

**Compuestos anti-TNF**

## SOLICITUD RELACIONADA

La presente solicitud reivindica la prioridad en  
5 virtud de 35 U.S.C. § 119 de la solicitud provisional de  
EE.UU. con número de serie 62/060.424, presentada el 6 de  
octubre de 2014, cuyo contenido se incorpora en el presente  
documento en su totalidad.

## CAMPO DE LA INVENCION

10 La invención se refiere a compuestos de ácido nucleico  
anti-TNF, así como a métodos de uso de los mismos y  
composiciones de los mismos.

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El TNF- $\alpha$  (factor de necrosis tumoral alfa) es una  
15 citocina pleiotrópica producida por macrófagos/monocitos y  
linfocitos activados que suele potenciar las respuestas  
inflamatorias que conducen a una variedad de enfermedades.  
El TNF- $\alpha$  se libera de los macrófagos, los monocitos y las  
células linfocíticas naturales, y desempeña un papel  
20 importante en las respuestas inflamatorias e inmunes,  
incluyendo el reclutamiento de los leucocitos en tejidos  
lesionados durante las infecciones bacterianas y otras  
infecciones microbianas, y tras la estimulación con  
sustancias inflamatorias. Cuando está presente en  
25 cantidades excesivas, se sabe que el TNF- $\alpha$  causa lesión  
tisular y se ha implicado en la patología asociada con las  
enfermedades inflamatorias y autoinmunes.

El TNF- $\alpha$  media en los efectos biológicos a través de  
dos receptores distintos de proteína de membrana, el TNF-RI  
30 y el TNF-RII, que difieren en secuencia y masa molecular.  
Se ha informado que el TNF-RI está presente a bajos niveles  
en la mayoría de, si no en todos, los tipos de células

humanas, y la expresión del gen TNF-RI en seres humanos puede ser regulado positivamente por la infección, los interferones y los moduladores de segundos mensajeros, tales como ésteres de forbol. Las partes extracelulares de  
5 ambos receptores de TNF también existen en formas solubles, que se derivan de formas unidas a membrana de los receptores mediante escisión proteolítica en la superficie celular. Los receptores de TNF solubles conservan la capacidad de unirse a TNF- $\alpha$  en solución. Se han  
10 identificado receptores de TNF solubles en la orina y los sueros de individuos sanos, y se ha demostrado que están elevados en algunas enfermedades crónicas y tras la inoculación con agentes que inducen el TNF- $\alpha$ .

#### SUMARIO DE LA INVENCION

15 En algunos aspectos, la invención es un compuesto que comprende la estructura representada en la Figura 7 o sus sales. En algunas realizaciones, el compuesto tiene una longitud de 18 nucleótidos. En otras realizaciones, el compuesto se formula en una composición con un vehículo. En  
20 otras realizaciones, el compuesto es una sal de sodio. En otras realizaciones, el compuesto es la estructura representada en la Figura 8.

En algunas realizaciones, el compuesto comprende además una especie molecular en uno de los extremos. En  
25 otras realizaciones, el compuesto comprende además una especie molecular en ambos extremos.

En otra realización más, la especie molecular se selecciona del grupo que consiste en un espaciador, un lípido, un esteroide, un colesterol, un estearilo, una cadena alquilo C16, ácidos biliares, ácido cólico, ácido taurocólico, desoxicolato, ácido oleil-litocólico, ácido oleoil-colénico, glicolípidos, fosfolípidos, esfingolípidos,

30

isoprenoides tales como esteroides, vitaminas tales como vitamina E, ácidos grasos saturados, ácidos grasos insaturados, ésteres de ácidos grasos tales como triglicéridos, pirenos, porfirinas, texafirina, adamantano, acridinas, biotina, cumarina, fluoresceína, rodamina, rojo Texas, digoxigenina, dimetoxitritilo, t-butildimetilsililo, t-butildifenilsililo, colorantes de cianina (por ejemplo, Cy3 o Cy576), colorante Hoechst 33258, psoraleno e ibuprofeno.

En otra realización, la especie molecular es una seleccionada del grupo que consiste en una fracción lipófila; un radical de ácido fólico; un radical de esteroide; un radical de carbohidrato; un radical de vitamina A; un radical de vitamina E; o un radical de vitamina K.

En otra realización, la especie molecular está conectada directamente al compuesto a través de un enlace seleccionado del grupo que consiste en enlaces fosfodiéster, fosforotioato, metilfosfonato y amida. En algunas realizaciones, la especie molecular está conectada indirectamente al compuesto a través de un enlazador.

En otras realizaciones, el enlazador es un enlazador no nucleotídico seleccionado del grupo que consiste en restos abásicos (dSpacer), oligoetilenglicol tal como trietilenglicol (espaciador 9) o hexaetilenglicol (espaciador 18) y alcano-diol tal como butanodiol.

Otro aspecto de la invención es un oligonucleótido que comprende mUmGmGmGmAmGT\*A\*G\*A\*T\*G\*mAmGmGmUmAmC (SEQ ID NO: 16), en el que el oligonucleótido tiene 18 nucleótidos de longitud, en el que m es un 2'O-metilo, y en el que \* es una modificación de fosforotioato. En algunas realizaciones, el oligonucleótido se formula en una composición con un

vehículo. En otras realizaciones, el vehículo es un vehículo basado en lípidos. En otra realización, el vehículo es una nanopartícula.

En otra realización, el oligonucleótido comprende además una especie molecular en el extremo 3' o 5'. En algunas realizaciones, el oligonucleótido comprende además una especie molecular en ambos extremos 3' y 5'.

En otras realizaciones, la especie molecular se selecciona del grupo que consiste en un espaciador, un lípido, un esterol, colesterol, estearilo, cadena alquilo C16, ácidos biliares, ácido cólico, ácido taurocólico, desoxicolato, ácido oleil-litocólico, ácido oleoil-colénico, glicolípidos, fosfolípidos, esfingolípidos, isoprenoides tales como esteroides, vitaminas tales como vitamina E, ácidos grasos saturados, ácidos grasos insaturados, ésteres de ácidos grasos tales como triglicéridos, pirenos, porfirinas, texafirina, adamantano, acridinas, biotina, cumarina, fluoresceína, rodamina, rojo Texas, digoxigenina, dimetoxitritilo, t-butildimetilsililo, t-butildifenilsililo, colorantes de cianina (por ejemplo, Cy3 o Cy576), colorante Hoechst 33258, psoraleno e ibuprofeno.

En algunas realizaciones, la especie molecular es una seleccionada del grupo que consiste en una fracción lipófila; un radical de ácido fólico; un radical de esteroide; un radical de carbohidrato; un radical de vitamina A; un radical de vitamina E; o un radical de vitamina K. En otra realización, la especie molecular está conectada directamente al compuesto a través de un enlace seleccionado del grupo que consiste en enlaces fosfodiéster, fosforotioato, metilfosfonato y amida. En otra realización más, la especie molecular está conectada indirectamente al compuesto a través de un enlazador.

En algunas realizaciones, el enlazador es un enlazador no nucleotídico seleccionado del grupo que consiste en restos abásicos (dSpacer), oligoetilenglicol tal como trietilenglicol (separador 9) o hexaetilenglicol (espaciador 18) y alcano-diol tal como butanodiol.

En otros aspectos, la invención es un oligonucleótido que comprende 5' TGGGAGTAGATGAGGTAC 3' (SEQ ID NO: 4), teniendo el oligonucleótido una longitud de 18-19 nucleótidos, en la que de 4 a 6 nucleótidos del extremo 5' y 4-6 nucleótidos del extremo 3' del oligonucleótido incluyen un grupo 2'O-metilo, y en el que de 4 a 10 nucleótidos tienen una modificación de fosforotioato. En algunas realizaciones, los 6 nucleótidos del extremo 5' y 6 nucleótidos del extremo 3' del oligonucleótido incluyen un 2'O-metilo. En otras realizaciones, 6 nucleótidos tienen una modificación de fosforotioato. En otra realización, 7 nucleótidos tienen una modificación de fosforotioato. En otra realización más, 8 nucleótidos tienen una modificación de fosforotioato.

En otras realizaciones, los nucleótidos modificados con fosforotioato están en una región central del oligonucleótido.

En otra realización, el enlace internucleotídico asociado con el séptimo, octavo, noveno, décimo, undécimo y duodécimo nucleótido del extremo 5' del oligonucleótido está modificado con fosforotioato.

En otra realización, cada nucleótido tiene una modificación de 2'O-metilo o un enlace internucleotídico de fosforotioato. En algunas realizaciones, solo un nucleótido tiene tanto una modificación de 2'O-metilo como un enlace internucleotídico de fosforotioato. En otras realizaciones, solo un nucleótido tiene un nucleótido modificado en 2'.

En algunas realizaciones, la modificación de 2' se selecciona del grupo de: 2'-desoxi, 2'-desoxi-2'-fluoro, 2'-O-metilo, 2'-O-metoxietilo (2'-O-MOE), 2'-O-aminopropilo (2'-O-AP), 2'-O-dimetilaminoetilo (2'-O-DMAOE), 2'-  
5 dimetilaminopropilo (2'-O-DMAP) 2'-O-dimetilaminoetiloxietilo (2'-O-DMAEOE) y 2'-O-N-metilacetamido (2'-O-NMA).

Un aspecto de la invención es una nanoestructura estable de autoensamblaje, que comprende un oligonucleótido  
10 antisentido de 18 a 19 nucleótidos de longitud que comprende TGGGAGTAGATGAGGTAC (SEQ ID NO. 4), en la que un grupo hidrófobo del extremo 3' o 5' se autoasocia para formar el núcleo de la nanoestructura en agua u otros disolventes adecuados. Las nanoestructuras de  
15 autoensamblaje, en general, se forman cuando el oligonucleótido está a concentraciones superiores a 5  $\mu$ M en agua exenta de DNasa y RNasa u otros disolventes adecuados. En algunas realizaciones, el oligonucleótido antisentido tiene una longitud de 18 nucleótidos. En otras  
20 realizaciones, el oligonucleótido antisentido tiene enlaces internucleotídicos fosfodiéster. En otra realización, menos de todos los enlaces internucleotídicos son fosfodiéster.

Otro aspecto de la invención es una nanoestructura de autoensamblaje estable, que comprende un oligonucleótido  
25 antisentido de 18 a 19 nucleótidos de longitud que comprende TGGGAGTAGATGAGGTAC (SEQ ID NO. 4), estando el oligonucleótido antisentido asociado con un núcleo. En algunas realizaciones, el oligonucleótido antisentido tiene una longitud de 18 nucleótidos. En otras realizaciones, el  
30 oligonucleótido antisentido tiene enlaces internucleotídicos fosfodiéster. En otra realización, menos de todos los enlaces internucleotídicos son fosfodiéster.

En otras realizaciones, el oligonucleótido antisentido tiene enlaces internucleotídicos fosforotioato. En algunas realizaciones, menos de todos los enlaces internucleotídicos son fosforotioato.

5 En algunas realizaciones, el oligonucleótido antisentido tiene modificaciones de 2'O-metilo. En otra realización, menos de todos los nucleótidos incluyen una modificación de 2'O-metilo.

10 En otra realización, el oligonucleótido antisentido tiene 17 enlaces internucleotídicos y en el que los 6 enlaces internucleotídicos centrales son fosforotioato. En otras realizaciones, los 6 primeros enlaces internucleotídicos del extremo 5' del oligonucleótido son enlaces internucleotídicos fosfodiéster. En otra  
15 realización más, los 6 primeros nucleótidos del extremo 5' del oligonucleótido son nucleótidos modificados con 2'O-metilo.

20 En otras realizaciones, los 5 últimos nucleótidos del extremo 3' del oligonucleótido son nucleótidos modificados con 2'O-metilo.

En otra realización, el oligonucleótido antisentido se selecciona del grupo que consiste en T-G-G-G-A-G-T-A-G-A-T-G-A-G-G-T-A-C (SEQ ID NO. 4), mUmGmGmGmAmGmUmAmGmAmUmGmAmGmGmUmAmC (SEQ ID NO. 10, Oligo  
25 3742), T\*G\*G\*G\*A\*G\*T\*A\*G\*A\*T\*G\*A\*G\*G\*T\*A\*C (SEQ ID NO. 9, Oligo 3500), mUmGmGmGmAmGT\*A\*G\*A\*T\*G\*mAmGmGmUmAmC (SEQ ID NO. 16, Oligo 3534) y  
mU\*mG\*mG\*mG\*mA\*mG\*T\*A\*G\*A\*T\*G\*mA\*mG\*mG\*mU\*mA\*mC (SEQ ID NO. 18, Oligo 3509), en el que - se refiere a un enlace  
30 fosfodiéster, \* se refiere a un enlace fosforotioato y m se refiere a un O-metilo.

En otra realización, el oligonucleótido antisentido

está unido al exterior del núcleo. En algunas realizaciones, la nanoestructura incluye de 2 a 1000 copias del oligonucleótido antisentido. En otras realizaciones, la nanoestructura incluye al menos un oligonucleótido estructuralmente distinto del oligonucleótido antisentido.

En algunas realizaciones, el oligonucleótido antisentido tiene su extremo 5' expuesto a la superficie exterior de la nanoestructura. En otras realizaciones, el oligonucleótido antisentido tiene su extremo 3' expuesto a la superficie exterior de la nanoestructura. En algunas realizaciones, el oligonucleótido antisentido está situado lateralmente sobre la superficie de la nanoestructura.

En otra realización, el oligonucleótido antisentido está unido indirectamente al núcleo a través de un enlazador. En algunas realizaciones, el oligonucleótido antisentido está unido indirectamente al núcleo a través de más de un enlazador.

En algunas realizaciones, el núcleo es un núcleo sólido o hueco. En otras realizaciones, el núcleo es inerte, paramagnético o superparamagnético. En otra realización, el núcleo es un núcleo sólido.

En otras realizaciones, el núcleo sólido se compone de metales nobles, incluyendo oro y plata, metales de transición que incluyen hierro y cobalto, óxidos metálicos que incluyen sílice, polímeros o combinaciones de los mismos. En otras realizaciones, el núcleo es un núcleo polimérico y en el que el núcleo polimérico se compone de copolímeros de bloques anfífilos, polímeros hidrófobos que incluyen poliestireno, poli(ácido láctico), poli(ácido co-glicólico láctico), poli(ácido glicólico), poli(caprolactona) y otros polímeros biocompatibles.

En otra realización más, el núcleo es un núcleo

liposomal.

Otro aspecto de la invención es una composición que comprende las realizaciones previamente mencionadas del compuesto, el oligonucleótido o la nanoestructura, que comprenden además un agente terapéutico para tratar un trastorno de TNF asociado con la nanoestructura. En algunas realizaciones, el agente terapéutico está unido al oligonucleótido.

Cada una de las composiciones y de los ácidos nucleicos descritos en el presente documento puede formularse en una variedad de vehículos. En algunas realizaciones, los compuestos de la invención se formulan en un vehículo tópico. En algunas realizaciones, la formulación tópica es una crema. En otras realizaciones, la formulación tópica es un gel.

Otro aspecto de la invención es un método de tratamiento de un trastorno de TNF, que comprende administrar a un sujeto que tiene un trastorno de TNF una composición que comprende los aspectos anteriormente descritos del compuesto, el oligonucleótido o la nanoestructura en una cantidad eficaz para tratar el trastorno de TNF.

En otra realización, el trastorno de TNF se selecciona del grupo que consiste en una enfermedad autoinmune, una enfermedad infecciosa, rechazo de trasplante o enfermedad de injerto contra hospedador, malignidad, un trastorno pulmonar, un trastorno intestinal, un trastorno cardíaco, sepsis, una espondiloartropatía, un trastorno metabólico, anemia, dolor, un trastorno hepático, un trastorno cutáneo, alteraciones en las uñas, artritis reumatoide, soriasis, soriasis en combinación con artritis soriásica, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, vasculitis, enfermedad de

Behcet, espondilitis anquilosante, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), fibrosis pulmonar idiopática (FPI), restenosis, diabetes, anemia, dolor, trastorno relacionado con la enfermedad de Crohn, artritis reumatoide juvenil (ARJ), una infección por el virus de la hepatitis C, artritis soriásica y soriasis en placa crónica.

En algunas realizaciones, el trastorno autoinmune se selecciona del grupo que consiste en artritis reumatoide, espondilitis reumatoide, artrosis, artritis gotosa, alergia, esclerosis múltiple, diabetes autoinmune, uveítis autoinmune y síndrome nefrítico.

En otro aspecto, la invención es un método de reducción de los niveles de TNF *in vivo*, que comprende administrar a un sujeto una composición que comprende las realizaciones descritas anteriormente del compuesto, el oligonucleótido o la nanoestructura en una cantidad eficaz para reducir los niveles de TNF *in vivo*.

Cada una de las limitaciones de la invención puede englobar diversas realizaciones de la invención. Por lo tanto, se anticipa que cada una de las limitaciones de la invención que implica cualquier elemento o combinaciones de elementos puede incluirse en cada aspecto de la invención. La presente invención no está limitada en su aplicación a los detalles de construcción ni a la disposición de los componentes expuestos en la siguiente descripción o ilustrados en las figuras. La invención es capaz de otras realizaciones y de ponerse en práctica o de llevarse a cabo de diversas maneras.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Las figuras adjuntas no pretenden estar dibujadas a escala. En las figuras, cada componente idéntico o casi idéntico que se ilustra en diversas figuras está

representado por un número similar. Para fines aclaratorios, puede que no todos los componentes estén marcados en cada figura. En las figuras:

La FIG. 1 es un gráfico de barras que muestra la actividad inhibidora en queratinocitos humanos primarios de varios oligonucleótidos incluyendo Oligo 3482, 3483, 3484, 3485, 3486, 3487 y 3488, normalizados con respecto al Oligo 3495 (un control desordenado) sobre la expresión de TNF.

La FIG. 2 es un gráfico de barras que muestra la actividad inhibidora en queratinocitos humanos primarios de varios oligonucleótidos que incluyen Oligo 3485, 3472, 3508, 3500, 3496, 3526, 3607, 3534, 3514, 3509, 3516 y 3495 en expresión de TNF.

La FIG. 3 es un gráfico de barras que muestra el efecto de diversas sustancias químicas sobre la actividad inhibidora en queratinocitos humanos primarios de varios oligonucleótidos que incluyen Oligo 3660, 3743, 3661, 3657, 3669 y 3652 en comparación con sus respectivos controles. Los oligonucleótidos se formularon como ácidos nucleicos esféricos (SNA).

Las FIG. 4A-4B muestran el porcentaje de desactivación génica del TNF por los SNA en los queratinocitos humanos estimulados. En la FIG. 4A, se muestra gráficamente el porcentaje de expresión de ARNm de TNF- $\alpha$  entre el Oligo 3657 y su control, el Oligo 3661. La FIG. 4B representa las concentraciones inhibitoras máximas de la mitad de los compuestos (CI<sub>50</sub>), 1.8 nM y >100 nM, respectivamente.

Las FIG. 5A-5B muestran los efectos de modificaciones adicionales de fosforotioato en SNA modificados con el Oligo 3657. En la FIG. 5A, se representa en una gráfica el porcentaje de expresión relativa de ARNm de oligonucleótidos con un contenido creciente de

fosforotioato. La FIG. 5B muestra una tabla de la concentración máxima eficaz de la mitad ( $CE_{50}$ ) de cada oligonucleótido explorado.

Las FIG. 6A-6B muestran el efecto de SNA huecos en la expresión de TNF. En la FIG. 6A, se muestra la expresión de TNF, normalizada con respecto a la ausencia de tratamiento, mientras que la FIG. 6B muestra los valores de  $CI_{50}$  de los compuestos.

La FIG. 7 es una estructura de una forma de ácido libre de un oligonucleótido antisentido de TNF.

La FIG. 8 es una estructura de una forma de sal de un oligonucleótido antisentido de TNF.

La FIG. 9 muestra el porcentaje de desactivación génica del TNF por los SNA en queratinocitos humanos estimulados. Se muestra gráficamente el porcentaje de expresión de ARNm de TNF entre el Oligo 6081 y su control, el Oligo 6093. Los datos presentados son expresiones génicas de ARNm de TNF en relación con células estimuladas con TNF solo (sin oligonucleótido, fijado en 1.0).

La FIG. 10 es un gráfico de barras que muestra el efecto de diversas longitudes espaciadoras de hexa(etilenglicol) sobre la actividad inhibidora de la expresión de ARNm de TNF en queratinocitos humanos primarios estimulados. Se muestra el porcentaje de expresión de ARNm de TNF de células tratadas con los Oligos 6080, 6081, 6082 y 6092, y con respecto a sus respectivos controles, los Oligos 6083, 6093, 6094 y 6095 (fijado en 100).

La FIG. 11 es un gráfico de barras que muestra TNF con desactivación de L-SNA en explantes ex vivo soriásicos.

