

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 450 929**

51 Int. Cl.:

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 31/115 (2006.01)

A61K 31/711 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.10.2005 E 05802169 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.12.2013 EP 1812075**

54 Título: **Oligonucleótidos antisentido para tratar la alergia y la proliferación de las células neoplásicas**

30 Prioridad:

29.10.2004 US 623206 P

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

25.03.2014

73 Titular/es:

**TOPIGEN PHARMACEUTICALS INC. (100.0%)
2901 RUE RACHEL BUREAU 13
MONTREAL QC H1W4A4, CA**

72 Inventor/es:

**ZEMZOUMI, KHALID y
RENZI, PAOLO**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 450 929 T3

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

DESCRIPCIÓN

Oligonucleótidos antisentido para tratar la alergia y la proliferación de las células neoplásicas

Campo de la invención

5 La invención se refiere al uso de oligonucleótidos antisentido dirigidos contra receptores celulares específicos, en monoterapia o en politerapia, para inhibir la inflamación general, incluida la inflamación asociada al asma y la alergia, y la hipereosinofilia. La descripción también se refiere al uso de oligonucleótidos antisentido para inhibir la proliferación de las células neoplásicas, tal como el cáncer.

Antecedentes de la invención

10 Los oligonucleótidos antisentido son una nueva clase de sustancias farmacéuticas. En general, antisentido se refiere al uso de oligonucleótidos sintéticos pequeños, con los mismos constituyentes que los encontrados en el ADN o el ARN humano. Los oligonucleótidos antisentido se diseñan como una secuencia complementaria de una parte de un gen al cual se dirigen para que sean capaces de adherirse a esta secuencia e inhibir la expresión génica. La expresión del gen se inhibe por la hibridación de un oligonucleótido antisentido a una diana sentido específica de ARN mensajero (ARNm) de acuerdo con el apareamiento de bases de Watson y Crick, en el cual la adenosina y la
15 timidina (uracilo en el ARNm) o la guanosina y la citidina interaccionan a través de puentes de hidrógeno. Estos efectos se pueden explicar mediante dos mecanismos, el primero es que la hibridación empeora la traducción del ARNm deseado, y el segundo es que se induce la ARNasa H o enzimas similares que degradan el ARNm. Una ventaja importante de esta estrategia es que la acción es específica y posiblemente provoque menos efectos secundarios y toxicidad, en especial cuando se aplica en el sitio de acción (tratamiento tópico). Esta estrategia
20 terapéutica posiblemente se pueda aplicar a cualquier enfermedad en la que se crea que una sobreexpresión de uno o varios genes ocasiona la presencia o persistencia de la enfermedad. Como resultado, se han realizado numerosos estudios sobre la capacidad terapéutica de los oligonucleótidos antisentido a la hora de luchar contra el cáncer y las enfermedades víricas.

25 Los oligonucleótidos antisentido se pueden utilizar para inhibir la expresión del receptor de la interleucina 6 (IL-6) y, en consecuencia, los efectos de la interleucina 6, el mediador inflamatorio agudo, sobre las células. Se han realizado pocos estudios para evaluar si los oligonucleótidos antisentido se pueden emplear para inhibir otros receptores que expresan las células que intervienen en la inflamación, que incluyen, pero sin limitarse a ellas, la inflamación asociada al asma y la inflamación asociada a las enfermedades atópicas y la alergia, o en las células cancerígenas.

30 El asma es una enfermedad que afecta del 5 al 10% de la población y que ha doblado su prevalencia en los últimos 25 años. Este incremento se ha notado especialmente en los lactantes después de una infección vírica de las vías aéreas (bronquiolitis), en los niños y en el asma inducida por el trabajo. Los problemas respiratorios recurrentes relacionados con el asma a menudo están favorecidos por alérgenos, pero se desconoce aún la causa exacta del asma. Sin embargo, se cree que agentes tales como los virus están implicados en la perpetuación de la inflamación anormal que se encuentra en las vías aéreas de los pacientes con asma y, por lo tanto, en la persistencia de la
35 enfermedad.

Por este motivo, las recomendaciones actuales para el tratamiento de primera línea del asma es una medicación antiinflamatoria potente, tal como las que contienen corticoesteroides y antileucotrienos. Aunque este tratamiento es eficaz en muchos pacientes, algunos pacientes son resistentes a los corticoesteroides. Esta medicación también es un inmunosupresor potente con efectos secundarios a largo plazo y no se ha demostrado que sea eficaz para
40 prevenir la alergia ni el asma. Los antileucotrienos tienen algún efecto en la alergia y el asma, pero no son tan eficaces como los corticoesteroides.

En la aparición y perpetuación de la inflamación de las vías aéreas de los pacientes con asma intervienen varios mediadores inflamatorios. Algunos mediadores atraen las células inflamatorias a las vías aéreas, bien a través de la quimiotaxia de los eosinófilos (las quimiocinas: RANTES, eotaxinas 1, 2, 3, MCP-3, -4 que actúan principalmente en la inflamación asmática a través de un receptor denominado CCR3), o bien a través de la activación de las células
45 endoteliales (IL-4, IL-13). Otros mediadores provocan la sensibilización e incrementan la supervivencia de las células inflamatorias en las vías aéreas (IL-3, IL-4, IL-5, GM-CSF). Así pues, estos mediadores consisten bien en citocinas específicas de los eosinófilos, o bien en citocinas del fenotipo de tipo 2 de los linfocitos T cooperadores (Th2: IL-3, -4, -5, -6, -9, -10, -13 y GM-CSF), (John A. E. y Lukacs N. W., 2003 *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis.*, 20: 180-189; Blease et al., 2003, *Expert Opin Emerg Drugs* 8: 71-81). Se ha demostrado que mejora el asma y la inflamación respiratoria general cuando hay una disminución de estos mediadores inflamatorios en las vías aéreas.

La alergia es una hipersensibilidad a un alérgeno que ocasiona una respuesta inmunitaria indeseable. La alergia es una enfermedad muy prevalente, por ejemplo, la rinitis atópica y la conjuntivitis afectan en torno al 30% de la población. La alergia se caracteriza por la producción anómala de la IgE y la inflamación contra un alérgeno. En
55 presencia de IgE y del alérgeno, las células efectoras, tales como los mastocitos, se desgranulan y liberan los

mediadores inflamatorios que conducen al reclutamiento de las mismas células inflamatorias que se encuentran en el asma. En la rinitis alérgica (a saber, rinitis alérgica polínica o «fiebre del heno»), en la conjuntivitis alérgica, en la poliposis nasal, en la sinusitis crónica y en el eccema, tal como la dermatitis atópica, uno encuentra el mismo exceso de mediadores inflamatorios, tal como los presentes en el asma. La IL-4 y la IL-13 se necesitan para producir la IgE e inducir las células con un fenotipo Th2 (Barnes P. J., 2003, *Cytokine Growth Factor Rev.* 14: 511-522; Schuh et al., 2003, *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003, 14: 503-510). Enfermedades atópicas es un nombre genérico para las enfermedades alérgicas que se desarrollan por la exposición a alérgenos, en especial en los individuos con una propensión genética a que los alérgenos lo sensibilicen con facilidad. Los individuos que tienen estos factores de predisposición desarrollan con facilidad una respuesta inmunitaria anómala contra antígenos alimentarios y alérgenos inhalados. Algunos ejemplos específicos de enfermedades alérgicas son el asma bronquial, la dermatitis atópica, la urticaria, la rinitis alérgica, la conjuntivitis alérgica y la enterogastritis alérgica.

Una neoplasia es el crecimiento anormal de tejido que es incontrolable y progresivo. Una neoplasia maligna a menudo se caracteriza como un cáncer. El cáncer es la segunda causa por importancia de muerte en los humanos y es una terminología general para más de 100 enfermedades que se caracterizan por la proliferación anormal de las células inmortalizadas. Uno de los mecanismos que interviene en la persistencia y el incremento de estas células es mediante la liberación de factores de crecimiento que actúan a través de receptores y que conducen a la proliferación celular. Entre estos factores de crecimiento se ha demostrado que el GM-CSF es un factor de crecimiento importante para varias células tumorales. El receptor de quimiocinas CCR3 se caracterizó recientemente en los linfocitos B malignos recuperados de pacientes con leucemia linfocítica crónica (LLC) y con tricoleucemia (HCL, por su nombre en inglés) (Trentin et al., 2004, *Blood*, 104, 502-508). De hecho, la transactivación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, por su nombre en inglés) a través de CCR3, el receptor de quimiocinas, se encontró que era una vía decisiva que desencadenaba la activación de la cinasa de MAP y la producción de citocinas en las células epiteliales de los bronquios (Adachi et al., 2004, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320, 292-396). La inhibición de la proliferación de las células cancerosas mediante el bloqueo de los receptores de los factores de crecimiento y/o de las quimiocinas puede ser importante para el tratamiento de determinados cánceres.

Los eosinófilos son un tipo de glóbulos blancos. Son leucocitos granulares con un núcleo que normalmente tiene dos lóbulos conectados por una hebra delgada de cromatina y cuyo citoplasma contiene gránulos redondos gruesos de tamaño uniforme y que se tiñen con eosina. La hipereosinofilia se caracteriza por un incremento del número de eosinófilos, y a menudo está asociada a las alergias, asma e infecciones.

Para inhibir las reacciones inflamatorias se sabe que se han usado a veces oligonucleótidos dirigidos contra secuencias de ácidos nucleicos específicas que codifican receptores. La solicitud PCT de patente internacional n.º WO 99/66037 de Renzi describe los oligonucleótidos antisentido que se utilizan para tratar y/o prevenir asma, alergia, hipereosinofilia, inflamación general y cáncer. Específicamente, los oligonucleótidos de Renzi se dirigen contra las secuencias de ácidos nucleicos que codifican un receptor CCR3, una subunidad común de los receptores de IL-4 e IL-3, o una subunidad común de los receptores de IL-3, IL-5 y GM-CSF. Entre otros, se describe en dicha memoria un oligonucleótido antisentido identificado como 107A (5' -GGGTCTGCAGCGGGATGGT-3'), que está dirigido contra la subunidad beta (β) común del receptor de IL-3, de IL-5 y de GM-CSF.

Para los posibles usos clínicos, los oligonucleótidos antisentido deberían ser estables a la degradación por nucleasas celulares y del suero, mostrar una fijación inespecífica baja a las proteínas celulares y del suero, reconocer mejor la secuencia diana del ARNm, mostrar que es capaz de atravesar la membrana celular y de desencadenar nucleasas celulares cuando forman complejo con el ARNm complementario. Está bien documentado que los oligonucleótidos que contienen azúcares naturales (D-ribosa y D-2-desoxirribosa) y enlaces fosfodiéster son degradados con rapidez por las nucleasas intracelulares y del suero, lo que limita su utilidad como agentes terapéuticos eficaces. Se han descrito modificaciones químicas estratégicas de los oligonucleótidos para mejorar su estabilidad y eficacia como agentes terapéuticos. Los principales cambios químicos incluían la modificación del resto glucídico, del resto básico y/o la modificación o reemplazo del enlace fosfodiéster internucleotídico. Hasta la fecha, los análogos más ampliamente estudiados son los oligodesoxinucleótidos con fosforotioato (PS, por su nombre en inglés), en los cuales uno de los átomos de oxígeno que no forman puente en el esqueleto fosfodiéster está reemplazado por un azufre (Eckstein F., 1985, *Ann. Rev. Biochem.*, 54: 367-402). Se han desarrollado varias generaciones de oligonucleótidos antisentido y se han utilizado para estudios *in vitro* e *in vivo* (Goodchild J., 2004, *Curr. Opin. Mol. Ther.* 2004, 6: 120-128; Urban E. y R. Noe C. R., 2003, *Farmaco*, 58: 243-258).

Recientemente, Renzi et al. describieron el uso de la 2',6'-diaminopurina (DAP) y los análogos de la misma en las moléculas de ácido nucleico para las composiciones antiinflamatorias (solicitud PCT de patente internacional n.º WO 03/004511 A2). En esta referencia también se describe la preparación de moléculas de ácido nucleico que tienen mayor eficacia fisiológica *in vivo* y menor toxicidad en comparación con los oligonucleótidos sin DAP. Renzi et al. enseñan además que la sustitución de DAP es particularmente útil para preparar oligonucleótidos dirigidos contra enfermedades pulmonares/respiratorias tales como fibrosis quística, asma, bronquitis crónica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, bronquitis eosinófila, alergias, rinitis alérgica, fibrosis pulmonar, síndrome de dificultad respiratoria aguda del adulto, sinusitis, virus sincitial respiratorio u otra infección vírica de las vías respiratorias y

cáncer.

Allam et al. (*Antisense & Nucl. Acids Drug Devel.* 11: 289-300 (2001)) describen la inhibición de la señalización de GM-CSF/IL-3/IL-5 por los oligodesoxinucleótidos antisentido cuya diana es la cadena β común de sus receptores.

- 5 Allakhverdi et al. (*Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 165: 1015-1021 (2002)) describe la inhibición de la eosinofilia inducida por antígeno y la hiperreactividad de las vías aéreas por tales oligonucleótidos antisentido en un modelo de asma alérgica en ratas.

10 Sería deseable tener más oligonucleótidos antisentido dirigidos contra al menos un receptor común específico de las citocinas de Th2 o bien de los receptores para los mediadores que atraen células que responden a las citocinas de Th2, para inhibir la reacción inflamatoria que está presente en el asma o en la alergia, y para inhibir la proliferación celular neoplásica.

También sería muy deseable tener más oligonucleótidos antisentido dirigidos contra secuencias de ácido nucleico que codifican receptores de tal modo que, al inhibir a estos receptores, estos oligonucleótidos se podrían emplear en el tratamiento y/o la prevención de asma, alergia, hipereosinofilia, inflamación general y cáncer.

Compendio de la invención

- 15 La presente invención se define mediante las reivindicaciones.

La presente invención da a conocer el uso de oligonucleótidos antisentido, dirigidos contra al menos una subunidad común de un receptor celular, tal como, por ejemplo, la subunidad β común de los receptores de IL-3, IL-5 y GM-CSF o del receptor de quimiocinas CCR3, para tratar y/o prevenir al menos una de asma, alergia, hipereosinofilia e inflamación general.

- 20 La presente invención da a conocer composiciones terapéuticamente eficaces que comprenden dos oligonucleótidos antisentido, cada uno dirigido contra secuencias de ácido nucleico que codifican la subunidad β común de los receptores de IL-3, IL-5 y GM-CSF, o el receptor CCR3, para un mejor efecto en el tratamiento y/o la prevención de al menos una de asma, alergia, hipereosinofilia e inflamación general.

- 25 La presente invención trata de dar a conocer oligonucleótidos antisentido para cualquiera de lo anterior así como oligonucleótidos antisentido modificados químicamente, que se modifican por los medios conocidos, y que son más estables en el organismo al mismo tiempo que muestran una eficacia mejorada y una menor toxicidad.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se da a conocer un uso de la composición farmacéutica, para tratar y/o prevenir al menos una de asma, alergia, hipereosinofilia e inflamación general.

- 30 La invención de la presente memoria también se refiere a modificaciones de un oligonucleótido u oligonucleótidos antisentido que no afectan adversamente de manera significativa a su capacidad para reducir la actividad o inhibir la expresión de una proteína deseada, pero que puede mejorar esta capacidad.

Breve descripción de los dibujos

Éstas y otras características de las realizaciones preferidas de la invención serán más evidentes en la siguiente descripción detallada en la que se hace referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

- 35 La figura 1A muestra el alineamiento de secuencias de tres clones obtenidos de la amplificación por PCR de la cadena β común de los genes del receptor de IL-3, IL-5 y GM-CSF del macaco cangrejero con los correspondientes ortólogos de humano, chimpancé, cerdo, rata y ratón, que rodea la secuencia del complemento de TOP004 humano.

- 40 La figura 1B muestra las secuencias de aminoácidos predichas de la región traducida que rodea el segmento complementario TOP004 en las secuencias de ADN clonadas de la cadena β común de macaco cangrejero, humano, chimpancé, cerdo, rata y ratón.

La figura 2A muestra la reducción de la expresión del ARNm de la cadena β (β_c) al variar la concentración de TOP004 en las PBMC de macaco cangrejero en comparación con células sin tratar.

La figura 2B muestra la reducción de la expresión del ARNm de CCR3 al variar la concentración de TOP005 en las PBMC de macaco cangrejero en comparación con células sin tratar.

- 45 La figura 3A muestra la reducción de la expresión de la proteína de la cadena β (β_c) en la superficie celular con distintas concentraciones de TOP004 en las PBMC de macaco cangrejero en comparación con células sin tratar.

La figura 3B muestra la reducción de la expresión de la proteína de CCR3 en la superficie celular con distintas concentraciones de TOP005 en las PBMC de macaco cangrejero en comparación con células sin tratar.

La figura 4A muestra la reducción de la expresión del ARNm de la cadena β (β_c) al variar la concentración de ASM8 en las PBMC de macaco cangrejero en comparación con células sin tratar.

La figura 4B muestra la reducción de la expresión del ARNm de CCR3 al variar la concentración de ASM8 en las PBMC de macaco cangrejero en comparación con las células sin tratar.

- 5 La figura 5 muestra el efecto de los oligonucleótidos sobre la expresión del ARNm de CCR3 en las células diferenciadas de HL60. Se demuestra que el oligonucleótido antisentido A86, dirigido contra CCR3, disminuye la expresión del ARNm de CCR3 cuando se compara con el control y con los oligonucleótidos sentido que no tienen ningún efecto sobre la expresión de la G3PDH.

- 10 La figura 6 muestra un ensayo de movilización del calcio en las células HL-60 cl-15 tratadas con oligonucleótidos. La disminución de la movilización en respuesta a la eotaxina en células tratadas con A86 se compara con las células tratadas con los oligonucleótidos sentido y de control.

La figura 7 muestra el efecto de los oligonucleótidos sobre la respuesta quimiotáctica a la eotaxina que presentan los eosinófilos humanos purificados. La respuesta quimiotáctica relativa de los eosinófilos tratados con A86 se compara con las células tratadas con los oligonucleótidos sentido y de control.

- 15 La figura 8 muestra un ensayo de movilización del calcio en los eosinófilos tratados con oligonucleótidos en respuesta a la eotaxina. La movilización del calcio se compara en los eosinófilos tratados con A86 y con las células tratadas con los oligonucleótidos sentido y de control.

La figura 9 muestra el efecto de TOP005 sobre la expresión de CCR3 en la superficie celular presentado como el porcentaje de expresión frente a los controles en células Eol-1 y U937.

- 20 La figura 10 muestra el efecto de TOP005 sobre la expresión del ARNm en las PBMC humanas. Los geles que muestran la expresión de G3PDH y de CCR3 se encuentran sobre el gráfico de barras. La proporción de expresión del ARNm de CCR3 por G3PDH, normalizada para los controles, se presenta en la parte inferior.

- 25 La figura 11A muestra la modulación de la expresión del ARNm de la cadena β (β_c) en las células TF-1 tratadas con 107A mediante el uso de la RT-PCR para detectar la expresión del ARNm de la cadena β (β_c) o del ARNm de la G3PDH.

Las figuras 11B y 11C muestran el efecto del tratamiento con 107A y oligonucleótidos sentido sobre la expresión de la cadena β en la superficie celular de las células TF-1, según se determina mediante análisis por FACS.

La figura 11D muestra el efecto de TOP004 sobre la expresión del ARNm y de la proteína de la cadena β común en las células U937.

- 30 La figura 12 muestra la proliferación de las células TF-1 tratadas con 107A en presencia de GM-CSF, IL-3 o IL-5.

La figura 13A muestra la modulación de la supervivencia de los eosinófilos debida a 107A, según se valoró con el uso del ensayo de exclusión con colorante azul tripano.

La figura 13B muestra la modulación de la supervivencia de los eosinófilos debida a 107A según se valoró mediante análisis citométrico de flujo con el protocolo de yoduro de propidio y anexina-V-FITC.

- 35 La figura 14 muestra el perfil de elución de los productos que forman ASM8 (TOP004 y TOP005) por cromatografía de intercambio aniónico con DEAE.

La figura 15 muestra el perfil de elución para ASM8 tras el tratamiento con CH_3COOH durante 3 horas y luego la lisis alcalina antes del fraccionamiento por cromatografía de intercambio aniónico con DEAE.

- 40 La figura 16 muestra el perfil de elución para ASM8 tras el tratamiento con CH_3COOH durante 6 horas y luego la lisis alcalina antes del fraccionamiento mediante cromatografía de intercambio aniónico con DEAE.

Las figuras 17A1, 17A2, 17B1 y 17B2 muestran la estabilidad química de ASM8 después de la conservación a diferentes temperaturas y después de la elución con cromatografía de intercambio aniónico con DEAE.

La figura 18 muestra las curvas de fusión para TOP004 y TOP005 en PBS a 1X.

- 45 La figura 19 muestra un resumen de la termodinámica basado en los resultados de los ajustes de la curva de fusión de TOP004 y TOP005 en PBS a 1X.

Las figuras 20A y 20B muestran las concentraciones de TOP004 y TOP005 y de sus metabolitos en el plasma de mono el día 1 después del tratamiento con una dosis alta de ASM8.

Las figuras 21A y 21B muestran las concentraciones de TOP004 y TOP005 y de sus metabolitos en el plasma de macaco el día 14 después del tratamiento con una dosis alta de ASM8.

Descripción detallada de la invención

- Varios mediadores inflamatorios intervienen en la aparición y perpetuación de la inflamación de las vías aéreas de los pacientes con asma. Algunos mediadores atraen las células inflamatorias a las vías aéreas a través de la quimiotaxia de los eosinófilos. Muchas de estas quimiocinas actúan principalmente en la inflamación asmática o alérgica a través del receptor CCR3. Otros mediadores ocasionan la sensibilización y el incremento de la supervivencia de las células inflamatorias en las vías aéreas o la piel, tales como IL-3, IL-5 y GM-CSF. Se ha demostrado que el asma mejora cuando hay una disminución de estos mediadores inflamatorios en las vías aéreas.
- Además, el cáncer, caracterizado por la proliferación anormal de las células inmortalizadas, puede estar provocado por la liberación de mediadores inflamatorios y/o factores de crecimiento que actúan a través de los receptores y conducen a la proliferación celular. Entre estos, el GM-CSF se ha demostrado que es un factor de crecimiento importante para varias células tumorales. El receptor de quimiocinas CCR3 se caracterizó en los linfocitos B malignos recuperados de pacientes con leucemia linfocítica crónica (LLC) y con tricoleucemia (Trentin et al., 2004, *Blood*, 104, 502-508). De hecho, la transactivación del EGFR a través del CCR3 se encontró que era una vía decisiva que desencadenaba la activación de la cinasa de MAP y la producción de citocinas en las células epiteliales bronquiales (Adachi et al., 2004, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320, 292-396). La inhibición de la proliferación y la metástasis de las células cancerosas mediante el bloqueo de los receptores para los factores de crecimiento o el receptor de quimiocinas CCR3 podría ser importante para el tratamiento de determinados cánceres.
- En una realización de la invención, se da a conocer un nuevo oligonucleótido antisentido identificado como 828 (5'-**GTTACTACTTCCACCTGCCTG**-3', (SEQ ID n.º 1)) y dirigido contra el receptor de quimiocinas CCR3. Los ejemplos descritos en la presente memoria muestran que 828 es eficaz para disminuir o bloquear la expresión del ARNm de CCR3 en las líneas de células humanas.
- En otra realización de la invención, se dan a conocer los oligonucleótidos antisentido nuevos TOP004 y TOP005 basados en el 107A descrito previamente y en el 828 anterior. El TOP004 (5'-**GGGTCTGCXGCGGGXTGGT**-3', (SEQ ID n.º 13), en donde X representa una modificación con DAP de un resto de adenosina), al igual que 107A, es un 19-mero dirigido contra el ARNm de la cadena β común de los receptores de IL-3, IL-5 y GM-CSF. El TOP005 (5'-**GTIXCIXCTTCCXCCTGC**-3', (SEQ ID n.º 14), en donde X representa una modificación con DAP de un resto de adenosina), al igual que 828, es un 21-mero dirigido contra el ARNm del receptor de quimiocinas CCR3. Una composición que comprende el TOP004 y el TOP005 se identifica como parte de ASM8.
- Tal y como se describe en la presente memoria, TOP004 y TOP005 poseen actividad en un sistema de primate no humano, lo que valida el uso del macaco cangrejero para la valoración de la seguridad. La figura 1 muestra la secuenciación del gen de la cadena β común del macaco cangrejero. La secuencia de la cadena β del macaco cangrejero complementaria a TOP004 mostró una homología significativa. El altísimo grado de identidad entre el macaco y la secuencia de la cadena β humana sugiere una probable actividad funcional de TOP004 en el macaco cangrejero. La eficacia de TOP004 y TOP005 a la hora de bloquear o disminuir la expresión de la cadena β común y de CCR3 en las células mononucleares de la sangre periférica de macaco se muestra en las figuras 2, 3 y 4. Los resultados muestran que TOP004 y TOP005 dirigidos contra las dianas génicas humanas son eficaces a la hora de reducir la expresión de sus dianas respectivas en las células mononucleares de la sangre periférica (PBMC) de macaco cangrejero. El ASM8, que contiene tanto TOP004 como TOP005, inhibió significativamente, con la concentración más baja, la expresión de los receptores con la cadena β común y CCR3, bien hasta mayor nivel de inhibición o hasta el mismo nivel. Por lo tanto, TOP004 y TOP005 juntos presentan efectos sinérgicos a la hora de bloquear la expresión del ARNm de CCR3 y de la cadena β . Además, en las tabla 7 y 8, las muestras traqueales, tomadas de monos tratados con ASM8, se analizaron por el nivel de la expresión del ARNm. La expresión de los genes diana se normalizó por las concentraciones del ARNm de las citocinas inflamatorias (IL-4 y TNF- α). Incluso aproximadamente 24 horas después de la administración de ASM8, la expresión relativa de la subunidad de β_c y del ARNm de CCR3 normalizadas por el ARNm de IL-4 disminuyó un 29% y un 24%, respectivamente, y la expresión relativa del TNF- α disminuyó un 30% y un 24%, respectivamente, en los animales tratados con ASM8.
- En las figuras 5 a 10, a los nucleótidos antisentido, entre ellos A86 y TOP005, dirigidos contra el ARNm de CCR3, se les analizó la eficacia en las células humanas y en las líneas celulares. Cuando se valoró mediante la reacción en cadena de la polimerasa acoplada a transcripción inversa semicuantitativa (RT-PCR, por su nombre en inglés), los oligonucleótidos antisentido ocasionaron la inhibición de la expresión del ARNm de CCR3. Además, mediante el análisis por FACS se demuestra que la expresión de la proteína de CCR3 en la superficie celular también se inhibió mediante el tratamiento con el oligonucleótido antisentido. Aún más, la inhibición funcional de CCR3 se confirmó mediante la inhibición de la movilización del calcio (Ca^{2+}) en los eosinófilos purificados tras la estimulación con eotaxina. Adicionalmente, los oligonucleótidos inhibieron la quimiotaxia de los eosinófilos un 55% en un ensayo de la quimiotaxia.

