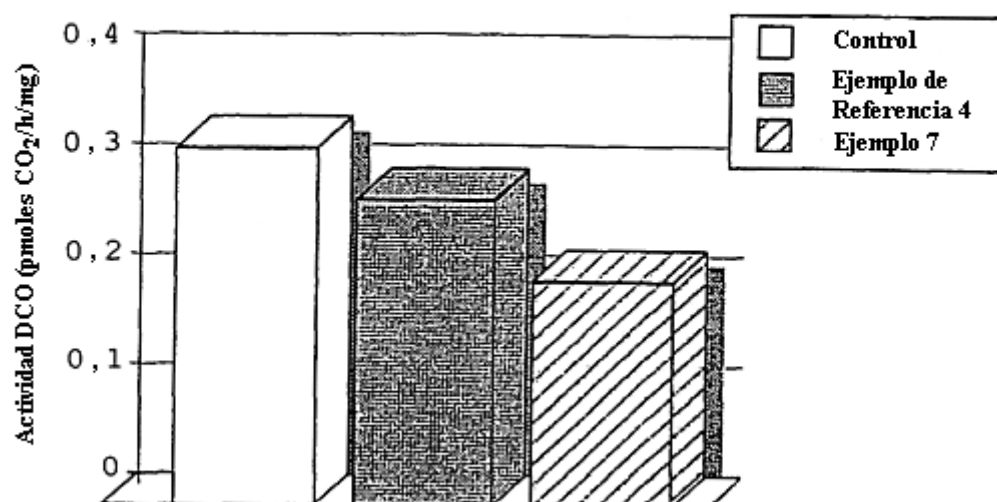


Fig. 13

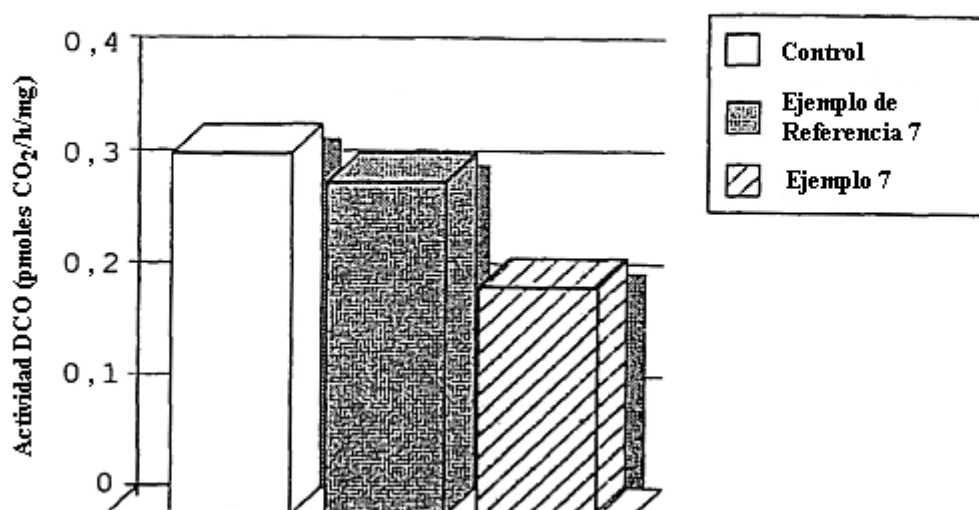


Fig. 14