Las FIG. 12A-12D muestran las puntuaciones reducidas de patología clínica y total para las formas S-SNA (SNA

autoensamblado) y L-SNA (SNA liposomal) de oligonucleótidos antisentido de TNF en ratones que tienen la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD). En la FIG. 12A, se muestran las puntuaciones clínicas de la enfermedad para el vehículo, TNBS, el Oligo 227901 en formato S-SNA de diversas cantidades de dosificación. En la FIG. 12B, se muestran las puntuaciones clínicas de la enfermedad para el vehículo, TNBS, Oligo 227901 en formato L-SNA de diversas cantidades de dosificación. En la FIG. 12C, se muestran las puntuaciones de patología total de la enfermedad para el vehículo, TNBS, Oligo 227901 en el formato S-SNA de diversas cantidades de dosificación. En la FIG. 12D, se muestran las puntuaciones de patología total de la enfermedad para el vehículo, TNBS, el Oligo 227901 en formato L-SNA de diversas cantidades de dosificación. \* indica  $p < 0,05$  frente al grupo de vehículo usando ANOVA de una vía seguido del ensayo post-hoc de Tukey.

La FIG. 13 muestra un crío-TEM de SNA de autoensamblaje al Oligo 6307.

Las FIG. 14A-14B muestran una representación esquemática de crío-TEM de SNA de autoensamblaje al oligo 6307. Se muestran esquemas de SNA individuales (FIG. 14A) y de un grupo de SNA (FIG. 14B).

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA

En algunos aspectos, la invención se refiere a composiciones para reducir el TNF- $\alpha$  y a métodos de tratamiento de un trastorno de TNF usando dichas composiciones. Se han identificado inhibidores de TNF- $\alpha$  altamente eficaces de acuerdo con aspectos de la invención. Los inhibidores de TNF- $\alpha$  son composiciones antisentido basadas en ácidos nucleicos. El término "TNF-alfa" o "TNF- $\alpha$ " se refiere a una citocina que existe como una forma

secretada de 17 kD y una forma asociada a membrana de 26 kD, cuya forma biológicamente activa se compone de un trímero de moléculas de 17 kD unidas no covalentemente.

Un "inhibidor de TNF- $\alpha$ ", como se usa en el presente documento, se refiere a un agente basado en ácido nucleico que interfiere en la actividad de TNF- $\alpha$ . En particular, los inhibidores antisentido de TNF- $\alpha$  o los oligonucleótidos antisentido de TNF- $\alpha$  de la invención reducen la expresión del gen TNF- $\alpha$ .

Los inhibidores de TNF de la invención son ácidos nucleicos antisentido. Los ácidos nucleicos antisentido normalmente incluyen ARN modificado o no modificado, ADN, o ácidos nucleicos poliméricos mixtos, y funcionan principalmente mediante la unión específica a secuencias coincidentes que dan lugar a la modulación de la síntesis peptídica. Los ácidos nucleicos antisentido se unen al ARN diana mediante el emparejamiento de bases de Watson Crick, y bloquean la expresión génica mediante la prevención de la traducción ribosomal de las secuencias unidas bien mediante bloqueo estérico o mediante la activación de la enzima RNasa H. Las moléculas antisentido también pueden alterar la síntesis de proteínas interfiriendo con el procesamiento o el transporte del ARN desde el núcleo hacia el citoplasma.

Como se usa en el presente documento, la expresión "ácido nucleico antisentido" u "oligonucleótido antisentido" describe un ácido nucleico que se hibrida en condiciones fisiológicas con ADN que comprende un determinado gen o con un producto de transcripción de ARNm de ese gen, en este caso, TNF- $\alpha$  y, de ese modo, inhibe la transcripción de ese gen y/o la traducción de ese ARNm. Las moléculas antisentido están diseñadas para interferir con la transcripción o la traducción de un gen diana tras la

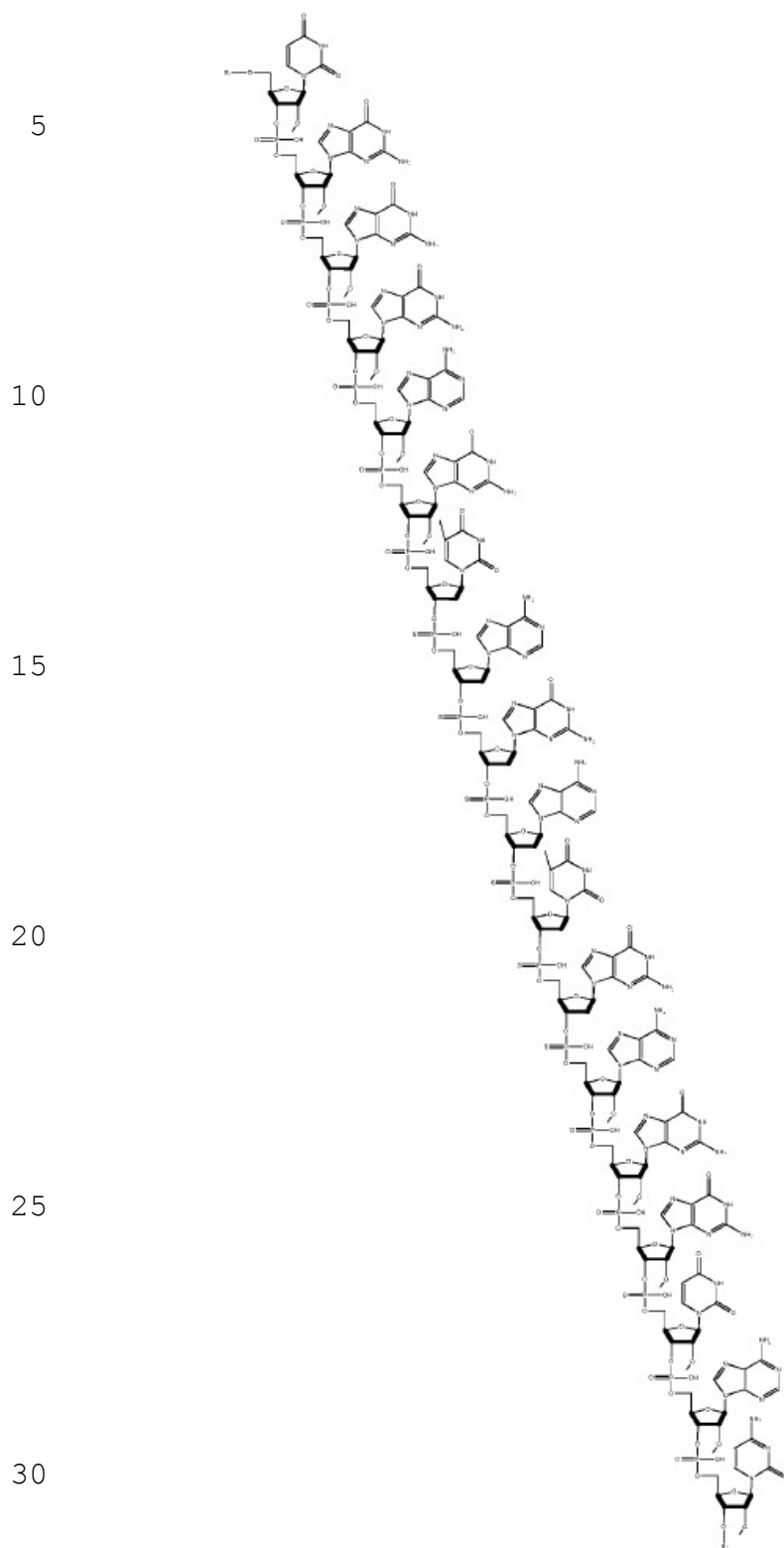
hibridación con el gen diana o producto de la transcripción. Los expertos en la materia reconocerán que la longitud exacta del oligonucleótido antisentido y su grado de complementariedad con su diana dependerán de la diana específica seleccionada, incluyendo la secuencia de la diana y las bases particulares que comprenden dicha secuencia.

"Inhibición de la expresión génica" se refiere a la ausencia o reducción observable del nivel de proteína y/o producto de ARNm de un gen diana, tal como el gen TNF- $\alpha$ . La "especificidad" se refiere a la capacidad para inhibir el gen diana sin efectos manifiestos sobre otros genes de la célula. Las consecuencias de la inhibición pueden confirmarse examinando las propiedades externas de la célula o del organismo, o mediante técnicas bioquímicas tales como hibridación en solución de ARN, protección por nucleasa, hibridación Northern, transcripción inversa, monitorización de la expresión génica con una micromatriz, unión de anticuerpo, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), transferencia Western, radioinmunoensayo (RIA), otros inmunoensayos y análisis de células activadas por fluorescencia (FACS).

Los oligonucleótidos antisentido de la invención inhiben la expresión de TNF- $\alpha$ . Dependiendo del ensayo, la cuantificación de la cantidad de expresión génica permite determinar un grado de inhibición que es superior al 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 99 % en comparación con una célula no tratada de acuerdo con la presente invención. Como ejemplo, la eficacia de la inhibición puede determinarse evaluando la cantidad de producto génico en la célula.

En algunos casos, el inhibidor de TNF- $\alpha$  es un

compuesto que tiene la siguiente estructura o bioequivalentes incluyendo sales y profármacos del mismo:



La expresión "compuestos equivalentes", incluyendo las sales farmacéuticamente aceptables y los profármacos como se usan en el presente documento, se refiere a oligonucleótidos antisentido que tienen la misma estructura primaria que el oligonucleótido antisentido de interés, pero que incluye formas de sal o estructuras que pueden ser escindidas o modificadas para tener el mismo tipo de efecto biológico que el oligonucleótido antisentido de interés. Se pretende englobar cualquiera de las sales farmacéuticamente aceptables, ésteres o sales de dichos ésteres, o cualquier otro compuesto que, tras la administración a un animal incluyendo un ser humano, sea capaz de proporcionar (directa o indirectamente) el metabolito biológicamente activo o resto del mismo.

Las "sales farmacéuticamente aceptables" son sales fisiológica y farmacéuticamente aceptables de los ácidos nucleicos de la invención: es decir, sales que conservan la actividad biológica deseada del compuesto de interés y que no transmiten efectos toxicológicos no deseados al mismo. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación, (a) sales formadas con cationes tales como sodio, potasio, amonio, magnesio, calcio, poliaminas tales como espermina y espermidina, etc.; (b) sales de adición de ácido formadas con ácidos inorgánicos, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido nítrico y similares; (c) sales formadas con ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, ácido acético, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido glucónico, ácido cítrico, ácido málico, ácido ascórbico, ácido benzoico, ácido tánico, ácido palmítico, ácido algínico, ácido poliglutámico, ácido naftalenosulfónico, ácido metanosulfónico, ácido p-

toluenosulfónico, ácido naftalenodisulfónico, ácido poligalacturónico y similares; y (d) sales formadas a partir de aniones elementales tales como cloro, bromo y yodo.

5           Un ejemplo de una sal del oligonucleótido antisentido de la invención es, por ejemplo, un compuesto que es una sal de sodio que tiene la siguiente estructura:

10

15

20

25

30

5

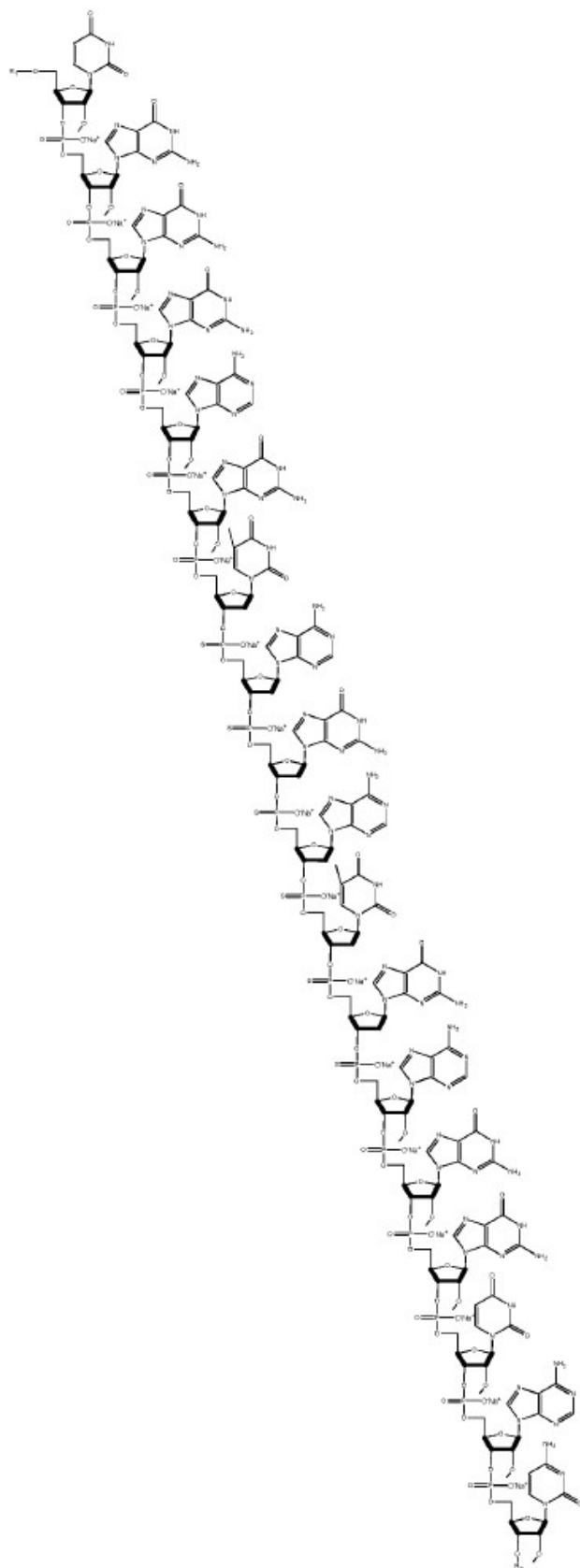
10

15

20

25

30



Los compuestos de la invención también se pueden preparar para su suministro en una forma de "profármaco". Un "profármaco" es un agente terapéutico que se prepara en una forma inactiva que se convierte en una forma activa (es decir, fármaco) dentro del organismo o células del mismo mediante la acción de enzimas endógenas u otros productos químicos y/o condiciones.

Los oligonucleótidos antisentido de la invención son oligonucleótidos antisentido de TNF- $\alpha$ . Un oligonucleótido de TNF- $\alpha$  antisentido se refiere a un compuesto que tiene una secuencia de bases de nucleótidos y una estructura principal de subunidad a subunidad que permite que el oligonucleótido antisentido se hibride con una secuencia diana de TNF- $\alpha$  normalmente mediante emparejamiento de bases de Watson-Crick, para formar un heterodúplex de ARN:oligómero dentro la secuencia diana.

La hibridación específica de un oligonucleótido antisentido con su ácido nucleico diana, TNF- $\alpha$ , interfiere en la función normal del ácido nucleico, TNF- $\alpha$ . Esta modulación de la función de un ácido nucleico diana por compuestos que se hibridan específicamente al mismo se denomina, en general, "antisentido". Las funciones de ADN en las que se interfiere incluyen la replicación y la transcripción. Las funciones del ARN en las que se interfiere incluyen todas las funciones vitales tales como, por ejemplo, la translocación del ARN al sitio de traducción de la proteína, la traducción de la proteína del ARN, el corte y empalme del ARN para producir una o más especies de ARNm y la actividad catalítica que puede ser incorporada o facilitada por el ARN. El efecto global de dicha interferencia con la función del ácido nucleico diana es la modulación de la expresión de la proteína TNF- $\alpha$ . En

el contexto de la presente invención, "modulación" significa una reducción o inhibición de la expresión de un gen.

Un oligonucleótido antisentido "se hibrida específicamente" con un polinucleótido diana si el oligonucleótido se hibrida con el TNF- $\alpha$  diana en condiciones fisiológicas, con un punto de fusión térmico (Tf) esencialmente superior a 37 °C, preferentemente de al menos 45 °C y normalmente de 50 °C a 80 °C o superior. Dicha hibridación corresponde preferentemente a condiciones de hibridación rigurosas, que se seleccionan para que sean de aproximadamente 10 °C y preferentemente aproximadamente 50 °C inferiores a la Tf para la secuencia específica a una fuerza iónica y a un pH definido. A una fuerza iónica y un pH determinados, la Tf es la temperatura a la que el 50 % de una secuencia diana se hibrida con un polinucleótido complementario.

Los polinucleótidos se describen como "complementarios" entre sí cuando la hibridación tiene lugar en una configuración antiparalela entre dos polinucleótidos monocatenarios. Un polinucleótido bicatenario puede ser "complementario" a otro polinucleótido, si se puede producir hibridación entre una de las cadenas del primer polinucleótido y la segunda. La complementariedad (el grado en que un polinucleótido es complementario a otro) es cuantificable en términos de la proporción de bases de las cadenas opuestas que se espera que formen enlaces de hidrógeno entre sí, de acuerdo con reglas de emparejamiento de bases aceptadas en general. Un compuesto antisentido puede ser complementario a una región diana de un producto de transcripción diana incluso si las secuencias de dos bases no son complementarias al 100 %,

siempre y cuando la estructura heterodúplex formada entre el compuesto y el producto de transcripción tenga la estabilidad de la Tf deseada.

La identificación de un oligonucleótido antisentido que se dirige a un determinado ácido nucleico puede ser un proceso de múltiples etapas. El proceso normalmente comienza con la identificación de una secuencia de ácido nucleico cuya función se vaya a modular. Esto puede ser, por ejemplo, un gen celular (o ARNm transcrito del gen) cuya expresión está asociada con un determinado trastorno o estado patológico de TNF- $\alpha$ . El proceso de dirección también incluye la determinación de uno o varios sitios dentro de este gen TNF- $\alpha$  para que la interacción antisentido ocurra de manera que genere el efecto deseado, por ejemplo, la detección o modulación de la expresión de la proteína. En el contexto de la presente invención, un sitio intragénico preferido es la región que engloba la secuencia nucleotídica 2283-2300 de SEQ ID NO. 34, es decir, gtacctca tctactccca (SEQ ID NO. 35).

Los oligonucleótidos antisentido preferidos están diseñados para dirigirse al TNF- $\alpha$  humano, por ejemplo, a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 34, que se expone a continuación. La secuencia de ADNc de TNF- $\alpha$  humano ha sido publicada por Nedwin, G. E. *et al.* (*Nucleic Acids Res.* 1985, 13, 6361-6373); y se desvela en el número de acceso del Genbank X02910.