- En las figuras 11 a 13, los antisentido 107A y TOP004 se utilizaron para tratar distintas células. Las células TF-1 incubadas con 107A mostraron una reducción de la expresión del ARNm de la cadena β . El 107A también inhibió la proliferación de las células TF-1 en presencia de IL-3, IL-5 o GM-CSF. Además, el 107A redujo, de una manera dependiente de la dosis, el efecto antiapoptótico de IL-5 sobre los eosinófilos. Las células U937 incubadas con TOP004 mostraron una reducción de la expresión de la cadena β común a nivel del ARNm y de la proteína. Los antisentidos 107A y TOP004 fueron, así pues, muy eficaces a la hora de bloquear la expresión del ARNm y de la proteína de la cadena β , y fue funcional a la hora de bloquear las respuestas celulares asociadas en los cultivos de células humanas.
- En las figuras 14 a 17B2, se demuestra la estabilidad del ASM8 mediante la elución de la composición en diversas condiciones. El ASM8 se eluyó con el sistema de fraccionamiento basado en la cromatografía líquida de gran resolución (HPLC) de intercambio de aniones con DEAE para valorar la integridad de ASM8 y sus productos de degradación tras la conservación a diferentes temperaturas. Los componentes del ASM8 no sufrieron ninguna degradación detectable cuando se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ o $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ incluso durante 2 meses.
- En las figuras 18 a 19, las curvas de fusión y los resúmenes termodinámicos proporcionados por el ASM8 muestran que las dos hebras de oligonucleótidos no interactúan significativamente en la solución.
- En las figuras 20 a 21, se midió la concentración de los constituyentes oligonucleotídicos de ASM8 y sus metabolitos primarios ($n - 1$) en muestras de plasma de mono. Las muestras se recogieron durante un ensayo de toxicidad no clínica en la que los animales se trataron durante 14 días consecutivos por inhalación.
- Así pues, se dan a conocer los oligonucleótidos antisentido dirigidos contra la subunidad β común de los receptores de IL-3, IL-5 y GM-CSF, y el receptor CCR3 y contra los ácidos nucleicos que los codifican. También se dan a conocer las composiciones farmacéuticas que comprenden los oligonucleótidos con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Se describen los usos de los oligonucleótidos y los procedimientos que comprenden la administración de los oligonucleótidos para tratar y/o prevenir al menos una de asma, alergia, hipereosinofilia, inflamación general y cáncer.
- La terminología «ácido nucleico» y «molécula de ácido nucleico» tal y como se utilizan indistintamente en la presente memoria, se refiere a una molécula que comprende nucleótidos, a saber, ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos o ambos. La terminología incluye monómeros y polímeros de ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos, en donde el ribonucleótido y/o desoxirribonucleótidos están conectados, en el caso de los polímeros, mediante enlaces de 5' a 3'. Sin embargo, los enlaces pueden incluir cualquiera de los enlaces conocidos en la técnica de la síntesis de ácidos nucleicos que incluye, por ejemplo, ácidos nucleicos que comprenden enlaces de 5' a 2'. Los nucleótidos utilizados en la molécula de ácido nucleico se pueden producir de forma natural o pueden ser análogos producidos por medios sintéticos que son capaces de formar relaciones de pares de bases con pares de bases que se producen de forma natural.
- Ejemplos de bases que no se producen de forma natural y que son capaces de formar las relaciones de apareamiento de bases incluyen, pero no se limitan a ellos, análogos de aza- y desaza-pirimidina, análogos de aza- y desaza-purina, y otros análogos de base heterocíclicos, en donde uno o varios de los átomos de carbono y nitrógeno de los anillos de purina y pirimidina se han sustituido por heteroátomos, p. ej., oxígeno, azufre, selenio, fósforo y similares.
- La terminología «esqueleto de ácido nucleico», tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a la estructura química que enlaza los nucleótidos en una molécula. Esto puede incluir las estructuras formadas por alguno y por todos los medios de conectar nucleótidos químicamente. Un esqueleto modificado tal y como se utiliza en la presente memoria incluye modificaciones del enlace químico entre los nucleótidos, así como otras modificaciones que pueden utilizarse para mejorar la estabilidad y la afinidad, tales como modificaciones de la estructura del azúcar. Por ejemplo, puede utilizarse un $[\alpha]$ -anómero de desoxirribosa, en donde la base está invertida respecto al $[\beta]$ -anómero natural. En una realización preferida, el 2'-OH del grupo del azúcar se puede alterar a 2'-O-alquilo o a 2'-O-alquil-n(O-alquilo), que proporciona resistencia a la degradación sin comprometer la afinidad.
- La terminología «oligonucleótido», tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una molécula de ácido nucleico que comprende de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 nucleótidos, más preferiblemente de 1 a 80 nucleótidos, e incluso más preferiblemente de aproximadamente 4 a aproximadamente 35 nucleótidos.
- Los compuestos de oligonucleótidos antisentido de acuerdo con la presente invención también incluyen siRNA (ARN interferentes pequeños) y los RISC (complejos de silenciamiento inducidos por ARN) que los contienen y que surgen de la estrategia de RNAi (interferencia por ARN). La estrategia de la interferencia por ARN (RNAi, por su nombre en inglés), que se ha descrito recientemente, se considera una nueva herramienta para la inhibición de la expresión del gen diana. Como ya se sabe desde hace algunos años, la RNAi se basa en un antiguo mecanismo de defensa antivírica de los eucariotas inferiores. Está inducido por los ARN bicatenarios y se procesan en los ARN interferentes pequeños de 21 a 23 nt (siRNA, por su nombre en inglés), que provoca la degradación del ARNm endógeno

homólogo tras hibridarse al ARNm diana una forma monocatenaria con la ayuda del complejo RISC. Aunque todavía no se conoce completamente el modo en el que funciona la RNAi, ya sirve como estrategia preferente para generar fenotipos por pérdida de función entre una amplia variedad de especies eucariotas, tales como nemátodos, moscas, plantas, hongos y mamíferos.

- 5 Los compuestos de oligonucleótidos antisentido de acuerdo con la presente invención también incluyen ribozimas y secuencias nucleotídicas cortas, ARN o ADN monocatenario o bicatenario, que puede incorporar modificaciones químicas como las que se describieron anteriormente, capaces de inhibir la transcripción y/o traducción génica *in vitro* y/o *in vivo*.

- 10 La terminología «oligonucleótido modificado» y «molécula de ácido nucleico modificado» incluye compuestos de oligonucleótidos antisentido que se han modificado sin un efecto adverso significativo para su actividad, por ejemplo, mediante la inserción o delección de 1 o más bases. En particular, la adición o delección de las bases de los extremos terminales de los oligonucleótidos que muestran un 100% de complementación con el gen al que se dirigen se puede realizar por lo general sin una pérdida significativa de actividad inhibidora. Tales modificaciones se pueden realizar para incrementar la actividad o para proporcionar una mejor estabilidad del oligonucleótido. Además, la
- 15 sustitución de 1 o varias bases en los presentes compuestos de oligonucleótidos antisentido también se puede realizar sin un efecto adverso para la actividad, por ejemplo, sustitución de purina por otra purina (adenina, guanina) y de pirimidina por pirimidina (citocina, timina, uracilo). Oligonucleótido modificado y molécula de ácido nucleico modificado tal y como se utiliza en la presente memoria también incluye ácidos nucleicos, entre ellos oligonucleótidos, con una o más modificaciones químicas a nivel molecular de las estructuras moleculares naturales
- 20 de todas o alguna de las bases del ácido nucleico, restos de azúcar, enlaces fosfato internucleosídicos así como moléculas que tienen sustituyentes añadidos, tales como diaminas, colesterol u otros grupos lipófilos, o una combinación de modificaciones en estos sitios. Los enlaces fosfato internucleosídicos pueden ser fosfodiéster, fosfotriéster, fosforamidato, siloxano, carbonato, carboximetiléster, acetamidato, carbamato, tioéter, fosforamidato puenteado, metilfosfonato puenteado, fosforotioato, metilfosfonato, fosforoditioato, fosforotioato puenteado y/o
- 25 enlaces sulfona internucleotídicos, o enlaces 3'-3', 2'-5' o 5'-5', y combinaciones de tales enlaces similares (para producir oligonucleótidos modificados de esqueleto mixto). Las modificaciones pueden ser internas (únicas o repetidas) o en uno o ambos extremos de la molécula de oligonucleótido, y puede incluir adiciones a la molécula de los enlaces fosfato internucleosídicos, tales como colesterol, compuestos de diamina con diversos números de restos de carbono entre los grupos amino y modificaciones de ribosa, desoxirribosa y fosfato terminal que escinden o se entrecruzan con las cadenas opuestas o con enzimas asociadas u otras proteínas. Los grupos electrófilos tales como la ribosa-dialdehído pueden estar unidos por enlace covalente con un grupo amino en ϵ del resto lisilo de tal proteína. Un grupo nucleófilo tal como n-etilmaleimida inmovilizado en un oligómero se podría fijar covalentemente al extremo 5' de un ARNm u otro sitio electrófilo. La terminología oligonucleótidos modificados también incluye los oligonucleótidos que comprenden modificaciones de los restos de azúcar tales como ribonucleótidos 2'-sustituidos o
- 30 monómeros de desoxirribonucleótido, cualquiera de los cuales se conectan entre sí mediante enlaces de 5' a 3'. Los oligonucleótidos modificados también pueden comprender PNA o esqueletos morfolino-modificados en los que se mantiene la especificidad selectiva de la secuencia. La terminología oligonucleótidos modificados también incluye compuestos oligonucleotídicos, como se define en la presente memoria, de una forma que no afecta significativamente de manera adversa a su actividad para reducir la actividad o inhibir la expresión de una proteína deseada, pero que puede mejorar esta actividad.
- 40

- Los oligonucleótidos modificados también incluyen oligonucleótidos que se basan o que están formados por arabinonucleótido o restos de arabinonucleótido modificado, entre ellos, pero sin limitarse a ellos, construcciones de oligonucleótidos antisentido basados en el β -arabinofuranosa y sus análogos. Los arabinonucleósidos son estereoisómeros de ribonucleósidos, que difieren sólo en la configuración en la posición 2' del anillo de azúcar. La
- 45 solicitud PCT de patente internacional n.º WO 99/67378 de Dahma et al. (1), que se incorpora en la presente memoria por referencia en su totalidad, describe oligómeros de ácidos arabinonucleicos (ANA) y sus análogos para mejorar la inhibición específica de secuencia de la expresión génica a través de la asociación con el ARN mensajero complementario. Dahma et al. además enseñan oligonucleótidos con azúcares modificados que forman un dúplex con su secuencia de ARN diana, lo que da lugar a un sustrato para la ARNasa H. Específicamente, se describen los oligómeros que comprenden β -D-arabinonucleótidos y 2'-desoxi-2'-fluoro- β -D-arabinonucleósidos. La solicitud PCT de patente internacional n.º WO 02/20773 también de Dahma et al. (2), que se incorpora en la presente memoria por referencia a su totalidad, describe quimeras de oligonucleótidos utilizadas para inhibir la transcripción génica y la expresión de una manera específica de secuencia. Específicamente, Dahma et al. (2) enseñan oligonucleótidos antisentido formados por arabinonucleótidos que flanquean una serie de restos de nucleótidos de desoxirribosa de
- 50 longitud variable. Los oligonucleótidos antisentido construidos de este modo se utilizan para hibridar e inducir la escisión del ARN complementario. La solicitud PCT de patente internacional n.º WO 03/037909 también de Dahma et al. (3), que se incorpora en la presente memoria por referencia en su totalidad, describe oligonucleótidos que tienen un resto conector acíclico interno. Los oligonucleótidos antisentido preparados con un conector acíclico se utilizan para impedir o agotar la función de un ácido nucleico diana de interés, tal como el ARN. La solicitud PCT de
- 60 patente internacional WO 03/064441 también de Dahma et al. (4), que se incorpora en la presente memoria mediante referencia en su totalidad, describe oligonucleótidos que tienen segmentos alternantes de nucleósidos con

azúcares modificados y 2'-desoxinucleósidos, y también segmentos alternantes de nucleótidos con azúcares modificados y 2'-desoxinucleótidos. Los oligonucleótidos antisentido que tienen estos segmentos alternantes se describen para ser usados para prevenir o agotar el funcionamiento de un ácido nucleico diana de interés, tal como el ARN.

- 5 La terminología «sustancialmente resistente a las nucleasas» se refiere a los ácidos nucleicos que son resistentes a la degradación por nucleasas, en comparación con los ácidos nucleicos sin modificar o que se producen de forma natural. Los ácidos nucleicos modificados de la invención son al menos 1,25 veces más resistentes a la degradación por nucleasas que su homólogo sin modificar, más preferiblemente al menos 2 veces más resistente, incluso más preferiblemente al menos 5 veces más resistente, y lo más preferiblemente al menos 10 veces más resistente, que su homólogo sin modificar. Tales ácidos nucleicos sustancialmente resistentes a las nucleasas incluyen, pero sin limitarse a ellos, los ácidos nucleicos con esqueletos modificados tales como fosforotioatos, metilfosfonatos, etilfosfotriésteres, 2'-O-metilfosforotioatos, 2'-O-metil-p-etoxirribonucleótidos, 2'-O-alquilos, 2'-O-alquil-n(O-alquilo), 3'-O-alquilos, 3'-O-alquil-n(O-alquilo), 2'-fluoros, 2'-desoxi-eritropentofuranosilos, 2'-O-metilribonucleósidos, metilcarbamatos, metilcarbonatos, bases invertidas (p. ej., T invertidas) o versiones químicas de estos esqueletos.
- 10
- 15 La terminología «oligonucleótidos antisentido del receptor CCR3 y de la cadena β común de los receptores de IL3/IL-5/GM-CSF», tal y como se utiliza en la presente memoria, cada uno se refiere a un oligonucleótido que se dirige, respectivamente, a las secuencias que afectan la expresión y/o actividad del receptor de quimiocinas CCR3 y de la cadena β común de los receptores de IL-3/IL-5/GM-CSF. Estos incluyen, pero sin limitarse a ellos, el receptor de la quimiocina CCR3 y la cadena β común de los receptores de IL-3/IL-5/GM-CSF, secuencias de ADN codificantes, secuencias de ADN promotoras, secuencias de ADN potenciadoras, secuencias codificantes del ARNm y similares.
- 20

Tal y como se explicó anteriormente, una realización de la presente invención da a conocer oligonucleótidos antisentido dirigidos a las secuencias que afectan la expresión y/o actividad del receptor de quimiocinas CCR3 y de la cadena β común de los receptores de IL-3/IL-5/GM-CSF. En una realización, el oligonucleótido antisentido puede comprender fragmentos o variantes de estas secuencias, como sabrá el experto en la técnica, que pueden alterar la construcción de oligonucleótidos y/o su longitud, pero que mantiene o incrementa la actividad del oligonucleótido a la hora de reducir la expresión génica. En otra realización, la presente invención da a conocer combinaciones de al menos dos oligonucleótidos antisentido de las secuencias identificadas como SEQ ID n.º 1, SEQ ID n.º 13 y SEQ ID n.º 14.

25

- 30 La terminología «tratamiento», «tratar», «terapia» y similares se utilizan en la presente memoria para significar de forma general que se obtiene un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser preventivo en términos de que impide completa o parcialmente una enfermedad o síntomas de la misma, y/o puede ser terapéutico en términos de una curación parcial o completa de una enfermedad y/o mejoría de un efecto adverso atribuible a la enfermedad. «Tratamiento», tal y como se utiliza en la presente memoria, cubre cualquier tratamiento de una enfermedad en un sujeto como se definió anteriormente, en particular un humano, e incluye:
- 35 (a) impedir que se produzca una enfermedad en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad, pero que no se ha diagnosticado que la tenga;
- (b) inhibir una enfermedad, a saber, detener su desarrollo; o
- (c) aliviar una enfermedad, a saber, provocar la regresión de la enfermedad.

- 40 La terminología «farmacéuticamente aceptable», tal y como se utiliza en la presente memoria respecto a los vehículos, tensioactivos y composiciones, se refiere a las sustancias que son aceptables para ser utilizadas en el tratamiento de un paciente y que no son tóxicas o por lo demás inaceptables para la administración mediante cualquiera de las vías descritas en la presente memoria.

- 45 La invención se dirige de forma general al tratamiento de los sujetos mediante la administración de cantidades terapéuticamente eficaces de compuestos de oligonucleótidos antisentido de acuerdo con la presente invención, entre ellos siRNA, ribozimas, secuencias nucleotídicas cortas monocatenarias o bicatenarias que incluyen ARN y/o ADN que pueden ser complementarias a un ácido nucleico diana, o se pueden modificar opcionalmente como se describe anteriormente, un oligonucleótido de ARN que tiene al menos una porción de dicho oligonucleótido de ARN capaz de hibridarse con el ARN para formar un dúplex oligonucleótido-ARN, o un oligonucleótido químico, que reducirá o inhibirá la expresión de un gen endógeno *in vivo*.

- 50 Mediante cantidad «terapéuticamente eficaz» se quiere decir una cantidad no tóxica, pero suficiente, de un compuesto de oligonucleótido antisentido que proporciona el efecto terapéutico deseado. En el presente caso, esa dosis eficaz del compuesto de oligonucleótido antisentido para aliviar, mejorar o prevenir los síntomas de la afección o enfermedad a tratar, p. ej., enfermedad asociada a la alergia, asma, enfermedad inflamatoria tal como enfermedad respiratoria inflamatoria.

La terminología «alergia» tal y como se utiliza en la presente memoria describe cualquier respuesta inmunitaria indeseable por el organismo contra una sustancia a la cual se ha vuelto hipersensible.

Las formulaciones de la presente invención se administran preferiblemente de forma directa al sitio de acción y, así pues, son preferiblemente tópicas, entre ellas, pero sin limitarse a ellas, oral, intravestibular, intrapulmonar, rectal, intrauterina, intratumoral, nasal, intratecal, inhalable, transdérmica, intradérmica, intracavitaria, iontoforética, ocular, vaginal, intraarticular, ótica, transmucosa, rectal, formulaciones de revestimiento entérico o de liberación lenta. Sin limitarse a ninguna de las anteriores, las formulaciones de la presente invención pueden ser también intracraneales, intramusculares, subcutáneas, intravasculares, intraglandulares, intraorgánicas, intralinfáticas, intraperitoneales, intravenosas e implantables. Los vehículos utilizados en las formulaciones pueden ser, por ejemplo, vehículos sólidos y/o líquidos.

Se hace referencia a «Remington's Pharmaceutical Sciences», 17.^a ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985, para otros vehículos que serían idóneos para la combinación con los presentes compuestos de oligonucleótidos para producir composiciones/formulaciones idóneas para administración para tratar la enfermedad respiratoria.

Opcionalmente, los oligonucleótidos descritos en la presente memoria se pueden formular con muchas moléculas de vehículo fisiológicas. Los oligonucleótidos descritos en la presente memoria también pueden formar complejos con moléculas que mejoran su capacidad para introducirse en las células diana. Ejemplos de tales moléculas incluyen, pero sin limitarse a ellas, glúcidos, poliaminas, aminoácidos, péptidos, lípidos y moléculas vitales para el crecimiento celular. Por ejemplo, los oligonucleótidos se pueden combinar con un lípido, y la emulsión resultante de oligonucleótido/lípido, o la suspensión liposómica, puede, entre otras cosas, incrementar con eficacia la semivida *in vivo* del oligonucleótido.

Las composiciones farmacéuticas dadas a conocer en la presente memoria pueden comprender compuestos de oligonucleótidos antisentido descritos anteriormente o uno o más tensioactivos farmacéuticamente aceptables. Los tensioactivos o componentes de tensioactivos idóneos para mejorar la captación de los oligonucleótidos antisentido de la invención se han descrito anteriormente en la solicitud de publicación de los EE.UU. n.º 2003/0087845, cuyo contenido se incorpora en la presente memoria con respecto a los tensioactivos. La solicitud afirma que los tensioactivos idóneos «...incluyen formas sintéticas y naturales así como formas completas y truncadas del tensioactivo de proteína A, tensioactivo de proteína B, tensioactivo de proteína C, tensioactivo de proteína D y tensioactivo de proteína E, fosfatidilcolina di-saturada (diferente al dipalmitoilo) dipalmitoilfosfatidilcolina, fosfatidilcolina, fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, ácido fosfatídico, ubiquinonas, lisofosfatidiletanolamina, lisofosfatidilcolina, palmotol-lisofosfatidilcolina, deshidroepiandrosterona, dolicoles, ácido sulfatídico, glicerol-3-fosfato, fosfato de dihidroxiacetona, glicerol, glicero-3-fosfocolina, dihidroxiacetona, palmitato, diacilglicerol de difosfato de citidina (CDP, por su nombre en inglés), CDP-colina, colina, fosfato de colina; así como cuerpos lamelares naturales y artificiales que son los vehículos de los excipientes naturales para los componentes de tensioactivo, ácidos grasos ω -3, ácido poliéxico, ácido polienoico, lecitina, ácido palmítico, copolímeros de bloque no iónico de etileno u óxidos de propileno, polioxipropileno, monoméricos y poliméricos, polioxietileno, monomérico y polimérico, poli(vinilamina) con cadenas laterales de dextrano y/o alcanolio, Brij 35TM, Triton X-100TM y los tensioactivos sintéticos ALECTM, ExosurfTM, SurvanTM y AtovaquoneTM entre otros. Estos tensioactivos se pueden utilizar solos o como parte de un tensioactivo con varios componentes en una formulación, o como adiciones covalentemente fijadas a los extremos 5' y/o 3' de los oligonucleótidos antisentido».

El componente antisentido de las presentes composiciones puede estar contenido en una formulación farmacéutica dentro de una partícula o vesícula lipídica, tal como un liposoma o microcristal. Tal y como se describe en la patente de los EE.UU. n.º 6.025.339, las partículas lipídicas pueden tener cualquier estructura idónea, tal como unilamelar o plurilamelar, siempre y cuando el oligonucleótido antisentido esté contenido en ésta. Los lípidos cargados positivamente tales como N-[1-(2,3-dioleoiloxi)propil]-N,N,N-trimetil-amoniometilsulfato o «DOTAP» se prefieren particularmente para tales partículas o vesículas. Se conoce bien la preparación de tales partículas lipídicas. Véase, p. ej., las patentes de los EE.UU. n.º 4.880.635 de Janoff et al.; 4.906.477 de Kurono et al.; 4.911.928 de Wallach; 4.917.951 de Wallach; 4.920.016 de Allen et al.; 4.921.757 de Wheatley et al.; etc.

La composición de la invención se puede administrar mediante cualquier medio que transporte el compuesto de oligonucleótido antisentido al sitio deseado, tal como por ejemplo, el pulmón. Los compuestos antisentido descritos en la presente memoria se pueden administrar a los pulmones de un paciente mediante cualquier medio adecuado, pero se administran preferiblemente mediante inhalación de un aerosol compuesto por partículas respirables que comprenden el compuesto antisentido.

La composición de la presente invención se puede administrar al aparato respiratorio como una formulación que incluye partículas de tamaño respirables, p. ej., partículas de un tamaño suficientemente pequeño para pasar a través de la nariz, la boca y la laringe tras la inhalación y a través de los bronquios y alvéolos de los pulmones. En general, las partículas respirables oscilan de unos 0,5 a 10 μ m de tamaño. Las partículas de tamaño irrespirable que

se incluyen en el aerosol tienden a depositarse en la garganta y a ser ingeridas, y, por tanto, hay que disminuir la cantidad de partículas irrespirables del aerosol. Para la administración nasal se prefiere un tamaño de partícula de 10 a 500 μm (micrómetros) para garantizar la retención en la cavidad nasal.

- 5 Las composiciones farmacéuticas líquidas del compuesto activo (el compuesto o los compuestos de oligonucleótido antisentido) para producir un aerosol se pueden preparar mediante la combinación del compuesto antisentido con un vehículo adecuado, tal como un pirógeno estéril sin agua o una disolución salina tamponada con fosfato.

- 10 Una composición de partículas sólidas que comprende el compuesto antisentido puede opcionalmente contener un dispersante que sirve para facilitar la formación de un aerosol, así como otros compuestos terapéuticos. Un dispersante adecuado es la lactosa, que puede estar mezclada con el compuesto antisentido en cualquier proporción adecuada, p. ej., una proporción de 1 a 1 en peso.

- 15 Las composiciones antisentido se pueden administrar en una cantidad eficaz antibroncoconstrictiva, antialérgica y/o antiinflamatoria, cuya cantidad depende de la gravedad de la enfermedad a tratar, de la afección del paciente, de la formulación concreta, de la vía de administración, de la pauta de administración a un sujeto, etc. En general, son deseables las concentraciones intracelulares de oligonucleótido de 0,05 a 50 μM , o más en particular de 0,2 a 5 μM . Para la administración a un paciente mamífero, tal como un humano, típicamente se emplea una dosis de aproximadamente 0,001, 0,01, 0,1 o 1 mg/kg hasta aproximadamente 50 o 100 mg/kg o más. No obstante, también se contemplan otras dosis. Según la solubilidad del compuesto activo en cualquier formulación concreta, la dosis diaria se puede repartir entre una o varias administraciones de dosis unitarias.

- 20 Los aerosoles de partículas líquidas que comprenden el compuesto antisentido se pueden producir mediante cualquier medio adecuado, tal como un nebulizador. Los nebulizadores son dispositivos disponibles en el mercado que transforman las soluciones o suspensiones del ingrediente activo en un vaho para aerosol terapéutico bien por medio de la aceleración de un gas comprimido, típicamente aire u oxígeno, a través de un orificio difusor estrecho, o por medio de agitación ultrasónica. Las formulaciones adecuadas para usarlas en los nebulizadores comprenden el ingrediente de oligonucleótido antisentido activo en un vehículo líquido en una cantidad de hasta el 40% p/p, preferiblemente menos del 20% p/p de la formulación. El vehículo es típicamente agua o una solución alcohólica acuosa diluida, que preferiblemente se hace isotónica a los líquidos corporales mediante la adición de, por ejemplo, cloruro de sodio. Los aditivos opcionales incluyen conservantes si la formulación no se prepara estéril, por ejemplo, hidroxibenzoato de metilo, antioxidantes, antibacterianos, aromatizantes, aceites volátiles, tamponantes y emulsionantes y otros tensioactivos de formulación.

- 30 Los aerosoles de partículas sólidas que comprenden el compuesto o compuestos de oligonucleótido activo y un tensioactivo farmacéuticamente aceptable pueden de este modo producirse con cualquier generador de aerosol farmacológico de partículas sólidas. Los generadores de aerosoles para administrar medicamentos de partículas sólidas a un sujeto producen partículas que son respirables, como se explicó anteriormente, y generan un volumen de aerosol que contiene una dosis medida predeterminada de un fármaco a una velocidad adecuada para la administración a humanos. El ingrediente de oligonucleótido activo comprende típicamente del 0,1 al 100 p/p de la formulación. Un segundo tipo de generador de aerosol ilustrativo comprende un inhalador dosificador. Los inhaladores dosificadores son dispensadores de aerosol presurizado, que contienen típicamente una formulación de suspensión o solución del ingrediente activo en un propulsor líquido. Durante su uso, estos dispositivos descargan la formulación a través de una válvula adaptada para administrar un volumen concreto, típicamente de 10 a 150 μl , para producir un pulverizado de partículas finas que contienen el ingrediente activo. Los propulsores idóneos incluyen determinados compuestos de clorofluorocarburo, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano o hidrofluoroalcanos y mezclas de los mismos. La formulación puede adicionalmente contener uno o más cosolventes, por ejemplo, etanol, emulsionantes y otros tensioactivos de formulación, tales como ácido oleico o trioleato de sorbitano, antioxidantes y aromatizantes idóneos.

- 45 El aerosol, bien en forma de partículas sólidas o líquidas, se puede producir mediante el generador de aerosol a una velocidad de aproximadamente 1 a 150 litros por minuto.

- 50 En otro aspecto de la presente invención, se da a conocer un artículo de fabricación que incluye material de envasado dentro del cual se encuentra contenida una composición de oligonucleótido antisentido farmacéuticamente aceptable que es terapéuticamente eficaz para tratar las afecciones asociadas a la alergia, el asma, la rinitis y la enfermedad inflamatoria. En una realización, la composición comprende un compuesto de oligonucleótido antisentido que es eficaz para inhibir un receptor de quimiocinas CCR3 o el gen de la cadena β común de los receptores de IL-3/IL-5/GM-CSF, en donde dicho compuesto de oligonucleótidos es al menos complementario al 50% al gen. En otro aspecto, la composición comprende al menos 2 compuestos de oligonucleótidos antisentido, en donde cada compuesto de oligonucleótido antisentido es capaz de reducir la expresión del receptor de quimiocinas CCR3 y el gen de la cadena β común de los receptores de IL-3/IL-5/GM-CSF, en donde cada compuesto de oligonucleótido antisentido está presente a una concentración en la cual el compuesto de oligonucleótido antisentido es prácticamente ineficaz en monoterapia para reducir la expresión del gen contra el cual se dirige, en donde la

combinación de los compuestos de oligonucleótidos antisentido es eficaz para reducir la expresión de al menos uno de los genes contra los cuales se dirigen los oligonucleótidos antisentido.

En una realización, el material de acondicionamiento del artículo comprende un prospecto que indica que la composición se puede utilizar para tratar la enfermedad respiratoria inflamatoria y puede incluir adicionalmente una indicación de que la enfermedad es una de alergia, rinitis y asma.

En una realización, el material de acondicionamiento del artículo comprende un prospecto que indica que la composición se puede utilizar para tratar la enfermedad respiratoria inflamatoria, y puede adicionalmente incluir una indicación de que la enfermedad es una de alergia, asma, hipereosinofilia, bronquitis, rinitis o sinusitis.

Para los propósitos de la presente invención, el material de acondicionamiento puede ser cualquier material adecuado para envasar una composición que contiene nucleótidos de acuerdo con la presente invención, entre ellas un frasco u otro contenedor (bien de plástico o de vidrio), un cartón, un tubo u otro envoltorio protector. Tal y como se apreciará, el envase puede variar con la naturaleza de la composición oligonucleotídica, por ejemplo, una formulación líquida se puede envasar de modo diferente a una formulación para aerosol.

La presente invención se comprenderá con más facilidad mediante referencia a los ejemplos que se ofrecen para ilustrar la siguiente invención, que no pretenden limitar su alcance. Con respecto a estos ejemplos, se utilizaron los siguientes procedimientos y materiales.