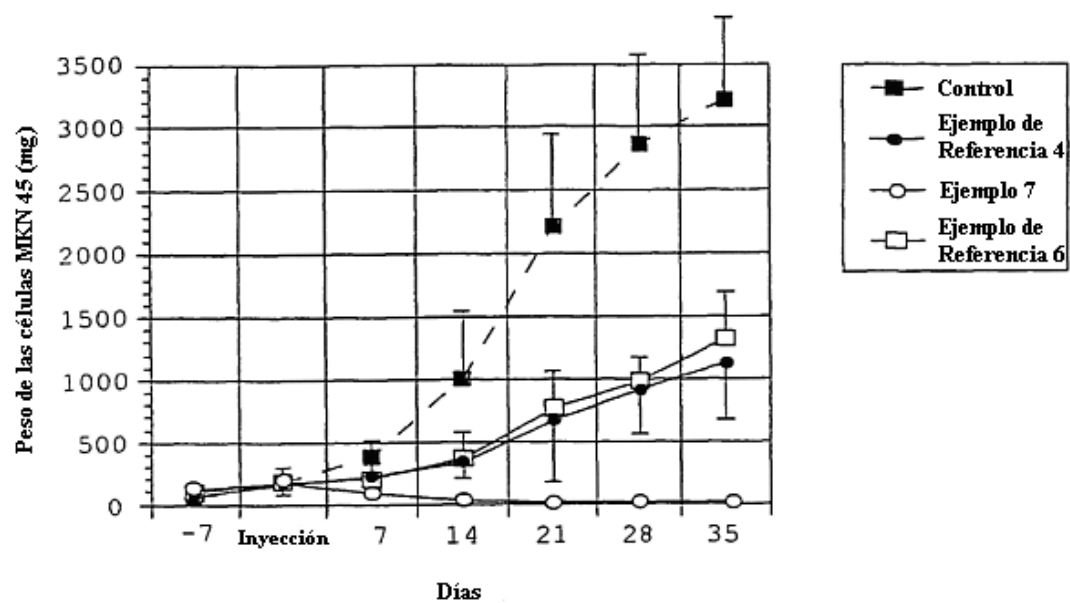


Fig. 15

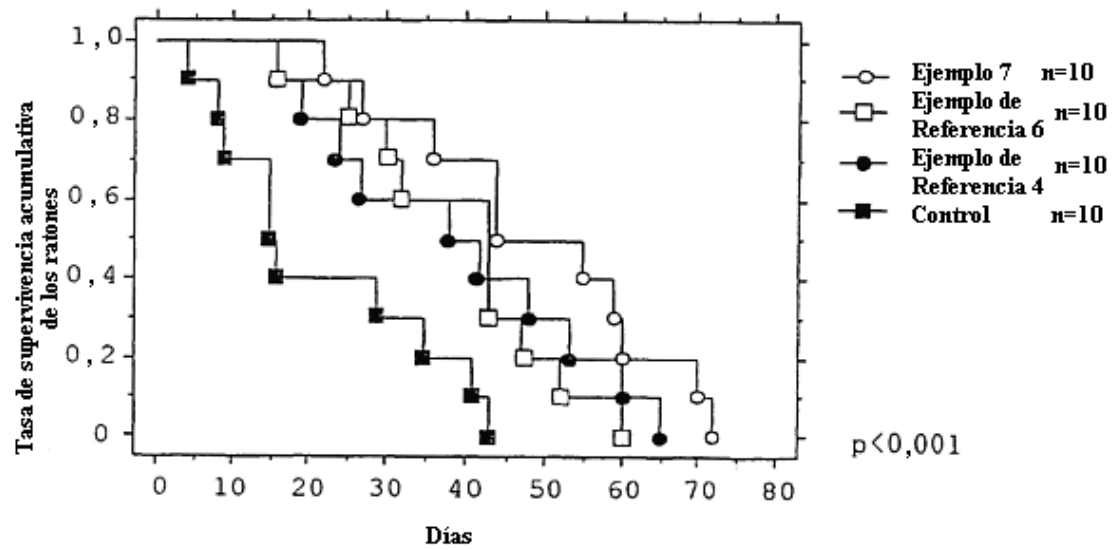


Fig. 16

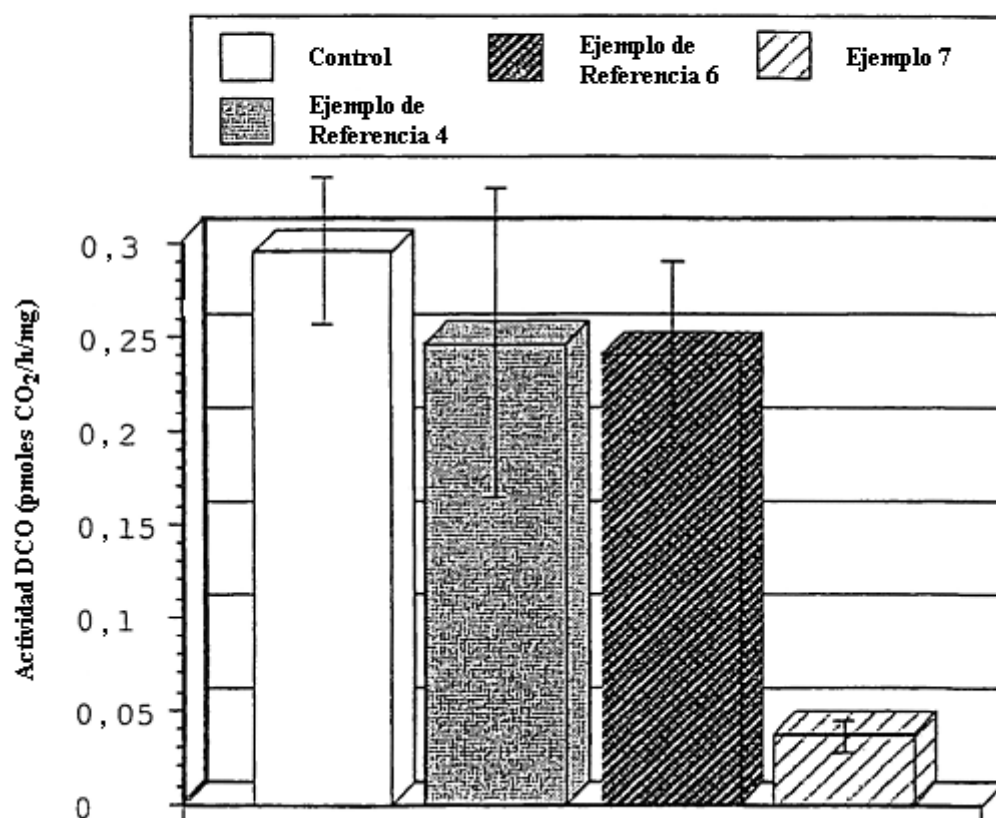