1 gaattccggg tgatttcaact cccgggtgtc caggcttggtc ctgtaccccc acccagcctt  
61 tccctgaggcc tcaagcctgc caccaagccc ccagctcctt ctccccgcag gacccaaaca  
121 caggcctcag gactcaacac agcttttccc tccaaccgtg tttctctccc tcaacggact  
181 cagctttctg aagccccctcc cagttctagt tctatctttt tccctgcatcc tgtctggaag  
241 ttagaaggaa acagaccaca gacctggtcc ccaaaaagaaa tggaggcaat aggttttgag  
301 gggcatgggg acgggggttca gcctccaggg tcctacacac aaatcagtca gtggcccaga  
361 agacccccct cggaatcgga gcaggaggga tggggagtgt gaggggtatc cttgatgctt  
421 gtgtgtcccc aactttccaa atccccgccc ccgcgatgga gaagaaaccg agacagaagg  
481 tgcaggggccc actaccgctt cctccagatg agctcatggg tttctccacc aagggaagttt  
541 tccgctggtt gaatgattct tccccgccc tcctctcgcc ccagggacat ataaaggcag  
601 ttgttggcac acccagccag cagacgctcc ctcagcaagg acagcagagg accagctaag  
661 agggagagaa gcaactacag accccccctg aaaacaacc tccagcgcca catccccga  
721 caagctgcca ggcagggttct ctctctctca cactactgacc caccgcttca cctctctctc  
781 cctggaagg acaccatgag cactgaaagc atgatccggg acgtggagct ggccgaggag  
841 gcgctcccca agaagacagg ggggccccag ggctccaggc ggtgcttgtt cctcagcctc  
901 ttctccttcc tgatcgtggc aggcgccacc acgctcttct gcctgctgca ctttgagtg  
961 atcgggcccc agagggaaga ggtgagtgcc tggccagcct tcatccactc tcccacccaa  
1021 ggggaaatga gagacgcaag agaggagag agatgggatg ggtgaaagat gtgcgctgat  
1081 agggagggat gagagagaaa aaaacatgga gaaagacggg gatgcagaaa gagatgtggc  
1141 aagagatggg gaagagagag agagaaaagat ggagagacag gatgtctggc acatggaagg  
1201 tgctcactaa gtgtgtatgg agtgaatgaa tgaatgaatg aatgaacaag cagatatata  
1261 aataagatat ggagacagat gtgggggtgtg agaagagaga tgggggaaga aacaagtgat  
1321 atgaataaag atggtgagac agaaagagcg ggaaatatga cagctaagga gagagatggg  
1381 ggagataagg agagaagaag atagggtgtc tggcacacag aagacactca gggaaagagc  
1441 tggtgaatgc tggaaagtga atacacagat gaatggagag agaaaaccag acacctcagg  
1501 gctaagagcg caggccagac aggcagccag ctgttcctcc ttttaagggtg actccctcga  
1561 tgtaaacctt tctccttctc cccaacagtt ccccagggac ctctctctaa tcagccctct  
1621 ggcccaggca gtcagtaagt gtctccaaac ctctttccta attctgggtt tgggtttggg  
1681 ggtagggtta gtaccggtat ggaagcagtg ggggaaattt aaagttttgg tcttggggga  
1741 ggatggatgg aggtgaaagt aggggggtat tttctaggaa gtttaagggt ctacgctttt  
1801 tcttttctct ctctcttca ggatcatctt ctogaacccc gagtgaacag cctgtagccc  
1861 atgttgtagg taagagctct gaggatgtgt cttggaactt ggagggctag gatttgggga  
1921 ttgaagcccg gctgatggta ggcagaactt ggagacaatg tgagaaggac tcgctgagct

1981 caaggggaagg gtggaggaac agcacaggcc ttagtgggat actcagaacg tcatggccag  
 2041 gtgggatgtg ggatgacaga cagagaggac aggaaccgga tgtgggggtgg gcagagctcg  
 2101 agggccagga tgtggagagt gaaccgacat ggccacactg actctctctc cctctctctc  
 2161 ctccctccag caaacctca agctgagggg cagctccagt ggctgaaccg ccgggccaat  
 2221 gccctcctgg ccaatggcgt ggagctgaga gataaccagc tgggtgggtgc atcagagggc  
 2281 ctgtacctca tctactccca ggtcctcttc aaggggccaag gctgcccctc caccatgtg  
 2341 ctctcaccac acaccatcag ccgcatcgcc gtctctacc agaccaaggt caacctctc  
 2401 tctgccatca agagcccctg ccagagggag accccagagg gggctgaggc caagccctgg  
 2461 tatgagccca tctatctggg aggggtcttc cagctggaga aggggtgacc actcagcgt  
 2521 gagatcaatc ggcccacta tctcgacttt gccgagtctg gccaggtcta ctttgggac  
 2581 attgccctgt gaggaggacg aacatccaac cttcccaaac gcctccctg ccccaatccc  
 2641 tttattacc cctccttcag acacctcaa cctctcttg ctcaaaaaga gaattggggg  
 2701 cttagggtcg gaaccaagc ttagaacttt aagcaacaag accaccactt cgaaacctgg  
 2761 gattcaggaa tgtgtggcct gcacagtga gtgctggcaa ccactaagaa ttcaaactgg  
 2821 ggctccaga actcactgg gcctacagct ttgatccctg acatctggaa tctggagacc  
 2881 agggagcctt tggttctggc cagaatgctg caggacttga gaagacctc cctagaaatt  
 2941 gacacaagtg gaccttaggc ctctctctc ccagatgtt ccagacttc ttgagacag  
 3001 gagccagcc ctcccagtg agccagctcc ctctatttat gtttgcactt gtgattattt  
 3061 attatttat tattatttat ttatttacag atgaatgtat ttatttggga gaccgggta  
 3121 tctgggggga cccaatgtag gagctgcctt ggctcagaca tgttttcctg gaaaacggag  
 3181 ctgaacaata ggctgttccc atgtagcccc ctggcctctg tgcttctttt tgattatgtt  
 3241 ttttaaataa tttatctgat taagttgtct aaacaatgct gatttgggtga ccaactgtca  
 3301 ctcatgtctg agcctctgct cccaggggga gttgtgtctg taatcgccct actattcagt  
 3361 ggcgagaaat aaagtttgct tagaaaagaa acatggctc cttcttgga ttaattctgc  
 3421 atctgcctct tcttgtgggt gggaagaagc tccctaagtc ctctctccac aggccttaag  
 3481 atccctcgga ccagtccca tccttagact cctagggcc tggagacctt acataaaca  
 3541 agccaacag aatattcccc atccccagg aaacaagagc ctgaacctaa ttacctctc  
 3601 ctcagggcat gggaatttcc aactctggga attc (SEQ ID NO. 34)

Las nanoestructuras descritas en el presente documento pueden ser nanoestructuras de autoensamblaje estables. Por ejemplo, la nanoestructura puede ser un oligonucleótido antisentido de 18 a 19 nucleótidos de longitud que comprende TGGGAGTAGATGAGGTAC (SEQ ID NO. 4), en el que un grupo hidrófobo del extremo 3' o 5' se autoasocia para formar el núcleo de la nanoestructura en agua u otros disolventes adecuados. Un grupo hidrófobo como el usado en el presente documento puede incluir colesterol, un colesterilo o un resto de colesterilo modificado, adamantina, dihidrotesterona, alquilo de cadena larga, alquenilo de cadena larga, alquinilo de cadena larga, ácido oleil-litocólico, ácido colénico, ácido oleoil-colénico, palmitilo, heptadecilo, mirisitilo, ácidos biliares, ácido cólico o ácido taurocólico, desoxicolato, ácido oleil-litocólico, ácido oleoil-colénico, glicolípidos,

fosfolípidos, esfingolípidos, isoprenoides tales como esteroides, vitaminas tales como vitamina E, ácidos grasos bien saturados o insaturados, ésteres de ácidos grasos tales como triglicéridos, pirenos, porfirinas, texafirina, adamantano, acridinas, biotina, cumarina, fluoresceína, rodamina, rojo Texas, digoxigenina, dimetoxitritilo, t-butildimetilsililo, t-butildifenilsililo, colorantes de cianina (por ejemplo, Cy3 o Cy5), colorante de Hoechst 33258, psoraleno o ibuprofeno.

Los oligonucleótidos antisentido normalmente tienen una longitud de 15 a 20 bases que, en general, es lo suficientemente larga como para tener una secuencia complementaria en el genoma de mamífero. Además, los compuestos antisentido que tienen una longitud de al menos 12, normalmente de al menos 15 nucleótidos de longitud se hibridan bien con su ARNm diana. De este modo, los oligonucleótidos antisentido de la invención normalmente están en un intervalo de tamaños de 8 a 100 nucleótidos, más preferentemente de 12 a 50 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones de la invención, los oligonucleótidos antisentido tienen una longitud de 18 a 19 nucleótidos y comprenden TGGGAGTAGATGAGGTAC (SEQ ID NO. 4). Los oligonucleótidos antisentido que comprenden SEQ ID NO. 4 pueden incluir nucleótidos adicionales en el extremo 5' y/o 3' del oligonucleótido. Sin embargo, un oligonucleótido antisentido que comprende SEQ ID NO. 4 y está limitado a 18 nucleótidos de longitud no tiene ningún nucleótido adicional del extremo 5' o 3' de la molécula. Se pueden unir otras moléculas no nucleótidas covalentemente o no covalentemente al extremo 5' y/o 3' de dichos oligonucleótidos.

En algunos casos, el oligonucleótido antisentido es

uno de los siguientes oligonucleótidos: T-G-G-G-A-G-T-A-G-A-T-G-A-G-G-T-A-C (SEQ ID NO. 4), mUmGmGmGmAmGmUmAmGmAmUmGmAmGmGmUmAmC (SEQ ID NO. 10, Oligo 3742), T\*G\*G\*G\*A\*G\*T\*A\*G\*A\*T\*G\*A\*G\*G\*T\*A\*C (SEQ ID NO. 9, Oligo 3500), mUmGmGmGmAmGT\*A\*G\*A\*T\*G\*mAmGmGmUmAmC (SEQ ID NO. 16, Oligo 3534) y mU\*mG\*mG\*mG\*mA\*mG\*T\*A\*G\*A\*T\*G\*mA\*mG\*mG\*mU\*mA\*mC (SEQ ID NO. 18, Oligo 3509), en los que - se refiere a un enlace fosfodiéster, \* se refiere a un enlace fosforotioato y m se refiere a un O-metilo.

Los términos "ácido nucleico" y "oligonucleótido" se usan indistintamente para referirse a múltiples nucleótidos (es decir, moléculas que comprenden un azúcar (por ejemplo, ribosa o desoxirribosa) unido a un grupo fosfato y a una base orgánica intercambiable, que es bien una pirimidina sustituida (por ejemplo, citosina (C), timina (T) o uracilo (U)) o una purina sustituida (por ejemplo, adenina (A) o guanina (G)). Como se usan en el presente documento, los términos "ácido nucleico" y "oligonucleótido" se refieren a oligorribonucleótidos, así como oligodesoxirribonucleótidos. Los términos "ácido nucleico" y "oligonucleótido" también incluirán polinucleósidos (es decir, un polinucleótido menos el fosfato) y cualquier otro polímero que contenga una base orgánica. Las moléculas de ácido nucleico son preferentemente sintéticas (por ejemplo, producidas mediante la síntesis de ácidos nucleicos). Los oligonucleótidos pueden tener cualquier tamaño útil para producir efectos antisentido. En algunas realizaciones, tienen una longitud de 18 a 23 nucleótidos. En otras realizaciones, el oligonucleótido antisentido tiene una longitud de 18 nucleótidos.

Los términos "ácido nucleico" y "oligonucleótido"

también pueden englobar ácidos nucleicos u oligonucleótidos con sustituciones o modificaciones tales como en las bases y/o los azúcares. Por ejemplo, incluyen ácidos nucleicos que tienen azúcares de cadena principal que están unidos covalentemente a grupos orgánicos de bajo peso molecular distintos de un grupo hidroxilo en la posición 2' y distintos de un grupo fosfato o grupo hidroxilo en la posición 5'. Así pues, los ácidos nucleicos modificados pueden incluir un grupo ribosa 2'-O-alquilado. Además, los ácidos nucleicos modificados pueden incluir azúcares tales como arabinosa o 2'-fluoroarabinosa en lugar de ribosa. Por lo tanto, los ácidos nucleicos pueden ser heterogéneos en la composición de la estructura principal, conteniendo, por lo tanto, cualquier combinación posible de unidades poliméricas unidas entre sí, tales como ácidos nucleicos peptídicos (que tienen una cadena principal de aminoácidos con bases de ácido nucleico). Otros ejemplos se describen con más detalle a continuación.

Los oligonucleótidos pueden ser ADN, ARN, PNA, LNA, ENA o híbridos incluyendo cualquier modificación química o natural de los mismos. Las modificaciones químicas y naturales son bien conocidas en la técnica. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, modificaciones diseñadas para aumentar la unión a una cadena diana (es decir, aumentar sus temperaturas de fusión), para ayudar en la identificación del oligonucleótido o un complejo de oligonucleótido-diana, para aumentar la penetración celular, para estabilizarse contra las nucleasas y otros enzimas que degradan o interfieren en la estructura o actividad de los oligonucleótidos, para proporcionar un modo de interrupción (una terminación) una vez enlazados de manera específica de la secuencia a una diana y para mejorar las propiedades

farmacocinéticas del oligonucleótido.

Las modificaciones incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, (a) modificaciones terminales, por ejemplo, modificaciones del extremo 5' (fosforilación, desfosforilación, conjugación, enlaces invertidos, etc.), modificaciones del extremo 3' (conjugación, nucleótidos de ADN, enlaces invertidos, etc.); (b) modificaciones de bases, por ejemplo, sustitución con bases modificadas, bases estabilizantes, bases desestabilizantes o bases que se emparejan con un repertorio expandido de parejas o bases conjugadas; (c) modificaciones de azúcar (por ejemplo, en la posición 2' o la posición 4') o sustitución del azúcar; así como (d) modificaciones de enlaces internucleosídicos, incluyendo la modificación o la sustitución de los enlaces fosfodiéster. En la medida en que dichas modificaciones interfieran en la traducción (es decir, se produce una reducción del 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 % o superior en la traducción con relación a la falta de la modificación—por ejemplo, ensayo de traducción *in vitro*), la modificación puede no ser óptima para los métodos y las composiciones que se describen en el presente documento.

Los ejemplos no limitantes de enlaces internucleosídicos modificados incluyen fosforotioatos, fosforotionatos quirales, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilmfosfotriésteres, metil- y otros alquilmfosfonatos, incluyendo fosfonatos de 3'-alquileo y fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidatos que incluyen 3'-aminofosforamidato y aminoalquilmfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionoalquilmfosfonatos, tionoalquilmfosfotriésteres y boranofosfatos que tienen enlaces 3'-5' normales, análogos unidos a 2'-5' de estos y aquellos que tienen polaridad invertida en la que los pares

adyacentes de unidades de nucleósidos están unidos a 3'-5' y 5'-3' o 2'-5' a 5'-2'. También se incluyen diversas sales, sales mixtas y formas de ácido libre.

Los enlaces internucleosídicos modificados que no incluyen un átomo de fósforo en los mismos tienen enlaces internucleosídicos que están formados por enlaces internucleosídicos de alquilo o cicloalquilo de cadena corta, heteroátomos mixtos y enlaces internucleosídicos de alquilo o cicloalquilo, o uno o más enlaces internucleosídicos heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta. Estos incluyen los que tienen enlaces morfolino (formados en parte a partir de la parte de azúcar de un nucleósido); estructuras principales de siloxano; estructuras principales de sulfuro, sulfóxido y sulfona; estructuras principales de formaceto y tioformaceto; estructuras principales de metilen-formaceto y tioformaceto; estructuras principales que contienen alqueno; estructuras principales de sulfamato; estructuras principales de metilenoimino y metilenohidrazino; estructuras principales de sulfonato y sulfonamida; estructuras principales de amida; y otras que tienen partes componentes de N, O, S y CH<sub>2</sub> mixtas.

Las fracciones de azúcar sustituidas incluyen, pero sin limitación, una de las siguientes en la posición 2': H (desoxirribosa); OH (ribosa); F; O-, S- o N-alquilo; O-, S- o N-alqueno; O-, S- o N-alquino; o O-alquil-O-alquilo, en los que el alquilo, alqueno y alquino pueden ser alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>10</sub> o alqueno y alquino C<sub>2</sub> a C<sub>10</sub> sustituidos o no sustituidos.

Un oligonucleótido modificado químicamente o de manera natural puede incluir, por ejemplo, al menos un nucleótido modificado en la posición 2' del azúcar, lo más

preferentemente un nucleótido modificado con 2'-O-alquilo, 2'-O-alquil-O-alquilo o 2'-fluoro o una protección terminal. En otras realizaciones, las modificaciones de ARN incluyen modificaciones de 2'-fluoro, 2'-amino y 2'O-metilo sobre la ribosa de pirimidinas, restos abásicos o una base invertida del extremo 3' del ARN.

Los oligonucleótidos útiles de acuerdo con la invención pueden incluir un solo nucleósido modificado. En otras realizaciones, el oligonucleótido puede incluir al menos dos nucleósidos modificados, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 15, al menos 20 o más nucleósidos, hasta toda la longitud del oligonucleótido.

Los nucleósidos o nucleobases incluyen las bases purinas naturales adenina (A) y guanina (G), y las bases pirimidinas timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Los nucleósidos modificados incluyen otras nucleobases sintéticas y naturales tales como inosina, xantina, hipoxantina, nubularina, isoguanisina, tubercidina, 2-(halo)adenina, 2-(alquil)adenina, 2-(propil)adenina, 2(amino)adenina, 2-(aminoalquil)adenina, 2(aminopropil)adenina, 2(metiltio)N6(isopentenil)adenina, 6(alquil)adenina, 6(metil)adenina, 7(desaza)adenina, 8(alquenil)adenina, 8-(alquil)adenina, 8(alquinil)adenina, 8(amino)adenina, 8-(halo)adenina, 8-(hidroxil)adenina, 8(tioalquil)adenina, 8-(tiol)adenina, N6-(isopentil)adenina, N6(metil)adenina, N6,N6(dimetil)adenina, 2-(alquil)guanina, 2(propil)guanina, 6-(alquil)guanina, 6(metil)guanina, 7(metil)guanina, 7(metil)guanina, 7(desaza)guanina, 8(alquil)guanina, 8-(alquenil)guanina, 8(alquinil)guanina, 8-(amino)guanina, 8(halo)guanina, 8-(hidroxil)guanina, 8(tioalquil)guanina, 8-(tiol)guanina, N(metil)guanina, 2-

(tio)citosina, 3(desaza)5(aza)citosina, 3-(alquil)citosina,  
3(metil)citosina, 5-(alquil)citosina, 5-(alquinil)citosina,  
5(halo)citosina, 5(metil)citosina, 5(propinil)citosina,  
5(propinil)citosina, 5(trifluorometil)citosina, 6-  
5 (azo)citosina, N4(acetil)citosina, 3(3-amino-3-  
carboxipropil)uracilo, 2-(tio)uracilo, 5-  
(metil)2(tio)uracilo, 5(metilaminometil)-2(tio)uracilo, 4-  
(tio)uracilo, 5(metil)4(tio)uracilo, 5(metilaminometil)-  
4(tio)uracilo, 5(metil)2,4(ditio)uracilo,  
10 5(metilaminometil)-2,4(ditio)uracilo, 5(2-  
aminopropil)uracilo, 5-(alquil)uracilo, 5-(alquinil)uracilo,  
5-(alilamino)uracilo, 5(aminoalil)uracilo,  
5(aminoalquil)uracilo, 5(guanidinilalquil)uracilo, 5(1,3-  
diazol-1-alquil)uracilo, 5-(cianoalquil)uracilo, 5-  
15 (dialquilaminoalquil)uracilo, 5(dimetilaminoalquil)uracilo,  
5-(halo)uracilo, 5-(metoxi)uracilo, ácido uracil-5-  
oxiacético, 5(metoxicarbonilmetil)-2-(tio)uracilo,  
5(metoxicarbonilmetil)uracilo, 5(propinil)uracilo,  
5(propinil)uracilo, 5(trifluorometil)uracilo, 6(azo)uracilo,  
20 dihidrouracilo, N3(metil)uracilo, 5-uracilo (es decir,  
pseudouracilo), 2(tio)pseudouracilo, 4(tio)pseudouracilo,  
2,4-(ditio)pseudouracilo, 5-(alquil)pseudouracilo, 5-  
(metil)pseudouracilo, 5-(alquil)-2-(tio)pseudouracilo, 5-  
(metil)-2-(tio)pseudouracilo, 5-(alquil)-  
25 4(tio)pseudouracilo, 5-(metil)-4(tio)pseudouracilo, 5-  
(alquil)-2,4(ditio)pseudouracilo, 5-(metil)-  
2,4(ditio)pseudouracilo, pseudouracilo 1-sustituido,  
2(tio)-pseudouracilo 1-sustituido, 4(tio)pseudouracilo 1-  
sustituido, 2,4-(ditio)pseudouracilo 1-sustituido, 1  
30 (aminocarboniletilenil)-pseudouracilo, 1  
(aminocarboniletilenil)-2(tio)-pseudouracilo, 1  
(aminocarboniletilenil)-4(tio)pseudouracilo, 1

aminocarboniletilenil)-2,4-(ditio)pseudouracilo, 1  
(aminoalquilaminocarboniletilenil)-pseudouracilo, 1  
(aminoalquilaminocarboniletilenil)-2(tio)-pseudouracilo,  
1(aminoalquilaminocarboniletilenil)-4(tio)pseudouracilo, 1  
5 (aminoalquilaminocarboniletilenil)-2,4-(ditio)pseudouracilo,  
1,3-(diazaz)-2-(oxo)-fenoxazin-1-ilo, 1-(aza)-2-(tio)-3-  
(aza)-fenoxazin-1-ilo, 1,3-(diazaz)-2-(oxo)-fentiazin-1-ilo,  
1-(aza)-2-(tio)-3-(aza)-fentiazin-1-ilo, 1,3-(diazaz)-2-  
(oxo)-fenoxazin-1-ilo 7-sustituido, 1-(aza)-2-(tio)-3-  
10 (aza)-fenoxazin-1-ilo 7-sustituido, 1,3-(diazaz)-2-(oxo)-  
fentiazin-1-ilo 7-sustituido, 1-(aza)-2-(tio)-3-(aza)-  
fentiazin-1-ilo 7-sustituido, 7-(aminoalquilhidroxi)-1,3-  
(diazaz)-2-(oxo)-fenoxazin-1-ilo, 7-(aminoalquilhidroxi)-1-  
(aza)-2-(tio)-3-(aza)-fenoxazin-1-ilo, 7-  
15 (aminoalquilhidroxi)-1,3-(diazaz)-2-(oxo)-fentiazin-1-ilo,  
7-(aminoalquilhidroxi)-1-(aza)-2-(tio)-3-(aza)-fentiazin-1-  
ilo, 7-(guanidinioalquilhidroxi)-1,3-(diazaz)-2-(oxo)-  
fenoxazin-1-ilo, 7-(guanidinioalquilhidroxi)-1-(aza)-2-  
(tio)-3-(aza)-fenoxazin-1-ilo, 7-(guanidinioalquil-  
20 hidroxi)-1,3-(diazaz)-2-(oxo)-fentiazin-1-ilo, 7-  
(guanidinioalquilhidroxi)-1-(aza)-2-(tio)-3-(aza)-  
fentiazin-1-ilo, 1,3,5-(triazaz)-2,6-(dioxaz)-naftaleno,  
inosina, xantina, hipoxantina, nubularina, tubercidina,  
isoguanisina, inosinilo, 2-aza-inosinilo, 7-desaza-  
25 inosinilo, nitroimidazolilo, nitropirazolilo,  
nitrobencimidazolilo, nitroindazolilo, aminoindolilo,  
pirrolopirimidinilo, 3-(metil)isocarbostirililo, 5-  
(metil)isocarbostirililo, 3-(metil)-7-  
(propinil)isocarbostirililo, 7-(aza)indolilo, 6-(metil)-7-  
30 (aza)indolilo, imidizopiridinilo, 9-(metil)-  
imidizopiridinilo, pirrolopiricinilo, isocarbostirililo, 7-  
(propinil)isocarbostirililo, propinil-7-(aza)indolilo,

2,4,5-(trimetil)fenilo, 4-(metil)indolilo, 4,6-(dimetil)indolilo, fenilo, naftalenilo, antracenilo, fenantracenilo, pirenilo, estilbenilo, tetracenilo, pentacenilo, diilfluorotolilo, 4-(ilfluoro)-6-(metil)bencimidazol, 4-(metil)bencimidazol, 6-(azo)timina, 2-piridinona, 5-nitroindol, 3-nitropirrol, 6-(aza)pirimidina, 2(amino)purina, 2,6-(diamino)purina, pirimidinas 5-sustituidas, purinas sustituidas en N2, purinas sustituidas en N6, purinas sustituidas en 6, 1,2,4-triazoles sustituidos, pirrolo-pirimidin-2-on-3-ilo, 6-fenil-pirrolo-pirimidin-2-on-3-ilo, 6-fenil-pirrolo-pirimidin-2-on-3-ilo para-sustituido, 6-fenil-pirrolo-pirimidin-2-on-3-ilo orto-sustituido, 6-fenil-pirrolo-pirimidin-2-on-3-ilo bis-orto-sustituido, para-(aminoalquilhidroxi)-6-fenil-pirrolo-pirimidin-2-on-3-ilo, orto-(aminoalquilhidroxi)-6-fenil-pirrolo-pirimidin-2-on-3-ilo, bis-orto-(aminoalquilhidroxi)-6-fenil-pirrolo-pirimidin-2-on-3-ilo, piridopirimidin-3-ilo, 2-oxo-7-amino-piridopirimidin-3-ilo, 2-oxo-piridopirimidine-3-ilo o cualquier derivado O-alquilado o N-alquilado de los mismos.