Ejemplos

Materiales y procedimientos

Materiales

Se utilizaron los siguientes materiales y reactivos para los experimentos: RPMI 1640 (Wisent, cat. n.º 10040 CV); SBF (suero bovino fetal, Wisent, cat. n.º 80150); penicilina-estreptomycin (GIBCO, cat. n.º 15140-122); HEPES (Wisent, cat. n.º 26060CI); L-glutamina (Gibco, cat. n.º 25030-081); piruvato de sodio (Wisent, cat. n.º 25000-Ci); PBS estéril (Gibco, cat. n.º 25030-081); solución salina equilibrada de Hanks (HBSS, por su nombre en inglés, Cellgro, cat. n.º 20021-CV); sistema de síntesis de la primera cadena Superscript para el kit de RT-PCR (Invitrogen, cat. n.º 11904-018); dNTP (Invitrogen, cat. n.º 10297-018; oligo (dT)₁₂₋₁₈ (Invitrogen, cat. n.º 11904-018); mini kit RNAeasy de Qiagen (Qiagen, cat. n.º 74106); kit de extracción de gel de Qiagen (Qiagen, cat. n.º 28704); kit de extracción de PCR de Qiagen (Qiagen, cat. n.º 28104); β-mercaptoetanol (Sigma, cat. n.º M-6250); etanol al 99% (Commercial Alcohols Inc., Brampton, Ontario, Canadá); distribuidor QiaVac 24 (Qiagen, cat. n.º 19403); vacuoconectores desechables (Qiagen, cat. n.º 19407); kit de ADNasa I (Fermentas, cat. n.º ENO521); reactivo de cuantificación RiboGreen (Invitrogen Molecular Probes, cat. n.º R-1190); kit de núcleo de PCR con Taq (Qiagen, cat. n.º 201223), equipo de tinción Hema-3 (Fisher Scientific Co., cat. n.º 122-911, lote n.º 999901); Alamar Blue™ (Biosource, cat. n.º DAL1100); pareja de cebadores del CCR3 humano (R & D Systems, cat. n.º RDP-209-025); pareja de cebadores de la GAPDH humana (R & D Systems, cat. n.º RDP-39-025); Ficoll (Amersham Biosciences, cat. n.º 17-1440-03); anti-CD16 (kit de purificación de eosinófilos, Miltenyi Biotec, Auburn, CA, cat. n.º 130-045-701); rhEotaxina (Biosource, cat. n.º PMC1434); membranas y cámara de quimiotaxia (NeuroProbe, Nucleopore-Neuroprobe, Cabin John, MD); seroalbúmina humana (SIGMA, cat. n.º A9511); anticuerpos contra la cadena β de los receptores de IL-3/IL-5/GM-CSF humanos (IgG2b monoclonal de ratón; Santa Cruz Biotechnology, cat. n.º sc-457); anticuerpo contra la IgG2b de ratón (monoclonal de cabra, Alexa Fluor 488, Molecular Probes, cat. n.º A-21141); anticuerpo contra el CCR3 humano (monoclonal de rata, IgG2a, R & D, cat. n.º MAB155); anticuerpo contra la IgG de rata (monoclonal de cabra, Alexa Fluor 633, Molecular Probes, cat. n.º A-21094); rhGM-CSF (R & D Systems, cat. n.º 215-GM-005); rhIL-3 (R & D Systems, cat. n.º 203-IL-010); rhIL-5 (R & D Systems, cat. n.º 205-IL-005), rhIL-2 (R & D Systems, cat. n.º 202-IL-010); TOP004 (n – 1) (Biosource, oligonucleótido con un nucleótido menos en el extremo 3'); TOP005 (n – 1) (Biosource, oligonucleótido con un nucleótido menos en el extremo 3'); TOP004-TP (Biosource, sonda molde); TOP004 (n – 1-TP-T) (Biosource Biosource, sonda molde); LP (Biosource, sonda de ligación); TOP005-TP (Biosource); TOP004 (n – 1-LP-A, Biosource); placas de alta capacidad de fijación revestidas con neutravidina Reacti-Bind (Pierce, cat. n.º 15508); ADN ligasa de T4 a 5 U/ml (Roche, cat. n.º 799 009); anticuerpo anti-DIG-AP (Roche, cat. n.º 1093274); tampón de bloqueo SuperBlock en PBS (Pierce, cat. n.º 37515); sustrato de fosfatasa alcalina fosfato de metilumbeliferilo (Molecular Probes, cat. n.º M-6491); muestras de plasma de monos que contienen ASM8; MW96 Plate Washer (Beckman Coulter); placa de polipropileno de 96 pocillos de gran capacidad, Nunc); micropipeteadores de Eppendorf Research Brand; placas de 96 pocillos opacas negras (Costar, cat. n.º 3915).

Síntesis de los antisentido e identificación de la secuencia

Se sintetizaron oligonucleótidos con un Gene Assembler-Plus™ (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, EE.UU), fosforotioatado y purificado por HPLC. El TOP005 utilizado en los experimentos ilustrados en las figuras 5 a 7 se realizó con los oligonucleótidos de cGMP. Las secuencias antisentido y las identificaciones se describen en la tabla

1.

Tabla 1

Antisentido n.º	Secuencia 5'-3' del antisentido	N.º de acceso a GenBank y/o SEQ ID n.º
828	5-GTTACTACTTCCACCTGCCTG-3	AF224496 – SEQ ID n.º 1
773	5-TGGAAAAGCGACACCTACCTG-3	AF247360 – SEQ ID n.º 2
786	5-CCCTTTTCTCTGGAAAAGCGACA-3	AF247360 – SEQ ID n.º 3
788	5-CTCCCTTTTCTCTGGAAAAGCG-3	AF247360 – SEQ ID n.º 4
793	5-TCCACCTCCCTTTTCTCTGGA-3	AF247361 – SEQ ID n.º 5
807	5-CCTCCTTGTTCCACCTCCCTT-3	AF247362 – SEQ ID n.º 6
RZ1	5-ACCCATTGGCATTGCTCATTT-3	AF247360 – SEQ ID n.º 7
RZ2	5-TCCTTGCAATTAGTGCTGCTT-3	AF247361 – SEQ ID n.º 8
RZ3	5-TCGTGCAGTTCTTCTTTTTCA-3	AF247362 – SEQ ID n.º 9
RZ4	5-CAGACTAGCTTCTCAGTTTTG-3	AF247363 – SEQ ID n.º 10
RZ5	5-TGCTAATTTAGTGAAGTCTT-3	AF247364 – SEQ ID n.º 11
RZ6	5-CTTCTCCCTGAAAATCTCTTCT-3	AF224495 – SEQ ID n.º 12
107A	5-GGGTCTGCAGCGGGATGGT-3	NM_000398-1
A86	5-CTGGGCCATCAGTGCTCTG-3	NM_178329 - SEQ ID n.º 29
* TOP004	5-GGGTCTGCXGCGGGXTGGT-3	NM_000395-1- SEQ ID n.º 13
* TOP005	5-GTTXCTXCTTCCXCCTGCCTG-3	AF224496 – SEQ ID n.º 14
*: X =	X representa una modificación con DAP de un resto de adenosina	

Células y cultivo de células

- 5 Se utilizaron las siguientes líneas celulares: TF-1 (línea celular de eritroleucemia humana, ATCC n.º CRL-2003); EOL-1 (línea células de leucemia «eosinófila» mieloide aguda humana; DSMZ n.º ACC386) y U937 (línea celular de linfoma histiocítico humano; ATCC n.º CRL-1593.2). EOL-1 y U937 se cultivaron en RPMI 1640 con 2 mM de L-glutamina; bicarbonato de sodio a 1,5 g/l; glucosa a 4,5 g/l; Hepes a 10 mM; piruvato de sodio a 1 mM; SBF al 10%, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina. Se utilizó el mismo medio para el cultivo de TF-1, salvo que se añada rhGM-CSF a 2 ng/ml.

Cultivo celular y diferenciación del clon 15 de HL-60

- 15 El clon 15 de HL-60 se diferenció en eosinófilos como se describe en Tiffany et al., 1998, *J. Immunol.* 160: 1385-1392. Brevemente, la línea celular promielocítica HL-60 se mantuvo en RPMI 1640 con L-glutamina complementado con SBF inactivado con calor al 10% y 25 mM de N-[2-hidroxietil]piperazina-N'-[ácido 2-hidroxipropanosulfónico] (Sigma Chemical Co., San Luís, MO), pH 7,6, a 37 °C y CO₂ al 5%. Se indujeron las células para diferenciar en el fenotipo de tipo eosinófilo tratándolas con ácido butírico a 0,5 µM (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) durante al menos 5 días. Se utilizó el análisis por FACS para valorar la presencia de la cadena β común para los receptores de IL-3/IL-5/GM-CSF, después de la diferenciación de las células.

Viabilidad de las células y tratamiento con los antisentido

- 20 Se analizó sistemáticamente la viabilidad de las células mediante la prueba con Alamar Blue™ siguiendo el procedimiento del fabricante. Se recogieron las células EOL-1; TF-1; HL-60 o U937 por centrifugación (5 minutos, 1500 rpm, a temperatura ambiente), se lavaron con 3 x HBSS y se resuspendieron a 1 x 10⁶ células/ml en el medio RPMI sin suero. Se incubaron 1 x 10⁶ células, por triplicado, durante 5 minutos con una concentración de antisentido exacta (entre 0 y 20 µM) en un microtubo estéril. A continuación, cada reacción se transfirió a placas de 12 pocillos y se incubó a 37 °C, CO₂ al 5%, durante 5 horas para la cuantificación del ARNm, o 12 horas para el análisis de las proteínas. Se añadió RPMI/SBF al 20% para una concentración final de SBF del 10% y las células se incubaron a 37 °C, CO₂ al 5%, durante una noche. Se recogieron las células por centrifugación (5 minutos, 1500 rpm, a temperatura ambiente) y se lavaron con 1 x HBSS. Se incluyeron experimentos de control y consistían en tratamientos de las células en ausencia de antisentido o en presencia de oligonucleótidos con discordancias.

Purificación de eosinófilos humanos

La fracción de granulocitos se obtuvo por centrifugación de sangre completa a través de gradientes de Ficoll-Hypaque (1,077 g/ml a 350 g durante 30 minutos) para obtener la capa de leucocitos. Los eosinófilos humanos se purificaron adicionalmente mediante la selección negativa con microperlas inmunomagnéticas revestidas con anti-CD16 a 4 °C con el sistema de clasificación de células magnéticas de Miltenyi Biotec (Auburn, CA). La pureza de las poblaciones de eosinófilos, estimada mediante tinción de Giemsa, fue típicamente del 92% al 100%.

Purificación de PBMC de macaco cangrejero y humanas

La sangre recién extraída de macacos cangrejeros se obtuvo de ITR Laboratories Canada Inc. Las PBMC se aislaron por centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque de sangre K3 en EDTA de donantes normales. Las PBMC se sembraron a 2×10^6 células/ml en cada pocillo en placas de 12 pocillos en medio de cultivo de células RPMI 1640 complementado con SBF inactivado por calor al 10%, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin. La viabilidad de las células se valoró con Alamar Blue™ y era típicamente del 85% al 95%.

PBMC humanas y transfección de eosinófilos

Se recogieron las PBMC humanas por centrifugación (5 minutos, 1500 rpm, a temperatura ambiente), se lavaron con 3 x HBSS y se resuspendieron a 2×10^6 células/ml en medio RPMI, suero al 5% que contiene 10 µg/ml de PHA. Se incubaron 2×10^6 células, por triplicado, durante 5 minutos con una concentración antisentido exacta (entre 0 y 20 µM) en un microtubo estéril. A continuación, cada reacción se transfirió a placas de 12 pocillos y se incubó a 37 °C, CO₂ al 5%, durante una noche para la cuantificación del ARNm, o 48 horas, o menos cuando se menciona, para el análisis de las proteínas. Las células se recogieron por centrifugación (5 minutos, 1500 rpm, a temperatura ambiente) y se lavaron con 1 x HBSS. Se incluyeron experimentos de control y consistían en tratamientos de las células en ausencia de antisentido o en presencia de los oligonucleótidos con discordancias.

Se recogieron eosinófilos humanos purificados por centrifugación (5 minutos, 1500 rpm, a temperatura ambiente), se lavaron con 3 x HBSS y se resuspendieron a $2,5 \times 10^6$ células/ml en el medio RPMI con suero al 10% que contiene 2 ng/ml de rhGM-CSF o rhIL-5, durante una noche. Al día siguiente, las células se lavaron dos veces con HBSS y se resuspendieron a $2,5 \times 10^6$ células/ml en el medio RPMI con suero al 5% y se incubaron, por triplicado, durante 5 minutos con una concentración antisentido exacta (entre 0 y 20 µM) en un microtubo estéril. A continuación, cada reacción se transfirió a placas de 12 pocillos y se incubó a 37 °C, CO₂ al 5%, durante una noche para la cuantificación del ARNm, o 48 horas, o menos cuando se menciona, para el análisis de las proteínas. Se recogieron las células por centrifugación (5 minutos, 1500 rpm, a temperatura ambiente) y se lavaron con 1 x HBSS. Se incluyeron experimentos de control y consistían en tratamientos de las células en ausencia de antisentido o en presencia de los oligonucleótidos con discordancias.

Transfección de las PBMC de mono

Se recogieron PBMC de macaco cangrejero por centrifugación (5 minutos, 1500 rpm, a temperatura ambiente), se lavaron con 3 x HBSS y se resuspendieron a 2×10^6 células/ml en medio RPMI con suero al 5% y 10 µg/ml de PHA (o 10 ng/ml de rhIL-2, cuando se menciona). Se incubaron 2×10^6 células, por triplicado, durante 5 minutos con una concentración de antisentido exacta (entre 0 y 20 µM) en un microtubo estéril. A continuación, cada reacción se transfirió a placas de 12 pocillos y se incubaron a 37 °C, CO₂ al 5%, durante una noche para la cuantificación del ARNm, o 48 horas, o menos cuando se menciona, para el análisis de las proteínas. Las células se recogieron por centrifugación (5 minutos, 1500 rpm, a temperatura ambiente) y se lavaron con 1 x HBSS. Se incluyeron experimentos de control y consistían en tratamientos de las células en ausencia de antisentido o en presencia de los oligonucleótidos con discordancias.

Análisis por citometría de flujo

Se contaron las células y se resuspendieron a 1×10^6 células/ml. Se centrifugaron las células a 400 x g durante 3 min a 20-25 °C, y se descartaron los sobrenadantes. Después, el sedimento celular se resuspendió en 50 µl del tampón de FACS (PBS a 1X, pH 7,2-7,4; albúmina humana al 0,5%; suero humano al 2,5%) y se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Sin retirar el sobrenadante, se añade el anticuerpo primario directamente al tubo y se mezcla. Se incubó a 4 °C protegido de la luz durante 1 hora, (el anticuerpo contra el CCR-3 humano se utilizó a 1 µg por $0,5 \times 10^6$ células. El anticuerpo contra la cadena β común humana se utilizó a 2 µg por $0,5 \times 10^6$ células). Se lava con 2 ml del tampón de FACS, se centrifuga a 400 x g durante 3 min y se retira el sobrenadante. Para los controles del isotipo, se resuspende el sedimento celular con 300 µl de FACSFix (PBS a 1X, pH 7,2-7,4; paraformaldehído al 4%), y se mantiene a 4 °C protegido de la luz.

Para la marcación de la cadena β común y del CCR3, se resuspende el sedimento celular con 50 µl del tampón de FACS y se añade el anticuerpo secundario (se utilizó anticuerpo contra la IgG2a de rata con Alexa Fluor 633 a 1 µg por $0,5 \times 10^6$ células. Se utilizó el anticuerpo contra la IgG2b de ratón con Alexa Fluor 488 a 2 µg por $0,5 \times 10^6$

células). Se incubó a 4 °C protegido de la luz durante 1 h. Se lava con 2 ml del tampón de FACS, se centrifuga a 400 x g durante 3 min y se retira el sobrenadante. Las células marcadas se fijan con 300 µl de FACSFix y se mantienen a 4 °C protegidas de la luz. Los datos se analizaron en un FACS Calibur de BD Biosciences y se procesaron con el programa Cell Quest.

5 Ensayo de movilización del calcio

Se resuspendieron los eosinófilos a 1×10^7 células/ml en RPMI 1640 que contiene SBF al 10% y se cargaron incubándolos con 5 M de Fura-2 AM (Molecular Probes, Eugene, OR, EE.UU.) a temperatura ambiente durante 30 minutos en la oscuridad. Las células (1×10^6 células/ml) se lavaron tres veces y se resuspendieron en tampón salino (138 mM de NaCl, 6 mM de KCl, 1 mM de CaCl_2 , 10 mM de Hepes, 5 mM de glucosa y SAB al 1%, pH 7,4). A continuación, cada suspensión celular de 2 ml se transfirió a una cubeta de cuarzo, que se colocó en un espectrofotómetro de luminiscencia LS50B (Perkin-Elmer, Beaconsfield, GB). La movilización del Ca^{2+} de las células se midió registrando la proporción de la fluorescencia emitida a 510 nm después de la excitación secuencial a 340 y 380 nm en respuesta a la quimiocina.

Ensayo de la quimiotaxia

- 15 Se evaluó la quimiotaxia *in vitro* en cámaras de 48 pocillos (NeuroProbe, Cabin John, MD) con membranas de policarbonato sin polivinilpirrolidona con poros de 5 µm (Nucleopore-Neuroprobe). Los eosinófilos tratados con antisentido o de control se suspendieron en 1×10^6 células/ml en el medio RPMI 1640 que contiene SAB al 0,25%. Los pocillos superiores e inferiores contenían 50 µl y 31 µl de suspensión de células, respectivamente, en donde la última suspensión estaba complementada con una concentración óptima de eotaxina (80 ng/ml). Tras 1 hora de incubación a 37 °C en CO_2 al 5%, se contaron las células migratorias que están presentes en el pocillo inferior. Se determinó la migración espontánea en ausencia de eotaxina y se ponderó en los resultados.

Tratamiento antisentido y estudios sobre la toxicidad con monos

- 25 Este protocolo fue revisado y evaluado por el Comité de Cuidados Animales (ACC, por su nombre en inglés) de ITR Laboratories Canada Inc. Todos los animales se cuidaron de acuerdo con los principios descritos en la «Guía para el cuidado y uso de animales de experimentación» actual que publicó el Consejo Canadiense sobre Cuidados animales y la «Guía para el cuidado y el uso de los animales de laboratorio», una publicación del NIH.

- 30 La toxicidad del ASM8, que consistía en una mezcla a 1:1 de dos oligonucleótidos (TOP004 y TOP005), se investigó para caracterizar el perfil toxicocinético de sus componentes oligonucleotídicos individuales, cuando se administraron mediante exposición por inhalación una vez al día durante 14 días seguidos. También se evaluó la reversibilidad de cualquier efecto de ASM8 después de un periodo de recuperación de 14 días. También se evaluó cualquier afección de hipersensibilidad sistémica después de 14 días de exposición al ASM8 por inhalación (detectable mediante inyección intradérmica (i.d.)).

- 35 El artículo de control del vehículo era la solución de cloruro de sodio al 0,9% para la inyección USP y se utilizó tal como se recibió. Las formulaciones líquidas del artículo problema (ASM8) para la aerosolización se preparó mezclando TOP004 y TOP005 con una solución de cloruro de sodio al 0,9% para inyección, USP, para conseguir una mezcla de 1:1. La concentración en solución de las dosis deseadas se basó en el oligonucleótido puro. Por lo tanto, se aplicó un factor de corrección para ajustar la pureza para pesar y dispensar los componentes del artículo problema. Los factores de corrección son 1,15 para TOP004 y 1,24 para TOP005. Antes de comenzar el periodo de exposición de 14 días, se retiraron por pesada las cantidades de cada oligonucleótido correspondiente requeridas para cada exposición diaria, se combinaron (como polvos) en los viales designados para cada día de exposición, y se almacenaron congeladas a -80 °C. El día de la exposición se retiró el vial correcto del congelador en el que se conservaban, el contenido se disolvió en el vehículo salino, se filtró a través de un filtro estéril de 0,2 µm y se utilizó la formulación sólo para la exposición de ese día.

El número de animales por grupo y los tratamientos se presentan en las tablas 2 y 3 que vienen a continuación:

45 Tabla 2

N.º de grupo	Tratamiento	N.º de animales			
		Fase principal		Fase de recuperación	
		Machos	Hembras	Machos	Hembras
1	Control de vehículo	3	3	1	1
2	Dosis baja de ASM8	3	3	-	-
3	Dosis media de ASM8	3	3	-	-

N.º de grupo	Tratamiento	N.º de animales			
		Fase principal		Fase de recuperación	
		Machos	Hembras	Machos	Hembras
4	Dosis alta de ASM8	3	3	1	1

Intervalo de la masa corporal: de 2 a 4 kg el día 1 de tratamiento.

Intervalo de edades: adultos jóvenes el día 1 de tratamiento.

Tabla 3

5 Concentraciones de la exposición al ASM8 y niveles de dosis (4)

N.º de grupo	Tratamiento	Dosis de ASM8 ((mg/kg)/día), (1)	Concentración de ASM8 para aerosol (mg/l), (3)
1	Control de vehículo, (2)	0	0
2	Dosis baja de ASM8	0,05	0,00795
3	Dosis media de ASM8	0,25	0,0397
4	Dosis alta de ASM8	2,5	0,3976

(1): Basado en la masa corporal estimada de 2,5 kg.

(2): Los animales de control del vehículo se expusieron a un aerosol generado a partir de la solución del vehículo en una concentración para aerosol que se considera equivalente en términos de masa a la generada para el grupo de dosis alta.

10 (3): La dosis deseada y las concentraciones para aerosol se basaron en la pureza absoluta de los artículos problema, que se consiguieron con los factores de corrección apropiados para la pureza en el procedimiento de formulación de la solución de la dosis.

(4): Los niveles de dosis alcanzados durante el periodo de exposición se estimaron con la fórmula siguiente: $D_L = E_C \times RMV \times T/BW$, en la que

15 D_L = concentración que alcanza la dosis ((mg/kg)/día)

E_C = concentración real administrada a los animales (mg/l de aire)

RMV = volumen por minuto (ml/min) estimado de acuerdo con la fórmula de Bide et al., 2000, *J. App. Toxicol.*, 20, 273-290 según se detalló: $RMV (L) = 0,499 \times W (kg)^{0,809}$

T = tiempo, duración de la exposición diaria (min)

20 BW = masa corporal media (kg) durante el periodo de exposición

Esta estimación de la dosis conseguida suponía que se depositaba el 100% dentro de las vías respiratorias.

En todos los animales se llevaron a cabo las observaciones mientras estaban vivos, entre ellas la mortalidad, las evaluaciones clínicas, la masa corporal, el consumo de comida, la electrocardiografía, la oftalmoscopia, la enfermedad clínica, las determinaciones de la concentración plasmática, el ensayo de hipersensibilidad.

25 Tras completar el periodo de tratamiento, se mataron los animales y se sometieron a pruebas anatomopatológicas, autopsia, pesado de los órganos, histopatología.

Se utilizó la RT-PCR semicuantitativa para medir si había algún efecto inhibitor de ASM8 sobre la expresión del ARNm de la cadena β común y del CCR3 en las muestras de la tráquea de los macacos cangrejeros tratados con dosis altas 24 horas después de la administración del ASM8.

30 HL-ELISA para las mediciones de los oligonucleótidos en el plasma de los monos

Se recogieron muestras de sangre de monos (aproximadamente 1 ml cada una) de cada animal en los días 1 y 14 antes de la dosis, y 0,5, 1, 3, 6 y 24 horas después de la dosis. Las muestras de sangre se centrifugaron a 4 °C para generar plasma, y el plasma se separó y se congeló en hielo seco hasta que se analizó para determinar la

concentración de TOP004 y TOP005 (y los metabolitos n – 1 proximales) mediante el ensayo de ligación/hibridación cuantificado por ELISA.

La solución del oligonucleótido para la curva estándar se preparó mediante diluciones en serie para las muestras de plasma de mono. El intervalo de trabajo de la curva estándar usual es de 125 nM a 0,007629 nM. Las muestras de plasma se diluyeron apropiadamente para medirlas en la porción lineal de la curva estándar, con más de una dilución para la medición exacta.

Cada muestra de plasma o estándar se distribuyó en alícuotas (200 µl) en una placa de polipropileno de 96 pocillos a la cual se añadieron 200 µl de la solución de la sonda de plantilla adecuada a los 200 µl de la muestra plasmática y se incubó a 37 °C durante 60 minutos. Se transfirieron 150 µl a una placa revestida de NeutrAvidin por duplicado y se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Esto se lavó 4 veces con tampón de lavado y un lavador de placas (200 µl cada una). Se añadió una solución de sonda de ligación de 150 µl y luego se incubó a temperatura ambiente durante 120 minutos. Tras la incubación, la muestra se lavó 2 veces con el tampón de lavado con el lavador de placas (200 µl cada una) y luego se lavó 3 veces con ddH₂O con el lavador de placas (200 µl). Se añadieron 150 µl de la dilución de 1:2000 (en Super Block, Peirce) de anti-DIG-AP y luego se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. La muestra se lavó 4 veces con tampón de lavado con el lavador de placas (200 µl). A continuación, se añadieron 150 µl del reactivo MUP a 10 µM y luego se incubó a temperatura ambiente durante 60 minutos. Se leyó la fluorescencia a 355 ex/485 em.

Soluciones utilizadas en el HL-ELISA:

Solución de la sonda de plantilla (sonda de plantilla a 0,05 µM, 60 mM de Na₂HPO₄, pH 7,4, 0,9 M de NaCl, 0,24% de Tween-20); tampón de ligación a 10X (0,8248 M de Tris-Cl, pH 7,5, 0,0828 M de MgCl₂, 1,93% de DTT); solución de ATP a 100 mM (se prepara en agua y se ajusta a un pH 7 ± 0,5 con NaOH); solución de la sonda de ligación (0,067 µM de oligonucleótido en el tampón de ligación a 1X, 0,025 unidades/ml de ADN ligasa de T4, 0,05 mM de ATP); tampón de lavado (25 mM de Tris-Cl, pH 7,2, 0,15 M de NaCl, 0,1% de Tween).

Homogeneización de la tráquea de mono y extracción del ARN

Se homogeneizaron las tráqueas de mono con un politron PT 1200 (Brinkmann Instruments) y se extrajo el ARN total con el mini kit RNAeasy de Qiagen (Qiagen, Mississauga ON, Canadá) y luego se digirió con la ADNasa I. Se cuantificó el ARN total con el ensayo fluorescente de Ribogreen (Invitrogen Corporation, Burlington ON, Canadá). Se preparó el ADNc a partir de 1 a 2 µg de ARN el kit de síntesis de la primera cadena de ADNc monocatenario con la RT SuperScript™ II (Invitrogen Corporation, Burlington ON, Canadá).

Extracción del ARN, transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa

El ARN se extrajo de sedimentos celulares de acuerdo con el protocolo del minikit RNAeasy de Qiagen utilizando el distribuidor QiaVac 24 de Qiagen y el ARN se trató con ADNasa I de acuerdo con los procedimientos de Fermentas. Se cuantificó el ARN utilizando el reactivo de RiboGreen de acuerdo con el protocolo del fabricante. De no ser así, el ARN se cuantificó en un espectrofotómetro. La preparación de la primera cadena de ADNc se realizó con el kit de RT-PCR con el sistema de síntesis de la primera cadena con Superscript de Invitrogen, en un volumen de reacción total de 20 µl. Brevemente, de 1 a 2,5 µg de ARN se desnaturalizaron primero a 65 °C durante 5 minutos, con 0,5 mM de cada dNTP, 0,5 µg de oligo (dT)₁₂₋₁₈ y se enfrió en hielo durante al menos 1 min. La mezcla se incubó a 42 °C durante 2 minutos y se añadió una segunda premezcla que contiene 1 x del tampón para la primera cadena, 10 mM de DTT, 40 unidades de RNaseOUT y 40 unidades de RT Superscript II. Las reacciones se incubaron a 42 °C durante 10 minutos, a 50 °C durante 1 hora y se inactivaron por calor a 70 °C durante 15 minutos. La PCR se realizó con una cantidad optimizada de ADNc (de 100 a 250 ng para CCR3 y de 1 a 10 ng para G3PDH) en un tampón de PCR a 1X (10X: Tris-HCl, KCl, (NH₄)₂SO₄, 15 mM de MgCl₂; pH 8,7) en un volumen de reacción total de 50 µl, 0,2 mM de cada dNTP, 8,5 pmol de cada cebador de PCR y 2,5 unidades de la ADN polimerasa Taq. La mezcla se calentó a 94 °C durante 5 minutos, seguida de 30 a 35 ciclos, que cada uno consiste en una incubación de 1 minuto a 94 °C, 45 segundos a 60 °C y 45 segundos a 72 °C. Se realizó la elongación complementaria a 72 °C durante 10 minutos. Se analizaron los productos de la PCR por electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en presencia de bromuro de etidio. La cuantificación de los productos de PCR se realizó con el programa informático Total Lab (sustracción del ruido de fondo con Rolling Ball; Ultra Lum Inc., modelo UC4800). Los cebadores de la PCR eran: pareja de cebadores del CCR3 humano (R & D Systems, cat. n.º RDP-209-025); pareja de cebadores de la GAPDH humana (R & D Systems, cat. n.º RD-39-025) y los cebadores mostrados en la tabla 4. Los experimentos de control se incluyeron sistemáticamente y consistían en PCR sobre RNA no retrotranscrito.