Fig. 17

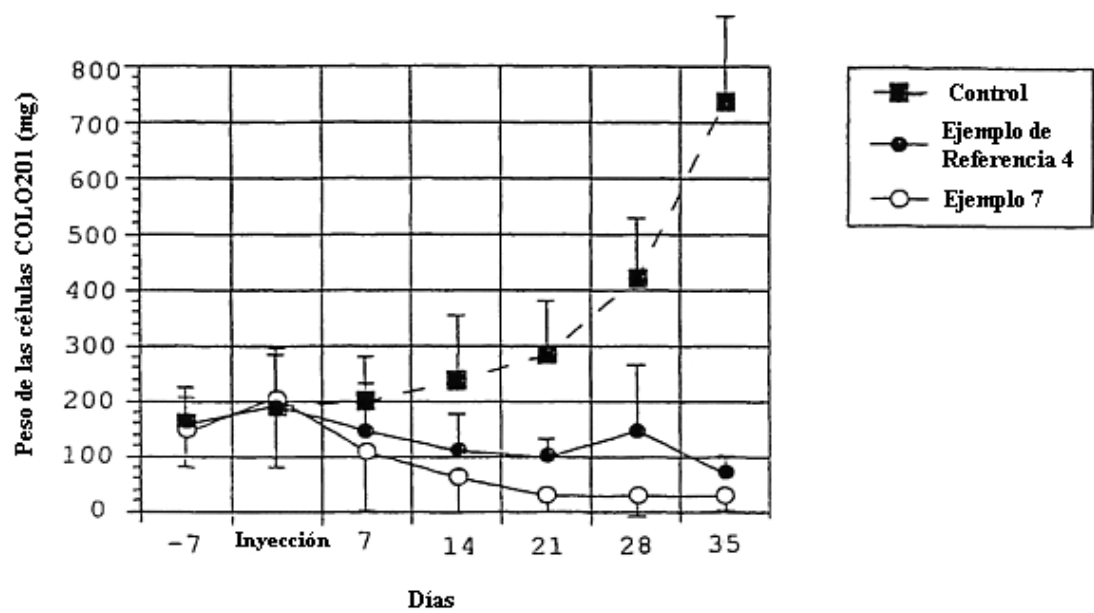


Fig. 18

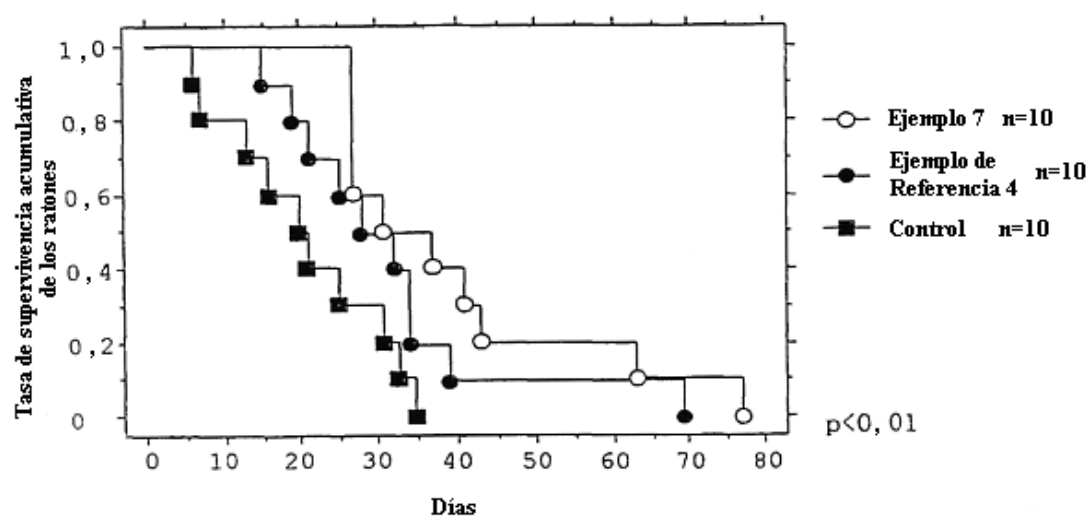