Los oligonucleótidos antisentido de la invención pueden ser oligonucleótidos quiméricos. Los compuestos antisentido quiméricos de la invención pueden formarse como estructuras compuestas de dos o más oligonucleótidos, oligonucleótidos modificados, oligonucleótidos y/o miméticos de oligonucleótido como se ha descrito anteriormente. Dichos compuestos también se han denominado en la técnica híbridos u oligómeros con huecos. En particular, un oligómero con huecos es un oligonucleótido que tiene al menos tres partes diferenciadas, dos de las cuales son similares, es decir, incluyen una o más modificaciones de la estructura principal, y rodean una

región que es distinta, es decir, que no incluye modificaciones de la estructura principal.

Los oligonucleótidos pueden incluir una especie molecular en uno o ambos extremos, es decir, en el extremo 3' y/o 5'. Una especie molecular como se usa en el presente documento se refiere a cualquier compuesto que no sea un nucleótido natural o artificial. Las especies moleculares incluyen, pero sin limitación, un espaciador, un lípido, un esteroil, fracciones lipídicas tales como una fracción de colesterol, ácido cólico, un tioéter, por ejemplo, hexil-S-tritiltiol, un tiocolesterol, una cadena alifática, por ejemplo, dodecandiol o restos undecilo, un fosfolípido, por ejemplo, di-hexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato de trietilamonio, una poliamina o una cadena de polietilenglicol o ácido acético de adamantano, una fracción palmitilo, una fracción octadecilamina o hexilamino-carbonil-oxicolesterol, estearilo, cadena alquilo C16, ácidos biliares, ácido cólico, ácido taurocólico, desoxicolato, ácido oleil-litocólico, ácido oleoil-colénico, glicolípidos, fosfolípidos, esfingolípidos, isoprenoides tales como esteroides, vitaminas tales como vitamina E, ácidos grasos saturados, ácidos grasos insaturados, ésteres de ácidos grasos tales como triglicéridos, pirenos, porfirinas, texafirina, adamantano, acridinas, biotina, cumarina, fluoresceína, rodamina, rojo Texas, digoxigenina, dimetoxitritilo, t-butildimetilsililo, t-butildifenilsililo, colorantes de cianina (por ejemplo, Cy3 o Cy576), colorante Hoechst 33258, psoraleno o ibuprofeno.

Las especies moleculares pueden estar unidas en diversas posiciones del oligonucleótido. Como se ha descrito anteriormente, las especies moleculares pueden

estar unidas al extremo 3' o 5' del oligonucleótido, donde también sirve para aumentar la estabilidad del oligómero frente a las exonucleasas 3' o 5'. Como alternativa, puede estar unido a un nucleótido interno o a un nucleótido de una ramificación. La especie molecular puede estar unida a una posición 2' del nucleótido. Las especies moleculares también pueden estar unidas a la base heterocíclica del nucleótido.

La especie molecular puede estar conectada al oligonucleótido por una fracción enlazadora. Opcionalmente, la fracción enlazadora es una fracción enlazadora no nucleotídica. Los enlazadores no nucleotídicos son, por ejemplo, restos abásicos (DSpacer), oligoetilenglicol tal como trietilenglicol o hexaetilenglicol, o alcano-diol tal como butanodiol. Las unidades espaciadoras están preferentemente unidas por enlaces fosfodiéster o fosforotioato. Las unidades enlazadoras pueden aparecer solo una vez en la molécula o pueden incorporarse varias veces, por ejemplo, mediante enlaces fosfodiéster, fosforotioato, metilfosfonato o amida.

El oligonucleótido de la invención (separado de los enlazadores que conectan nucleótidos con las especies moleculares) también puede contener enlazadores no nucleotídicos, en particular, enlazadores abásicos (dSpacers), unidades de trietilenglicol o unidades de hexaetilenglicol. Otros enlazadores preferidos son enlazadores de alquilamino tales como enlazadores amino C3, C6 y C12, y también enlazadores alquiltiol tales como enlazadores tiol C3 o C6.

El TNF- $\alpha$  desempeña un papel en una amplia variedad de trastornos relacionados con TNF- $\alpha$ . Un trastorno de TNF- $\alpha$  como se usa en el presente documento se refiere a un

trastorno en el que la actividad de TNF- $\alpha$  es perjudicial para una determinada función fisiológica en un sujeto. Como se usa en el presente documento, la expresión "un trastorno en el que la actividad de TNF- $\alpha$  es perjudicial" pretende

5 incluir enfermedades y otros trastornos en los que los niveles de TNF- $\alpha$  expresados en un sujeto que padece el trastorno desempeñan un papel en la fisiopatología del trastorno o como un factor que contribuye al empeoramiento o mantenimiento del trastorno. Por consiguiente, un

10 trastorno en el que la actividad de TNF- $\alpha$  es perjudicial es un trastorno en el que se espera que la inhibición de la actividad de TNF- $\alpha$  alivie al menos un síntoma y/o la progresión o el empeoramiento del trastorno. Dichos trastornos pueden evidenciarse, por ejemplo, mediante un

15 aumento de la concentración de TNF- $\alpha$  en un fluido biológico de un sujeto que padece el trastorno (por ejemplo, un aumento en la concentración de TNF- $\alpha$  en suero, plasma, líquido sinovial, etc. del sujeto), que puede detectarse, por ejemplo, usando una sonda de TNF- $\alpha$  o un anticuerpo

20 anti-TNF- $\alpha$  para detectar el mensaje de TNF- $\alpha$  o la proteína, respectivamente.

Los trastornos de TNF- $\alpha$  incluyen pero, sin limitación, sepsis, infecciones, enfermedades autoinmunes, cáncer, rechazo de trasplante y enfermedad de injerto contra

25 hospedador, rechazo de trasplante, malignidad, un trastorno pulmonar, un trastorno intestinal, un trastorno cardíaco, sepsis, una espondiloartropatía, un trastorno metabólico, anemia, dolor, un trastorno hepático, un trastorno cutáneo, alteraciones en las uñas, artritis reumatoide, soriasis, soriasis en combinación con artritis soriásica, colitis

30 ulcerosa, enfermedad de Crohn, vasculitis, enfermedad de Behcet, espondilitis anquilosante, asma, enfermedad

pulmonar obstructiva crónica (EPOC), fibrosis pulmonar idiopática (FPI), restenosis, diabetes, anemia, dolor, un trastorno relacionado con la enfermedad de Crohn, artritis reumatoide juvenil (ARJ), una infección por el virus de la hepatitis C, artritis soriásica y soriasis en placa crónica.

A continuación, se describe el papel biológico desempeñado por el TNF- $\alpha$  en varias de estas enfermedades. La inhibición de la expresión de TNF- $\alpha$  en estas enfermedades proporciona un tratamiento terapéutico para el trastorno. El TNF- $\alpha$  desempeña un papel en la sepsis. Los efectos biológicos incluyen hipotensión, supresión miocárdica, síndrome de pérdida vascular, necrosis de órganos, estimulación de la liberación de mediadores secundarios tóxicos y activación de la cascada de coagulación.

El TNF- $\alpha$  se ha implicado en la enfermedad autoinmune, por ejemplo, activando la inflamación tisular y causando la destrucción de la articulación en la artritis reumatoide, potenciando la muerte de las células de los islotes y mediando la resistencia a la insulina en la diabetes, mediando la citotoxicidad hacia los ligodendrocitos y la inducción de placas inflamatorias en la esclerosis múltiple, mediando la citotoxicidad hacia los oligodendrocitos y la inducción de placas inflamatorias en la esclerosis múltiple, y en el desarrollo de la enfermedad de Crohn.

Los efectos biológicos observados en una variedad de enfermedades infecciosas se deben al TNF- $\alpha$ . Por ejemplo, el TNF- $\alpha$  se ha implicado en la mediación de la inflamación cerebral y la trombosis capilar y el infarto en la malaria, mediando la inflamación cerebral, induciendo la ruptura de la barrera hematoencefálica, activando el síndrome del choque séptico y activando el infarto venoso en la

meningitis, y en la inducción de la caquexia, estimulando la proliferación vírica y mediando en la lesión del sistema nervioso central en el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).

5 El TNF- $\alpha$  también se ha implicado como un mediador clave del rechazo de aloinjertos y de la enfermedad del injerto contra el hospedador (GVHD) y en la mediación de una reacción adversa que se ha observado cuando se usa el anticuerpo OKT3 de rata, dirigido contra el complejo CD3  
10 del receptor de linfocitos T para inhibir el rechazo de los trasplantes renales.

El TNF- $\alpha$  se ha implicado en la inducción de la caquexia, estimulando el crecimiento tumoral, potenciando el potencial metastásico y mediando la citotoxicidad en los  
15 tumores malignos.

Los trastornos pulmonares también están relacionados con el TNF- $\alpha$ . Por ejemplo, el TNF- $\alpha$  desempeña un papel en el síndrome de dificultad respiratoria del adulto (SDRA), incluyendo la estimulación de la activación leucocitaria-  
20 endotelial, dirigiendo la citotoxicidad a los neumocitos e induciendo el síndrome de pérdida vascular. Las composiciones de la invención se pueden usar para tratar diversos trastornos pulmonares, incluyendo el síndrome de dificultad respiratoria del adulto, pulmón de choque,  
25 enfermedad pulmonar inflamatoria crónica, sarcoidosis pulmonar, fibrosis pulmonar, silicosis, enfermedad pulmonar intersticial idiopática y trastornos obstructivos crónicos de las vías respiratorias. Los ejemplos de trastornos obstructivos crónicos de las vías respiratorias incluyen el  
30 asma y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).

Los trastornos intestinales inflamatorios incluyendo la enfermedad de Crohn también están asociados con el TNF.

Los ejemplos de trastornos relacionados con la enfermedad de Crohn incluyen fístulas en la vejiga, la vagina y la piel; obstrucciones intestinales; abscesos; deficiencias nutricionales; complicaciones del uso de corticosteroides; inflamación de las articulaciones; eritema nodoso; pioderma gangrenoso; y lesiones del ojo.

El TNF- $\alpha$  desempeña un papel en los trastornos cardíacos o coronarios, incluyendo la isquemia del corazón. Un trastorno cardíaco en el que la actividad de TNF- $\alpha$  es perjudicial pretende incluir enfermedades coronarias y cardiovasculares en las que se ha demostrado que la presencia de TNF- $\alpha$  en un sujeto que padece el trastorno es o se sospecha que es responsable de la fisiopatología del trastorno o un factor que contribuye a un empeoramiento del trastorno, incluyendo trastornos cardiovasculares, por ejemplo, restenosis. Estos trastornos se refieren a cualquier enfermedad, trastorno o estado que implique al sistema cardiovascular, por ejemplo, el corazón, los vasos sanguíneos y/o la sangre. Los ejemplos de un trastorno cardiovascular incluyen, pero sin limitación, enfermedad de las arterias coronarias, angina de pecho, infarto de miocardio, daño en el tejido cardiovascular causado por paro cardíaco, daño en el tejido cardiovascular causado por una derivación cardíaca, choque cardiogénico e hipertensión, aterosclerosis, espasmo de las arterias coronarias, enfermedad de las arterias coronarias, enfermedad valvular, arritmias y cardiomiopatías.

Las enfermedades inflamatorias tales como las espondiloartropatías también se ven agravadas por el TNF- $\alpha$ . La espondiloartropatía se refiere a una cualquiera de varias enfermedades que afectan a las articulaciones de la columna vertebral, compartiendo dichas enfermedades rasgos

clínicos, radiológicos e histológicos comunes.

Los trastornos metabólicos tales como la diabetes y la obesidad se han relacionado con el TNF- $\alpha$ . La expresión trastorno metabólico se refiere a enfermedades o trastornos que afectan a cómo el organismo procesa sustancias necesarias para llevar a cabo funciones fisiológicas. Los ejemplos de diabetes incluyen diabetes mellitus de tipo 1, diabetes mellitus de tipo 2, neuropatía diabética, neuropatía periférica, retinopatía diabética, ulceraciones diabéticas, ulceraciones de retinopatía, macrovasculopatía diabética y obesidad.

El TNF- $\alpha$  se ha implicado en el desarrollo de anemias. Una anemia es un número anormalmente bajo de glóbulos rojos circulantes o una disminución de la concentración de hemoglobina en la sangre. Los ejemplos de anemia relacionados con la artritis reumatoide incluyen, por ejemplo, anemia de enfermedad crónica, anemia por deficiencia de hierro y anemia hemolítica autoinmune.

El TNF- $\alpha$  también se ha implicado en una amplia variedad de síndromes de dolor. El término "dolor", como se usa en el presente documento, se refiere a todos los tipos de dolor incluyendo dolores agudos y crónicos, tales como dolor neuropático y dolor postoperatorio, dolor lumbar crónico, cefaleas en racimos, neuralgia de herpes, dolor de miembro fantasma, dolor central, dolor dental, dolor resistente a opiáceos, dolor visceral, dolor quirúrgico, dolor por lesión ósea, dolor durante el parto, dolor resultante de quemaduras incluyendo quemaduras solares, dolor postparto, migraña, dolor de angina y dolor relacionado con el tracto genitourinario incluyendo la cistitis. El término también incluye dolor nociceptivo o nocicepción.

Los trastornos hepáticos también se asocian con el TNF- $\alpha$ . Los trastornos hepáticos incluyen enfermedades y otros trastornos del hígado o afecciones asociadas con la lesión hepatocelular o trastornos del tracto biliar en los que se ha demostrado que la presencia de TNF- $\alpha$  en un sujeto que padece el trastorno es o se sospecha que es responsable de la fisiopatología del trastorno o un factor que contribuye a un empeoramiento del trastorno. Los trastornos hepáticos incluyen trastornos asociados con las lesiones hepatocelulares, incluyendo la cirrosis alcohólica, deficiencia de la antitripsina  $\alpha_1$ , cirrosis autoinmune, cirrosis criptogénica, hepatitis fulminante, hepatitis B y C y esteatohepatitis. Los ejemplos de trastornos de las vías biliares incluyen fibrosis quística, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante y obstrucción biliar

El TNF- $\alpha$  se ha implicado en trastornos cutáneos y alteraciones de las uñas. Un trastorno cutáneo se refiere a anomalías, aparte de las heridas por lesión, de la piel afectada por la inflamación. Los ejemplos de trastornos cutáneos incluyen, pero sin limitación, soriasis, pénfigo vulgar, esclerodermia, dermatitis atópica, sarcoidosis, eritema nudoso, hidradenitis supurativa, liquen plano, síndrome de Sweet y vitíligo.

El TNF- $\alpha$  se ha implicado en vasculitis, un grupo de trastornos que se caracterizan por la inflamación de los vasos sanguíneos. Los ejemplos de vasculitis en los que la actividad de TNF- $\alpha$  es perjudicial incluyen, pero sin limitación, enfermedad de Behcet, enfermedades de vasos grandes tales como arteritis de células gigantes, polimialgia reumática y enfermedad de Takayasu o arteritis, enfermedades de vasos medios tales como poliarteritis nodosa clásica y enfermedad de Kawasaki o enfermedades de

vasos pequeños tales como el síndrome de Behcet, granulomatosis de Wegner, poliangitis microscópica, vasculitis de hipersensibilidad, vasculitis de vasos pequeños, púrpura de Henoch-Schonlein, granulamotosis alérgica y vasculitis, y vasculitis aislada del sistema nervioso central y tromboangitis obliterante.

Otros diversos trastornos en los que la actividad de TNF- $\alpha$  es perjudicial incluyen, pero sin limitación, artritis juvenil, endometriosis, prostatitis, neovascularización coroidea, ciática, síndrome de Sjogren, uveítis, degeneración macular húmeda, osteoporosis, artrosis, trastornos inflamatorios óseos, enfermedad de resorción ósea, alteraciones de coagulación, quemaduras, lesión por reperfusión, formación de queloides, formación de tejido cicatricial, pirexia, enfermedad periodontal, obesidad, toxicidad por radiación, caquexia relacionada con la edad, enfermedad de Alzheimer, edema cerebral, lesión cerebral inflamatoria, cáncer, síndrome de fatiga crónica, dermatomiositis, reacciones a fármacos tales como el síndrome de Stevens-Johnson y la reacción de Jarisch-Herxheimer, edema en y/o alrededor de la médula espinal, fiebre periódica familiar, síndrome de Felty, fibrosis, glomerulonefritis (por ejemplo, glomerulonefritis postestreptocócica o nefropatía por IgA), aflojamiento de prótesis, poliangiítis microscópica, trastorno del tejido conjuntivo mixto, mieloma múltiple, cáncer y caquexia, trastorno multiorgánico, síndrome mielodisplásico, osteólisis de orquitis, pancreatitis incluyendo abscesos agudos, crónicos y pancreáticos, polimiositis, insuficiencia renal progresiva, pseudogota, pioderma gangrenoso, policondritis recidivante, enfermedad cardíaca reumática, sarcoidosis, colangitis esclerosante, apoplejía,

reparación de aneurisma aórtico toracoabdominal (TAAA),  
síndrome periódico asociado a los receptores de TNF (TRAPS),  
síntomas relacionados con la vacunación contra la fiebre  
amarilla, enfermedades inflamatorias asociadas con el oído,  
5 inflamación crónica del oído, otitis media crónica con o  
sin colesteatoma, inflamación del oído pediátrica, miotosis,  
cáncer de ovario, cáncer colorrectal, terapia asociada con  
síndrome inflamatorio inducido (por ejemplo, síndromes tras  
la administración de IL-2) y trastornos asociados con una  
10 lesión por reperfusión.