Tabla 4

ID del cebador	Secuencia del cebador: 5'-3'	SEQ ID n.º
huBcATG.for	5-ATGGTGCTGGCCCAGGG-3	15

ID del cebador	Secuencia del cebador: 5'-3'	SEQ ID n.º
huBcATG1.for	5-CCAGGGAGATGGTGCTGG-3	16
huBc6.rev	5-CCGCTTGTAGACCACCTCAAC-3	17
huBc7.rev	5-CCTTGGCTGAACAGAGACG-ATG-3	18
mkCCR3.for	5-TGCTCTGTGAAAAAGCCGA-TG-3	19
mkCCR3-2.rev	5-ACCAAAAGTGACAGTCCTG-GC-3	20
huBc4.for	5-AAGTCAGGGTTTGAGGGCT-ATG-3	21
huBc4.rev	5-CAAGGGGGCAGAGACAGGTAG-3	22
G3pdh.for	5-ACCACAGTCCATGCCATCA-C-3	23
G3pdh.rev	5-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3	24

Degradación química de oligonucleótidos

Para inducir la degradación de TOP004 y TOP005 antes del análisis (para asegurar la resolución de los productos de degradación de las moléculas intactas), se realizaron los tratamientos siguientes:

- 5 *Despurinación: se resuspendió el ASM8 en CH₃COOH al 30% a una concentración final de 0,5 mg/ml, y se incubó durante 3, 4 o 6 horas a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con la adición de 5 volúmenes de agua y la mezcla se colocó a -20 °C antes de la liofilización en un Speed-Vac para retirar el ácido acético.

*Escisión: los oligonucleótidos despurinados se resuspendieron en 0,2 mM de NaOH (0,5 mg/ml), se incubaron a 50 °C durante 1 hora y se conservaron a -20 °C o se analizaron por HPLC.

10 Fraccionamiento por HPLC de TOP004 y TOP005

Se pesó el ASM8, y se solubilizó en PBS a una concentración de 0,5 mg/ml (0,25 mg/ml de TOP004 y 0,25 mg/ml de TOP005). Los parámetros del gradiente para la HPLC se muestran a continuación en la tabla 5.

Tabla 5: Parámetros para el gradiente de la HPLC

Tiempo (min)	Flujo (ml/min)	% del tampón A	% del tampón B
0	1	100	0
5	1	100	0
10	1	93	7
100	1	65	35
102	1	20	80
122	1	20	80
124	1	100	0
144	1	100	0
146	0,1	100	0

- 15 Se realizó la separación por HPLC con una bomba para HPLC binaria Waters 1500 Series acoplada a un detector de absorbancia Waters 2487 Dual λ y equipado con un desgasificador en línea, horno y un inyector manual 1500 Series, Reodyne 7725i. La mezcla de oligonucleótidos se fraccionó en una columna de intercambio aniónico Waters Protein Pak DEAE 5PW (0,5 cm x 75 cm), se mantuvo a 60 °C y se detectó mediante absorción de UV a 260 nm. La mezcla de oligonucleótidos (volumen = 25 μ l) se cargó en una columna en agua (tampón A: agua (calidad MilliQ)) y la elución se realizó mediante el incremento progresivo de la proporción del tampón B (1 M de LiClO₄ (filtrado por 0,22 μ m)), lo que da lugar a un incremento de la fuerza iónica de la fase líquida, que eluyó el oligonucleótido a partir de la fase sólida (columna).

En las condiciones del ensayo, 62,5 μ g de TOP004 o de TOP005 produjeron un cambio medible a 260 nm de > 0,15 unidades de absorbancia (UA).

Conservación de los oligonucleótidos

Alícuotas de ASM8 (0,5 mg/ml) en PBS se incubaron a -20 °C, 4 °C, 30 °C y 40 °C durante 2 meses. En las semanas 4 y 8, se estableció el perfil de ASM8 por HPLC. La condición de control se definió como el perfil de ASM8 por HPLC antes de algún tipo de conservación (a saber, en el tiempo 0). El sistema de HPLC se guió con el programa informático Breeze™ (V 3.30) de Waters.

Curvas de fusión de los oligonucleótidos y tablas de resumen termodinámico

Se mezclaron TOP004 y TOP005 a concentraciones equimolares en PBS a 1X (así como en otros sistemas de tamponamiento). La concentración de oligonucleótidos total oscilaba de aproximadamente 1,2 a 8,7 mM. Se realizaron procedimientos estándares de desnaturalización térmica por UV con un espectrofotómetro DU640 de Beckman con un accesorio para Tm. El cambio de la absorbancia se detectó a 260 nm en cada grado desde 10 °C a 90 °C. Las curvas de fusión se ajustaron con el programa informático MELTWIN™ 3.5 para determinar los parámetros termodinámicos. Se obtuvieron capturas de pantalla de las curvas de fusión y las tablas de resumen termodinámico.

Ejemplos

15 Ejemplo 1

Eficacia de los oligonucleótidos antisentido dirigidos al receptor CCR3

A varios oligonucleótidos antisentido con diana en el receptor de quimiocinas CCR3 se les analizó su capacidad para inhibir la expresión del ARNm del receptor e inhibir el funcionamiento del receptor. El cribado primario con el antisentido de CCR3 se realizó en las líneas celulares Eo1-1 y U937. Estas células expresan el ARNm de CCR3 en las condiciones normales de cultivo celular descritas anteriormente. La tabla 6 muestra los oligonucleótidos antisentido dirigidos contra el receptor humano de quimiocinas CCR3.

Respecto a la tabla 6, el oligonucleótido 828 antisentido dirigido contra el receptor CCR3 (828: 5'-**GTTACTACTTCCACCTGCCTG**-3' SEQ ID n.º 1) es eficaz para inhibir la expresión del ARNm del receptor tal y como se muestra en la tabla 6.

25 El oligonucleótido 828 está dirigido contra el gen de CCR3 y comienza 48 bases después del final del exón 1 y tiene 21 bases de longitud. Se realizaron búsquedas con BLAST contra 828 y otros que no son el receptor CCR3, encontrándose que la siguiente homología más próxima era una homología de menos del 72%. Se considera que es una homología insignificante para conseguir la asociación completa de dos secuencias complementarias. La especificidad de 828 se evaluó con un oligonucleótido con discordancias (SEQ ID n.º 32). La discordancia no tuvo ningún efecto sobre el ARNm de CCR3 ni sobre el gen de mantenimiento G3PDH utilizado como control interno en estos experimentos. Así pues, el oligonucleótido antisentido 828 es específico.

Tabla 6

Identificación del antisentido	Secuencia del antisentido: 5'-3'	% de la inhibición del ARNm de CCR3
773	5-TGGAAAAGCGACACCTACCTG-3	73%
828	5-GTTACTACTTCCACCTGCCTG-3	71%
786	5-CCCITTTCTCTGGAAAAGCGACA-3	45%
788	5-CTCCCTTTTCTCTGGAAAAGCG-3	37%
793	5-TCCACCTCCCITTTCTCTGGA-3	35%
807	5-CCCTCTGTTCACCTCCCTT-3	31%

Ejemplo 2

35 Eficacia de dos oligonucleótidos sustituidos con DAP en las células mononucleares de la sangre periférica (PBMC) de mono

Tal y como se explicó anteriormente, los oligonucleótidos antisentido 107A y 828 se modificaron por sustitución de la adenosina con DAP para producir los oligonucleótidos antisentido TOP004 y TOP005, respectivamente. El TOP004 (5'-**GGGTCTGCXGCGGGXTGGT**-3' (SEQ ID n.º 13), donde X representa una modificación con DAP de un resto de adenosina), como con 107A, es un 19-mero dirigido a la cadena β común de los receptores de IL-3, IL-5 y

GM-CSF. El TOP005 (5'-**GTTXCTXCTTCCXCCTGCCTG**-3' (SEQ ID n.º 14)), al igual que con 828, es un 21-mero dirigido contra el receptor de quimiocinas CCR3.

Se analizó la eficacia de TOP004 y de TOP005 por separado y en combinación. El ASM8 es una composición que comprende, en parte, tanto TOP004 como el TOP005. Se realizaron estudios de la eficacia en las células mononucleares de la sangre periférica (PBMC) de mono, para validar el uso de esta especie para explorar los posibles efectos tóxicos que surjan de la actividad farmacológica de ASM8.

Para que ASM8 sea eficaz en el macaco cangrejero, debe existir la homología suficiente con sus secuencias diana. La secuencia de la cadena β del macaco cangrejero no está disponible en las bases de datos públicas y, por lo tanto, se clonó y se secuenció el segmento que abarca la región de la secuencia de TOP004. Sin embargo, la actividad de TOP004 entre las especies de primates se puede valorar directamente en un sistema *in vitro* pertinente. En concreto, una preparación de células mononucleares de la sangre periférica (PBMC) es un sistema adecuado para analizar la funcionalidad del TOP004, ya que la cadena β común se encuentra en la mayoría de las subpoblaciones de leucocitos mononucleares (linfocitos T y B, monocitos y macrófagos).

La información de las secuencias para el receptor CCR3 del macaco cangrejero está disponible sólo para la región codificante; no hay disponible ninguna información de secuencia para la región de fijación de TOP005 en las bases de datos públicas. La secuencia diana de TOP005 comienza 48 bases después del final del exón 1 del gen humano; este intrón abarca más de 20 kilopares de bases, lo que convierte su clonación y secuenciación en algo muy tedioso. Los trabajos en la bibliografía han demostrado que algunos segmentos de las secuencias intrónicas están conservadas entre humanos y monos (Rahman et al. 2004, *Genomics*, 8376-84). Los estudios evolutivos también demuestran que los segmentos de las secuencias intrónicas homólogas se encuentran entre los taxones (humano, ballena y foca) y que estos segmentos se encuentran más a menudo cerca de la uniones entre el intrón y el exón (Hare M. P. y Palumbi S. R., 2003, *Mol Biol Evol.* 20, 969-978). La funcionalidad de TOP005 en los monos se analizó en una preparación de PBMC en la cual la expresión del receptor CCR3 se encuentra en subconjuntos de linfocitos T y B.

25 Secuenciación de la cadena β común del macaco cangrejero

El análisis de la cadena β común para los genes de los receptores de IL-3/IL-5/GM-CSF de humano, chimpancé, cerdo, ratón y rata revelaron un grado alto de similitud de las secuencias génicas entre los vertebrados. Se diseñaron las secuencias de los cebadores para la clonación por PCR. Las secuencias de los cebadores se dedujeron de secuencias nucleotídicas muy conservadas de humano, chimpancé, cerdo, ratón y rata que rodean la región oligonucleotídica de TOP004 del gen de la cadena β común. La tabla 2 muestra los diferentes cebadores. Estos cebadores se utilizaron para amplificar productos específicos del ADNc de las PBMC del macaco cangrejero. Se obtuvieron varios productos de PCR, en función del conjunto de cebadores utilizados. Se utilizó una ronda de PCR anidada para valorar la especificidad de los productos obtenidos. Los amplicones positivos se clonaron y se secuenciaron.

La figura 1A muestra las secuencias de tres clones (SEQ ID n.º 25, 26 y 27, respectivamente) obtenidas de la amplificación por PCR de la región de TOP004 del macaco cangrejero alineada con la secuencia humana (SEQ ID n.º 28) y la correspondiente región en las secuencias nucleotídicas de chimpancé (SEQ ID n.º 33), cerdo (SEQ ID n.º 34), rata (SEQ ID n.º 35) y ratón (SEQ ID n.º 36). Los nucleótidos no homólogos se muestran con minúsculas, mientras que las regiones conservadas se muestran en mayúsculas. La región de TOP004 está subrayada. La secuencia de la cadena β del macaco cangrejero complementaria a la región de TOP004 mostró una homología significativa (18 de 19 bases eran idénticas) en los tres clones secuenciados. La diferencia se encontró en la posición 6 (que comienza a partir del extremo en 5' de TOP004), donde se encontraron tanto una «A» como una «G» (en donde la «A» es la base esperada). La figura 1B muestra el alineamiento de las secuencias de las proteínas predichas a partir de la secuencia clonada de macaco cangrejero (SEQ ID n.º 37) y las secuencias nucleotídicas conocidas de humano (SEQ ID n.º 38), chimpancé (emb. AADA01213660) (SEQ ID n.º 39); cerdo (U94688.1) (SEQ ID n.º 40); ratón (NM_007780.1) (SEQ ID n.º 41) y rata (NM_133555.1) (SEQ ID n.º 42). La discrepancia nucleotídica encontrada en la posición 6 (si se comienza desde el extremo 5' de TOP004 donde se encontraron una «A» y una «G») corresponde a la segunda base del codón de la glutamina (Q) o la lisina (K) en la cadena β común de las secuencias de proteínas disponibles en el banco de datos público. Los datos presentados en la figura 1B muestran que las especies muy evolucionadas contienen un resto de glutamina (flecha en humano, chimpancé y cerdo) en la región complementaria de TOP004. La glutamina está codificada por 2 codones, CAA o CAG. En las especies inferiores (ratón y rata), la glutamina está sustituida por un resto de lisina. La lisina está codificada por 2 codones, AAA o AAG. En cualquier caso, se conserva una adenosina en la segunda posición. Como tal, el resto de adenosina es un probable candidato para que la secuencia del mono sea funcional al igual que lo es en los otros vertebrados superiores. Sin embargo, no se pueden descartar los polimorfismos de la cadena β de GM-CSF. Freeburn et al. describen varias mutaciones en la región intracitoplasmática del receptor con la cadena β que podrían explicar la susceptibilidad a la leucemia, (Freeburn et al., 1997, *Exp. Hematol.*, 25: 306-311). Los datos de secuenciación presentados en la figura 1A muestran que puede aparecer un resto de guanosina en la posición 6 comenzando

desde el 5' de la secuencia de TOP004 subrayada. En este caso, el codón será CGG y la secuencia de la proteína contendrá un resto de arginina (R) en esa posición. Una base básica (H, K o R) en esa posición es una reminiscencia de los vertebrados inferiores y es poco probable que sea el caso de los primates.

A pesar de esta discrepancia, el elevadísimo grado de identidad entre la secuencia de la cadena β de humano y de mono sugiere que TOP004 sería funcional en el macaco cangrejero.

Eficacia de TOP004 y TOP005 en las PBMC de macaco cangrejero

TOP004 y TOP005 se analizaron por separado en las PBMC de macaco cangrejero en busca de su capacidad para disminuir selectivamente la expresión de la cadena β y de CCR3, respectivamente. Las PBMC de mono purificadas se incubaron con diferentes concentraciones de TOP004 y TOP005.

Respecto a las figuras 2A y 2B, los resultados de los experimentos realizados sobre más de 10 muestras de sangre obtenidas de monos se presentan en el gráfico de barras A y en el gráfico de barras B. El gráfico de barras muestra una reducción de la expresión del ARNm de CCR3 y de la cadena β cuando se usan TOP004 (A) y TOP005 (B) en las PBMC de mono. La inhibición era específica para TOP004 y TOP005, y no se debe a la degradación del ARN ni a la pérdida de viabilidad celular, como prueba el control interno (producto de 451 pb que corresponde al ARNm de la G3PDH y al ensayo de viabilidad celular). El TOP004 redujo específicamente la expresión de la cadena β común en las PBMC primarias de mono según se midió por RT-PCR (figura 2A). Se obtuvo la máxima eficacia con concentraciones de 10 a 15 μM , en donde se observó una inhibición de > 50% la mayor parte de las veces. El que TOP004 inhibiera la cadena β de mono confirmó los datos de secuenciación (figura 1A) que mostraban un grado muy alto de identidad entre las secuencias de ARNm de la cadena β de mono y de humano. De igual forma, la transfección de TOP005 en las PBMC de mono disminuyó la expresión del ARNm de CCR3, según se midió por RT-PCR (figura 2b). La inhibición máxima de TOP005 sobre la expresión del ARNm de CCR3 se obtuvo a concentraciones de oligonucleótido antisentido más bajas (de 0,05 a 2,5 μM) que para la cadena β (de 10 a 15 μM).

La inhibición de la expresión del ARNm, según se midió por RT-PCR, también se corroboró a nivel de proteína mediante citometría de flujo (FACS). Se incubaron las PBMC de mono durante 36 horas en medio de crecimiento en presencia de distintas concentraciones de TOP004 o TOP005. Se realizó la cuantificación por citometría según se describe anteriormente. Respecto a las figuras 3A y 3B, los gráficos de barras muestran la expresión en la superficie celular de CCR3 y de la cadena β en presencia de TOP004 y TOP005, respectivamente, en las PBMC de macaco cangrejero. Los gráficos muestran que, tras el tratamiento con TOP004 o TOP005, se observó una reducción del porcentaje de células que expresan la cadena β y el CCR3 de más del 30%, lo que se consiguió a 7,5 μM y 0,5 μM , respectivamente.

El TOP004 y el TOP005 también se analizaron en combinación (politerapia), a una proporción de 1:1 (ASM8), en las PBMC de macaco cangrejero para detectar su capacidad para disminuir selectivamente la expresión de la cadena β y de CCR3, respectivamente. Las PBMC de macaco se incubaron durante una noche en presencia de diferentes concentraciones de ASM8 antes de valorar por RT-PCR la expresión de la cadena β y del CCR3. En las figuras 4A y 4B, los gráficos de barras que presentan la expresión del ARNm de CCR3 y de la cadena β en presencia de ASM8 en las PBMC del macaco cangrejero se muestran para más de cinco (5) muestras de sangre obtenidas de los monos. Se observó una inhibición significativa de la cadena β con concentraciones de ASM8 que oscilaban de 2,5 a 5 μM (figura 4A), que es más baja que el intervalo de concentración óptimo que da la inhibición máxima con TOP004 en monoterapia (entre 10 a 15 μM (figura 2A)). Estos resultados muestran que la politerapia con los antisentidos TOP004 y TOP005 proporciona una mejoría de la potencia y de la sinergia de ASM8 a la hora de bloquear la expresión de la cadena β , en comparación con el TOP004 en monoterapia. De igual forma, la transfección de ASM8 en las PBMC de mono disminuyó la expresión del ARNm de CCR3, según se midió por RT-PCR (figura 4B). La inhibición máxima para la expresión del ARNm de CCR3 debida a TOP005 se obtuvo a una concentración de oligonucleótidos antisentido más baja (de 0,05 a 5 μM) que para la cadena β (2,5 a 5 μM). El efecto de ASM8 sobre la inhibición del CCR3 no era claramente dependiente de la concentración, y este resultado podría reflejar que la inhibición máxima (meseta) se alcanza a una concentración más baja para CCR3 que para la cadena β .

En resumen, la secuenciación de la cadena β común del macaco cangrejero indicó la existencia de un grado muy alto de identidad (al menos 18 de las 19 bases que abarcan la secuencia de TOP004). Se esperaba que este alto grado de homología con el gen humano permita que TOP004 se hibride lo suficiente al ARNm de la cadena β para inducir la actividad antisentido y, por tanto, disminuir su expresión.

El TOP004 se transfectó en las PBMC de macaco cangrejero purificadas para evaluar su capacidad para reducir la expresión de la cadena β de mono. El TOP004 disminuyó con eficacia la expresión del ARNm de la cadena β , medido por RT-PCR, entre un 30 y un 70%.

De igual forma, el TOP005 se transfectó en las PBMC de macaco cangrejero y el nivel de la expresión de CCR3 se determinó por RT-PCR semicuantitativa. Los resultados demuestran que TOP005 reduce la expresión del CCR3 de macaco cangrejero en un intervalo que varía entre el 30% y el 85%.

Del mismo modo, la transfección de TOP004 o bien de TOP005 en las PBMC de mono indujo una reducción específica a 0,5 μM ($> 30\%$) en el número de células que expresan la cadena β o el CCR3, medidos por citometría de flujo.

- 5 El ASM8 también se transfectó en las PBMC de mono purificadas para evaluar la eficacia del tratamiento politerápico (TOP004 y TOP005) a la hora de reducir la expresión del ARNm de la cadena β y del CCR3 de mono. En estas condiciones, el ASM8 redujo significativamente la expresión de la cadena β y del CCR3, medida por RT-PCR, a concentraciones de ASM8 de tan solo 0,1 a 0,5 μM . Esto también sugiere que el macaco cangrejero es una especie adecuada para examinar posibles los efectos tóxicos debidos a la actividad farmacológica de ASM8.

Ejemplo 3

- 10 Efecto de los oligonucleótidos antisentido dirigidos contra el CCR3 en las células y líneas celulares humanas

Se realizaron más experimentos para valorar la capacidad que A86 y TOP005 tenían para inhibir la expresión del ARNm de CCR3 en las células de tipo eosinófilo diferenciadas de HL-60 (Lee Tiffany et al., *J. Immunol.*, 1998, 160: 1385-92), células U937 y Eo1-1, así como en las células mononucleares de la sangre periférica (PBMC). También se investigó la capacidad que tenían A86 y TOP005 para inhibir la migración de los eosinófilos y la movilización del calcio en las células HL-60 y en los eosinófilos humanos purificados de la sangre periférica. El A86 es un oligonucleótido antisentido (5'-**CTG GGC CAT CAG TGC TCT G**-3' (SEQ ID n.º 29) que corresponde a la secuencia nucleotídica de 87 a 105 de la región codificante (exón 7) de CCR3. Como se explicó anteriormente, TOP005 es 828, pero con las tres adenosinas reemplazadas por 2,6 diaminopurina (5'-**GTT XCT XCT TCC XCC TGC CTG**-3' (SEQ ID n.º 14)). La secuencia complementaria de 828 comienza 20 48 bases después del final del exón 1 y tiene una longitud de 21 bases. Como los controles para A86, se utilizaron un oligonucleótido sentido complementario (5'-**CAG AGC ACT GAT GGC CCA G**-3' (SEQ ID n.º 30)) y uno con discordancias (5'-**CGT GGC ACT CAG TGT CCT G**-3' (SEQ ID n.º 31)). Como control para 828/TOP005, se utilizó uno con discordancias (5'-**CCT TTG ACC TGC CAA TGC TCT**-3' (SEQ ID n.º 32)).

- 25 Efecto del oligonucleótido antisentido A86 sobre la expresión del ARNm de CCR3 en los eosinófilos derivados del clon 15 de HL-60

Se sabe que la variante del clon 15 de las células HL-60 se puede inducir, mediante el tratamiento con ácido butírico, para que se diferencie en células que tienen muchas características de los eosinófilos de la sangre periférica (Lee Tiffany et al., *J. Immunol.* 1998, 160:1385-92). Con el mismo protocolo de diferenciación, se confirmó la expresión del ARNm de CCR3 en las células HL-60 diferenciadas. A continuación, se examinó por RT-PCR la capacidad que tienen los oligonucleótidos sintéticos para modular la expresión del ARNm que codifica el receptor CCR3 en las células HL-60 diferenciadas en eosinófilos. Tras el tratamiento de las células con A86 a 10 μM , se valoró el ARNm de CCR3 por PCR semicuantitativa utilizando como control interno la G3PDH. El ARN total se aisló de las células recién recogidas tal y como se describe más arriba. Respecto a la figura 5, en ella se muestra el efecto de los oligonucleótidos antisentido contra CCR3 sobre la expresión del ARNm de CCR3 en las células diferenciadas HL60. A diferencia de los oligonucleótidos sentido, y de los oligonucleótidos con discordancias, los oligonucleótidos antisentido inhiben notablemente la expresión del ARNm de CCR3. La expresión del ARNm de CCR3 en las células tratadas con los oligonucleótidos sentido y con los oligonucleótidos con discordancias no fue significativamente diferente de la obtenida en las células sin tratar. Además, todos los oligonucleótidos a la concentración utilizada no afectaron la expresión del ARNm de la G3PDH. Por lo tanto, el oligonucleótido antisentido 40 A86 en este experimento es capaz de inhibir específicamente la expresión del ARNm de CCR3.

Efecto de A86 sobre la expresión de las proteínas de CCR3 en la superficie celular

Se investigó adicionalmente si la disminución del ARNm de CCR3 podía reflejar la de la densidad de las proteínas de CCR3 en la superficie celular. Respecto a esto, se realizó un análisis por citometría de flujo para valorar la expresión del receptor CCR3 en los eosinófilos derivados de HL-60 tras el tratamiento con los oligonucleótidos. 45 Después del tratamiento con ácido butírico, el porcentaje de eosinófilos derivados de HL-60 que expresan el receptor CCR3 fue del 40%. Cuando se trataron con oligonucleótidos sentido y con discordancias (10 μM), el porcentaje de células positivas disminuyó ligeramente, pero no significativamente; el porcentaje de células positivas era el 35% y del 38%, respectivamente. Sin embargo, la densidad del receptor CCR3 sobre las células tratadas con A86 se redujo significativamente (26% de células positivas frente al 40% en la células sin tratar). El A86 a 10 μM es 50 capaz de reducir la expresión de CCR3 en la superficie celular un 65%. El efecto de A86 fue más significativo a concentraciones más altas. En concreto, se utilizaron 20 y 30 μM de A86 y los resultados muestran que la expresión de CCR3 en la superficie celular disminuyó un 75% y un 85%, respectivamente. El A86, un oligonucleótido antisentido para CCR3, es capaz de inhibir la expresión de CCR3 en la superficie celular de una manera dependiente de la dosis.

Efecto de A86 sobre la movilización del calcio inducida con eotaxina en las células HL-60

Típicamente, se observa un flujo transitorio y rápido del calcio cuando los leucocitos están estimulados por las quimiocinas para las cuales expresan un receptor específico. Esta movilización del calcio puede venir seguida en tiempo real por células cargadas con Fura-2AM y es una medida cómoda de la activación del receptor. La quimiocina eotaxina es un ligando específico del receptor CCR3 e induce un flujo rápido de entrada de calcio y la quimiotaxia de los leucocitos tras su ligación al receptor. Respecto a la figura 6, en ella se muestra el efecto de A86 sobre la activación de CCR3. La movilización del calcio en respuesta a la eotaxina disminuyó en las células tratadas con A86 cuando se comparó con los oligonucleótidos sentido y de control. Las células se trataron con el oligonucleótido A86 a la concentración de 10 μ M. Las células tratadas con el oligonucleótido sentido fueron capaces de responder a la eotaxina de la misma forma que respondieron las células sin tratar. En estas condiciones, la eotaxina induce un incremento de la concentración intracelular de Ca^{2+} . Sin embargo, en las células tratadas con A86, la eotaxina indujo mucho menos movilización de Ca^{2+} . Los resultados presentados aquí muestran que el A86 era eficaz a la hora de interferir con la activación del receptor CCR3 en la línea celular HL-60.

El tratamiento de los eosinófilos humanos purificados con los oligonucleótidos antisentido inhibe su respuesta a la eotaxina

Respecto a la figura 7, en ella se muestra el efecto de los oligonucleótidos antisentido sobre la respuesta quimiotáctica a la eotaxina por parte de los eosinófilos humanos purificados. Los eosinófilos humanos purificados se incubaron durante una noche con los oligonucleótidos antisentido (cuadrados) o los oligonucleótidos sentido (círculos) a la concentración de 10 μ M, en RPMI 1640 complementado con SBF al 5% e IL-5 (1,5 ng/ml). Las células de control (triángulos) se incubaron en las mismas condiciones sin ODNS. Los datos son de un sólo experimento representativo de tres y se presentan como el número medio de células migradas \pm DE de las determinaciones por triplicado de las células en migración en 5 campos a gran aumento. La migración de los eosinófilos se vio inhibida por los oligonucleótidos antisentido contra CCR3, y esta inhibición fue más significativa cuando se incrementó la concentración de eotaxina. A 80 ng/ml de eotaxina, la migración de los eosinófilos disminuyó un 55,6%.

La figura 8 muestra la movilización del calcio en los eosinófilos tratados con los oligonucleótidos antisentido. Cuando los eosinófilos se tratan con A86 (10 μ M), la movilización del Ca^{2+} inducida por la eotaxina también se vio inhibida en comparación con los oligonucleótidos sentido y de control.

Los resultados presentados aquí muestran que el A86 era potente a la hora de interferir con la quimiotaxia de los eosinófilos a la eotaxina, mediante la reducción del receptor CCR3.