Fig. 19

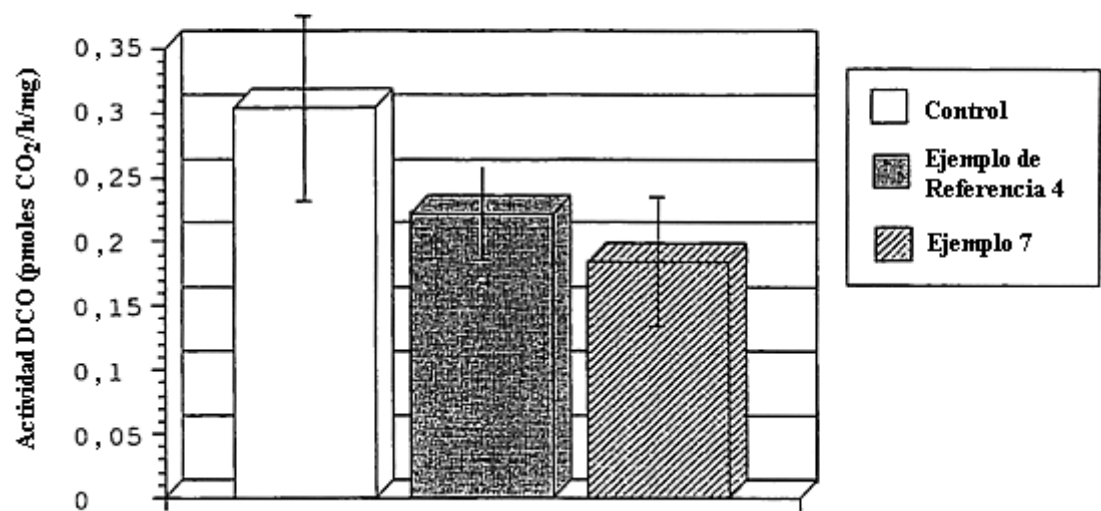


Fig. 20

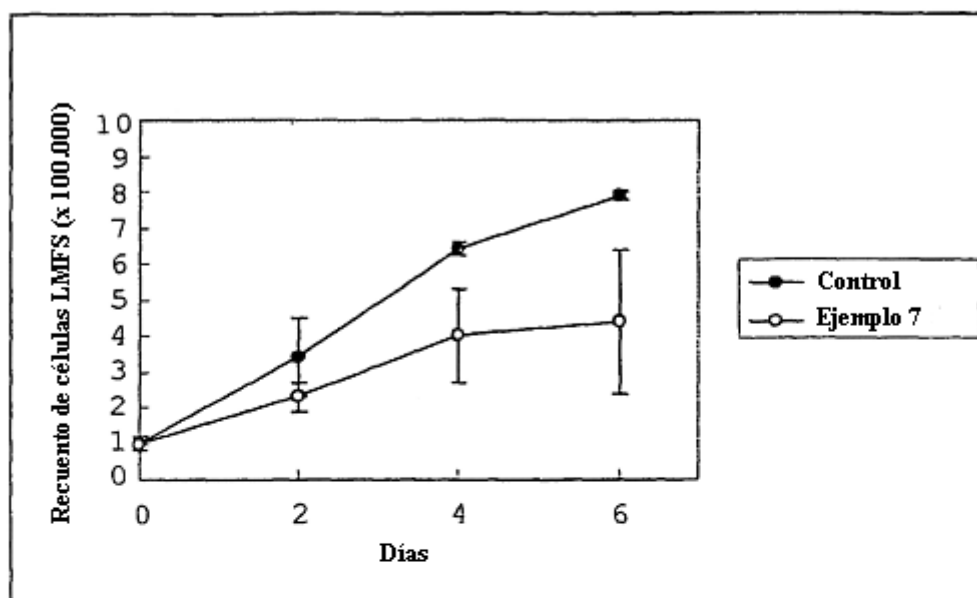


Fig. 21