Los oligonucleótidos pueden administrarse solos o en  
combinación con otro agente terapéutico para el tratamiento  
de un trastorno de TNF- $\alpha$ . Los ejemplos no limitantes de  
agentes terapéuticos con los que se puede combinar el  
15 inhibidor de TNF- $\alpha$  de la invención incluyen los siguientes:  
fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE); fármacos  
antiinflamatorios supresores de citocinas (CSAID); CDP-  
571/BAY-10-3356 (anticuerpo anti-TNF- $\alpha$  humanizado;  
Celltech/Bayer); cA2/infliximab (anticuerpo anti-TNF- $\alpha$   
20 quimérico; Centocor); TNFR de 75 kD-IgG/etanercept  
(proteína de fusión del receptor de TNF de 75 kD-IgG,  
Immunex, TNF de 55 kD-IgG (proteína de fusión del receptor  
del TNF de 55 kD-IgG, Hoffmann-LaRoche), IDEC-CE9/SB 210396  
(anticuerpo anti-CD4 primatizado no en agotamiento;  
25 IDEC/SmithKline, DAB 486-IL-2 y/o DAB 389-IL-2 (proteínas  
de fusión IL-2, Seragen, Anti-Tac (anti-IL-2R $\alpha$  humanizada,  
Protein Design Labs/Roche); IL-4 (citocina anti-  
inflamatoria, DNAX/Schering), IL-10 (SCH 52000; IL-10  
recombinante, citocina antiinflamatoria; DNAX/Schering);  
30 IL-4; agonistas de IL-10 y/o IL-4 (por ejemplo, anticuerpos  
agonistas); AR de IL-1 (antagonista del receptor de IL-1,  
Synergen/Amgen); anakinra (Kineret/Amgen); TNF-bp/s-TNF

(proteína de unión a TNF soluble); R973401 (inhibidor de la fosfodiesterasa de tipo IV; MK-966 (inhibidor de COX-2; Iloprost; metotrexato; talidomida y fármacos relacionados con la talidomida (por ejemplo, Celgen); leflunomida  
5 (inhibidor antiinflamatorio y de citocinas; ácido tranexámico (inhibidor de la activación del plasminógeno; T-614 (inhibidor de citocinas, prostaglandina E1; Tenidap (fármaco antiinflamatorio no esteroideo, Naproxeno (fármaco antiinflamatorio no esteroideo, Meloxicam (fármaco  
10 antiinflamatorio no esteroideo); Ibuprofeno (fármaco antiinflamatorio no esteroideo); Piroxicam (fármaco antiinflamatorio no esteroideo); Diclofenaco (fármaco antiinflamatorio no esteroideo); Indometacina (fármaco antiinflamatorio no esteroideo); Sulfasalazina; Azatioprina;  
15 Inhibidor de ICE (inhibidor de la enzima convertora de la enzima interleucina-1-beta); zap-70 y/o inhibidor de Ick (inhibidor de la tirosina quinasa zap-70 o Ick); inhibidor de VEGF y/o inhibidor de VEGF-R (inhibidores del factor de crecimiento de células endoteliales vasculares o receptor  
20 del factor de crecimiento de células endoteliales vasculares; inhibidores de la angiogénesis); fármacos antiinflamatorios corticosteroides (por ejemplo, SB203580); inhibidores de TNF-convertasa; anticuerpos anti-IL-12; anticuerpos anti-IL-18; interleucina-11; interleucina-13;  
25 inhibidores de la interleucina-17; oro; penicilamina; cloroquina; hidroxiclороquina; clorambucil; ciclosporina; ciclofosfamida; irradiación linfóide total; globulina anti-timocitos; anticuerpos anti-CD4; toxinas CD5; péptidos y colágeno administrados por vía oral; Lobenzarit disódico;  
30 agentes reguladores de citocinas (CRA) HP228 y HP466 (Houghten Pharmaceuticals, Inc.); oligodesoxinucleótidos de fosforotioato antisentido ICAM-1 (ISIS 2302, Isis

Pharmaceuticals, Inc.); receptor de complemento soluble 1 (TP10; T Cell Sciences, Inc.); prednisona; orgoteína; polisulfato de glicosaminoglicano; minociclina; anticuerpos anti-IL2R; lípidos marinos y botánicos (ácidos grasos de  
5 semillas de plantas y de peces, auranofina, fenilbutazona, ácido meclofenámico, ácido flufenámico, inmunoglobulina intravenosa, zileutón, azaribina, ácido micofenólico (RS-61443), tacrolimus (FK-506), sirolimus (rapamicina); amiprilosa (terafectina), cladribina (2-  
10 clorodesoxiadenosina), metotrexato, antivíricos; y agentes inmunomoduladores.

La toxicidad y la eficacia de los protocolos profilácticos y/o terapéuticos de la presente invención se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos  
15 convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la  $DL_{50}$  (la dosis letal para el 50 % de la población) y la  $DE_{50}$  (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población). La proporción de dosis entre los efectos tóxicos y  
20 terapéuticos es el índice terapéutico, y puede expresarse como la proporción de  $DL_{50}/DE_{50}$ . Se prefieren los agentes profilácticos y/o terapéuticos que presentan altos índices terapéuticos. Aunque se pueden usar agentes profilácticos y/o terapéuticos que presenten efectos secundarios tóxicos,  
25 se debe tener cuidado de diseñar un sistema de suministro que dirija dichos agentes al sitio del tejido afectado con el fin de reducir al mínimo el daño potencial a células no infectadas y, por lo tanto, reducir los efectos secundarios.

Los datos obtenidos a partir de los ensayos de  
30 cultivos celulares y los estudios con animales se pueden usar para formular una selección de dosis de los agentes profilácticos y/o terapéuticos para su uso en seres humanos.

La dosis de dichos agentes está preferentemente en un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la DE<sub>50</sub> con poca o ninguna toxicidad. La dosis puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la vía de administración utilizada. Para cualquier agente usado en el método de la invención, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Se puede formular una dosis en modelos con animales para conseguir un intervalo de concentraciones en plasma circulantes que incluya la CI<sub>50</sub> (es decir, la concentración del compuesto de ensayo que logra una inhibición semimáxima de los síntomas) determinada en cultivo celular. Dicha información se puede usar para determinar con mayor exactitud las dosis útiles en seres humanos. Los niveles en plasma se pueden medir, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alta resolución. Una serie de estudios ha examinado las dosis óptimas para los oligonucleótidos antisentido.

En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas pueden comprender, por ejemplo, al menos aproximadamente el 0.1 % de un compuesto activo. En otras realizaciones, el compuesto activo puede comprender entre aproximadamente el 2 % y aproximadamente el 75 % del peso de la unidad, o entre aproximadamente el 25 % y aproximadamente el 60 %, por ejemplo, y cualquier intervalo derivable en el mismo.

Las presentes dosis de los compuestos descritos en el presente documento varían normalmente de aproximadamente 0.1 µg a 10000 mg, más normalmente de aproximadamente 1 µg/día a 8000 mg, y lo más normalmente de aproximadamente 10 µg a 100 µg. Establecidas en términos del peso corporal

del sujeto, las dosis típicas varían de aproximadamente

|    |                                              |                          |                                                             |
|----|----------------------------------------------|--------------------------|-------------------------------------------------------------|
|    | 1 microgramo/kg/peso                         | corporal,                | aproximadamente                                             |
|    | 5 microgramos/kg/peso                        | corporal,                | aproximadamente                                             |
|    | 10 microgramos/kg/peso                       | corporal,                | aproximadamente                                             |
| 5  | 50 microgramos/kg/peso                       | corporal,                | aproximadamente                                             |
|    | 100 microgramos/kg/peso                      | corporal,                | aproximadamente                                             |
|    | 200 microgramos/kg/peso                      | corporal,                | aproximadamente                                             |
|    | 350 microgramos/kg/peso                      | corporal,                | aproximadamente                                             |
|    | 500 microgramos/kg/peso                      | corporal,                | aproximadamente                                             |
| 10 | 1 miligramo/kg/peso                          | corporal,                | aproximadamente                                             |
|    | 5 miligramos/kg/peso                         | corporal,                | aproximadamente                                             |
|    | 10 miligramos/kg/peso                        | corporal,                | aproximadamente                                             |
|    | 50 miligramos/kg/peso                        | corporal,                | aproximadamente                                             |
|    | 100 miligramos/kg/peso                       | corporal,                | aproximadamente                                             |
| 15 | 200 miligramos/kg/peso                       | corporal,                | aproximadamente                                             |
|    | 350 miligramos/kg/peso                       | corporal,                | aproximadamente                                             |
|    | 500 miligramos/kg/peso                       | corporal,                | hasta aproximadamente 1000                                  |
|    | mg/kg/peso                                   | corporal                 | o más por administración, y cualquier                       |
|    | intervalo derivable                          | en el mismo.             | En los ejemplos no                                          |
| 20 | limitantes de un intervalo derivable         | de los números           | enumerados en el presente documento, se puede administrar   |
|    | un intervalo de aproximadamente 5 mg/kg/peso | corporal                 | a                                                           |
|    | aproximadamente 100 mg/kg/peso               | corporal,                | aproximadamente                                             |
|    | 5 microgramos/kg/peso                        | corporal                 | hasta aproximadamente                                       |
| 25 | 500 miligramos/kg/peso                       | corporal,                | etc., basándose en los                                      |
|    | números descritos anteriormente.             | La cantidad absoluta     | dependerá de una variedad de factores incluyendo el         |
|    | tratamiento concurrente,                     | el número de dosis y los | parámetros individuales del paciente, incluyendo la edad,   |
| 30 | el estado físico, el tamaño y el peso.       | Estos son factores       | bien conocidos por los expertos en la materia, y pueden ser |
|    | tratados solo con una experimentación        | rutinaria.               | Se                                                          |

prefiere, en general, el uso de una dosis máxima, es decir, la dosis segura más alta de acuerdo con un juicio médico razonable.

También se contemplan dosis múltiples de las moléculas de la invención. En algunos casos, cuando se administran las moléculas de la invención con otro agente terapéutico, por ejemplo, un agente antiinflamatorio, se usa una dosificación subterapéutica bien de las moléculas o del otro agente, o una dosis subterapéutica de ambos en el tratamiento de un sujeto que tiene o está en riesgo de desarrollar un trastorno del TNF- $\alpha$ . Cuando se usan juntas las dos clases de fármacos, el otro agente se puede administrar a una dosis subterapéutica para producir un resultado terapéutico deseable. Una "dosis subterapéutica" como la usada en el presente documento se refiere a una dosis que es inferior a la dosis que produciría un resultado terapéutico en el sujeto si se administra en ausencia del otro agente. Por lo tanto, la dosis subterapéutica de un agente terapéutico es aquella que no produciría el resultado terapéutico deseado en el sujeto en ausencia de la administración de las moléculas de la invención. Las dosis terapéuticas de agentes útiles para tratar trastornos de TNF- $\alpha$  son bien conocidas en el campo de la medicina. Estas dosis se han descrito ampliamente en referencias tales como "Remington's Pharmaceutical Sciences"; así como muchas otras referencias médicas en las que se basa la profesión médica como guía para el tratamiento de enfermedades infecciosas, del cáncer y de enfermedades autoinmunes. Las dosis terapéuticas de oligonucleótidos también se han descrito en la técnica.

Las pautas posológicas pueden ser varias veces al día, todos los días, cada dos días, semanalmente, cada dos

semanas cualquier momento entre medias o con menos frecuencia. La expresión "dosificación quincenal", como se usa en el presente documento, se refiere al curso de tiempo de la administración de una sustancia (por ejemplo, un  
5 ácido nucleico anti-TNF- $\alpha$ ) a un sujeto una vez cada dos semanas. Los oligonucleótidos se pueden administrar cada 7-20 días, cada 11-17 días o cada 13-15 días, por ejemplo.

Los oligonucleótidos se administran en cantidades eficaces. La cantidad eficaz de un compuesto de la  
10 invención en el tratamiento de una enfermedad descrita en el presente documento puede variar dependiendo del compuesto específico usado, del modo de administración del compuesto y de si se usa solo o en combinación. La cantidad eficaz para cualquier aplicación particular también puede  
15 variar dependiendo de factores tales como la enfermedad que se esté tratando, el compuesto que se administre en particular, el tamaño del sujeto o la gravedad de la enfermedad o afección. Un experto habitual en la materia puede determinar empíricamente la cantidad eficaz de una  
20 determinada molécula de la invención sin la necesidad de realizar una experimentación excesiva. En combinación con las enseñanzas proporcionadas en el presente documento, escogiendo entre los diversos compuestos activos y factores de pesaje tales como la potencia, la biodisponibilidad  
25 relativa, el peso corporal del paciente, la gravedad de los efectos secundarios adversos y el modo preferido de administración, puede planificarse una pauta de tratamiento profiláctico o terapéutico eficaz que no genere toxicidad sustancial y, sin embargo, sea totalmente eficaz para  
30 tratar el sujeto en particular.

Los oligonucleótidos descritos en el presente documento se pueden usar solos o en conjugados con otras

moléculas tales como agentes de detección o citotóxicos en los métodos de detección y tratamiento de la invención, como se describe con más detalle en el presente documento.

El oligonucleótido puede estar, por ejemplo, acoplado o conjugado a un marcador detectable. Un marcador detectable es una fracción, cuya presencia se puede determinar directa o indirectamente. En general, la detección del marcador implica una emisión de energía por parte del marcador. El marcador se puede detectar directamente por su capacidad para emitir y/o absorber fotones u otras partículas atómicas de una determinada longitud de onda (por ejemplo, radiactividad, luminiscencia, densidad óptica o electrónica, etc.). Un marcador se puede detectar indirectamente por su capacidad para unirse, reclutar y, en algunos casos, escindir otra fracción que por sí misma puede emitir o absorber luz de una determinada longitud de onda (por ejemplo, marcador epitópico tal como epítipo FLAG, marcador enzimático tal como peroxidasa de rábano picante, etc.). Un ejemplo de detección indirecta es el uso de un primer marcador enzimático que escinde un sustrato en productos visibles. El marcador puede ser de naturaleza química, peptídica o de molécula de ácido nucleico, aunque no está limitada. Otros marcadores detectables incluyen isótopos radiactivos tales como  $P^{32}$  o  $H^3$ , marcadores luminiscentes tales como fluorocromos, marcadores de densidad óptica o electrónica, etc., o marcadores epitópicos tales como el epítipo FLAG o el epítipo HA, biotina, avidina y marcadores enzimáticos tales como peroxidasa de rábano picante,  $\beta$ -galactosidasa, etc. El marcador se puede unir a un oligonucleótido durante o tras su síntesis. Hay muchos marcadores diferentes y métodos de marcaje conocidos por los expertos en la materia. Los

ejemplos de los tipos de marcadores que se pueden usar en la presente invención incluyen enzimas, radioisótopos, compuestos fluorescentes, metales coloidales, compuestos quimioluminiscentes y compuestos bioluminiscentes. Los expertos habituales en la materia sabrán de otros marcadores adecuados para los oligonucleótidos descritos en el presente documento o podrán averiguarlos usando experimentación rutinaria. Además, el acoplamiento o la conjugación de estos marcadores a los oligonucleótidos de la invención se pueden realizar usando técnicas convencionales comunes para los expertos en la materia.

La conjugación de los oligonucleótidos con un marcador detectable facilita, entre otras cosas, el uso de dichos agentes en ensayos de diagnóstico. Otra categoría de marcadores detectables incluye marcadores de diagnóstico y de formación de imágenes (en general, denominadas marcadores detectables *in vivo*) tales como, por ejemplo, formación de imágenes por resonancia magnética (MRI): Gd(DOTA); para medicina nuclear:  $^{201}\text{Tl}$ , radionúclido emisor de gamma  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ; para la tomografía por emisión de positrones (PET): isótopos emisores de positrones,  $(^{18}\text{F})$ -fluorodesoxiglucosa ( $(^{18}\text{F})\text{FDG}$ ),  $(^{18}\text{F})$ -fluoruro, cobre-64, gadodiamida y radioisótopos de Pb(II) tales como  $^{203}\text{Pb}$ ;  $^{111}\text{In}$ . En dichos casos, se pudo observar el uso del oligonucleótido, ya que el oligonucleótido proporciona un efecto antisentido.

Las conjugaciones o modificaciones descritas en el presente documento emplean la química habitual, química que no forma parte de la invención y química que es muy conocida por los expertos en la materia química. El uso de grupos protectores y enlazadores conocidos tales como enlazadores mono- y hetero-bifuncionales están bien

documentados en la bibliografía, y no se repetirán en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, "conjugado" significa dos entidades unidas establemente entre sí por cualquier medio fisicoquímico. Es importante que la naturaleza de la unión sea tal que no perjudique esencialmente la eficacia de ninguna de las entidades. Teniendo en cuenta estos parámetros, se puede emplear cualquier enlace covalente o no covalente conocido por los expertos en la materia. En algunas realizaciones, se prefiere el enlace covalente. La conjugación no covalente incluye interacciones hidrófobas, interacciones iónicas, interacciones de alta afinidad tales como complejación de biotina-avidina y de biotina-estreptavidina, y otras interacciones de afinidad. Dichos medios y métodos de unión son bien conocidos por los expertos en la materia. Se puede usar una variedad de métodos para detectar el marcador, dependiendo de la naturaleza del marcador y de otros componentes de ensayo.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden una cantidad eficaz de uno o más agentes, disueltos o dispersados en un vehículo farmacéuticamente aceptable. La expresión "farmacéutica o farmacológicamente aceptables" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra reacción adversa cuando se administran a un animal tal como, por ejemplo, un ser humano, según lo apropiado. Además, para la administración a animales (por ejemplo, a seres humanos), se entenderá que las preparaciones deben cumplir con los patrones de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza según las exigencias de la Oficina de Patrones Biológicos

de la FDA. Los compuestos, en general, son adecuados para la administración a seres humanos. Dicha expresión requiere que un compuesto o una composición no sean tóxicos y sean suficientemente puros de manera que no se requiera manipulación adicional del compuesto o de la composición antes de la administración a seres humanos.

Como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, tensioactivos, antioxidantes, conservantes (por ejemplo, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos), agentes isotónicos, retardadores de la absorción, sales, conservantes, fármacos, estabilizantes de fármacos, geles, aglutinantes, excipientes, agentes de desintegración, lubricantes, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, colorantes, materiales similares y combinaciones de los mismos, como los conocidos por un experto habitual en la materia (véase, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences" (1990), incorporado en el presente documento por referencia). Excepto en la medida en que cualquier vehículo convencional sea incompatible con el principio activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas o farmacéuticas.

El agente puede comprender diferentes tipos de vehículos dependiendo de si se va a administrar en forma sólida, líquida o en aerosol, y si necesita ser estéril para vías de administración tales como la inyección. La presente invención puede administrarse por vía intravenosa, intradérmica, intraarterial, intralesional, intratumoral, intracraneal, intraarticular, intraprostática, intrapleural, intratraqueal, intranasal, intravítrea, intravaginal, intrarrectal, tópica, intratumoral, intramuscular,

intraperitoneal, subcutánea, subconjuntiva, intravesicular, mucosa, intrapericardial, intraumbilical, intraocular, oral, tópica, local, inhalación (por ejemplo, inhalación de aerosol), inyección, infusión, infusión continua, baño de perfusión localizada de células diana directamente, a través de un catéter, mediante lavado, en cremas, en composiciones lipídicas (por ejemplo liposomas) o por cualquier otro método o cualquier combinación de lo anterior como sería conocido por un experto habitual en la materia (véase, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences", incorporado en el presente documento por referencia). En una realización particular, se contempla la inyección intraperitoneal.

En cualquier caso, la composición puede comprender diversos antioxidantes para retardar la oxidación de uno o más componentes. Además, se puede conseguir la prevención de la acción de microorganismos por conservantes tales como diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, incluyendo, pero sin limitación, parabenos (por ejemplo, metilparabenos, propilparabenos), clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal o combinaciones de los mismos.

El agente puede formularse en una composición en forma de base libre, neutra o sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido, por ejemplo, las formadas con los grupos amino libres de una composición proteica o que están formadas con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como ácido acético, oxálico, tartárico o mandélico. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden derivarse de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férrico; o bases orgánicas tales

como isopropilamina, trimetilamina, histidina o procaína.

En las realizaciones en las que la composición está en una forma líquida, un vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que comprende, pero sin limitación, 5 agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido, etc.), lípidos (por ejemplo, triglicéridos, aceites vegetales, liposomas) y combinaciones de los mismos. Se puede mantener la fluidez adecuada, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina; mediante el mantenimiento del tamaño de 10 partícula requerido por la dispersión en vehículos tales como, por ejemplo, poliol líquido o lípidos; por el uso de tensioactivos tales como, por ejemplo, hidroxipropilcelulosa; o combinaciones de los mismos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos 15 tales como, por ejemplo, azúcares, cloruro de sodio o combinaciones de los mismos.

Los compuestos de la invención pueden administrarse directamente a un tejido. La administración directa de 20 tejidos se puede lograr mediante inyección directa. Los compuestos se pueden administrar una vez o, como alternativa, se pueden administrar en una pluralidad de administraciones. Si se administran múltiples veces, los compuestos se pueden administrar por vías diferentes. Por 25 ejemplo, las primeras (o unas cuantas de las primeras) administraciones pueden realizarse directamente en el tejido afectado mientras que las administraciones posteriores pueden ser sistémicas.

Las formulaciones de la invención se administran en 30 soluciones farmacéuticamente aceptables que pueden contener rutinariamente concentraciones farmacéuticamente aceptables de sal, agentes de tamponamiento, conservantes, vehículos

compatibles, adyuvantes y, opcionalmente, otros ingredientes terapéuticos.

De acuerdo con los métodos de la invención, el compuesto se puede administrar en una composición farmacéutica. En general, una composición farmacéutica comprende el compuesto de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Como se usa en el presente documento, un vehículo farmacéuticamente aceptable significa un material no tóxico que no interfiere en la eficacia de la actividad biológica de los principios activos.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen diluyentes, cargas, sales, tampones, estabilizantes, solubilizantes y otros materiales que son bien conocidos en la técnica. Dichas preparaciones pueden contener rutinariamente sal, agentes de tamponamiento, conservantes, vehículos compatibles y, opcionalmente, otros agentes terapéuticos. Cuando se usan en medicina, las sales deben ser farmacéuticamente aceptables, pero se pueden usar convenientemente sales no farmacéuticamente aceptables para preparar sales farmacéuticamente aceptables de las mismas, y no están excluidas del alcance de la invención. Dichas sales farmacológica y farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación, las preparadas a partir de los siguientes ácidos: clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, maleico, acético, salicílico, cítrico, fórmico, malónico, succínico y similares. También, las sales farmacéuticamente aceptables pueden prepararse como sales de metal alcalino o alcalinotérreo, tales como sales de sodio, potasio o calcio.