Eficacia de TOP005

Se realizaron experimentos similares con TOP005. Se eligió TOP005 debido a la eficacia de 828, a que los resultados de la valoración por BLAST de la secuencia muestran que 828 no tenía ninguna homología con los genes conocidos, a que 828 no se hibrida con TOP004 (experimentos realizados en el programa informático de ADN) y a su longitud (lo que permite la diferenciación de TOP004 cuando se mezclan juntos y se separan por HPLC de intercambio aniónico).

La figura 9 muestra el efecto de TOP005 sobre la expresión de CCR3 en la superficie celular. La eficacia de TOP005 se valoró en las células Eol-1 y U937. La expresión de CCR3 se valoró por citometría de flujo 36 horas después del tratamiento con TOP005. Los resultados se presentan como el porcentaje de expresión frente a los controles en las células Eol-1 y U937. Los gráficos de barras de la figura 9 muestran que TOP005 inhibió la expresión de la proteína de CCR3 sobre la superficie de las células U937 y Eol-1.

Las figuras 10A y 10B muestran el efecto de TOP005 sobre la expresión del ARNm de CCR3 en las células mononucleares de la sangre periférica (PBMC) de humano. Las PBMC de humano se acababan de aislar o bien se cultivaban en interleucina 2 humana (10 ng/ml durante 24 horas). A continuación se exponían al TOP005 y se cultivaban durante 18 horas. En la figura 10A, los geles que muestran la expresión de G3PDH y CCR3 se muestran en la parte superior. La proporción de la expresión del ARNm de CCR3 entre la de G3PDH, normalizada por los controles se presenta en la parte inferior. Respecto a la figura 10B, el gráfico de barras muestra que TOP005 es eficaz a la hora de disminuir la expresión del ARNm de CCR3 en las PBMC a dosis de tan solo 1 μ M.

Los oligonucleótidos antisentido A86 y TOP005 pueden, por lo tanto, inhibir la expresión del ARNm de CCR3 en las células Eol-1 (una línea celular eosinófila humana), en las células HL-60 diferenciadas en eosinófilos y en las células U937. La inhibición de CCR3 con estos oligonucleótidos también disminuyó la movilización del calcio en las células diferenciadas HL-60 y en los eosinófilos humanos, y también disminuyó la quimiotaxia de los eosinófilos a la eotaxina. Ni los correspondientes oligonucleótidos sentido ni los oligonucleótidos con discordancias alteraron la respuesta a la eotaxina.

Ejemplo 4

Eficacia de TOP004 a la hora de reducir la expresión de la subunidad de la cadena β común de los receptores de IL-3, IL-5 y GM-CSF, y las respuestas celulares asociadas en las líneas celulares humanas

Se realizaron más experimentos para analizar el efecto de 107A y de TOP004 sobre la expresión de la subunidad de la cadena β común de los receptores de IL-3, IL-5 y GM-CSF.

5 Modulación de la expresión del ARNm de la cadena β en las células TF-1 y U937

Respecto a las figuras 11A, 11B y 11C, en ellas se muestra la modulación de la expresión del ARNm de la cadena β en las células TF-1. Las células TF-1 se trataron con el antisentido 107A durante 12 horas. Respecto a la figura 11A, se realizó la RT-PCR para detectar la expresión del ARNm de la cadena β y del ARNm de G3PDH en las células TF-1. Las células se trataron como sigue: carril 1, control sin tratar; carril 2, oligonucleótido sentido (10 μ M); carril 3, 107A (10 μ M); carril 4, oligonucleótido con discordancias (10 μ M). Se utilizó la RT-PCR semicuantitativa en condiciones no saturantes para valorar la expresión del ARNm de la cadena β y de la G3PDH (utilizada como control). El tratamiento con 107A (10 μ M) inhibió casi completamente la expresión de la cadena β en las células TF-1 tratadas (figura 11A) y U937 (no se muestran los datos). La inhibición era específica para 107A y no se debía a la degradación del ARN ni a la pérdida de la viabilidad celular, como se puso de manifiesto mediante el control interno (producto de 450 pb que corresponde al ARNm de G3PDH) (figura 11A). Por el contrario, la expresión del ARNm de la cadena β no se inhibió en las célula de control sin tratar ni en las células tratadas con el oligonucleótido sentido o con discordancias (figura 11A). Así pues, la actividad era específica y eficaz a la hora de inhibir la expresión del ARNm de la cadena β .

Respecto a las figuras 11B y 11C, en ellas se muestra el efecto del tratamiento con el oligonucleótido sentido y con el 107A sobre la expresión de la cadena β en la superficie celular de las células TF-1, según se determinó mediante análisis por FACS. La figura 11B muestra los controles sin tratar (PC) frente a oligonucleótido sentido (S-ODN) y en donde NC representa un control negativo. La figura 11C muestra la expresión en la superficie celular en células tratadas con 107A (a concentraciones diferentes de 5, 10 y 20 μ M) durante 36 horas. La capacidad de los oligonucleótidos antisentido para inhibir la expresión de la proteína de la cadena β dio lugar a una correspondiente densidad más baja de la subunidad de la cadena β sobre la superficie de las células tratadas con 107A. Se utilizó un anticuerpo monoclonal (Acm) contra la proteína de la cadena β común de los receptores de GM-CSF/IL-3/IL-5, junto con el análisis por FACS, para medir la expresión en la superficie celular de la proteína de la cadena β en las células TF-1. El nivel de expresión de la cadena β en las células TF-1 sin tratar era muy alto y no se vio afectado por el tratamiento con los oligonucleótidos sentido. Sin embargo, la concentración creciente de 107A (5, 10 y 20 μ M) redujo significativamente el nivel de la expresión de la cadena β de una manera dependiente de la dosis (el porcentaje de células que dieron positivo en el análisis por FACS disminuyó del 69,9% al 27,8%).

La figura 11D muestra la inhibición de la expresión de la cadena β común en las células U937 tras el tratamiento con TOP004. Se incubaron células U937 en presencia de concentraciones crecientes de TOP004 (0,01, 0,1 y 10 μ M) durante 12 horas en medio sin suero antes de la RT-PCR y 48 horas antes del análisis por FACS. El porcentaje de inhibición de la proteína o del ARNm de la cadena β común se determinó por comparación de los valores obtenidos con los de las células sin tratar. El experimento se realizó por triplicado y los datos representan la media \pm EE. Los resultados presentados en la figura 11D muestran que el antisentido TOP004, que es el homólogo al antisentido 107A que contiene restos DAP, es eficaz para inhibir la cantidad de proteína y ARNm de cadena β común. Además, se encontró que bastaba una cantidad muy pequeña de TOP004 (p. ej., 1 μ M) para reducir el ARNm de la cadena β , así como la correspondiente proteína. Así pues, estos datos favorecen la eficacia de la química del DAP y su uso en las composiciones farmacológicas según se describe más arriba.

Supervivencia de las células y estudios funcionales

Respecto a la figura 12, en ella se muestra la proliferación de las células TF-1 tratadas con el antisentido 107A en presencia de GM-CSF, IL-3 o IL-5. Las células se incubaron con 107A (10 μ M) durante 5 horas en un medio sin suero, que contiene 1 ng/ml de GM-CSF o 3 ng/ml de IL-3 o 3 ng/ml de IL-5. La incubación se terminó al cabo de 2 días, y se midió la proliferación de las células mediante el ensayo con Alamar Blue™ (n = 3). Los resultados se expresan como la media de la absorbancia (570-595) \pm DE.

Las células TF-1 necesitan las citocinas GM-CSF, IL-3 o IL-5 para proliferar, y en la respuesta biológica a estas citocinas interviene la vía de señalización de la cadena β . Se esperaba que la inhibición de la expresión en la superficie celular de la proteína de la cadena β inhibiera la proliferación de las células TF-1, incluso en presencia de estas citocinas. El 107A (10 μ M) provocó la inhibición del crecimiento de las células TF-1 en presencia de IL-3, IL-5 o GM-CSF. Estos resultados demuestran que la inhibición de la expresión de la proteína de la cadena β en la superficie celular debida a 107A inhibió con eficacia la respuesta biológica celular a las tres citocinas.

Los eosinófilos expresan los receptores de GM-CSF, IL-3 e IL-5 y desempeñan una función importante en la inflamación y en la alergia. Los eosinófilos necesitan el GM-CSF, la IL-3 y particularmente la IL-5 para su diferenciación, activación y supervivencia (Oodera et al., 1998, *Lung*, 176: 237-247; Ohnishi et al., 1993, *J. Allergy*

Clin. Immunol., 92, 607-615). Se investigó la capacidad de inhibición de la supervivencia de los eosinófilos en respuesta a la IL-5 que tiene el oligonucleótido antisentido que se dirige al ARNm de la cadena β . Respecto a las figuras 13A y 13B, en ellas se muestra la modulación de la supervivencia de los eosinófilos ejercida por 107A.

Respecto a la figura 13A, se incubaron eosinófilos humanos purificados con 107A a las concentraciones indicadas (10, 15 y 20 μ M) en medio RPMI complementado con SBF al 5% y 1,5 ng/ml de IL-5 durante una noche. La viabilidad de los eosinófilos se evaluó con el ensayo de exclusión con colorante azul tripano. Los resultados son la media de los resultados de tres experimentos. El tratamiento con 107A a las concentraciones indicadas redujo significativamente la supervivencia de los eosinófilos de una manera dependiente de la dosis, al 35% \pm 12% (10 μ M), 43% \pm 2% (15 μ M) y 54% \pm 7% (20 μ M) de los niveles del control ($p < 0,01$). La supervivencia de los eosinófilos no se vio afectada significativamente por el tratamiento con el oligonucleótido sentido, como control, a una concentración de 20 μ M. Así pues, el 107A contra la cadena β inhibió la supervivencia de los eosinófilos incluso en presencia del medio de cultivo que contiene la citocina específica IL-5.

Respecto a la figura 13B, se incubaron los eosinófilos humanos purificados durante 48 horas en RPMI complementado con SBF al 5% y 2 ng/ml de IL-5 en presencia o ausencia de 107A (15 μ M). La viabilidad de los eosinófilos se valoró mediante análisis por citometría de flujo con el protocolo de yoduro de propidio y anexina-V-FITC según se describe en los materiales y procedimientos.

Cuando los eosinófilos se trataron con 107A, su viabilidad disminuyó un 64%, 41% debido a la apoptosis. En cambio, en las células sin tratar y en las células tratadas con el oligonucleótido sentido, el porcentaje de las células muertas era más bajo.

Así pues, el antisentido 107A inhibe específicamente la expresión de la cadena β común en las células TF-1 y en los eosinófilos primarios a nivel del ARNm y de la proteína, según se midió por RT-PCR y FACS. La eficacia máxima obtenida en el sistema celular ensayado, con las condiciones experimentales utilizadas, se observó a una concentración de 20 μ M. En presencia de 107A se redujo la proliferación de las células TF-1, tanto si se utilizaba IL-3, IL-5 o GM-CSF, como factor trófico. Este resultado demuestra que el antisentido 107A presenta especificidad y eficacia por la cadena β .

La supervivencia de los eosinófilos fue inhibida por el 107A en presencia de IL-5 y reveló que la apoptosis es una consecuencia de este efecto inhibitor. Los eosinófilos desempeñan una función importante en la inflamación alérgica y requieren GM-CSF, IL-3 e IL-5 para su diferenciación, activación y supervivencia (Adachi et al., 1995, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 151: 618-623 y Oddera et al., 1998, *Lung.* 176: 237-247). En el asma se piensa que la acumulación de los eosinófilos y su supervivencia contribuyen de forma importante a la inflamación y el daño del tejido epitelial porque liberan productos tóxicos, entre ellos la proteína catiónica de eosinófilos (Walsh et al., 1997, *Clin. Exp. Allergy*, 27: 482-487).

Ejemplo 5

Análisis del ARNm para los genes diana del ASM8 en las muestras de tráquea

Se llevaron a cabo más experimentos para analizar las muestras de tráquea de los macacos cangrejeros para detectar la cantidad de ARNm de los genes diana contra los cuales está dirigido ASM8 (subunidad de la cadena β y CCR3). El día 15 (un día tras la última dosis) se recogieron muestras de tráquea inmediatamente después del sacrificio de los animales de la fase principal en los grupos 1 (control) y 4 (grupo con dosis alta; dosis deseada de 2,5 (mg/kg)/día) y se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido. En las muestras de tráquea congeladas se analizó la cantidad de ARNm diana por RT-PCR.

Los niveles de expresión génica de las dianas (subunidad β_c y CCR3) se determinaron en las muestras de tráquea de mono con un procedimiento de RT-PCR semicuantitativo y validado. Las amplificaciones por PCR específicas de CCR3 y de la subunidad β_c se llevaron a cabo en extractos de tráquea para el control y para los animales tratados con ASM8 a dosis alta (tabla 7).

Tabla 7 Resultados del análisis de las muestras por RT-PCR

		Densitometría			
Dosis = 0 mg/kg de peso corporal al día					
Animal	Sexo	Subunidad β_c	CCR3	IL-4	TNF- α
1002A	M	21787	28776,5	15312,6	91432,5
1003A	M	25339	19986,9	11093,0	99032,7
1004C	M	27568	27600,6	13218,8	77107,2

1101A	M	21599	22619,4	12450,4	95441,5
1501A	F	5452	5063,0	18074,5	80778,5
1502A	F	14920	19799,4	15252,2	86741,0
1503B	F	9691	15004,8	15200,0	90229,0
1504C	F	22800	52842,7	9001,6	102726,5
Media		20529	26661	13700	90436
Dosis = 5 mg/kg de peso corporal al día					
4002B	M	22073	22778,3	11034,0	71911,0
4003B	M	12652	9109,4	5887,0	86317,4
4101A	M	21154	11365,8	15361,0	86526,0
4501A	F	14755	2227,0	173,0	57996,7
4502B	F	7604	21286,0	14463,4	98144,3
4503B	F	3505	29105,0	16711,0	103532,5
Media		13624	18729	12691	84071

Nota: los valores sombreados representan valores atípicos que no se incluyeron en el cálculo de los valores medios.

- 5 Aunque la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH) se utiliza típicamente como control interno en el análisis de las reacciones de RT-PCR, se observó un infiltrado celular leve de los pulmones y la tráquea (como se observa típicamente con otros oligonucleótidos antisentido en los sitios donde se depositan). Así pues, como el infiltrado celular contribuyó al nivel medido de la subunidad de β_c y de CCR3 (a saber, las células inmunitarias expresan la subunidad de β_c y el CCR3), se consideró que G3PDH no era el gen más apropiado para ser utilizado como el control interno en este caso. En su lugar, la expresión de los genes diana se normalizó por el nivel de los ARNm de las citocinas inflamatorias; a saber, IL-4 y TNF- α . Los resultados demuestran que incluso
- 10 aproximadamente 24 horas después de la administración de ASM8, la expresión relativa del ARNm de la subunidad de β_c y de CCR3 respecto al ARNm de IL-4 disminuyó un 29% y 24%, respectivamente, y la expresión respecto al TNF- α disminuyó un 30% y 24%, respectivamente, en los animales tratados con ASM8 (tabla 8).

	Proporción			
	Subunidad β_c /IL-4	CCR3/IL-4	Subunidad β_c /TNF- α	CCR3/TNF- α
Control	1,50	1,95	0,23	0,29
Con tratamiento	1,07	1,48	0,16	0,22
Inhibición	28,7%	24,1%	30,4%	24,1%

- 15 Así pues, el tratamiento con ASM8 inhibe significativamente la expresión del ARNm de la subunidad β_c y del CCR3 respecto a las citocinas inflamatorias IL-4 y TNF- α , a pesar de la complejidad del tejido de tráquea de mono y las 24 horas que pasaron entre la dosificación de ASM8 y la obtención de las muestras del tejido.

Ejemplo 6

Estabilidad de ASM8 en conservación

- 20 Se realizó el análisis de la estabilidad para evaluar la integridad de los constituyentes oligonucleotídicos de ASM8 (TOP004 y TOP005) a las diferentes temperaturas de conservación. Esta información es importante para definir las condiciones de conservación, reanálisis y vida útil óptimas para ASM8.

La electroforesis capilar en gel (CGE, por su nombre en inglés) y la cromatografía líquida de alta resolución (presión) (HPLC) se han utilizado ampliamente para el análisis químico de los oligonucleótidos antisentido. Como ASM8 consiste en dos oligonucleótidos, el sistema de análisis debe proporcionar una separación adecuada para cada una

de las dos moléculas antisentido. Así pues, se describirá lo siguiente: 1) un procedimiento basado en la cromatografía de intercambio aniónico para separar los componentes de ASM8 (TOP004 y TOP005) y sus productos de degradación, y 2) el efecto de la temperatura de almacenamiento sobre la estabilidad de los constituyentes de ASM8 (figuras 14 a 16).

- 5 Se pesó el ASM8 y se solubilizó en PBS a una concentración de 0,5 mg/ml (0,25 mg/ml de TOP004 y 0,25 mg/ml de TOP005). [El factor de pureza para TOP004 era de 1,15 (a saber, 1,15 g de polvo contienen 1 g de la molécula activa); el factor de pureza para TOP005 era de 1,24 (a saber, 1,24 g de polvo contienen 1 g de la molécula activa)].

Para inducir la degradación de TOP004 y de TOP005 antes del análisis (para garantizar que se resuelven los productos de degradación de las moléculas intactas), se realizaron los siguientes tratamientos:

- 10
- Despurinación: se resuspendió el ASM8 en CH₃COOH al 30% a una concentración final de 0,5 mg/ml, y se incubó durante 3, 4 o 6 horas a la temperatura ambiente. Se paró la reacción con la adición de 5 volúmenes de agua y la mezcla se colocó a -20 °C antes de la liofilización en una Speed-Vac para retirar el ácido acético.
 - Escisión: los oligonucleótidos despurinados se resuspendieron en NaOH a 0,2 M (0,5 mg/ml), se incubaron a 50 °C durante 1 hora y se conservaron a -20 °C o se analizaron por HPLC.
- 15

Las alícuotas de ASM8 (0,5 mg/ml) en PBS se incubaron a -20 °C, 4 °C, 30 °C y 40 °C durante 2 meses. En las semanas 4 y 8 se estableció el perfil del ASM8 por HPLC. Se definió la condición de control como el perfil de ASM8 por HPLC antes de ninguna conservación (a saber, a tiempo 0). El sistema de HPLC se guió con el programa Breeze (V 3.30) de Waters (figuras 17A1, 17A2, 17B1 y 17B2).

- 20 La separación por HPLC se realizó mediante una bomba de HPLC binaria Waters 1500 Series acoplada a un detector de absorbancia Waters 2487 Dual λ y equipado con un desgasificador en línea, un horno y un inyector manual de la serie 1500, Reodyne 7725i.

- 25 La mezcla de oligonucleótidos se fraccionó en una columna de intercambio aniónico Waters Protein Pak DEAE 5PW (0,5 cm x 7,5 cm), se mantuvo a 60 °C y se detectó mediante la absorción UV a 260 nm. La mezcla de oligonucleótidos (volumen = 25 µl) se cargó en la columna con agua (tampón A) y se realizó la elución progresivamente mediante el incremento de la proporción del tampón B (1 M de LiClO₄), lo que da lugar a un incremento de la fuerza iónica de la fase líquida (tabla 9), que eluyó el oligonucleótido de la fase sólida (columna).

En estas condiciones de ensayo, 62,5 µg de bien TOP004 o bien TOP005 produjeron un cambio mensurable de > 0,15 unidades de absorbancia (AU, por su nombre en inglés) a 260 nm.

Tabla 9. Gradiente de HPLC para la separación de ASM8 y los productos de degradación

Tiempo (min)	Flujo (ml/min)	Tampón A (%)	Tampón B (%)
0	1	100	0
5	1	100	0
10	1	93	7
100	1	65	35
102	1	20	80
122	1	20	80
124	1	100	0
144	1	100	0
146	0,1	100	0

- 30 El cromatograma de la figura 14 muestra el perfil de elución de cada uno de los productos que forman ASM8 (TOP004 y TOP005) en la cromatografía de intercambio aniónico con DEAE. En la cromatografía de intercambio aniónico con DEAE se fraccionó un volumen de 25 µl de ASM8 recién preparado (0,5 mg/ml). En las condiciones de gradiente descritas más arriba, TOP004 se eluyó antes que TOP005; esto es coherente con que TOP004 tiene 2 nucleótidos menos que TOP005 y que tiene menos restos cargados negativamente. El oligonucleótido TOP004 eluyó a los 81,3 minutos y representaba el 48,0% del material total que absorbe a 260 nm. TOP005 eluyó a los 86,8 minutos y representaba el 49,3% del material total que absorbe a 260 nm.
- 35

- Para confirmar que TOP004, TOP005 y los productos de degradación de ASM8 se separan convenientemente, se realizó una degradación química de ASM8 en dos etapas. La etapa de escisión se mantuvo constante, pero el periodo de incubación para la etapa de despurinación se realizó durante 3 a 6 horas. Respecto a la figura 15, el ASM8 (0,5 mg/ml) se trató con CH₃COOH durante 3 horas y se sometió a lisis alcalina (según se describe anteriormente) antes del fraccionamiento por cromatografía de intercambio aniónico con DEAE. El oligonucleótido TOP004 eluyó a los 81,5 minutos y representó el 32,4% del material total que se absorbe a 260 nm. El producto TOP005 eluyó a los 86,9 minutos y representó el 28,0% del material total. Los picos menores representan los productos de degradación de ASM8. Respecto a la figura 16, el ASM8 (0,5 mg/ml) se trató con CH₃COOH durante 6 horas y se sometió a lisis alcalina según se describe más arriba antes del fraccionamiento por cromatografía de intercambio aniónico con DEAE. Con la detección a 260 nm, el oligonucleótido TOP004 eluyó a 82,2 minutos y el TOP005 eluyó a los 86,7 minutos. Al incrementar el tiempo de despurinación, la proporción de TOP004 disminuyó al 20,6% y la de TOP005 al 14,5 %. El grado de degradación de TOP005 parecía ser ligeramente mayor en las condiciones experimentales. Tal y como se observa en los cromatogramas de las figuras 15 y 16, el incremento del tiempo de despurinación incrementó la degradación de ASM8.
- Respecto a las figuras 17A1, 17A2, 17B1 y 17B2, se evaluó la estabilidad química de ASM8 en las diferentes temperaturas de conservación. El ASM8 (0,5 mg/ml en PBS) se incubó a -20 °C, 4 °C, 30 °C o 40 °C durante 4 semanas (figuras 17A1 y 17A2) y 8 semanas (figuras 17B1 y 17B2), y se analizó por cromatografía de intercambio aniónico con DEAE. Las diferentes temperaturas de conservación analizadas en este experimento no afectaron al perfil de elución de los componentes de ASM8. No se observó ninguna degradación significativa de ASM8 a ninguna de las temperaturas a las cuales se almacenó el ASM8 durante incluso 2 meses.

Más arriba se ha descrito un procedimiento de separación basado en la HPLC de intercambio aniónico con DEAE para ASM8. Debido a la naturaleza de este producto, se prefiere la separación adecuada de los componentes de ASM8 (oligonucleótidos TOP004 y TOP005). En las condiciones de gradiente descritas, el tiempo de retención de TOP004 fue más de 5 minutos más corto que el tiempo de retención de TOP005, con muy poco solapamiento de los dos picos.

El procedimiento es también capaz de detectar los productos de degradación de ASM8. La estabilidad química de ASM8 en las diferentes condiciones de temperatura, humedad y luz se puede valorar mediante el procedimiento de HPLC.

La formulación del ASM8 en PBS era químicamente estable, y no se detectaron productos de degradación significativos mediante el procedimiento de HPLC después de la conservación en un intervalo de temperaturas de hasta 2 meses.

Ejemplo 7

Evaluación termodinámica de ASM8

Se realizaron más experimentos para asegurar que las dos hebras oligonucleotídicas, TOP004 y TOP005, no interactuaban en solución con las evaluaciones termodinámicas.

Se mezclaron TOP004 y TOP005 en concentraciones equimolares en PBS a 1X (así como en otros sistemas de tampamiento). La concentración de oligonucleótidos total osciló de aproximadamente 1,2 a 8,7 µM. Se realizaron procedimientos de desnaturalización térmica estándar con UV con un espectrofotómetro Beckman DU640 con un accesorio de Tm. El cambio de absorbancia se detectó a 260 nm a cada grado desde 10 a 90 °C. Las curvas de fusión se ajustaron con el programa informático MELTWIN 3.5™ para determinar los parámetros termodinámicos. Se tomaron capturas de la pantalla con las curvas de fusión y de las tablas del resumen termodinámico.

Respecto a la figura 18, en ella se muestran las curvas de fusión para TOP004 y TOP005 en PBS a 1X. La figura 19 es un resumen termodinámico basado en los resultados de los ajustes de la curva de fusión para TOP004 y TOP005 en PBS a 1X. Los resultados demuestran que ninguna de las combinaciones o condiciones de los oligonucleótidos produjeron una transición (salto de la absorbancia) significativa en el perfil de fusión tras el incremento de la temperatura. Esto indicó que las mezclas de oligonucleótidos analizadas no forman interacciones de estructura secundaria significativas en las condiciones de tamponamiento analizadas.

Ejemplo 8

Toxicidad de ASM8 en el macaco cangrejero

Este ejemplo muestra la toxicidad de ASM8, que consiste de una mezcla a 1:1 de TOP004 y TOP005. También se muestra el perfil toxicocinético de sus componentes oligonucleotídicos por separado, cuando se administran por exposición por inhalación una vez al día durante 14 días consecutivos a macacos cangrejeros. Además, 14 días de exposición por inhalación a ASM8 no desencadenaron ninguna enfermedad de hipersensibilidad sistémica

detectable mediante inyección intradérmica (i.d.).

Tabla 10. Estimación de la dosis alcanzada

Grupo de dosis/tratamiento	Estimación de la dosis alcanzada ((mg/kg)/día)		
	Machos	Hembras	Combinados
1: Control de vehículo	0	0	0
2: Dosis baja de ASM8	0,05	0,05	0,05
3: Dosis media de ASM8	0,22	0,23	0,22
4: Dosis alta de ASM8	2,4	2,5	2,5

Tabla 11. Concentraciones globales del aerosol para exposición

Grupo de dosis/tratamiento	Media (µg/l)	D.E. (µg/l)	C.V. (%)
1: Control de vehículo	0	-	-
2: Dosis baja de ASM8	7,4	0,89	12,1
3: Dosis media de ASM8	34,6	5,68	16,4
4: Dosis alta de ASM8	380,4	68,43	18,0

5

Se realizaron evaluaciones exhaustivas de la mortalidad, manifestaciones clínicas, masa corporal, consumo de alimento, electrocardiografía, oftalmoscopia y enfermedad clínica. Se obtuvieron muestras de sangre en serie en el primer y último día de exposición y al final del periodo de recuperación, y se recogieron tejidos al finalizar para determinar el contenido de cada uno de los oligonucleótidos. Adicionalmente, el día 25, a los animales designados para la fase de recuperación se les dio una inyección intradérmica (i.d.) de ASM8 para valorar la posible hipersensibilidad sistémica. Se sacrificaron todos los animales tras 14 días de exposición (día 15) o después de un periodo de recuperación de 14 días (día 29) y se sometieron a una autopsia completa con recogida de un conjunto completo de tejidos de cada animal.

10

La evaluación histopatológica consistía en el examen microscópico de todos los tejidos de los animales en los grupos de control y de dosis alta, y los tejidos de las vías respiratorias en los grupos de dosis más baja y animales en recuperación.

15

La formulación de ASM8 se convirtió en aerosol rápidamente y produjo unos aerosoles para exposición que eran invariablemente estables y respirables, con valores intergrupales de mediana del diámetro medio areodinámico (MMAD, por su nombre en inglés) y desviación estándar geométrica (DEG) entre 1,7-1,8 µm, y 2,12-2,22, respectivamente. Las dosis estimadas resultantes que se consiguieron eran cercanas a las esperadas de 0,05, 0,22 y 2,5 (mg/kg)/día para los grupos 2 a 4, respectivamente, tablas 7 y 8.

20

No hubo muertes, y los monos toleraron bien las dosis. No hubo efectos sobre los parámetros de masa corporal, consumo de alimentos, electrocardiograma, oftalmoscopia o manifestaciones clínicas, y la prueba de hipersensibilidad no reveló ningún efecto por la administración de ASM8. Después de la autopsia, la medición del peso de los órganos no arrojó ningún indicio de toxicidad. El examen macroscópico de todos los órganos reveló sólo una discromía pálida de los riñones en los animales tratados con ASM8. Sin embargo, debido a la ausencia de alteraciones microscópicas corroborativas, de hallazgos de enfermedad clínica o de cambios de peso de los órganos, y al hecho de que la discromía no se observó después de 14 días de recuperación, este hallazgo se consideró de importancia biológica y toxicológica equívoca.