Los compuestos de la invención se pueden formular en preparaciones en forma sólida, semisólida, líquida o

gaseosa tales como comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, pomadas, soluciones, depósitos, inhalantes e inyecciones, y formas habituales para la administración oral, parenteral o quirúrgica. La invención también engloba composiciones farmacéuticas que se formulan para la administración local, tal como mediante implantes.

Las composiciones adecuadas para la administración oral pueden presentarse como unidades diferenciadas tales como cápsulas, comprimidos, grageas, conteniendo cada una cantidad predeterminada del agente activo. Otras composiciones incluyen suspensiones en líquidos acuosos o líquidos no acuosos tales como un jarabe, un elixir o una emulsión.

Para la administración oral, los compuestos se pueden formular fácilmente combinando los compuestos activos con vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Dichos vehículos permiten la formulación de los compuestos de la invención en forma de comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, pastas, suspensiones y similares, para la ingestión oral por parte de un sujeto que se va a tratar. Las preparaciones farmacéuticas para uso oral se pueden obtener como excipiente sólido, opcionalmente, triturando una mezcla resultante, y procesando la mezcla de gránulos, tras la adición de adyuvantes adecuados, si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de grageas. Los excipientes adecuados son, en particular, cargas tales como azúcares, incluyendo lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; preparaciones de celulosa tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica y/o

polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, se pueden añadir agentes desintegrantes tales como polivinilpirrolidona reticulada, agar o ácido algínico o una sal del mismo tal como alginato sódico. Opcionalmente, las formulaciones orales también pueden formularse en solución salina o tampones para neutralizar las condiciones ácidas internas o pueden administrarse sin ningún vehículo.

Los núcleos de grageas se proporcionan con recubrimientos adecuados. Para ello, se pueden usar soluciones concentradas de azúcar, que pueden contener, opcionalmente, goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol y/o dióxido de titanio, soluciones de laca y disolventes orgánicos o mezclas de disolventes adecuados. Se pueden añadir colorantes o pigmentos a los comprimidos o recubrimientos de grageas para la identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuesto activo.

Las preparaciones farmacéuticas que se pueden usar por vía oral incluyen cápsulas de ajuste a presión hechas de gelatina, así como cápsulas blandas selladas hechas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de empuje a presión pueden contener los principios activos en mezcla con carga tal como lactosa, aglutinantes tales como almidones y/o lubricantes tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizantes. En las cápsulas blandas, los compuestos activos pueden disolverse o suspenderse en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicoles líquidos. Además, se pueden añadir estabilizantes. También se pueden usar microsferas formuladas para la administración oral. Dichas microesferas han sido bien definidas en la técnica. Todas las

formulaciones para la administración oral deben estar en dosis adecuadas para dicha administración.

Para la administración bucal, las composiciones pueden adoptar la forma de comprimidos o grageas formuladas de manera convencional.

Para la administración por inhalación, los compuestos para su uso de acuerdo con la presente invención se pueden administrar convenientemente en forma de una presentación de pulverizado en aerosol desde envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propulsor adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación se puede determinar proporcionando una válvula para suministrar una cantidad dosificada. Las cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina para su uso en un inhalador o insuflador se pueden formular para contener una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón. Las técnicas de preparación de sistemas de suministro de aerosol son bien conocidas por los expertos en la materia. En general, dichos sistemas deben utilizar componentes que no afecten significativamente a las propiedades biológicas del agente activo (véase, por ejemplo, Sciarra y Cutie, "Aerosols", en "Remington's Pharmaceutical Sciences"). Los expertos en la materia pueden determinar fácilmente los diversos parámetros y condiciones para producir aerosoles sin recurrir a una experimentación excesiva.

Los compuestos, cuando se desea administrarlos sistémicamente, pueden formularse para la administración parenteral por inyección, por ejemplo, mediante inyección en bolo o infusión continua. Las formulaciones para

inyección pueden presentarse en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en envases multidosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden adoptar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilización y/o dispersión.

Las preparaciones para la administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas estériles. Los ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen agua, soluciones alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, incluyendo solución salina y medio tamponado. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico, lactato de Ringer o aceites no volátiles. Los vehículos intravenosos incluyen reponedores de fluidos y nutrientes, reponedores electrolíticos (tales como los basados en dextrosa de Ringer) y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes, y similares. Se producirán dosis inferiores a partir de formas de administración tales como la administración intravenosa. En el caso de que una respuesta en un sujeto sea insuficiente a las dosis iniciales aplicadas, se pueden emplear dosis superiores (o dosis eficazmente más altas por una vía de administración diferente y más localizada) en la medida en que la tolerancia del paciente lo permita. Se contemplan múltiples dosis al día para alcanzar niveles sistémicos apropiados de

los compuestos.

Las composiciones de la invención pueden formularse en una composición tópica para su administración en la piel o en una cavidad corporal. Los vehículos tópicos y los componentes de vehículos adecuados son bien conocidos en las técnicas cosmética y farmacéutica, e incluyen dichos vehículos (o componentes de vehículos) como agua; disolventes orgánicos tales como alcoholes (en particular, alcoholes inferiores fácilmente capaces de evaporarse de la piel tales como etanol), glicoles (tales como propilenglicol, butilenglicol y glicerina), alcoholes alifáticos (tales como lanolina); mezclas de agua y disolventes orgánicos (tales como agua y alcohol) y mezclas de disolventes orgánicos tales como alcohol y glicerina (opcionalmente, también con agua); materiales a base de lípidos tales como ácidos grasos, acilgliceroles (incluyendo aceites tales como aceite mineral y grasas de origen natural o sintético), fosfoglicéridos, esfingolípidos y ceras; materiales a base de proteínas tales como colágeno y gelatina; materiales a base de silicona (tanto no volátiles como volátiles) tales como ciclometicona, demeticonol y copoliol de dimeticona (Dow Corning); materiales a base de hidrocarburos tales como vaselina y escualano; tensioactivos aniónicos, catiónicos y anfóteros y jabones; vehículos de liberación sostenida tales como microesponjas y matrices poliméricas; agentes estabilizantes y de suspensión; agentes emulsionantes; y otros vehículos y componentes de vehículos que son adecuados para su administración en la piel, así como mezclas de componentes de vehículos tópicos como los identificados anteriormente o conocidos en la técnica. El vehículo puede incluir además componentes adaptados para

mejorar la estabilidad o efectividad de la formulación aplicada, tales como conservantes, antioxidantes, potenciadores de la penetración en la piel, materiales de liberación sostenida, y similares. Los ejemplos de dichos  
5 vehículos y componentes de vehículos son bien conocidos en la técnica y se describen en obras de referencia tales como Martindale - "The Extra Pharmacopoeia" (Pharmaceutical Press, Londres 1993) y Martin (ed.), "Remington's Pharmaceutical Sciences".

10 La elección de un vehículo adecuado dependerá de la forma física particular y del modo de suministro que debe alcanzar la formulación. Los ejemplos de formas adecuadas incluyen líquidos (por ejemplo, gargarismos y enjuagues bucales, incluyendo formas disueltas del catión de  
15 estroncio, así como suspensiones, emulsiones y similares); sólidos y semisólidos tales como geles, espumas, pastas, cremas, pomadas, "barras" (como en barras de labios o desodorantes en barra para la axila), polvos y similares; formulaciones que contienen liposomas u otras vesículas de  
20 suministro; supositorios rectales o vaginales, cremas, espumas, geles o pomadas; y otras formas. Los modos típicos de suministro incluyen la aplicación usando los dedos; la aplicación usando un aplicador físico tal como un paño, un tejido, un hisopo, un bastón o un cepillo (como se consigue,  
25 por ejemplo, empapando el aplicador con la formulación justo antes de la aplicación, o aplicando o adhiriendo un aplicador preparado que ya contiene la formulación, tal como un vendaje tratado o previamente humedecido, un trapo, toallita o bastón - en la piel); pulverizando (incluyendo  
30 la pulverización de bruma, aerosol o espuma); la aplicación en cuentagotas (como, por ejemplo, con gotas para los oídos); la aspersión (como con una forma en polvo adecuada

de la formulación); y mediante empapado.

Las formulaciones tópicas también incluyen formulaciones para la administración rectal y vaginal. Las formulaciones para la administración rectal pueden presentarse como un supositorio con una base adecuada que comprende, por ejemplo, manteca de cacao. Las formulaciones adecuadas para la administración vaginal pueden presentarse como comprimidos, pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones de pulverización que contienen, además del principio activo, vehículos tales como los conocidos en la técnica como apropiados.

En otras realizaciones más, un vehículo de suministro es una micropartícula o un implante biocompatible que es adecuado para su implantación en el mamífero receptor. Otros sistemas de suministro pueden incluir sistemas de liberación controlada, de liberación retardada o de liberación sostenida. Dichos sistemas pueden evitar administraciones repetidas del compuesto, aumentando la conveniencia para el sujeto y el médico. Hay muchos tipos de sistemas de liberación disponibles y conocidos por los expertos en la materia. Incluyen sistemas a base de polímeros tales como poli(lactida-glicolida), copolioxalatos, policaprolactonas, poliesteramidas, poliortoésteres, ácido polihidroxibutírico y polianhídridos.

En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos antisentido de la invención se formulan como una nanoestructura de autoensamblaje estable. La nanoestructura incluye un oligonucleótido antisentido de TNF- $\alpha$ , en el que el oligonucleótido antisentido está asociado con un núcleo. El núcleo puede ser un núcleo sólido o hueco, tal como un núcleo liposomal. Un núcleo sólido es un material de forma esférica que no tiene un centro hueco. El término esférico,

como se usa en el presente documento, se refiere a una forma general y no implica ni se limita a una esfera perfecta o forma redonda. Puede incluir imperfecciones.

Los núcleos sólidos pueden construirse a partir de una amplia variedad de materiales conocidos por los expertos en la materia, incluyendo, pero sin limitación: metales nobles (oro, plata), metales de transición (hierro, cobalto) y óxidos metálicos (sílice). Además, estos núcleos pueden ser inertes, paramagnéticos o superparamagnéticos. Estos núcleos sólidos pueden construirse a partir de composiciones puras de los materiales descritos o en combinaciones de mezclas de cualquier número de materiales, o en composiciones de materiales en capas. Además, los núcleos sólidos se pueden componer de un núcleo polimérico tal como copolímeros de bloques anfífilos, polímeros hidrófobos tales como poliestireno, poli(ácido láctico), poli(ácido co-glicólico láctico), poli(ácido glicólico), poli(caprolactona) y otros polímeros biocompatibles conocidos por los expertos en la materia.

El núcleo puede ser, como alternativa, un núcleo hueco que tiene al menos algún espacio en la región central de un material de cubierta. Los núcleos huecos incluyen núcleos liposomales. Un núcleo liposomal, como se usa en el presente documento, se refiere a un compartimiento nuclear ubicado centralmente formado por un componente de los lípidos o fosfolípidos que forman una bicapa lipídica. Los "liposomas" son una estructura vesicular artificial, auto-cerrada, de varios tamaños y estructuras, en la que una o varias membranas encapsulan un núcleo acuoso. Lo más normalmente, las membranas de liposomas se forman a partir de membranas de bicapas lipídicas, en las que los grupos de cabeza hidrófilos están orientados hacia el medio acuoso, y

las cadenas de lípidos están embebidas en el núcleo lipófilo. Los liposomas también se pueden formar a partir de otras moléculas monoméricas y poliméricas anfífilas, tales como polímeros, como copolímeros de bloques, o polipéptidos. Las vesículas unilamelares son liposomas definidos por una sola membrana que encierra un espacio acuoso. Por el contrario, las vesículas oligo- o multilamelares están constituidas por varias membranas. Por lo general, las membranas tienen aproximadamente 4 nm de espesor y se componen de lípidos anfífilos tales como fosfolípidos, de origen natural o sintético. Opcionalmente, las propiedades de la membrana se pueden modificar mediante la incorporación de otros lípidos tales como esteroides o derivados de ácido cólico.

La bicapa lipídica se compone de dos capas de moléculas lipídicas. Cada molécula lipídica de una capa está orientada esencialmente paralela a las bicapas lipídicas adyacentes, y dos capas que forman una bicapa tienen los extremos polares de sus moléculas expuestos a la fase acuosa y los extremos no polares adyacentes entre sí. La región acuosa central del núcleo liposomal puede estar vacía o llena total o parcialmente de agua, una emulsión acuosa, oligonucleótidos u otros agentes terapéuticos o de diagnóstico.

"Lípido" se refiere a su sentido convencional como un término genérico que engloba grasas, lípidos, constituyentes solubles en alcohol y éter del protoplasma, que son insolubles en agua. Los lípidos habitualmente consisten en una fracción hidrófila y una fracción hidrófoba. En el agua, los lípidos pueden autoorganizarse para formar membranas bicapa, donde las fracciones hidrófilas (grupos de cabeza) están orientadas hacia la

fase acuosa, y las fracciones lipófilas (cadenas acilo) están embebidas en el núcleo de las bicapas. Los lípidos pueden comprender también dos fracciones hidrófilas (bolanfifilos). En ese caso, las membranas pueden formarse a partir de una sola capa lipídica, y no una bicapa. Los ejemplos típicos de lípidos en el contexto actual son grasas, aceites grasos, aceites esenciales, ceras, esteroides, esteroleos, fosfolípidos, glicolípidos, sulfolípidos, aminolípidos, cromolípidos y ácidos grasos. El término engloba los lípidos tanto naturales como sintéticos. Los lípidos preferidos en relación con la presente invención son: esteroides y esterol, en particular, colesterol, fosfolípidos, incluyendo fosfatidilo, fosfatidilcolinas y fosfatidiletanolaminas y esfingomielinas. Cuando hay ácidos grasos, podrían tener de aproximadamente 12 a 24 cadenas de carbono de longitud, conteniendo hasta 6 dobles enlaces. Los ácidos grasos están unidos a la cadena principal, que puede derivarse del glicerol. Los ácidos grasos del interior de un lípido pueden ser diferentes (asimétricos) o puede haber solamente una cadena de ácido graso presente, por ejemplo, lisolecitinas. También son posibles formulaciones mixtas, en particular, cuando los lípidos no catiónicos se obtienen de fuentes naturales tales como lecitinas (fosfatidilcolinas) purificadas de yema de huevo, corazón bovino, cerebro, hígado o soja.

El núcleo liposomal puede construirse a partir de uno o más lípidos conocidos por los expertos en la materia, incluyendo, pero sin limitación: esfingolípidos tales como esfingosina, fosfato de esfingosina, esfingosinas y esfinganinas metiladas, ceramidas, fosfatos de ceramida, ceramidas de acilo 1-0, dihidroceramidas, 2-

hidroxiceramidas, esfingomielina, esfingolípidos glicosilados, sulfátidos, gangliósidos, fosfoesfingolípidos y fitoesfingosinas de diversas longitudes y estados de saturación, y sus derivados, fosfolípidos tales como

5 fosfatidilcolinas, lisofosfatidilcolinas, ácidos fosfatídicos, ácidos lisofosfatídicos, LPA cíclico, fosfatidiletanolaminas, lisofosfatidiletanolaminas, fosfatidilglicerol, lisofosfatidilglicerol, fosfatidilserinas, lisofosfatidilserinas,

10 fosfatidilinositoles, fosfatos de inositol, LPI, cardiolipinas, lisocardiolipinas, bis(monoacilglicero)fosfatos, (diacilglicero)fosfatos, lípidos de éter, lípidos de difitaniléter y plasmalógenos de diversas longitudes, estados de saturación y sus

15 derivados, esterol, tales como colesterol, desmosterol, estigmasterol, lanosterol, latosterol, diosgenina, sitosterol, zimosterol, zimostenol, 14-desmetil-lanosterol, sulfato de colesterol, DHEA, sulfato de DHEA, 14-desmetil-14-deshidrlanosterol, sitostanol, campesterol, lípidos

20 aniónicos de éter, lípidos catiónicos de éter, lípidos quelantes de lantánido, oxisterol, substituidos en el anillo A, oxisterol, substituidos en el anillo B, oxisterol, substituidos en el anillo D, oxisterol, substituidos en la cadena lateral, oxisterol, doblemente

25 substituidos, derivados del ácido colestanoico, esterol, fluorados, esterol, fluorescentes, esterol, sulfonados, esterol, fosforilados y esterol, poliinsaturados de diferentes longitudes, estados de saturación y sus derivados.

30 Los oligonucleótidos pueden estar situados en el exterior del núcleo, dentro de las paredes del núcleo y/o en el centro del núcleo. Un oligonucleótido que está

situado en el núcleo normalmente se denomina acoplado al núcleo. El acoplamiento puede ser directo o indirecto. En algunas realizaciones, al menos 25, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o 1000 oligonucleótidos o cualquier combinación de intervalos de los mismos están en el exterior del núcleo. En algunas realizaciones, hay 1-1000, 10-500, 50-250 o 50-300 oligonucleótidos presentes en la superficie.

Los oligonucleótidos de la cubierta de oligonucleótido pueden estar orientados en una variedad de direcciones. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos están orientados radialmente hacia el exterior. La orientación de estos oligonucleótidos puede ser bien distal a 5'/terminal a 3' en relación con el núcleo o distal a 3'/terminal a 5' en relación con el núcleo, o pueden estar orientados lateralmente alrededor del núcleo. En una realización, uno o una multiplicidad de oligonucleótidos diferentes está presente en la misma superficie de un único SNA. En todos los casos, al menos 1 oligonucleótido está presente en la superficie, pero puede haber hasta 10000 presentes.

Los oligonucleótidos pueden estar unidos al núcleo o entre sí y/o a otras moléculas tales como agentes activos, ya sea directa o indirectamente a través de un enlazador. Los oligonucleótidos pueden conjugarse con un enlazador a través del extremo 5' o del extremo 3', por ejemplo [Secuencia, 5'-3']-Enlazador o Enlazador-[Secuencia, 5'-3']. Algunos o todos los oligonucleótidos de la nanoestructura pueden estar unidos entre sí directa o indirectamente a través de un enlace covalente o no covalente. La unión de un oligonucleótido a otro oligonucleótido puede ser adicional o como alternativa al enlace de ese oligonucleótido al núcleo liposomal.

La cubierta de oligonucleótido puede estar anclada a la superficie del núcleo a través de una o varias moléculas enlazadoras, incluyendo, pero sin limitación: cualquier estructura química que contenga uno o múltiples tioles, tales como los alcanotioles de diversas longitudes de cadena, ditiol cíclico, ácido lipoico u otros enlazadores de tiol conocidos por los expertos en la materia.

En una realización que contiene un núcleo liposomal, la cubierta de oligonucleótido puede anclarse a la superficie del núcleo liposomal mediante la conjugación con uno o una multiplicidad de moléculas enlazadoras incluyendo, pero sin limitación: tocoferoles, esfingolípidos tales como esfingosina, fosfato de esfingosina, esfingosinas y esfinganinas metiladas, ceramidas, fosfatos de ceramida, ceramidas de acilo 1-0, dihidroceramidas, 2-hidroxiceramidas, esfingomielina, esfingolípidos glicosilados, sulátidos, gangliósidos, fosfoesfingolípidos y fitoesfingosinas de diversas longitudes y estados de saturación, y sus derivados, fosfolípidos tales como fosfatidilcolinas, lisofosfatidilcolinas, ácidos fosfatídicos, ácidos lisofosfatídicos, LPA cíclico, fosfatidiletanolaminas, lisofosfatidiletanolaminas, fosfatidilglicerol, lisofosfatidilglicerol, fosfatidilserinas, lisofosfatidilserinas, fosfatidilinositoles, fosfatos de inositol, LPI, cardiolipinas, lisocardiolipinas, bis(monoacilglicero)fosfatos, (diacilglicero)fosfatos, lípidos de éter, lípidos de difitaniléter y plasmalógenos de diversas longitudes, estados de saturación y sus derivados, esteroides tales como colesterol, desmosterol, estigmasterol, lanosterol, latosterol, diosgenina, sitosterol, zimosterol, zimostenol, 14-desmetil-lanosterol,

sulfato de colesterol, DHEA, sulfato de DHEA, 14-desmetil-14-deshidrlanosterol, sitostanol, campesterol, lípidos aniónicos de éter, lípidos catiónicos de éter, lípidos quelantes de lantánido, oxiesteroles substituidos en el anillo A, oxiesteroles substituidos en el anillo B, oxiesteroles substituidos en el anillo D, oxiesteroles substituidos en la cadena lateral, oxiesteroles doblemente substituidos, derivados del ácido colestanoico, esteroides fluorados, esteroides fluorescentes, esteroides sulfonados, esteroides fosforilados y esteroides poliinsaturados de diferentes longitudes, estados de saturación y sus derivados.

El oligonucleótido también puede estar asociado con el núcleo incrustándolo dentro del núcleo (núcleo liposomal) o puede estar unido o enlazado, ya sea indirectamente (es decir, de forma no covalente o covalente a través de otras moléculas tales como enlazadores) o directamente (es decir, de forma covalente).

La invención también incluye artículos, que se refieren a uno cualquiera o un grupo de componentes. En algunas realizaciones, los artículos son kits. Los artículos incluyen compuestos de calidad farmacéutica o de diagnóstico de la invención en uno o más recipientes. El artículo puede incluir instrucciones o marcadores que potencien o describan el uso de los compuestos de la invención.