25

Las concentraciones de TOP004 y TOP005 en el plasma, así como de sus metabolitos proximales (n – 1), eran muy bajas en el plasma, en donde los grupos de dosis media y baja estaban por debajo del límite de cuantificación. Para el grupo de dosis alta (2,5 (mg/kg)/día), las concentraciones de TOP004 y TOP005 eran típicamente mayores bien en el momento de la toma de las primeras muestras de 0,5 horas después de la dosis, o bien en el punto de tiempo de 1 hora. En los puntos de tiempo más apartados de la dosis, la concentración media de TOP004 era similar a la de TOP005, figura 20A y figura 20B.

30

35

No había ninguna acumulación ni del componente oligonucleotídico (ni de sus metabolitos n – 1) en el plasma con la administración diaria repetida durante 14 días como se muestra en la figura 21A y en la figura 21B. No hubo diferencias de género claras en las concentraciones plasmáticas. Un porcentaje significativo del oligonucleótido en

- circulación estaba presente como el metabolito n – 1 proximal tanto para TOP004 como para TOP005, aunque el porcentaje tendió a ser ligeramente más bajo para TOP004. Para los dos oligonucleótidos y sus metabolitos n – 1, su eliminación del compartimento sanguíneo (plasma) resultó obvia durante el periodo de recogida de 24 horas. En el momento del sacrificio final (un día después de la última inhalación de la dosis de ASM8), se detectaron cantidades apreciables de los componentes oligonucleotídicos intactos de ASM8 (TOP004 y TOP005) en la tráquea de los animales con la dosis alta. Al final del periodo de recuperación de 14 días (día 29), las concentraciones de TOP004 y su metabolito n – 1 habían disminuido respecto al día 15 y la medida dio ligeramente por encima del límite de detección del ensayo. En cambio, ni TOP005 ni su metabolito eran cuantificables en el momento del sacrificio tras la recuperación. Estos resultados sugieren que TOP004 es más estable que TOP005 en los tejidos.
- En ningún órgano se observó ningún cambio microscópico relacionado con el tratamiento, salvo en las vías respiratorias. Todos los cambios observados en el vías respiratorias se estadificaron en el punto más bajo (mínimo) de una escala de 4 puntos. Los cambios que se observaron fueron para los pulmones e incluían: macrófagos alveolares espumosos en los animales con dosis de 0,22 o 2,5 (mg/kg)/día, inflamación granulocítica intraalveolar a 2,5 (mg/kg)/día, hemorragia focal en dos animales y metaplasia bronquiolar focal en un animal con una dosis de 2,5 (mg/kg)/día; para la cavidad nasal: erosión focal del epitelio escamoso del tabique nasal en 2 de los 6 animales con dosis de 2,5 (mg/kg)/día, acompañado de inflamación aguda y un exudado inflamatorio en un mono; y para los ganglios linfáticos bronquiales: macrófagos espumosos en los animales con dosis de 2,5 (mg/kg)/día. La gravedad de los cambios observados en los pulmones de los animales con dosis medias y altas fue menor y no estuvo acompañada por indicios de daño local ni de infiltración celular en el parénquima pulmonar. Las células inflamatorias eran escasas y se observaron sólo en un pequeño número de animales con dosis altas de ASM8 y la distribución de los cambios era coherente con la inhalación del material problema. Las hemorragias focales eran muy pequeñas y se interpretaron como que eran probablemente fortuitas. Los cambios descritos son, así pues, acordes por lo general con los mecanismos pulmonares normales asociados a la fagocitosis y a la eliminación del material problema inhalado. La retirada del tratamiento durante 14 días dio lugar a la presencia continua de unos pocos macrófagos alveolares espumosos sin ninguna inflamación en uno de los dos animales con dosis altas de ASM. Esta observación es coherente con la regresión gradual de las lesiones e indica que no había una alteración progresiva ni persistente del parénquima pulmonar.

- No había indicios de ningún efecto del tratamiento sobre los tejidos nasales después del periodo de recuperación de 14 días. Respecto a los hallazgos en los ganglios linfáticos bronquiales de los animales con dosis altas, los macrófagos espumosos en los senos medulares son coherentes con la eliminación del material problema por el drenaje linfático del pulmón. No había ningún indicio de lesiones en el parénquima, y los ganglios linfáticos no parecían estar en una situación reactiva.

- En conclusión, se toleró bien la inhalación de ASM8 durante 14 días consecutivos a las dosis que se estimaba que se alcanzó, de hasta 2,5 (mg/kg)/día, y no produjo ningún efecto sobre los parámetros de la masa corporal, el consumo de alimentos, el electrocardiograma, el peso de los órganos, la oftalmoscopia o la enfermedad clínica, y la prueba de la hipersensibilidad no reveló ningún efecto con la administración de ASM8. En los pulmones se observaron una serie de alteraciones histomorfológicas, la mayoría mínimas (0,22 y 2,5 (mg/kg)/día), así como en la cavidad nasal y en los ganglios linfáticos bronquiales (2,5 (mg/kg)/día). Tras 14 días de recuperación, se redujo la gravedad de estos cambios o incluso desaparecieron.

40 LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Topigen Pharmaceutique Inc.
- <120> Oligonucleótidos antisentido para tratar una enfermedad atópica y
- 45 <130> 13424-10PCT
- <140>
- <141>
- 50 <150> US 60/623,206
- <151> 29 de Octubre de 2004
- <160> 42
- 55 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 21

ES 2 450 929 T3

<212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <400> 1
 5 gttactactt ccacctgcct g 21

 <210> 2
 <211> 21
 <212> ADN
 10 <213> Homo sapiens

 <400> 2
 tggaaaagcg acacctacct g 21

 15 <210> 3
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 20 <400> 3
 cccttttct ggaaaagcga ca 22

 <210> 4
 <211> 21
 25 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <400> 4
 30 ctccctttc ctgaaaagc g 21

 <210> 5
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 35
 <400> 5
 tccacctccc ttttctgga 20

 <210> 6
 40 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <400> 6
 45 cctcctgtt ccacctcct t 21

 <210> 7
 <211> 21
 <212> ADN
 50 <213> Homo sapiens

 <400> 7
 acccattggc attgctcatt t 21
 <210> 8
 55 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <400> 8
 60 tccttgaat tagtgctgct t 21

 <210> 9
 <211> 21

<212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <400> 9
 5 tcgtgcagtt cttcttttc a 21

 <210> 10
 <211> 21
 <212> ADN
 10 <213> Homo sapiens

 <400> 10
 cagactagct tctcagttt g 21

 15 <210> 11
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 20 <400> 11
 tgctaattta gtgaagtct t 21

 <210> 12
 <211> 22
 25 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <400> 12
 cttctccctg aaaatctctt ct 22
 30
 <210> 13
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 35
 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (9)..(9)
 <223> n es 2,6-diaminopurina-2'-desoxirribósido
 40
 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (15)..(15)
 <223> n es 2,6-diaminopurina-2'-desoxirribósido
 45
 <400> 13
 gggctgcng cggngtgg 19

 <210> 14
 50 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <220>
 55 <221> característica miscelánea
 <222> (4)..(4)
 <223> n es 2,6-diaminopurina-2'-desoxirribósido

 <220>
 60 <221> característica miscelánea
 <222> (7)..(7)
 <223> n es 2,6-diaminopurina-2'-desoxirribósido

	<220>		
	<221>	característica miscelánea	
	<222>	(13)..(13)	
	<223>	n es 2,6-diaminopurina-2'-desoxirribósido	
5	<400>	14	
		gttctctctt ccnctgcct g	21
	<210>	15	
10	<211>	17	
	<212>	ADN	
	<213>	cebador	
	<400>	15	
15		atgggtctgg cccaggg	17
	<210>	16	
	<211>	18	
	<212>	ADN	
20	<213>	cebador	
	<400>	16	
		ccagggagat ggtgctgg	18
25	<210>	17	
	<211>	21	
	<212>	ADN	
	<213>	cebador	
30	<400>	17	
		ccgctttag accacctcaa c	21
	<210>	18	
	<211>	22	
35	<212>	ADN	
	<213>	cebador	
	<400>	18	
40		ccttgctga acagagacga tg	22
	<210>	19	
	<211>	21	
	<212>	ADN	
	<213>	cebador	
45	<400>	19	
		tgctctgta aaaagccgat g	21
	<210>	20	
50	<211>	21	
	<212>	ADN	
	<213>	cebador	
	<400>	20	
55		accaaaagtg acagtcctgg c	21
	<210>	21	
	<211>	22	
	<212>	ADN	
60	<213>	cebador	
	<400>	21	
		aagtcagggt ttgagggta tg	22
			33

<210> 22
 <211> 21
 <212> ADN
 5 <213> cebador

 <400> 22
 caagggggca gagacaggta g 21

 10 <210> 23
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> cebador

 15 <400> 23
 accacagtcc atgccatcac 20

 <210> 24
 <211> 21
 20 <212> ADN
 <213> cebador

 <400> 24
 tccaccaccc ctgtgctgt a 21
 25
 <210> 25
 <211> 150
 <212> ADN
 <213> Mono Cynomolgus
 30
 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (133)..(133)
 <223> n es a, c, g ó t
 35
 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (142)..(143)
 <223> n es a, c, g ó t
 40
 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (147)..(147)
 <223> n es a, c, g ó t
 45
 <400> 25
ggcagaagaa accatcccgc tgcrgaccct acgctgctac aatgactaca ccagccacat 60
cacctgcagg tgggcggaca cccaggatgc ccagcggcctt gtcaacgtga ccctcagtcg 120
ccgggtgaat gāngaccctc cnnagcnagt 150

 <210> 26
 50 <211> 150
 <212> ADN
 <213> Mono Cynomolgus

 <220>
 55 <221> característica miscelánea
 <222> (133)..(133)
 <223> n es a, c, g ó t

 <220>
 60 <221> característica miscelánea

<222> (142)..(142)
 <223> n es a, c, g ó t

<220>
 5 <221> característica miscelánea
 <222> (147)..(147)
 <223> n es a, c, g ó t

<400> 26
ggcagaagaa accatcccgc tgcrgaccct acgctgctac aatgactaca ccagccaca t 60
 10 **cacctgcagg tgggcggaca cccaggatgc ccagcggctt gtcaacgtga ccctcagtcg 120**
ccgggtgaat gangaccctc cncagcnagt 150

<210> 27
 <211> 150
 15 <212> ADN
 <213> Mono Cynomolgus

<220>
 <221> característica miscelánea
 20 <222> (142)..(143)
 <223> n es a, c, g ó t

<220>
 <221> característica miscelánea
 25 <222> (147)..(147)
 <223> n es a, c, g ó t

<400> 27
ggcagaagaa accatcccgc tgcrgaccct acgctgctac aatgactaca ccagccacat 60
cacctgcagg tgggcggaca cccaggatgc ccagcggctt gtcaacgtga ccctcagtcg 120
ccgggtgaat gaggaccctc cnnagcnagt 150

30 <210> 28
 <211> 150
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

35 <400> 28
ggcagaagaa accatcccgc tgcagaccct gcgctgctac aacgactaca ccagccacat 60
cacctgcagg tgggcagaca cccaggatgc ccagcggctc gtcaacgtga ccctcattcg 120
ccgggtgaat gaggacctcc tggagccagt 150

40 <210> 29
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

45 <400> 29
 ctgggccatc agtgctctg 19

<210> 30
 <211> 18
 <212> ADN
 50 <213> Homo sapiens

<400> 30
 cagagcactg atggcca 18

55 <210> 31

ES 2 450 929 T3

<211> 19
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5 <400> 31
 cgtggcactc agtgcctg 19

<210> 32
 <211> 21
 10 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 32
 ccttgacct gccaatgctc t 21

15 <210> 33
 <211> 132
 <212> ADN
 <213> Chimpancé

20 <400> 33
ctTgtcagaa accatcccgc tgcagaccct gcgctgctac aacgactaca ccagccacat 60
caCctgcagg tgggcagaca cccaggatgc ccagcggctc gtcaacgtga ccctcattcg 120
ccgggtgaat ga 132

<210> 34
 25 <211> 132
 <212> ADN
 <213> Cerdo

<400> 34
ctCagaggac accgtcccgc tgcagaccct gcgctgctac aatgactaca ccagccgcat 60
cgTgtgcagc tgggcggcgg aggcggccgc tgagcagctc atcaatgtga ccctccatcg 120
ccatcgcagg tt 132

<210> 35
 <211> 132
 <212> ADN
 35 <213> Rata

<400> 35
ggCagaagaa actgtccctc tgaagactct gcagtgtac aacgactata tcgagcgcac 60
caTctgcagc tgggccgaca cggaggacgc ccaggggctc gttaacctga ccctctatca 120
ctggctagac aa 132

<210> 36
 <211> 132
 <212> ADN
 <213> Ratón

45 <400> 36
ggCagaagaa acgggccctc tgaagactct gcagtgtac aatgactaca ccaaccacat 60
caTctgcagc tgggcggaca cagaggatgc ccaggggcta atcaacatga ccctctatca 120
ccagctagag aa 132

<210> 37
 50 <211> 12
 <212> PRT

<213> Mono Cynomolgus

<220>

<221> característica miscelánea

5 <222> (8)..(8)

<223> Xaa es Gln o Arg

<400> 37

Ala Glu Glu Thr Ile Pro Leu Xaa Thr Leu Arg Cys
1 5 10

10

<210> 38

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15

<400> 38

Ala Glu Glu Thr Ile Pro Leu Gln Thr Leu Arg Cys
1 5 10

20

<210> 39

<211> 12

<212> PRT

<213> Chimpancé

<400> 39

Leu Ser Glu Thr Ile Pro Leu Gln Thr Leu Arg Cys
1 5 10

25

<210> 40

<211> 12

<212> PRT

30

<213> Cerdo

<400> 40

Ser Glu Asp Thr Val Pro Leu Gln Thr Leu Arg Cys
1 5 10

35

<210> 41

<211> 12

<212> PRT

<213> Ratón

40

<400> 41

Ala Glu Glu Thr Val Pro Leu Lys Thr Leu Gln Cys
1 5 10

45

<210> 42

<211> 12

<212> PRT

<213> Rata

<400> 42

Ala Glu Glu Thr Val Pro Leu Lys Thr Leu Gln Cys
1 5 10

50

REIVINDICACIONES

1. Utilización de al menos dos oligonucleótidos antisentido que tienen secuencias que comprenden la SEQ ID n.º 13 y la SEQ ID n.º 14, respectivamente, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de al menos una de asma, alergia, hipereosinofilia e inflamación general.
- 5 2. Utilización de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el medicamento se utiliza para tratar y/o prevenir el asma.
3. Utilización de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el medicamento se utiliza para tratar y/o prevenir la alergia.
- 10 4. Utilización de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el medicamento se utiliza para tratar y/o prevenir la hipereosinofilia.
5. Utilización de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el medicamento se utiliza para tratar y/o prevenir la inflamación general.
- 15 6. Composición farmacéutica que comprende al menos dos oligonucleótidos antisentido que tienen las secuencias que comprenden la SEQ ID n.º 13 y la SEQ ID n.º 14, respectivamente, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
7. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la composición farmacéutica es tópica.
8. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, en donde la composición farmacéutica es para ser usada en el tratamiento y/o la prevención del asma.
- 20 9. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, en donde la composición farmacéutica es para ser usada en el tratamiento y/o la prevención de la alergia.
10. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, en donde la composición farmacéutica es para ser usada en el tratamiento y/o la prevención de la hipereosinofilia.
- 25 11. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, en donde la composición farmacéutica es para ser usada en el tratamiento y/o la prevención de la inflamación general.
12. Composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11, en donde los al menos dos oligonucleótidos consisten en las SEQ ID n.º 13 y 14, respectivamente.
13. Utilización de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde los al menos dos oligonucleótidos consisten en las SEQ ID n.º 13 y 14, respectivamente.

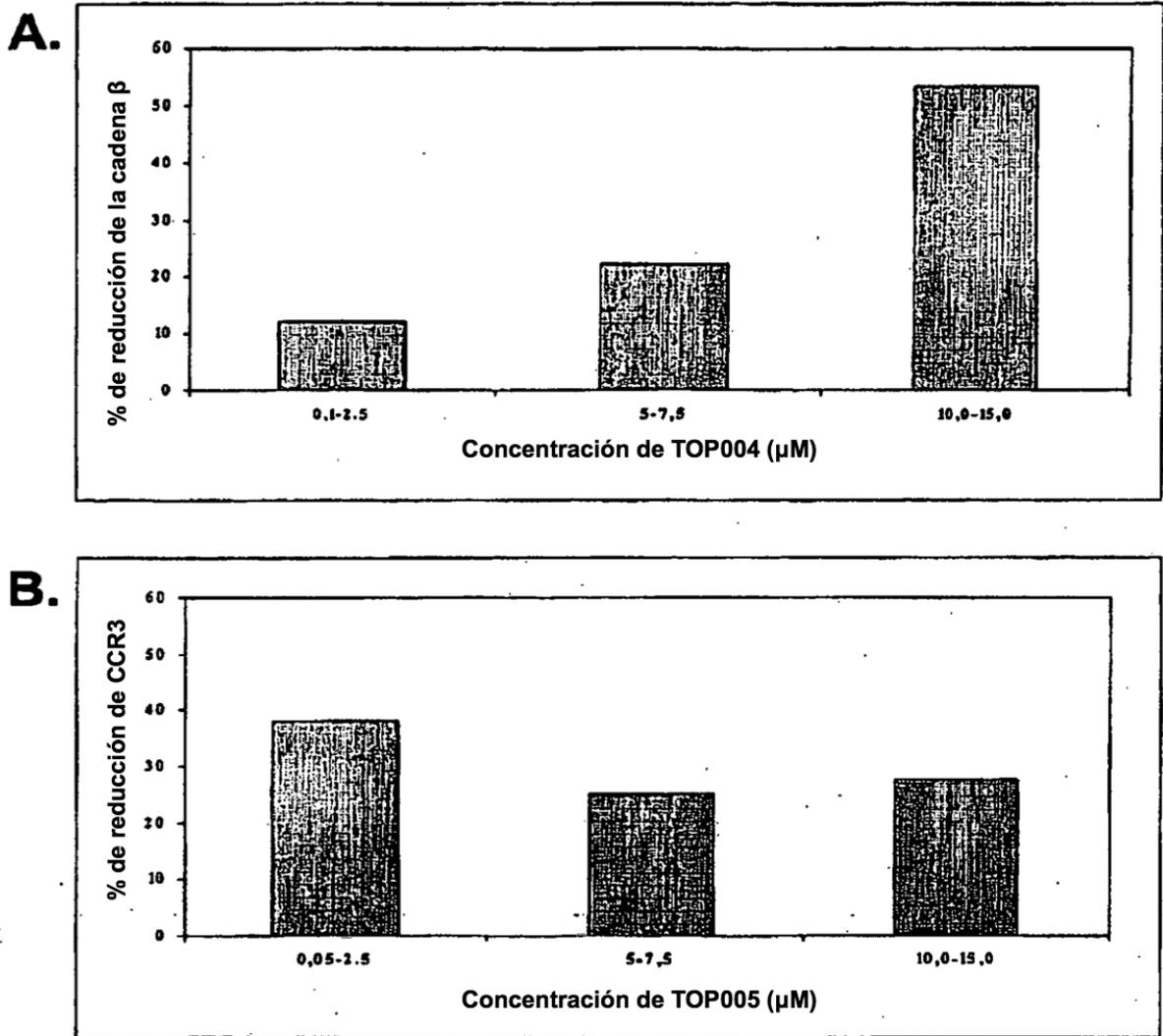
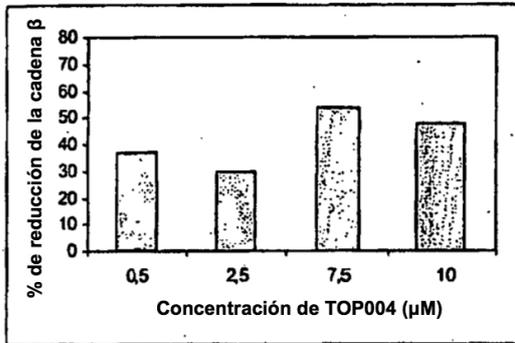


Figura 2

A.



B.