Como se usa en el presente documento, "potenciado" incluye todos los métodos de hacer negocios incluyendo métodos de educación, hospitalarios y otras instrucciones clínicas, actividad de la industria farmacéutica incluyendo ventas farmacéuticas y cualquier publicidad u otra actividad promocional incluyendo comunicación escrita, oral

y electrónica de cualquier forma asociada con composiciones de la invención en relación con el tratamiento de trastornos de TNF- $\alpha$ .

Las "instrucciones" pueden definir un componente de promoción y, normalmente, incluyen instrucciones escritas sobre o asociadas al envase de las composiciones de la invención. Las instrucciones también pueden incluir cualquier instrucción oral o electrónica proporcionada de cualquier manera.

Así pues, los agentes descritos en el presente documento pueden, en algunas realizaciones, estar ensamblados en kits farmacéuticos o de diagnóstico o de investigación para facilitar su uso en aplicaciones terapéuticas, de diagnóstico o de investigación. Un kit puede incluir uno o más recipientes que alojen los componentes de la invención e instrucciones de uso. En concreto, dichos kits pueden incluir uno o más agentes descritos en el presente documento, junto con las instrucciones que describen la aplicación terapéutica pretendida y la administración apropiada de estos agentes. En ciertas realizaciones, los agentes de un kit pueden estar en una formulación farmacéutica y dosis adecuada para una determinada aplicación y para un método de administración de los agentes.

El kit puede estar diseñado para facilitar el uso de los métodos descritos en el presente documento por los médicos y puede adoptar muchas formas. Cada una de las composiciones del kit, cuando sea aplicable, puede proporcionarse en forma líquida (por ejemplo, en solución) o en forma sólida (por ejemplo, un polvo seco). En ciertos casos, algunas de las composiciones pueden ser constituibles o procesables de otro modo (por ejemplo, a

una forma activa), por ejemplo, mediante la adición de un disolvente adecuado u otra especie (por ejemplo, agua o un medio de cultivo celular), que pueda o no proporcionarse con el kit. Como se usa en el presente documento, las "instrucciones" pueden definir un componente de instrucción y/o promoción, y normalmente incluyen instrucciones escritas sobre o asociadas con el envase de la invención. Las instrucciones también pueden incluir cualquier instrucción oral o electrónica proporcionada de cualquier manera, de modo que un usuario reconozca claramente que las instrucciones deben estar asociadas con el kit, por ejemplo, audiovisuales (por ejemplo, cinta de video, DVD, etc.), comunicaciones basadas en Internet y/o en la web, etc. Las instrucciones escritas pueden estar en la forma prescrita por un organismo gubernamental que regule la fabricación, el uso o la venta de productos farmacéuticos o biológicos, instrucciones que también pueden reflejar la aprobación por la agencia de fabricación, el uso o la venta para la administración a seres humanos.

El kit puede contener uno o más de los componentes descritos en el presente documento en uno o más recipientes. Como ejemplo, en una realización, el kit puede incluir instrucciones para mezclar uno o más componentes del kit y/o aislar y mezclar una muestra y aplicarla a un sujeto. El kit puede incluir un recipiente que contenga los agentes descritos en el presente documento. Los agentes se pueden preparar de forma estéril, envasarse en jeringas y enviarse refrigerados. Como alternativa, pueden alojarse en un vial u otro recipiente de almacenamiento. Un segundo recipiente puede tener otros agentes preparados de forma estéril. Como alternativa, el kit puede incluir los agentes activos previamente mezclados y enviados en una jeringa, un vial,

un tubo u otro recipiente.

El kit puede tener una variedad de formas tales como una bolsa de blíster, una bolsa envuelta contraída, una bolsa sellable al vacío, una bandeja termoconformable sellable, o una bolsa o bandeja similar, con los accesorios envueltos de forma suelta dentro de la bolsa, uno o más tubos, recipientes, una caja o una bolsa. El kit puede esterilizarse después de agregarse los accesorios, permitiendo de este modo que cada accesorio del recipiente se desempaque de otra manera. Los kits pueden ser esterilizados usando cualquier técnica de esterilización apropiada tal como esterilización por radiación, esterilización por calor u otros métodos de esterilización conocidos en la técnica. El kit también puede incluir otros componentes, dependiendo de la aplicación específica, por ejemplo, recipientes, medios celulares, sales, tampones, reactivos, jeringas, agujas, un tejido, tal como gasa, para aplicar o retirar un agente desinfectante, guantes desechables, un soporte para los agentes antes de la administración, etc.

Las composiciones del kit pueden proporcionarse como cualquier forma adecuada, por ejemplo, como soluciones líquidas o como polvos secos. Cuando la composición proporcionada es un polvo seco, el polvo se puede reconstituir mediante la adición de un disolvente adecuado, que también puede proporcionarse. En las realizaciones en las que se ensayan formas líquidas de la composición, la forma líquida puede estar concentrada o estar lista para su uso. El disolvente dependerá del compuesto y del modo de uso o administración. Los disolventes adecuados para las composiciones de fármacos son bien conocidos y están disponibles en la bibliografía. El disolvente dependerá del

compuesto y del modo de uso o administración.

Los kits, de un conjunto de realizaciones, pueden comprender un medio portador que está compartimentado para recibir en estrecho confinamiento uno o más medios receptores tales como viales, tubos y similares, comprendiendo cada uno de los medios receptores uno de los elementos separados para su uso en el método. Por ejemplo, uno de los recipientes puede comprender un control positivo para un ensayo. Además, el kit puede incluir recipientes para otros componentes, por ejemplo, tampones útiles en el ensayo.

La presente invención también engloba un producto farmacéutico envasado y etiquetado final. Este artículo de fabricación incluye la forma de dosificación unitaria apropiada en un vaso o recipiente apropiado tal como un vial de vidrio u otro recipiente sellado herméticamente. En el caso de las formas de dosificación adecuadas para la administración parenteral, el principio activo es estéril y adecuado para la administración en forma de una solución libre de partículas. En otras palabras, la invención engloba soluciones parenterales y polvos liofilizados, estando cada uno estéril y siendo los últimos adecuados para la reconstitución antes de la inyección. Como alternativa, la forma de dosificación unitaria puede ser un sólido adecuado para la administración oral, transdérmica, tópica o mucosa.

En una realización preferida, la forma de dosificación unitaria es adecuada para la administración intravenosa, intramuscular o subcutánea. Por lo tanto, la invención engloba soluciones, preferentemente estériles, adecuadas para cada vía de administración.

Al igual que con cualquier producto farmacéutico, el

material de embalaje y el recipiente están diseñados para proteger la estabilidad del producto durante el almacenamiento y el envío. Además, los productos de la invención incluyen instrucciones de uso u otro material informativo que aconseja al médico, técnico o paciente sobre cómo prevenir o tratar adecuadamente la enfermedad o trastorno del TNF- $\alpha$ . En otras palabras, el artículo de fabricación incluye medios de instrucción que indican o sugieren una pauta posológica que incluye, pero sin limitación, dosis reales, procedimientos de monitorización y otra información de monitorización.

Más concretamente, la invención proporciona un artículo de fabricación que comprende material de envasado, tal como una caja, un bote, un tubo, un vial, un recipiente, un pulverizador, un insuflador, una bolsa intravenosa (i.v.), una envoltura y similares; y al menos una forma de dosificación unitaria de un agente farmacéutico contenido dentro de dicho material de envasado. La invención también proporciona un artículo de fabricación que comprende material de envasado tal como una caja, un bote, un tubo, un vial, un recipiente, un pulverizador, un insuflador, una bolsa intravenosa (i.v.), una envoltura y similares; y al menos una forma de dosificación unitaria de cada agente farmacéutico contenido dentro de dicho material de envasado. La invención proporciona además un artículo de fabricación que comprende material de envasado tal como una caja, un bote, un tubo, un vial, un recipiente, un pulverizador, un insuflador, una bolsa intravenosa (i.v.), una envoltura y similares; y al menos una forma de dosificación unitaria de cada agente farmacéutico contenido dentro de dicho material de envasado. La invención proporciona además un artículo de fabricación que comprende una aguja o jeringa,

preferentemente envasada en forma estéril, para la inyección de la formulación y/o una almohadilla de alcohol envasada.

La presente invención no se limita en su aplicación a los detalles de construcción ni a la disposición de los componentes expuestos en la siguiente descripción o ilustrados en las figuras. La invención es capaz de otras realizaciones y ponerse en práctica o de llevarse a cabo de diversas maneras. Además, las expresiones y los términos usados en el presente documento tienen fines descriptivos y no deben considerarse limitantes. El uso de "que incluye/n", "que comprende/n" o "que tiene/n", "que contiene/n", "que implica/n" y las variantes de los mismos en el presente documento pretende englobar los elementos enumerados detrás y sus equivalentes, así como elementos adicionales.

Los expertos en la materia reconocerán o podrán determinar, usando no más que la experimentación rutinaria, muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la invención descritas en el presente documento. Se pretende que dichos equivalentes estén englobados por las siguientes reivindicaciones.

Todas las referencias, incluyendo los documentos de patente, que se desvelan en el presente documento se incorporan por referencia en su totalidad.

#### EJEMPLOS

##### **Ejemplo 1: Secuencias de oligonucleótidos inhibidores**

Los oligonucleótidos se sintetizaron en un MerMade 48 (Bioautomation) usando la química convencional de fosforamidita (reactivos de Glen Research y ChemGenes). Tres de las secuencias se dirigieron al codón de inicio del ARNm de TNF humano (Oligos 3482, 3483 y 3484). Se generaron tres secuencias adicionales con Sfold (Oligos 3485, 3486 y

3487). Una secuencia, el Oligo 3488, se humanizó. Finalmente, se generó un control desordenado (Oligo 3495). Las respectivas secuencias se enumeran en la Tabla 1:

**Tabla 1:** Lista de secuencias de oligonucleótidos

| ID del Oligo | Secuencia del Oligo (5' a 3') | SEQ ID NO. |
|--------------|-------------------------------|------------|
| Oligo 3482   | CATGGTGTCCCTTTCCAGG           | 1          |
| Oligo 3483   | TCAGTGCTCATGGTGTCC            | 2          |
| Oligo 3484   | CATGCTTTCAGTGCTCAT            | 3          |
| Oligo 3485   | TGGGAGTAGATGAGGTAC            | 4          |
| Oligo 3486   | TTGACCTTGGTCTGGTAG            | 5          |
| Oligo 3487   | GATGGCAGAGAGGAGGTT            | 6          |
| Oligo 3488   | TTATCTCTCAGCTCCACG            | 7          |
| Oligo 3495   | ATGGAGCAAAACCCGCAG            | 8          |

Los oligonucleótidos se purificaron después con cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa (Aglient). La identidad del producto oligonucleotídico se verificó con espectrometría de masas de ionización por desorción con láser asistida por matriz.

Los oligonucleótidos sintetizados se exploraron inicialmente para determinar la expresión de TNF. Se sembraron queratinocitos humanos primarios en placas de 96 pocillos. Al día siguiente, se transfectaron las células con 2  $\mu$ M de la cadena antisentido usando lipofectamina (Life Technologies) en Optimem (Life Technologies) durante 24 horas. Tras el período de incubación, se lavaron las células con PBS, se extrajo su ARNm, se sintetizó ADNc y se determinaron los niveles de TNF y GAPDH con RT-PCR (Figura 1). Los oligonucleótidos 3482, 4385 y 3487 fueron particularmente eficaces en la reducción de los niveles de expresión de TNF.

Se realizaron las mismas condiciones experimentales en un conjunto adicional de secuencias modificadas. En resumen, se sembraron queratinocitos humanos primarios en placas de 96 pocillos. Al día siguiente, se transfectaron las células con 2  $\mu$ M de la cadena antisentido usando lipofectamina (Life Technologies) en Optimem (Life Technologies) durante 24 horas. Tras el período de incubación, se lavaron las células con PBS, se extrajo su ARNm, se sintetizó ADNc y se investigaron los niveles de TNF y GAPDH con RT-PCR (Figura 2). Cada secuencia se emparejó con un respectivo control (*en cursiva*), como se observa en la Tabla 2:

**Tabla 2:** Secuencias de oligonucleótidos modificados y sus controles

| ID del oligo | Nombre del Oligo                             | Secuencia del Oligo (5' a 3')<br>(m = metilado; * = enlace fosforotioato) | SEQ ID NO. |
|--------------|----------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|------------|
| Oligo 3485   | hTNF 568 - PO                                | TGGGAGTAGATGAGGTAC                                                        | 4          |
| Oligo 3495   | <i>scr-18 PO</i>                             | <i>ATGGAGCAAAACCCGCAG</i>                                                 | 8          |
| Oligo 3742   | hTNF 568-OmePO                               | mUmGmGmGmAmGmUmAmGmAmUmGmAmGmUmAmC                                        | 10         |
| Oligo 3508   | <i>scr-18 OMePO</i>                          | <i>mAmUmGmGmAmGmCmAmAmAmCmCmGmCmAmG</i>                                   | 11         |
| Oligo 3500   | hTNF 568 - PS                                | T*G*G*G*A*G*T*A*G*A*T*G*A*G*G*T*A*C                                       | 12         |
| Oligo 3496   | <i>scr-18 PS</i>                             | <i>A*T*G*G*A*G*C*A*A*A*A*C*C*C*G*C*A*G</i>                                | 13         |
| Oligo 3526   | hTNF 568 - OmePS                             | mU*mG*mG*mG*mA*mG*mU*mA*mG*mA*mU*mG*mA*mG*mG*mU*mA*mC                     | 14         |
| Oligo 3607   | <i>scr-18 OMePS</i>                          | <i>mA*mU*mG*mG*mA*mG*mC*mA*mA*mA*mA*mC*mC*mC*mG*mC*mA*mG</i>              | 15         |
| Oligo 3534   | hTNF 568 - Oligómero con huecos/OmePO-PS     | mUmGmGmGmAmGT*A*G*A*T*G*mAmGmUmAmC                                        | 16         |
| Oligo 3514   | <i>scr-18 Oligómero con huecos /OmePO-PS</i> | <i>mAmUmGmGmAmGC*A*A*A*A*C*mCmCmGmCmAmG</i>                               | 17         |
| Oligo 3509   | hTNF 568 - Oligómero con huecos              | mU*mG*mG*mG*mA*mG*T*A*G*A*T*G*mA*mG*mG*mU*mA*mC                           | 18         |

| ID del oligo    | Nombre del Oligo                                   | Secuencia del Oligo (5' a 3')<br>(m = metilado; * = enlace fosforotioato) | SEQ ID NO. |
|-----------------|----------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|------------|
|                 | /OmePS-PS                                          |                                                                           |            |
| 5<br>Oligo 3513 | <i>scr-18</i><br>Oligómero con huecos<br>/OmePS-PS | <i>mA*mU*mG*mG*mA*mG*C*A*A*A*A*C*mC*mC*mG*mC*mA*mG</i>                    | 19         |

## Ejemplo 2: Inhibición de TNF por ácidos nucleicos esféricos (SNA)

Se compararon las químicas de diferentes SNA con los respectivos controles de oligonucleótidos. Se prepararon SNA que contenían cadenas antisentido anti-TNF. Se prepararon nanopartículas de oro de  $13 \pm 1$  nm de diámetro reduciendo una solución acuosa en ebullición de 490 ml de 0.1969 g de  $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  con 0.570 g de citrato trisódico en 10 ml de agua. A continuación, se filtró la solución de partículas a través de una membrana de acetato de celulosa de 0.45  $\mu\text{m}$  para eliminar cualquier nanopartícula agregada. La concentración de nanopartículas fue de 11 nM como se preparó.

Entonces, se usaron las nanopartículas de oro para preparar SNA anti-TNF y de control. La síntesis de SNA comenzó mediante la adición de un poli(etilenglicol) lineal de 5 kDa tiolado a las nanopartículas de oro sintetizadas hasta una concentración final de 5  $\mu\text{M}$ . Tras mezclar, se dejó reposar la solución durante 1.5 horas a 37 °C, momento en el que se añadieron los oligonucleótidos a la solución a una concentración final de 5  $\mu\text{M}$ . Mientras se mantenía la temperatura, se añadió una solución de cloruro sódico a la mezcla de funcionalización en dos alícuotas iguales en el transcurso de 1 hora para elevar la concentración de NaCl hasta 150 mM. Se dejó reposar esta mezcla a 37 °C durante

la noche. Al día siguiente, la centrifugación a 21000 x g precipitó las partículas, se retiró el sobrenadante y se volvieron a suspender las partículas en PBS estéril. Este proceso se repitió tres veces para eliminar el exceso de PEG y oligonucleótido que no se había adherido a las partículas. Se midió el número de oligonucleótidos por nanopartículas liberando los oligonucleótidos del núcleo de oro-las nanopartículas se disolvieron oxidativamente con KCN. Finalmente, se midió el número de oligonucleótidos liberados con un ensayo basado en fluorescencia (Oligreen, Life Technologies) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Se sembraron queratinocitos humanos primarios en placas de 96 pocillos. Al día siguiente, se transfectaron las células con el TNF o los SNA de control a una concentración de oligonucleótidos de 5  $\mu$ M. El tratamiento se dejó proceder durante la noche. Al día siguiente, se lavaron las células, se recogió el ARNm, se preparó ADNC y se investigaron las expresiones de TNF y GAPDH. Los resultados se muestran en la Figura 3. Cada secuencia se emparejó con un respectivo control (*en cursiva*), como se observa en la Tabla 3:

**Tabla 3:** Secuencias de oligonucleótidos y controles usados para comparar químicas de SNA

| ID del oligo | Nombre del Oligo                           | Secuencia del Oligo (5' a 3')<br>(m = metilado; * = enlace fosforotioato)  | SEQ ID NO. |
|--------------|--------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|------------|
| Oligo 3652   | hTNF568-Oligómero con huecos - OMePS/PS-SH | mU*mG*mG*mG*mA*mG*T*A*G*A*T*G*mA*mG*mG*mU*mA*mC*/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/ | 20         |

| ID del oligo     | Nombre del Oligo                           | Secuencia del Oligo (5' a 3')<br>(m = metilado; * = enlace fosforotioato)        | SEQ ID NO. |
|------------------|--------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 5<br>Oligo 4030  |                                            | <i>mA*mU*mG*mG*mA*mG*C*A*A*A*A*C*mC*mC*mG*mC*mA*Mg/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/</i> | 21         |
| Oligo 3657       | hTNF568-Oligómero con huecos - OMePO/PS-SH | <i>mUmGmGmGmAmGT*A*G*A*T*G*mAmGmGmUmAmC/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/</i>            | 22         |
| 10<br>Oligo 4028 |                                            | <i>mAmUmGmGmAmGC*A*A*A*A*C*mCmCmGmCmAmG/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/</i>            | 23         |
| Oligo 3743       | hTNF568-PO-SH                              | <i>TGGGAGTAGATGAGGTAC/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/</i>                              | 24         |
| Oligo 3660       |                                            | <i>ATGGAGCAAAACCCGCAG/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/</i>                              | 25         |

Se sembraron queratinocitos humanos en placas de cultivo tisular de 96 pocillos y se dejaron adherir durante la noche. Al día siguiente, se trataron con 50 ng/ml de TNF recombinante humano durante 4 horas antes del tratamiento con SNA modificados con el Oligo 3661 o SNA del Oligo 3657 (SEQ ID NO: 22). El tratamiento se dejó proceder durante la noche. Al día siguiente, se lavaron las células, se recogió el ARNm, se preparó ADNc y se investigó la expresión de TNF y GAPDH, y se calculó el porcentaje de desactivación del gen (Figura 4).