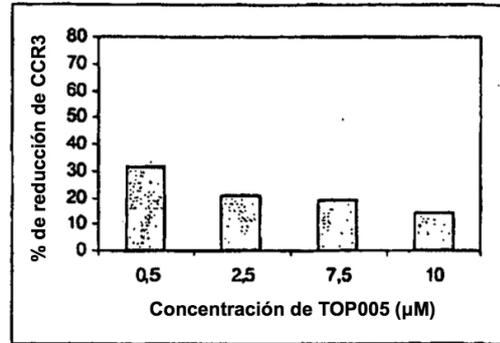


Figura 3

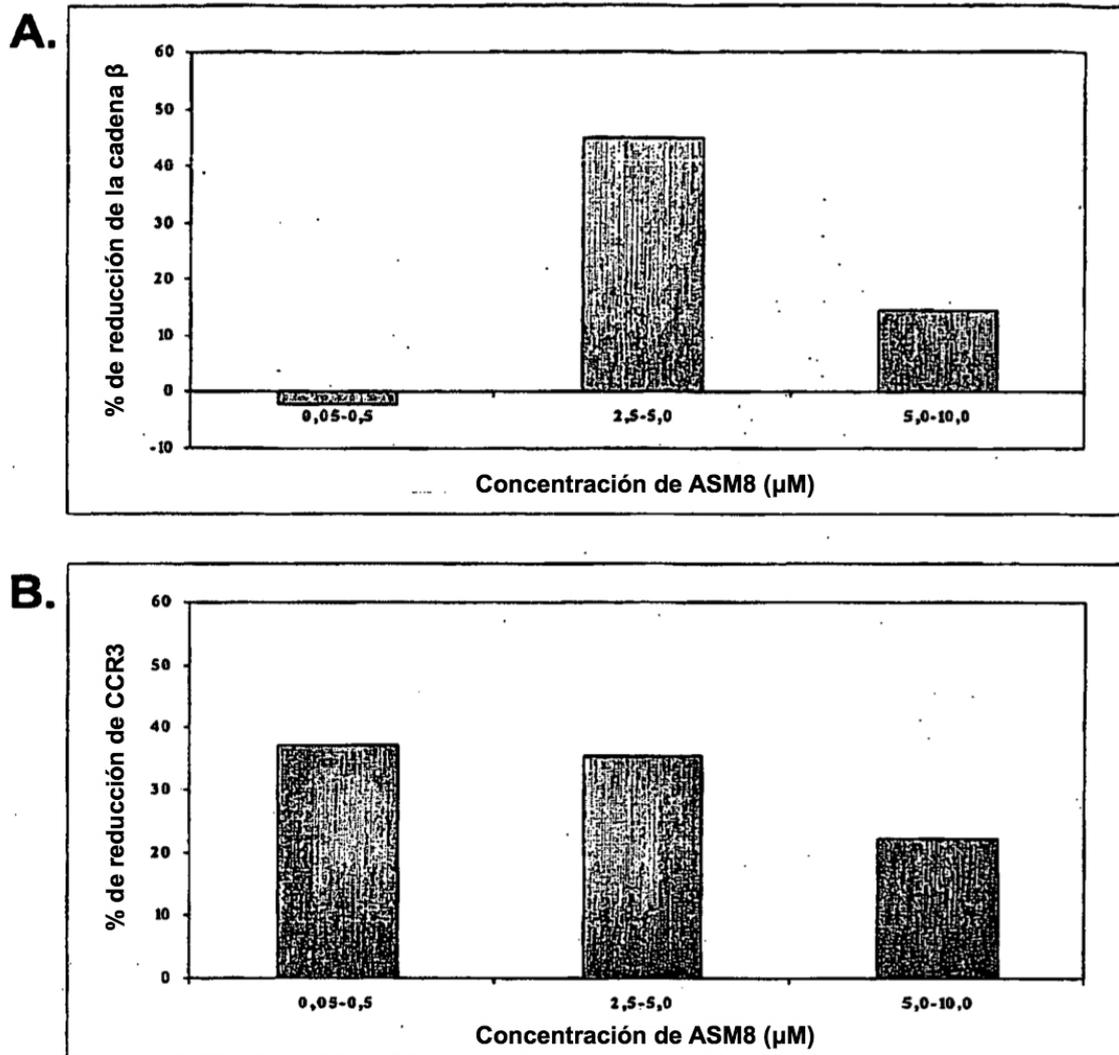


Figura 4

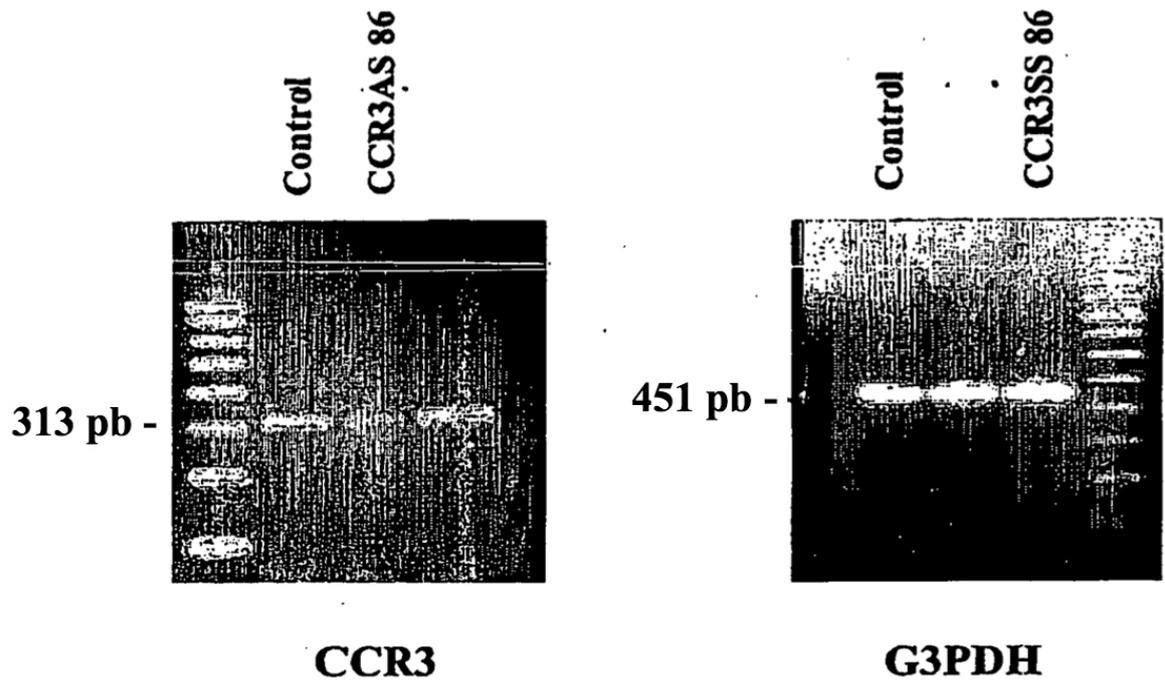


Figura 5

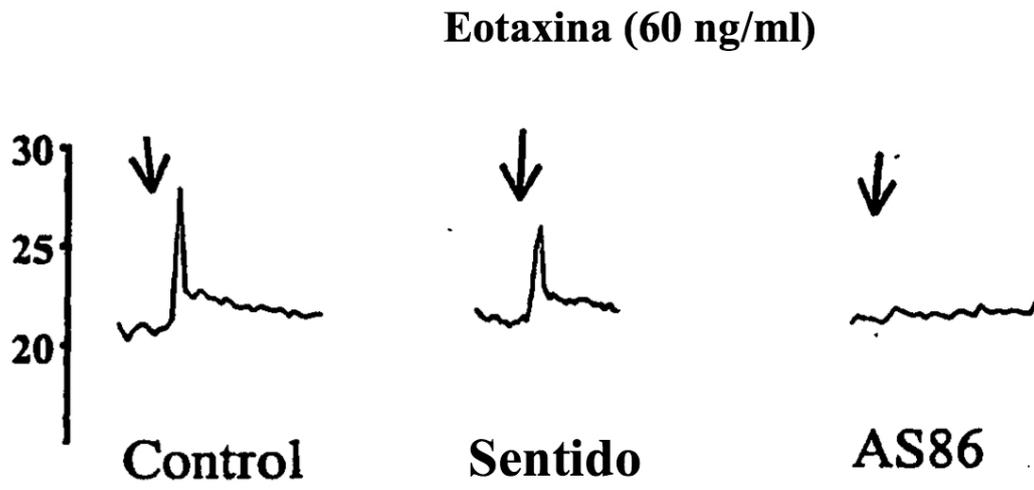


Figura 6

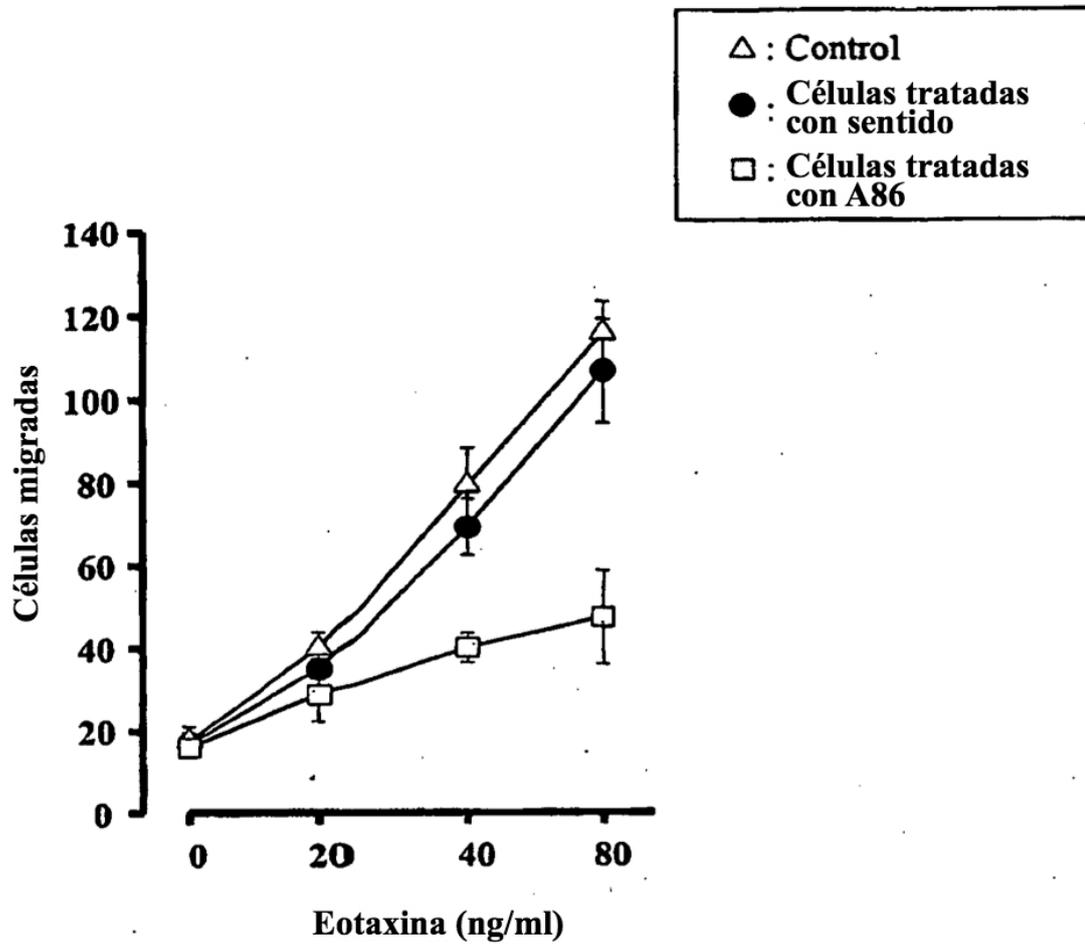


Figura 7

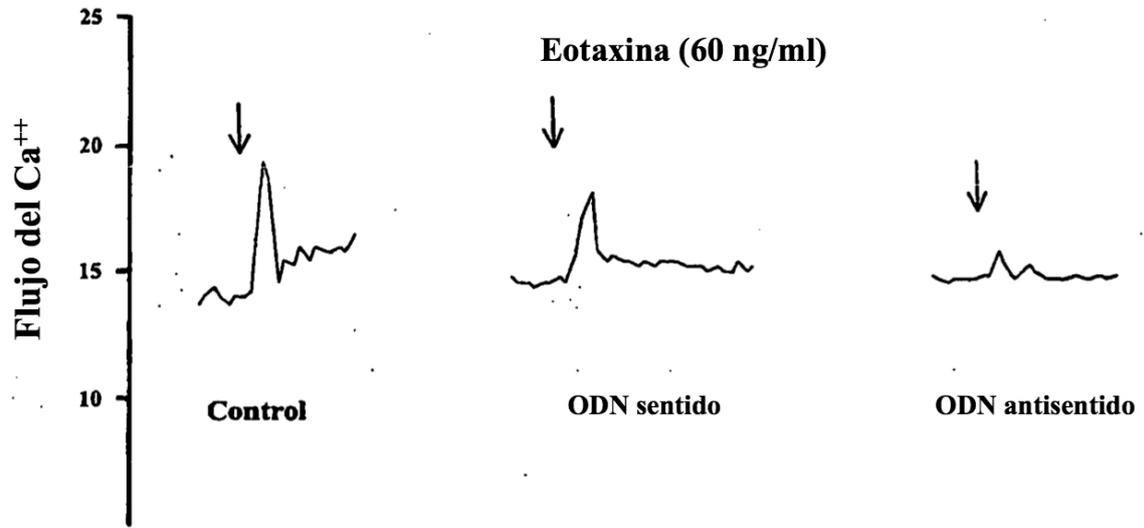


Figura 8

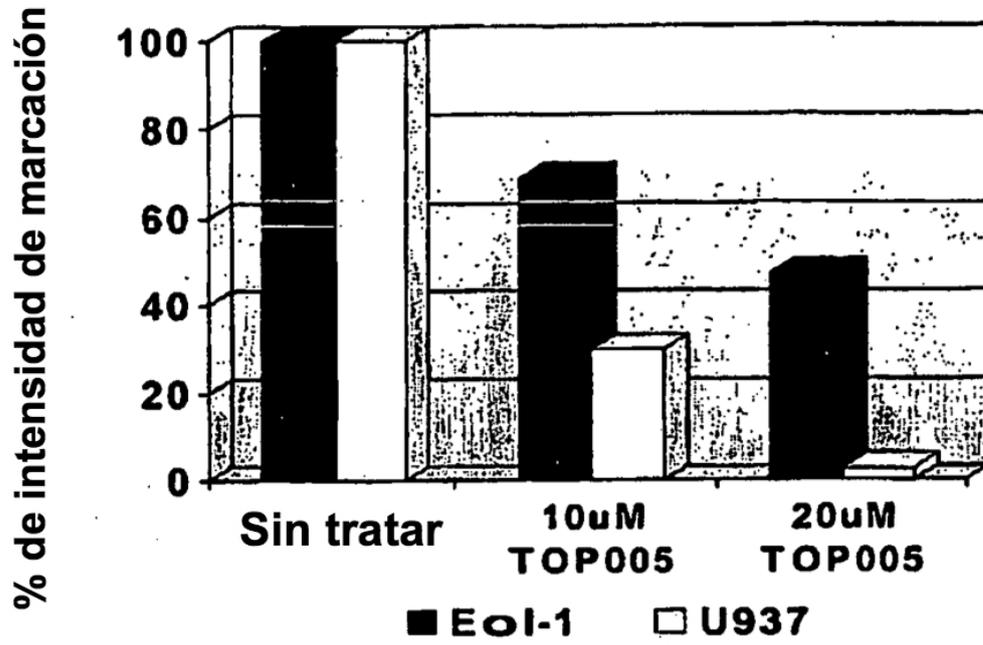


Figura 9

Figura 10A

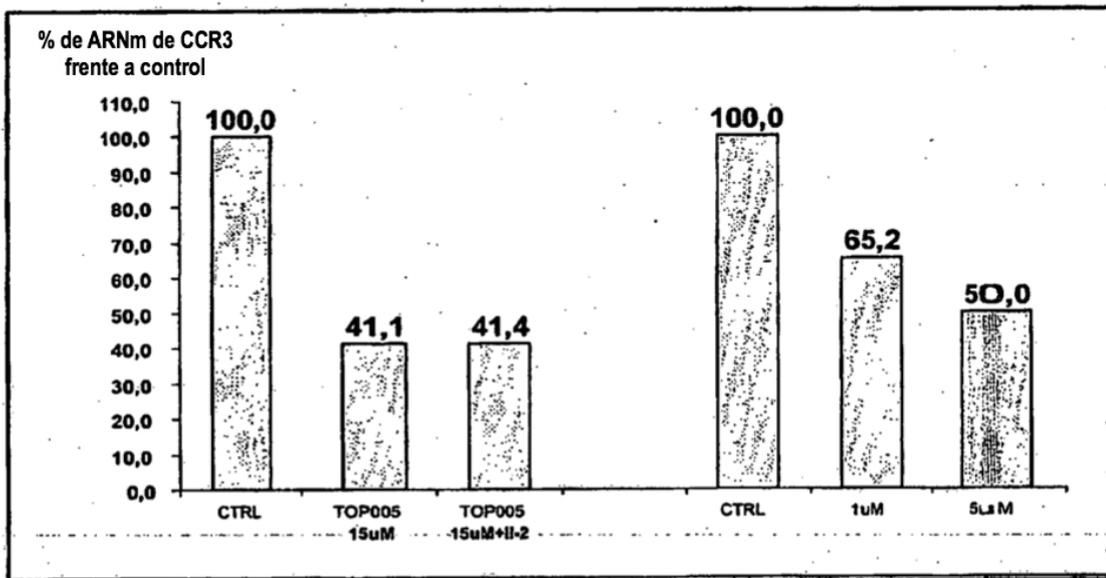
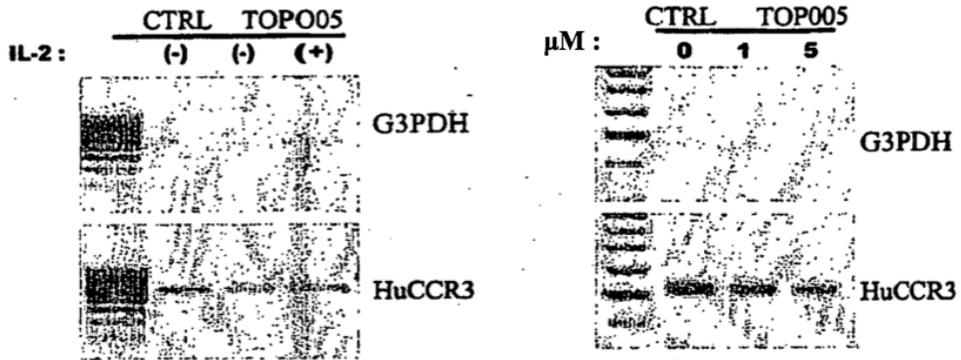


Figura 10B

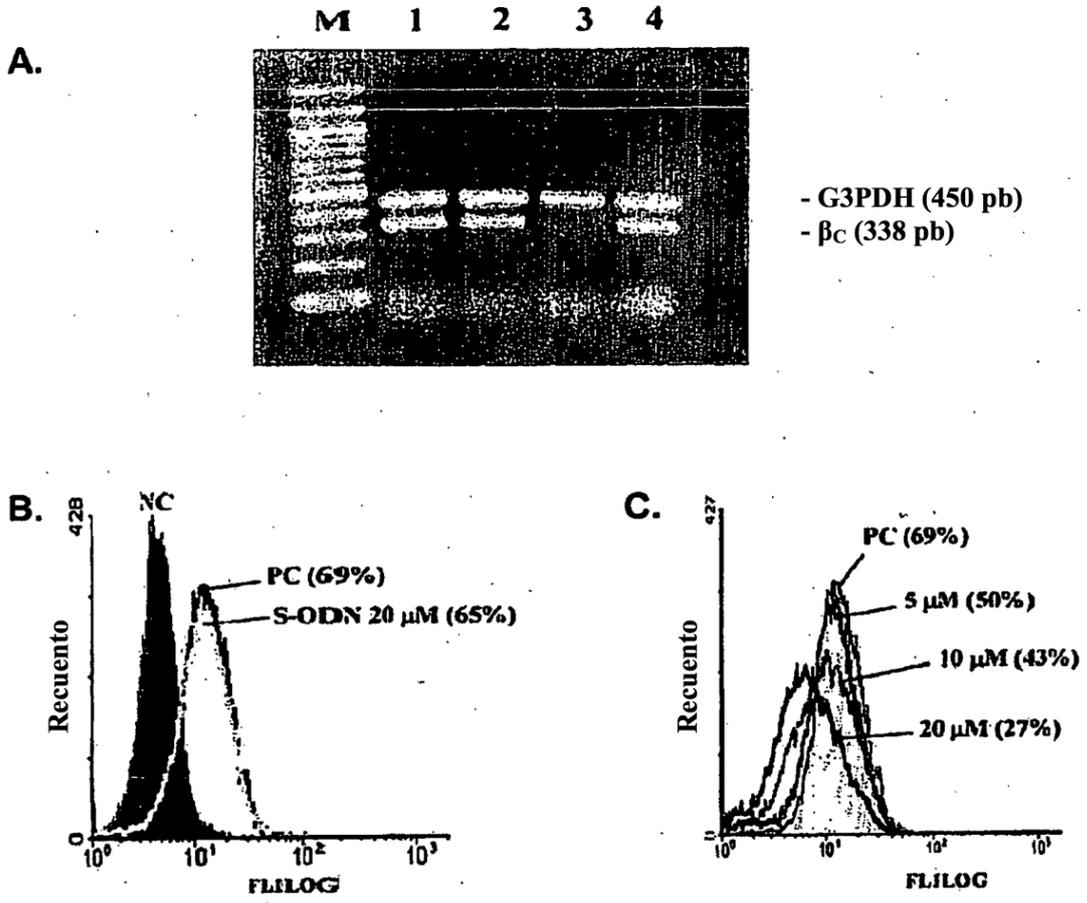


Figura 11

D.