Se examinó el efecto de modificaciones adicionales de fosforotioato en SNA modificados con el Oligo 3657. Se preparó una familia de oligonucleótidos con un contenido de fosforotioato creciente usando nanopartículas de oro como se ha descrito anteriormente. Las partículas se transfectaron en queratinocitos humanos durante la noche. Al día siguiente, se lavaron las células, se recogió el ARNm, se preparó ADNc y se investigó la expresión de TNF y

GAPDH, y se calculó el porcentaje de desactivación del gen (Figura 5). Se analizaron las secuencias de la Tabla 4:

**Tabla 4:** Oligonucleótidos con un contenido creciente de fosforotioato

| ID del oligo | Nombre del Oligo | Secuencia del Oligo (5' a 3')<br>(m = metilado; * = enlace fosforotioato) | SEQ ID NO. |
|--------------|------------------|---------------------------------------------------------------------------|------------|
| Oligo 5196   | hTNF 568-1 PS    | mUmGmGmGmAmG*T*A*G*A*T*G*mAmGmGmUmAmC/isp18//isp18//3thiomc3-d/           | 26         |
| Oligo 5289   | hTNF 568-2 PS    | mUmGmGmGmA*mG*T*A*G*A*T*G*mAmGmGmUmAmC/isp18//isp18//3thiomc3-d/          | 27         |
| Oligo 5290   | hTNF 568-3 PS    | mUmGmGmG*mA*mG*T*A*G*A*T*G*mAmGmGmUmAmC/isp18//isp18//3thiomc3-d/         | 28         |
| Oligo 5291   | hTNF 568-4 PS    | mUmGmG*mG*mA*mG*T*A*G*A*T*G*mAmGmGmUmAmC/isp18//isp18//3thiomc3-d/        | 29         |
| Oligo 5292   | hTNF 568-5 PS    | mUmG*mG*mG*mA*mG*T*A*G*A*T*G*mAmGmGmUmAmC/isp18//isp18//3thiomc3-d/       | 30         |
| Oligo 5293   | hTNF 568-6 PS    | mU*mG*mG*mG*mA*mG*T*A*G*A*T*G*mAmGmGmUmAmC/isp18//isp18//3thiomc3-d/      | 31         |

Se examinó el efecto de SNA huecos sobre la expresión de TNF. Se prepararon oligonucleótidos que contenían una fosforamidita de tocoferol (reactivos de ChemGenes). Se prepararon armazones liposomales que consistían en dioleoilfosfatidilcolina (DOPC) disolviendo el lípido en DCM a 75 mg/ml y, a continuación, se secó la solución bajo una corriente de nitrógeno y se liofilizó. Se disolvió el material residual en HEPES (pH 7,3) y NaCl 150 mM a una concentración de 40 mg/ml, y se dejó reposar durante 30 minutos, seguido de tres ciclos de congelación/descongelación usando nitrógeno líquido. A continuación, se extruyó esta solución a través de membranas de policarbonato que contenían poros con diámetros de 100, 50 y 30 nm. La solución resultante

contenía liposomas de aproximadamente 40 nm de diámetro. La funcionalización en SNA se produjo mediante la adición de los oligonucleótidos modificados con tocoferol a la solución de liposomas. Los materiales se concentraron entonces con filtración de flujo tangencial y se aplicaron a queratinocitos humanos como se ha descrito anteriormente. Las secuencias preparadas fueron como las de la Tabla 5:

**Tabla 5:** Secuencia de oligonucleótidos y su control para la investigación de SNA huecos

| ID del oligo | Nombre del Oligo | Secuencia del Oligo (5' a 3')<br>(m = metilado; * = enlace fosforotioato) | SEQ ID NO. |
|--------------|------------------|---------------------------------------------------------------------------|------------|
| 568T         | TNF568 - toco    | mUmGmGmGmAmGT*A*G*A*T*G*mAmGmGmUmAmC/<br>iSp18//iSp18//toco/              | 32         |
| ControlT     | Control - toco   | mAmUmGmGmAmGC*A*A*A*A*C*mCmCmGmCmAmG/<br>iSp18//iSp18//toco/              | 33         |

### **Ejemplo 3: Efecto inhibidor de los SNA antisentido dirigidos al ARNm de TNF**

Se comparó el efecto inhibidor de SNA antisentido dirigidos al ARNm de TNF sobre la expresión de ARNm se con los SNA de control no dirigidos. Se prepararon SNA que contenían cadenas antisentido anti-TNF, compuestos del compuesto 6081.

Todos los oligonucleótidos se sintetizaron en la escala 1  $\mu$ mol, empleando UniLinker convencional (ChemGenes). Los monómeros de ADN, ARN, 2'-O-Me y los espaciadores de hexa(etilenglicol) se obtuvieron en ChemGenes Corporation. El modificador del colesterol se obtuvo en Glen Research. Los enlaces eran fosfodiésteres o fosforotioatos convencionales preparados con disulfuro de fenilacetilo 0.2 M (PADS) en lutidina:ACN a 1:1 como agente de sulfuración. La síntesis se realizó con DMT-off, en la

dirección de 5' a 3'. Tras la síntesis, se escindieron los oligonucleótidos del soporte y se desprotegieron usando una mezcla a 4:1 de hidróxido de amonio y etanol a 55 °C durante 16 horas. Los oligonucleótidos se purificaron mediante técnicas de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) de intercambio iónico. Los pesos moleculares y los coeficientes de extinción se calcularon usando IDT OligoAnalyzer. La verificación del peso molecular de los oligonucleótidos se realizó usando desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI). La concentración de oligonucleótidos se determinó mediante absorbancia de UV a 260 nm en un lector de microplacas (BioTek) junto con el coeficiente de extinción calculado a partir del IDT OligoAnalyzer.

Entonces, se usaron los oligonucleótidos para preparar SNA anti-TNF y de control. La síntesis comenzó mediante la dilución de los oligonucleótidos a 100 µM en PBS. Luego, se almacenaron los oligonucleótidos durante la noche, protegidos de la luz, a 4 °C. Debido a la repulsión electrostática del disolvente polar hacia la cola de colesterol hidrófoba del oligonucleótido, se forman estructuras de micelas estructuradas con un núcleo de colesterol y oligonucleótidos que se extienden hacia fuera.

Se sembraron queratinocitos humanos primarios en placas de 96 pocillos. Al día siguiente, se trataron las células con 50 ng/ml de TNF recombinante humano durante 4 horas antes de transfectarse con SNA de Oligo ID 608 o de Oligo ID 6093 a concentraciones de oligonucleótidos de 1000; 333.3; 100; 33.3; 10; 3.3; 1; 0.33; 0.1; 0.03 y 0.01 nM. Se dejó proceder el tratamiento durante la noche. Al día siguiente, se lavaron las células, se recogió el ARNm, se preparó ADNc y se examinaron las expresiones de TNF y GAPDH,

y se calculó el porcentaje de expresión génica (Figura 9).

Se examinó el efecto de variar las longitudes de cadena del hexaetilenglicol (HEG) sobre la actividad antisentido de los SNA del Oligo ID 6081. Se prepararon oligonucleótidos con longitudes espaciadoras de HEG crecientes y se formularon en SNA de autoensamblaje. Se sembraron queratinocitos humanos primarios en placas de 96 pocillos. Al día siguiente, se trataron las células con 50 ng/ml de TNF recombinante humano durante 4 horas antes de transfectarse con SNA de Oligo ID 6080, 6081, 6082, 6092, 6083, 6093, 6094 o 6095 a concentraciones de oligonucleótidos de 100, 10, 1 y 0,1 nM. El tratamiento se dejó proceder durante la noche. Al día siguiente, se lavaron las células, se recogió el ARNm, se preparó ADNc y se examinaron las expresiones de TNF y GAPDH, y se calculó el porcentaje de expresión génica (Figura 10).

**Tabla 6:** Secuencias de oligonucleótidos para la investigación de SNA huecos

| ID del Oligo | Secuencia del oligonucleótido (5' a 3')                      | SEQ ID NO. |
|--------------|--------------------------------------------------------------|------------|
| 6080         | mUmGmGmGmAmGT*A*G*A*T*G*mAmGmGmUmAmC/iSp18//iSp18//3CholTEG/ | 35         |
| 6081         | mUmGmGmGmAmGT*A*G*A*T*G*mAmGmGmUmAmC/iSp18//iSp18//3CholTEG/ | 36         |
| 6082         | mUmGmGmGmAmGT*A*G*A*T*G*mAmGmGmUmAmC/iSp18//3CholTEG/        | 37         |
| 6092         | mUmGmGmGmAmGT*A*G*A*T*G*mAmGmGmUmAmC/3CholTEG/               | 38         |
| 6083         | mAmUmGmGmAmGC*A*A*A*A*C*mCmCmGmCmAmG/iSp18//iSp18//3CholTEG/ | 39         |
| 6093         | mAmUmGmGmAmGC*A*A*A*A*C*mCmCmGmCmAmG/iSp18//iSp18//3CholTEG/ | 40         |
| 6094         | mAmUmGmGmAmGC*A*A*A*A*C*mCmCmGmCmAmG/iSp18//3CholTEG/        | 41         |

|      |                                                                                                                                                                                               |    |
|------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 6095 | mAmUmGmGmAmGC*A*A*A*A*C*mCmCmGmCmAmG/3CholTE<br>G/                                                                                                                                            | 42 |
| 5    | "*" indica un enlace fosforotioato; "m" indica una base O'-metilada, "/iSp18/" indica un espaciador de hexa(etilenglicol), "/3CholTEG/" indique un tri(etilenglicol) 3' unido a un colesterol |    |

#### **Ejemplo 4: Ensayo de la actividad *ex vivo* en piel soriásica humana**

Se sintetizaron los oligonucleótidos con Mermade 48 (Bioautomation) usando la metodología convencional de fosforamidita en fase sólida. Las bases y los reactivos se adquirieron en Glen Research y Chemgenes. Todos los oligonucleótidos se purificaron mediante cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa (HPLC), y los pesos moleculares se midieron usando análisis de desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI). Los oligonucleótidos sintetizados se enumeran en la Tabla 7.

Los liposomas se sintetizaron por extrusión de 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC) hidratada en solución salina tamponada con fosfato (PBS) (NaCl 137 mM, fosfato 10 M, KCl 2.7 mM, pH 7.4, hyclon) usando membranas de polycarbonato de 47 mm de diámetro con poros de 50 nm (Sterlitech). Los diámetros de los liposomas se midieron usando dispersión dinámica de la luz usando un Malvern Zetasizer Nano (Malvern Instruments). La concentración de lípidos se determinó usando un kit de ensayo de fosfolípidos (Sigma).

Se sintetizaron los L-SNA mezclando oligonucleótidos con liposomas en una proporción molar de 100:1, e incubando la mezcla a temperatura ambiente durante 4 horas. Los L-SNA se aislaron a partir de materiales sin reaccionar y se concentraron usando filtración de flujo tangencial (TFF)

usando un sistema MiniKros Pilot i (Spectrum Labs) con un módulo de filtro de fibra hueca de poliétersulfona (mPES) modificado con corte de peso molecular de 30 kD. Se analizaron los L-SNA que contenían sustancias retenidas para determinar la concentración de lípidos usando un kit de ensayo de fosfolípidos (Sigma). Se diluyeron los L-SNA en metanol al 90 % para disolver los liposomas con el fin de liberar los oligonucleótidos funcionalizados superficialmente, cuya concentración se midió usando un espectrofotómetro Cary UV/vis (Agilent). Se calculó el número medio de oligonucleótidos conjugados con una nanopartícula dividiendo la concentración de oligonucleótidos entre la concentración de liposomas. Los diámetros de L-SNA se midieron usando dispersión dinámica de luz usando un Malvern Zetasizer Nano (Malvern Instruments).

Se examinaron los efectos reguladores génicos de la aplicación de L-SNA que contenían Oligo 4831.1 en cultivos de piel humana soriásica *ex vivo*. Los grupos experimentales se enumeran en la Tabla 8.

Se tomaron cuatro biopsias de piel de 3 mm de diámetro de placas soriásicas de 5 pacientes diferentes con soriasis en placas de leve a moderada. Cada repetición se tomó de un paciente diferente para obtener una representación exacta y contra una respuesta específica del paciente. Los explantes se cultivaron de la siguiente manera. Se perforaron orificios en el centro de las inserciones de filtro de cultivos celulares Corning de 12 pocillos. Se empujó la parte dérmica (parte inferior) de los explantes en el orificio del filtro de manera que la biopsia se embebió en el filtro. La epidermis se expuso a la cámara interna, y la dermis se expuso a la cámara externa. Se sumergieron estos

filtros en 1 ml de medio de cultivo celular (DMEM, FBS al 1 %, 1.25 µg/ml de anfotericina B, 50 µg/ml de gentamicina, 0.1 U/ml de penicilina/estreptomicina) de manera que la dermis entró en contacto con el medio del pocillo, y la epidermis quedó expuesta al aire. Los cultivos se trataron de la siguiente manera: se aplicaron 2 µl de cada compuesto en PBS a la parte superior (estrato córneo) de cada biopsia usando una pipeta. Se incubaron las biopsias durante 16 horas a 37 °C.

Las muestras se homogenizaron de inmediato en 300 µl de tampón RLT (Qiagen) en viales de tapón roscado de 2 ml llenos de rodamientos de bolas de circonio de 3 mm de diámetro usando un homogenizador de rodamiento de bolas. Las muestras homogenizadas se congelaron instantáneamente y se almacenaron a -80 °C. Los lisados se procesaron usando un kit de extracción de placas RNeasy de 96 pocillos Qiagen. Se realizó una RTPCR en un Lightcycler (Roche Diagnostics) usando sondas y cebadores contra hTNF y hGAPDH (Roche Diagnostics) y se midió la expresión de genes de TNF (Figura 11].

**Tabla 7:** Secuencias de oligonucleótidos

| Nombre                                                                                                                                                                          | ID del Oligo | Secuencia (5' a 3')                                            | SEQ ID NO. |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|----------------------------------------------------------------|------------|
| Control                                                                                                                                                                         | Oligo 4832.1 | mGmUmU mUmCmA C*C*A* C*C*C* mAmAmU mUmCmC/iSp18//iSp18//3Toco/ | 43         |
| TNF antisentido                                                                                                                                                                 | Oligo 4831.1 | mUmGmGmGmAmG T*A*G*A*C*A* mAmGmGmUmAmC/iSp18//iSp18//3Toco/    | 44         |
| Las bases especiales usadas en los oligonucleótidos son las siguientes : mX = ARN 2'O-metilo /iSp18/ = Espaciador 18 de fosforamidita, /3Toco/= 3' tocoferol, * = fosforotioato |              |                                                                |            |

**Tabla 8:** Grupos y tratamientos de piel soriásica ex vivo

| Grupos | Origen del tejido | Oligo        | Diana   | Tipo  | Concentración |
|--------|-------------------|--------------|---------|-------|---------------|
| 1      | Paciente A        | Oligo 4832.1 | Control | L-SNA | 100 $\mu$ M   |
| 2      | Paciente A        | Oligo 4831.1 | TNF     | L-SNA | 100 $\mu$ M   |
| 3      | Paciente A        | Oligo 4831.1 | TNF     | L-SNA | 10 $\mu$ M    |
| 4      | Paciente A        | Oligo 4831.1 | TNF     | L-SNA | 1 $\mu$ M     |
| 5      | Paciente B        | Oligo 4832.1 | Control | L-SNA | 100 $\mu$ M   |
| 6      | Paciente B        | Oligo 4831.1 | TNF     | L-SNA | 100 $\mu$ M   |
| 7      | Paciente B        | Oligo 4831.1 | TNF     | L-SNA | 10 $\mu$ M    |
| 8      | Paciente B        | Oligo 4831.1 | TNF     | L-SNA | 1 $\mu$ M     |

**Ejemplo 5: Prueba de la eficacia de SNA anti-TNF y L-SNA en el modelo de ratón de la enfermedad intestinal inflamatoria (IBD) inducida por TNBS**

Se evaluó el efecto de Oligo 227901 (Tabla 9) en un modelo de ratón de IBD inducida por TNBS. Se sintetizó el Oligo 227901 con colesterol en su extremo 3' (reactivos de ChemGenes). En el Ejemplo 6, se muestra la formación de la estructura de SNA autoensamblada de este oligonucleótido usando Cryo-EM. Además, se ha preparado una forma L-SNA del Oligo 227901 añadiendo oligonucleótido a soluciones de liposomas de DOPC de 50 nm. Se llevaron los S-SNA y L-SNA a pH 9.5 en solución de bicarbonato para su uso en animales.

Se realizaron estudios de colitis inducida por TNBS en ratones Balb/c de 6-7 semanas de vida. Para la inducción de la colitis, se administraron 10 mg de TNBS disueltos en

etanol al 80 % por animal por vía intrarrectal el día 0 del estudio. Los ratones de control consistían en ratones tratados solo con vehículo y ratones sin tratamiento previo no tratados.

5           Para examinar el efecto terapéutico de las formas S-SNA y L-SNA del Oligo 227901 en el estudio de colitis inducida por TNBS, los ratones se trataron con compuestos el día 1, 2, 3 y 4 (4 dosis en total) de 100 µg/dosis/ratones a 300 µg /dosis/ratones a través de  
10           sonda oral tras la inducción de la colitis. Los ratones se controlaron diariamente hasta 7 días en cuanto a las observaciones de las puntuaciones clínicas, y se sacrificaron el día 7 para el análisis de la patología total.

15           Las puntuaciones clínicas de los ratones de control y de los ratones tratados se asignaron considerando los parámetros: peso corporal, consistencia de las heces y sangrado por el recto, y cualquier anomalía observada en el pelaje y en el abdomen.

20           Las puntuaciones totales de la patología se asignaron a los ratones de control y a los ratones tratados el último día del estudio a partir de los cólores extraídos de los animales tras la eutanasia. Se asignaron puntuaciones totales de la patología de 0 a 5 de acuerdo con las  
25           observaciones: no se detectaron anomalías (puntuación 0); edema y enrojecimiento en una zona (puntuación 1); edema y enrojecimiento en más de una zona (puntuación 2); una úlcera (puntuación 3); más de una úlcera o úlcera grave (puntuación 4); y edema y enrojecimiento en más de una zona,  
30           y una o más de una úlcera (puntuación 5).

Los resultados del estudio están representados en la Figura 12. La significación estadística de los grupos se

calculó usando ANOVA de una vía, seguida de la prueba post-hoc de Tukey. Un aumento en la puntuación clínica y la puntuación total de la patología en el grupo de solo TNBS sugiere que la administración rectal de TNBS estableció la enfermedad de la colitis en todos los grupos, a excepción de los ratones no tratados previamente. Se observó una reducción significativa en la puntuación clínica media en comparación con el grupo de vehículo relevante para el grupo tratado con la forma S-SNA del Oligo 227901 en una cantidad de 200 µg/dosis de un total de 4 dosis desde el día 1 hasta el día 4 tras la inducción de la colitis con TNBS el día 0. Los animales que se trataron desde el día 1 hasta el día 4 con cuatro dosis de S-SNA (200 µg/dosis y 300 µg/dosis) y L-SNA (200 µg/dosis) mostraron una reducción significativa en la puntuación de la patología total en comparación con el grupo de vehículo. En general, los resultados sugieren que la administración oral de S-SNA tuvo un efecto positivo en los síntomas de la enfermedad, lo que refleja una menor puntuación clínica, menor puntuación de la patología y superior tasa de supervivencia de los animales.

**Tabla 9:** Secuencia del oligonucleótido en la investigación de la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD)

| ID del Oligo | Nombre del Oligo | Secuencia del Oligo (5' a 3')<br>(m = metilado; * = enlace fosforotioato) | SEQ ID NO. |
|--------------|------------------|---------------------------------------------------------------------------|------------|
| 227901       | TNF568-chol      | mUmGmGmGmAmGT*A*G*A*T*G*mAmGmGmUmAmC/iSp18/<br>/ iSp18//chol/             | 45         |

#### **Ejemplo 6: Cryo-TEM de SNA de autoensamblaje**

Se realizó una formación de imágenes con CryoTEM en una solución de ácidos nucleicos esféricos de autoensamblaje (S-SNA) de Oligo6307 (Tabla 10). Se prepararon

S-SNA en solución salina tamponada con fosfato (PBS) (NaCl 137 mM, fosfato 10 M, KCl 2.7 mM, pH 7.4, Hyclone) usando una solución de oligonucleótido 2.4 mM. La muestra se conservó en hielo vitrificado soportado por películas de carbón holey sobre rejillas de cobre de malla 400. Cada muestra se preparó aplicando una gota de 3  $\mu$ l de suspensión de muestra a una rejilla limpiada, secando con papel de filtro y procediendo de inmediato con la vitrificación en etano líquido. Las rejillas se almacenaron bajo nitrógeno líquido hasta que se transfirieron al microscopio electrónico para la formación de imágenes.

La microscopía electrónica se realizó usando un microscopio electrónico FEI Tecnai T12, que funcionaba a 120 keV dotado de una cámara CCD FEI Eagle 4K x 4k. Se transfirieron las rejillas de hielo vitrificado al microscopio electrónico usando un CryoStage, que mantiene las rejillas a una temperatura inferior a -170 °C. La imagen de alta ampliación se adquirió con un aumento nominal de 110000 x (0.10 nm/píxel). La imagen se adquirió con un subfoco nominal de -5  $\mu$ m a -3  $\mu$ m, y dosis electrónicas de 10 a 40 e-/Å<sup>2</sup>.

La muestra se compone principalmente de muchas partículas redondas pequeñas de ~3 nm en todo el campo (Figura 13). Estas partículas redondas corresponden al diámetro de una agrupación de moléculas de colesterol que forma el núcleo hidrófobo de la partícula de S-SNA. Las partículas redondas pequeñas de ~3 nm están espaciadas uniformemente por huecos de 3 a 5 nm que probablemente corresponden al oligonucleótido corona dispuesto en una orientación esférica alrededor del núcleo hidrófobo (Figura 14A). El oligonucleótido corona o cubierta define el radio hidrodinámico de S-SNA, que es de aproximadamente 13 nm,

dando como resultado el espaciamiento uniforme entre los núcleos hidrófobos densos de electrones (Figura 14B).

**Tabla 10:** Secuencia del oligonucleótido

|              |                                                                |            |
|--------------|----------------------------------------------------------------|------------|
| ID del Oligo | Secuencia (de 5' a 3')                                         | SEQ ID NO. |
| Oligo 6307   | mUmGmGmGmAmG T*A*G*A*C*A*<br>mAmGmGmUmAmC/iSp18//iSp18//3Chol/ | 46         |

Se hace constar que con relación a esta fecha, el mejor método conocido por la solicitante para llevar a la práctica la citada invención, es el que resulta claro de la presente descripción de la invención.