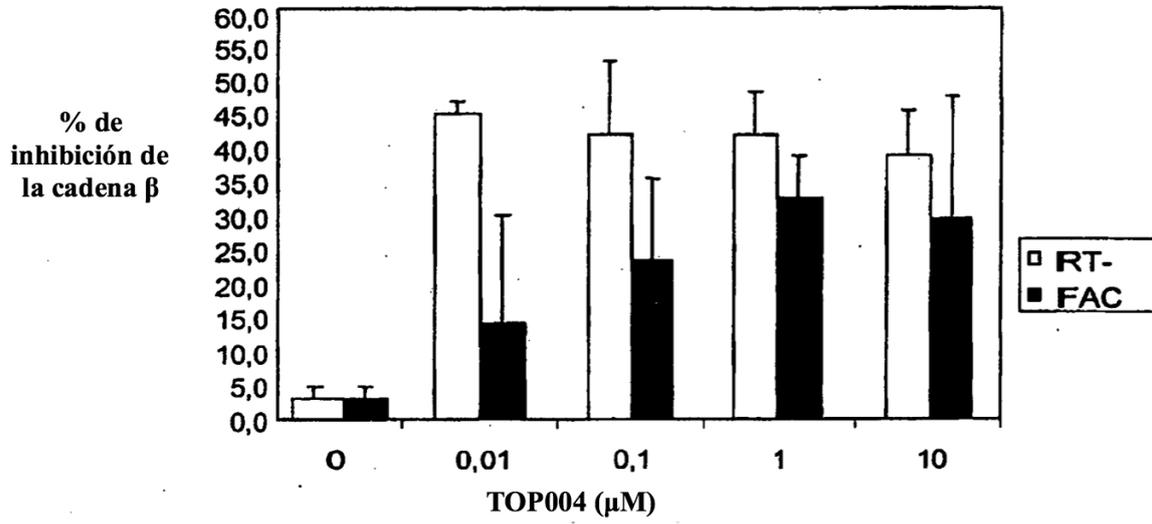


Figura 11

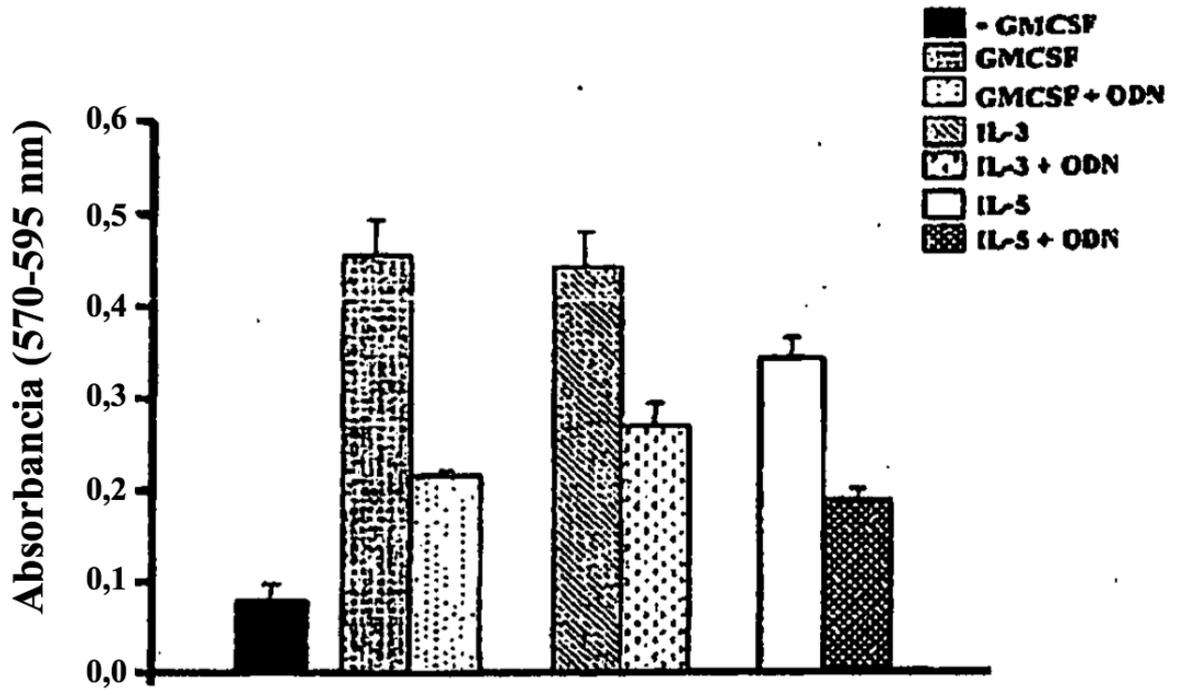


Figura 12

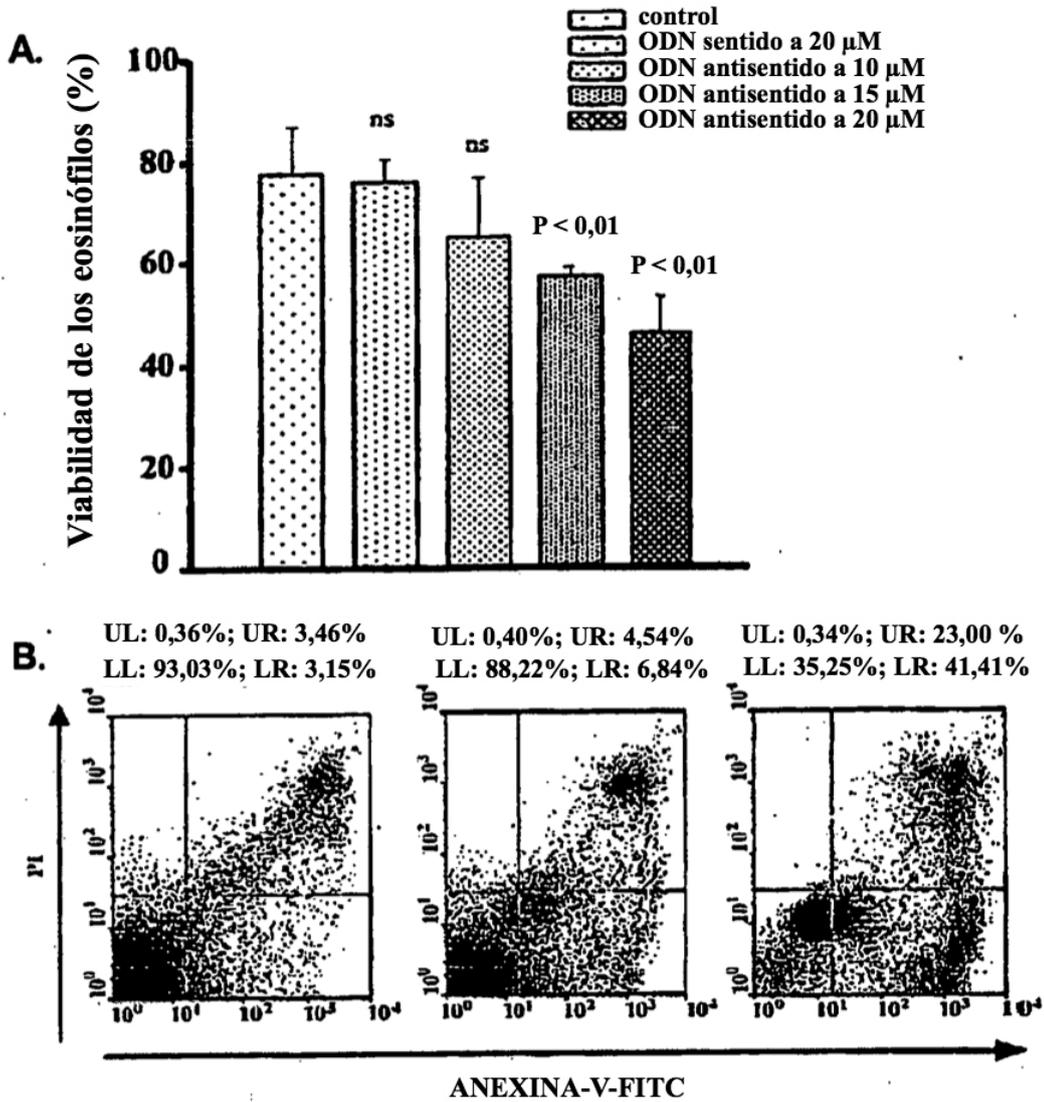


Figura 13

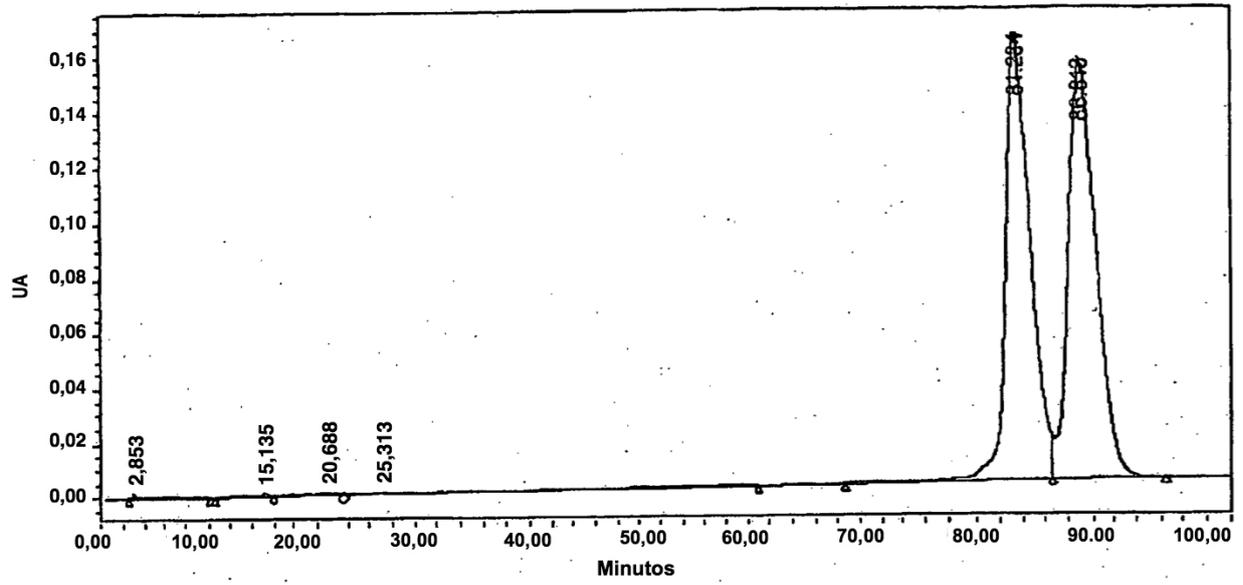


Figura 14

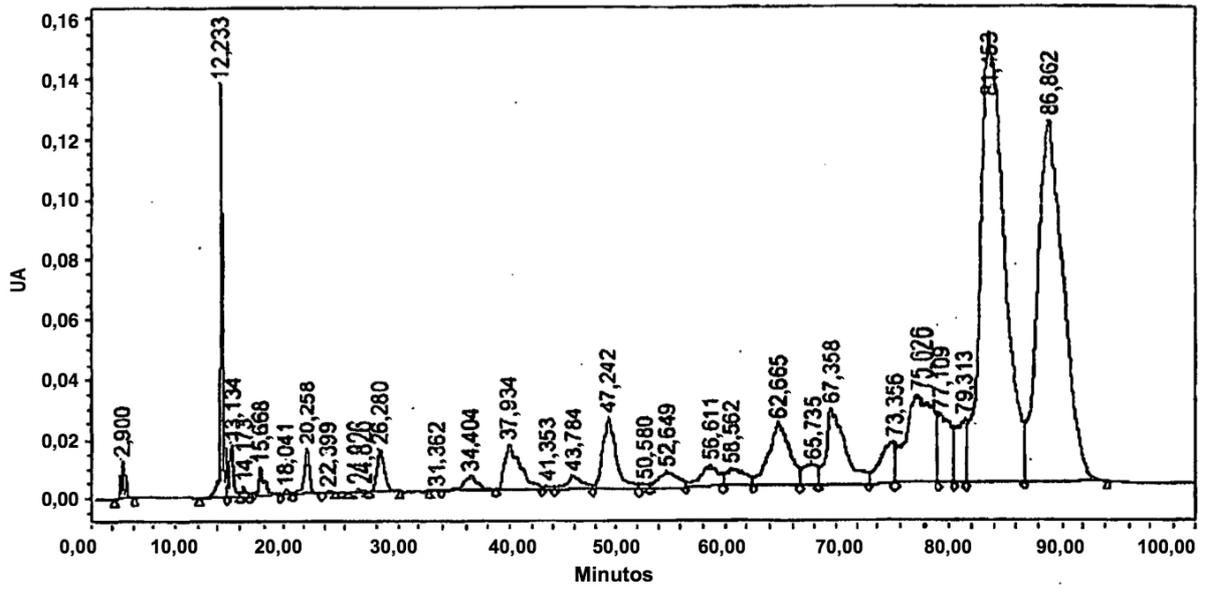


Figura 15

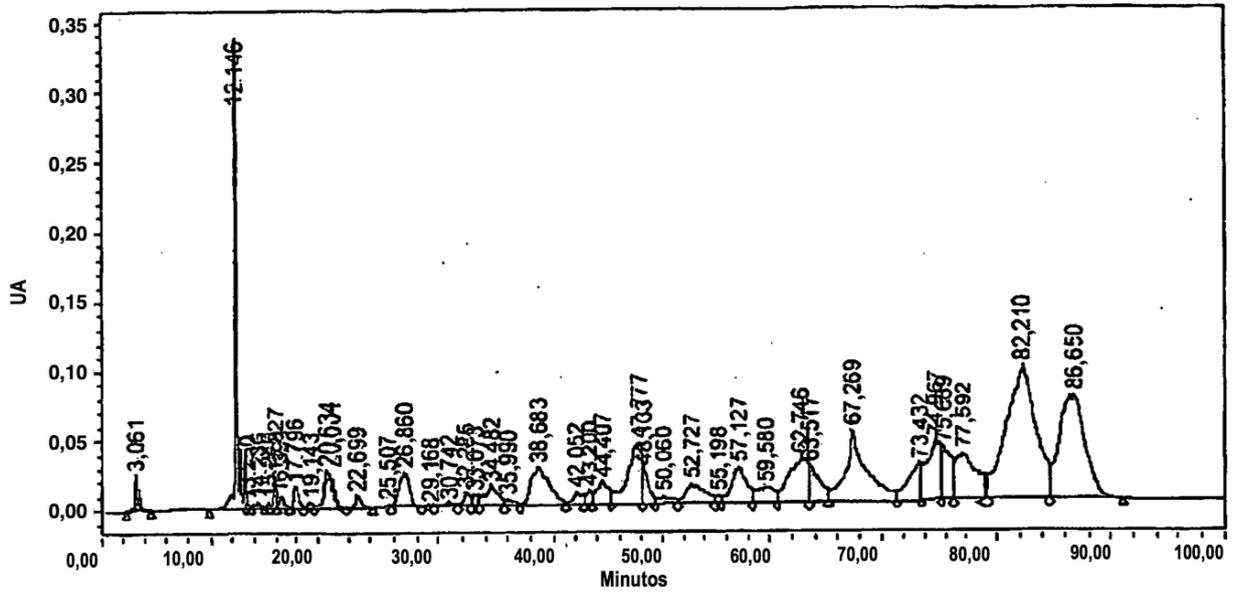


Figura 16

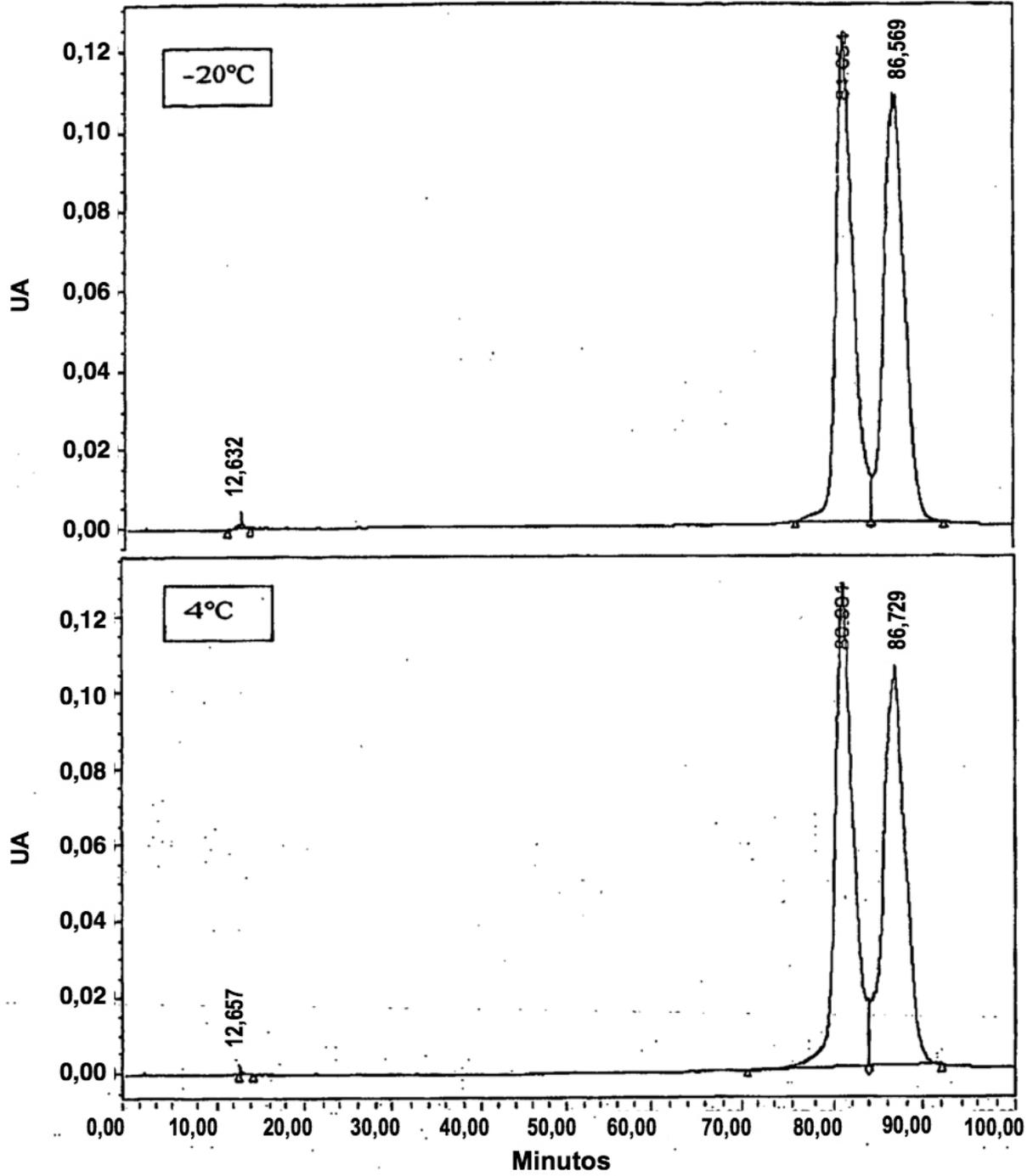


Figura 17A1

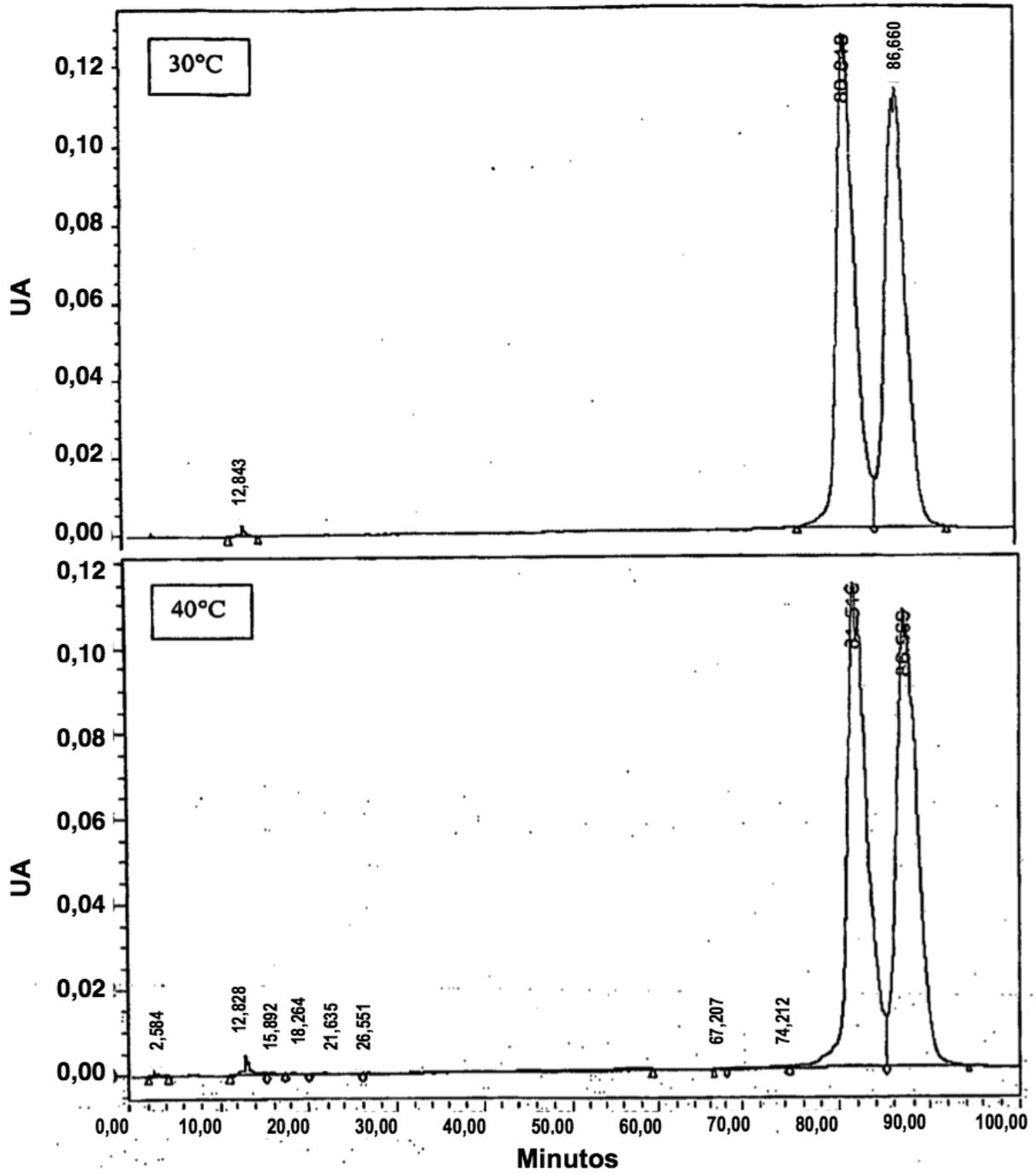


Figura 17A2

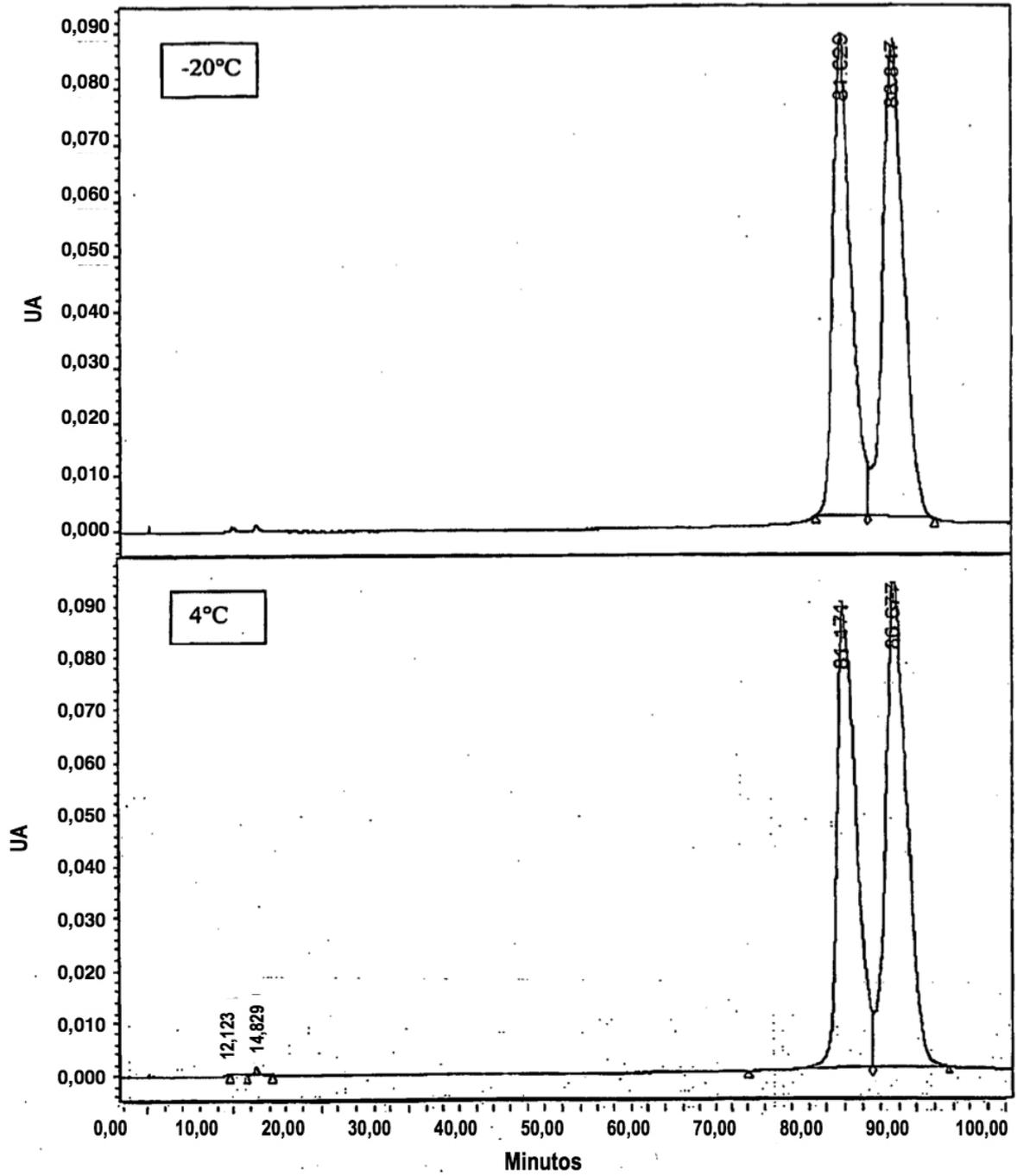


Figura 17B1

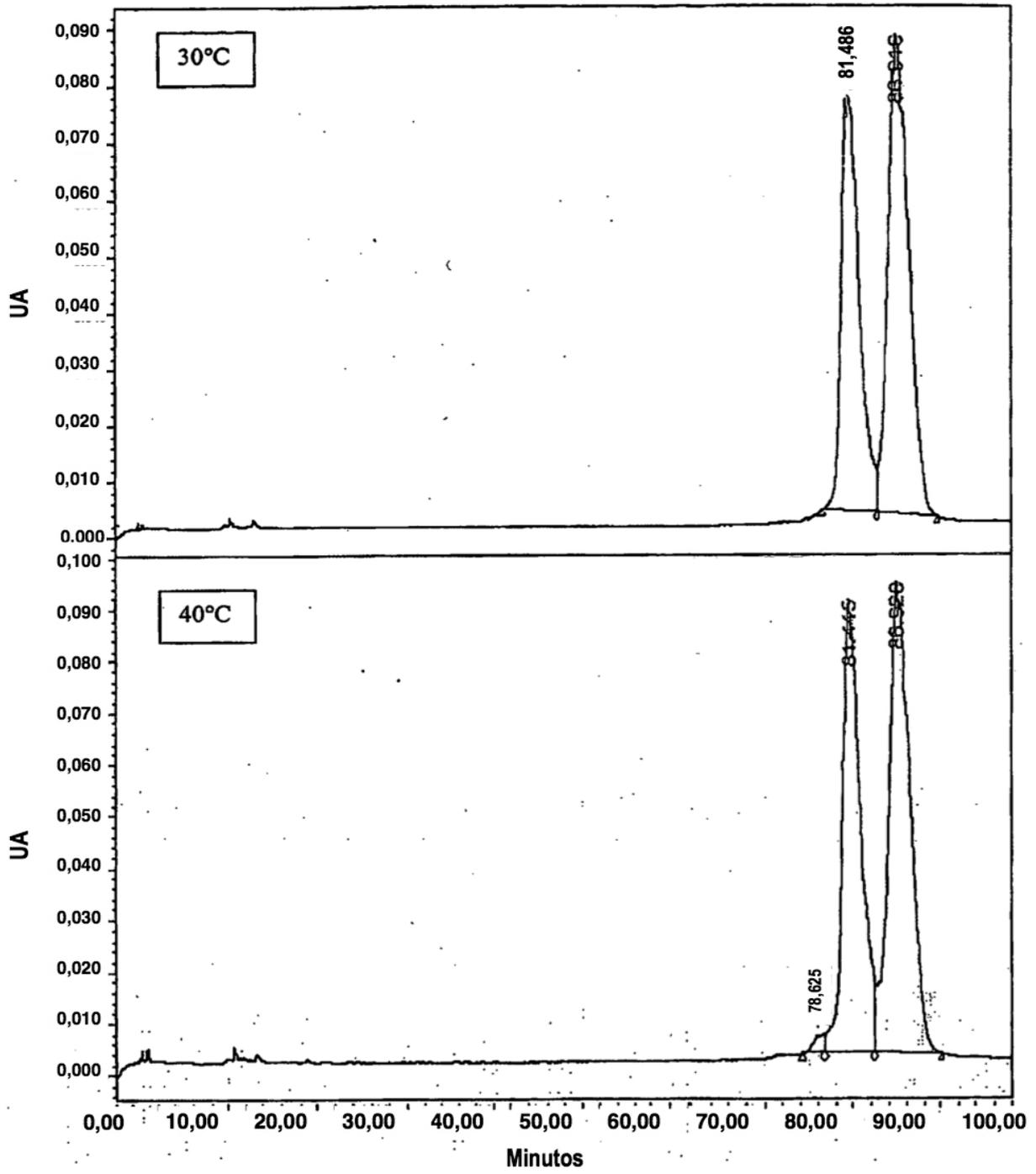


Figura 17B2

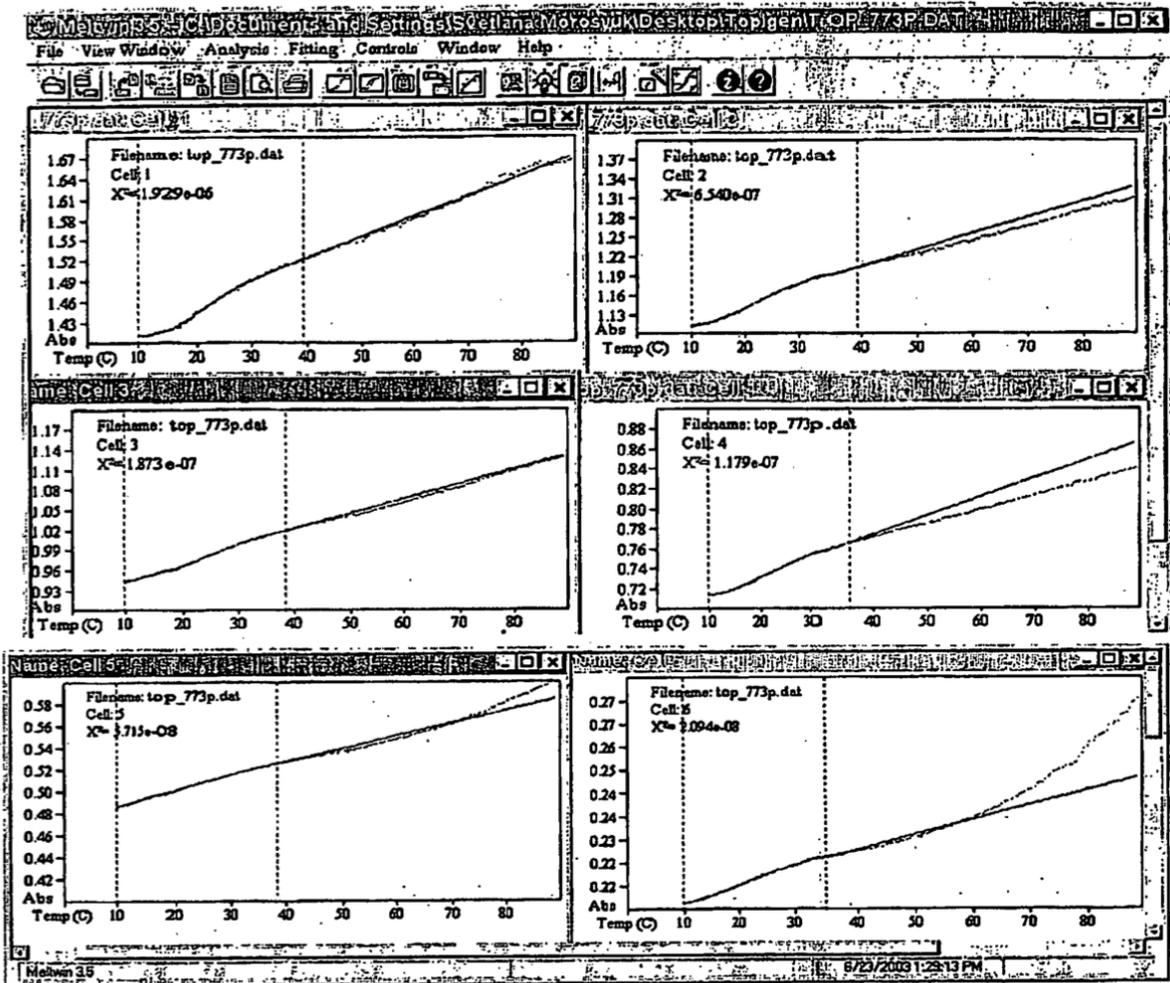


Figura 18

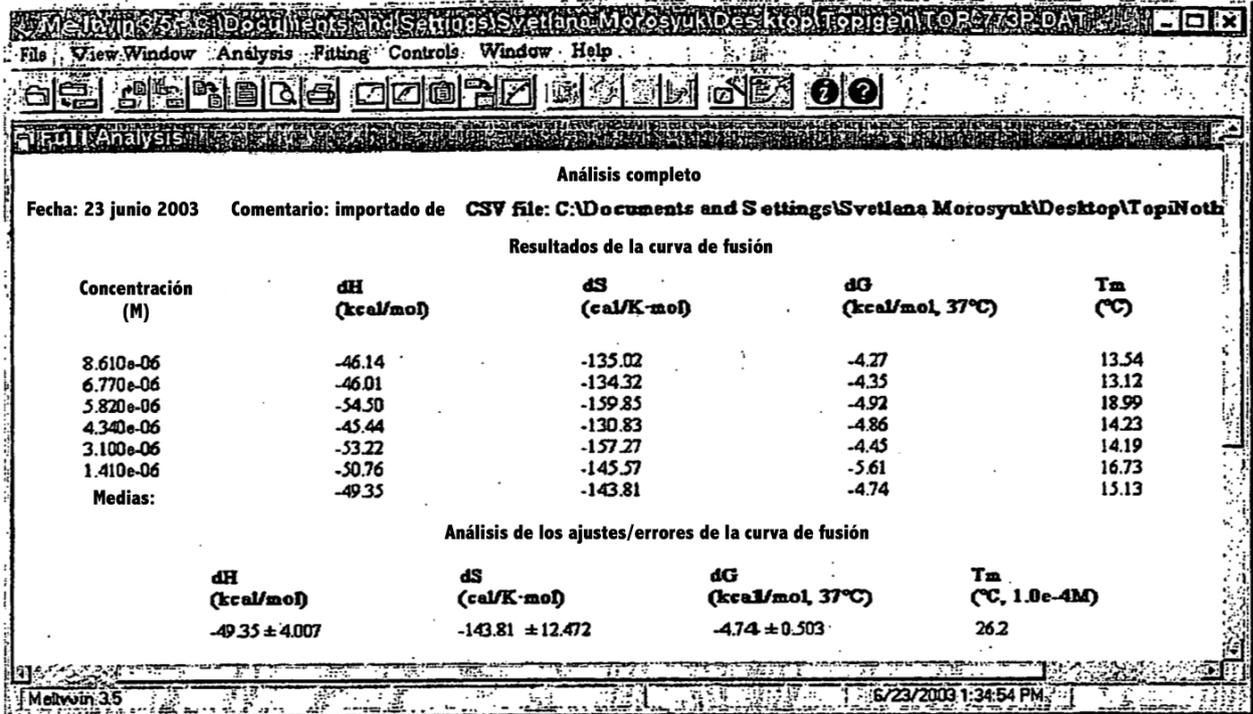


Figura 19

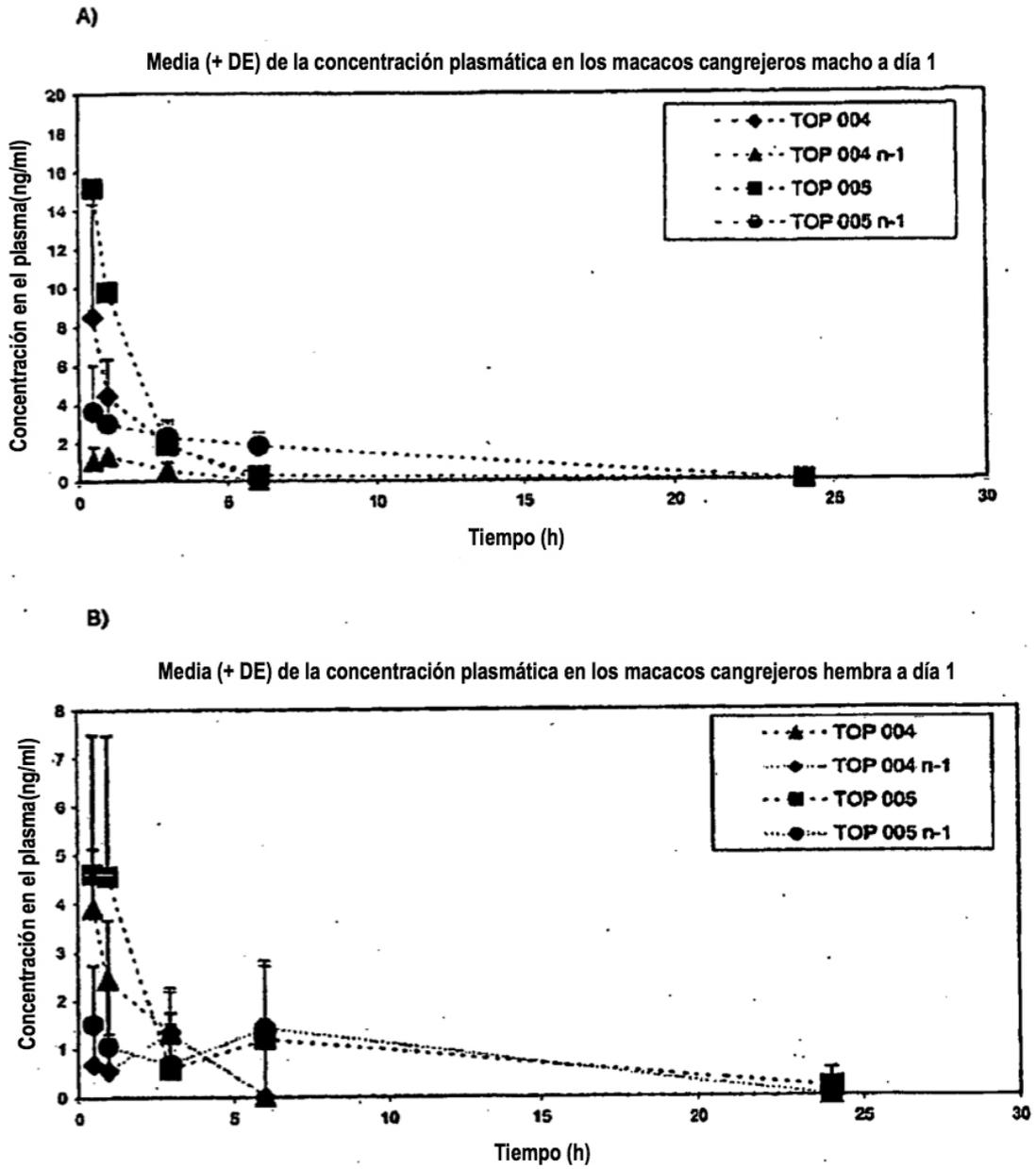
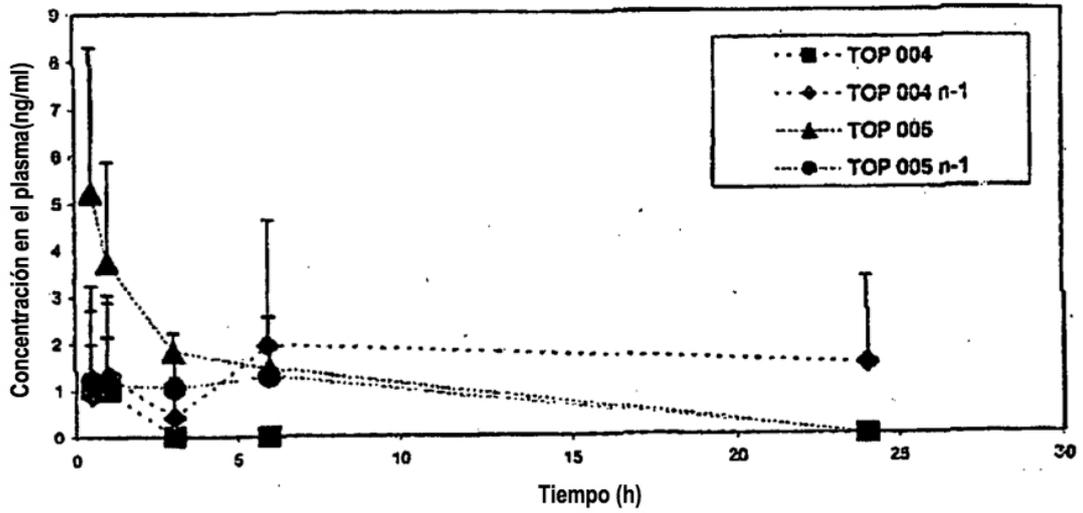


Figura 20

A)

Media (+ DE) de la concentración plasmática en los macacos cangrejeros macho a día 14



B)

Media (+ DE) de la concentración plasmática en los macacos cangrejeros hembra a día 14

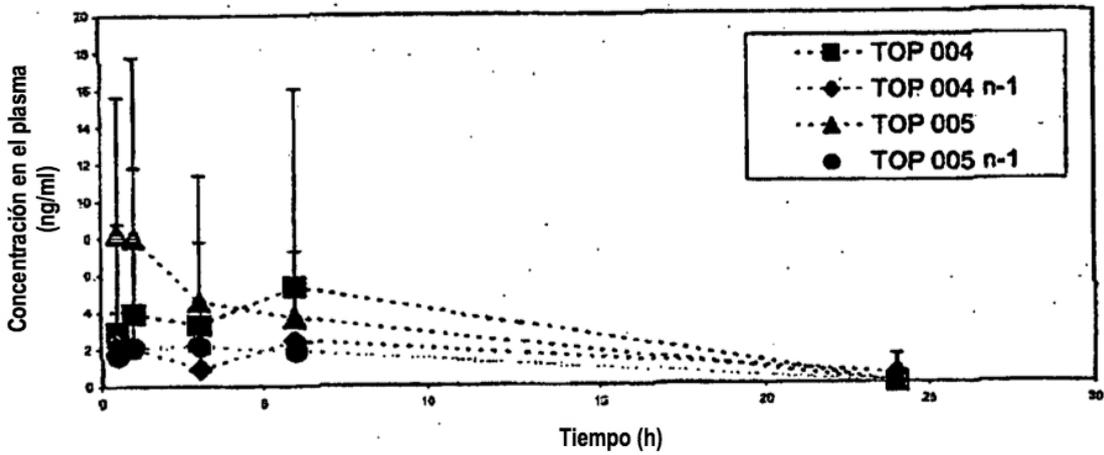


Figura 21